

Berl Münch Tierärztl Wochenschr
DOI 10.2376/0005-9366-18033

© 2018 Schlütersche
Verlagsgesellschaft mbH & Co. KG
ISSN 0005-9366

Korrespondenzadresse:
petra.reinhold@fli.de

Eingegangen: 12.03.2018
Angenommen: 23.05.2018

Online first: 28.6.2018
<http://vetline.de/facharchiv/158/3222>

Zusammenfassung

Summary

U.S. Copyright Clearance Center
Code Statement:
0005-9366/2018/18033 \$ 15.00/0

Übersichtsarbeit

Institut für molekulare Pathogenese im Friedrich-Loeffler-Institut (Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit), Standort Jena

Versuchstierkunde bei Nutztieren: Einblicke in Modelle für respiratorische Erkrankungen und Infektionen

Animal science in livestock: Insights in models of respiratory diseases and infections

Petra Reinhold, Heike Köhler, Elisabeth Liebler-Tenorio

Sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin stellen Atemwegs- und Lungenerkrankungen bedeutsame gesundheitliche Probleme dar. Mit Fokussierung auf das respiratorische System werden in der Grundlagenforschung wie auch in der translationalen und klinischen Forschung Tiermodelle eingesetzt, wobei das Spektrum der Tierarten auch Schweine, Schafe, Rinder und selbst Pferde einschließt. Unter Beachtung genetisch determinierter tierartlicher Besonderheiten in Struktur und Funktion des respiratorischen Systems sowie markanter Spezies-Unterschiede bezüglich wirtsspezifischer Abwehrmechanismen gilt für die Etablierung von biologisch relevanten Tiermodellen der Grundsatz: ‚So wenig artifiziert wie nötig und so nah an der Realität wie möglich‘. Respiratorische Infektionen oder nichtinfektiöse pulmonale Erkrankungen bei Tieren, denen eine ähnliche Pathophysiologie zugrunde liegt wie der vergleichbaren Affektion beim Menschen, stellen natürliche Modelle dar, die disziplinübergreifend zum Erkenntnisgewinn für Mensch und Tier beitragen können. Mit der Verfügbarkeit genetisch modifizierter Nutztiere bereichern auch transgene Modelle, z. B. das porcine Modell für zystische Fibrose, die moderne pneumologische Forschung. Experimentelle Expositionen des Respirationstraktes beziehen sich oft auf Pathogene, wobei insbesondere bei respiratorischen Infektionen mit zoonotischem Potenzial deutliche Schnittmengen zwischen humanmedizinischen und veterinärmedizinischen Fragestellungen existieren. Unabhängig von der Tierart umfasst die Charakterisierung eines respiratorisch fokussierten Modells am lebenden Tier ein klinisches Scoring, die Quantifizierung pulmonaler Dysfunktionen (Lungenfunktionsdiagnostik, Blutgasanalyse) und die Darstellung struktureller Veränderungen (bildgebende Verfahren). Die Implementierung von innovativen nicht-invasiven diagnostischen Methoden (z. B. Analyse exhalierter Biomarker) trägt im Sinne des Tierschutzes und 3R-Konzeptes zum Refinement eines jeden Tiermodells bei und befördert zugleich den Wissenschaftstransfer zwischen Human- und Veterinärmedizin. Am Versuchsende steht in der Regel die Sektion der Versuchstiere. Durch eine qualifizierte pathologische Untersuchung lassen sich Läsionen im Respirationstrakt beurteilen und quantifizieren. Die Gewinnung von Probenmaterial aus dem Respirationstrakt lebender Tiere (Tupfer, Abstriche, Spülproben, Biopate, Exhalat) sowie von Gewebeproben bei der Sektion erlauben weiterführende Untersuchungen zur Pathogenese bzw. zu Erreger-Wirt-Interaktionen.

Schlüsselwörter: experimentelle Pneumologie, Großtiermodelle, respiratorische Tiermodelle

Airway and lung diseases affect humans and animals. Consequently, models focusing on the respiratory system are indispensable in basic and translational research. Although rodent models are still dominating, livestock or domestic species (pigs, sheep, bovines, and horses) are also included in experimental pneumology being advantageous for within-subject assessments of functional, inflammatory and morphological changes in long-term studies. Species-specific peculiarities in structure and function of the respiratory system as well as in host response mechanisms must be taken into account when introducing animal models of biological relevance. Respiratory infections or pulmonary diseases

in livestock presenting significant pathophysiological similarities compared to human diseases are natural models that may contribute to scientific progress in both human and veterinary medicine. With the availability of genetically modified farm animal species, transgene disease models become available as well; one excellent example is the porcine model of cystic fibrosis. Experimental challenges of the respiratory system are often focused on pathogens. In this context, particularly zoonotic infections are relevant for interdisciplinary research between human and veterinary medicine. A profound *in vivo* characterization of each respiratory model (regardless of the animal species chosen) includes clinical scoring, evaluation of pulmonary dysfunctions (blood gases, lung function testing) and visualization of the changes induced (imaging techniques). Implementation of innovative non-invasive diagnostic methods (i.e., assessment of exhaled biomarkers) improves animal welfare, contributes markedly to refine any model (3R-concept), and advances knowledge transfer between human and veterinary medicine. At necropsy, pulmonary lesions need to be characterized and quantified by a profound pathological examination. Different samples from the respiratory tract (swabs, smears, lavage samples, biopsies, exhaled breath) and tissue samples assessed at necropsy are indispensable for further investigations towards pathogenesis or pathogen-host interactions.

Keywords: experimental pulmonology, large animal models, respiratory models

Einleitung

Respiratorische Erkrankungen sind für Mensch und Tier gleichermaßen bedeutsam.

In der Humanmedizin gehören u. a. chronische Atemwegsentzündungen wie Asthma bronchiale und COPD (chronic obstructive pulmonary disease), die Mukoviszidose bzw. zystische Fibrose (CF), die pulmonale Hypertonie (PH) sowie Schlaf-assoziierte Störungen der Atmung und diverse onkologische Probleme zu den seit Jahren intensiv beforschten nicht-infektiösen Erkrankungen der Lunge. Die infektiologische Forschung in der humanmedizinischen Pneumologie konzentriert sich schwerpunktmäßig auf neue Therapiestrategien gegen *Streptococcus pneumoniae* als den häufigsten Erreger der CAP (community-acquired pneumonia) und auf *Pseudomonas aeruginosa*, der zu den typischen bei HAP (hospital-acquired pneumonia) zu detektierenden Pathogenen gehört (Bonniaud et al. 2018). Weitere für den Menschen relevante bakterielle Pneumonie-Erreger sind u. a. *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella* spp., *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella* spp. und *Escherichia coli*. Von viralen Erregern werden gegenwärtig Influenzaviren und RSV (respiratory syncytial virus) und von den Pilzen *Candida* spp. und *Aspergillus* spp. als bedeutsame Pneumonie-Erreger eingeordnet. Bei immungeschwächten Patienten können Pneumonien zusätzlich durch *Mycobacteria* spp., *Pneumocystis jirovecii*, *Nocardia* spp., *Rhodococcus* spp. oder andere fakultative Pathogene induziert werden. Für die meisten der o. g. Themengebiete werden forschungsseitig Tiermodelle eingesetzt, die überwiegend in der Tierart Maus etabliert wurden (Bonniaud et al. 2018).

Auch in der Veterinärmedizin gehören Atemwegs- und Lungenerkrankungen zu den bedeutendsten Problemen in der tierärztlichen Praxis und stellen somit nach wie vor aktuelle Forschungsschwerpunkte dar. Auf Heim- und Hobbytiere soll an dieser Stelle nicht umfänglich eingegangen werden, jedoch ist zu erwähnen, dass chronisch-obstruktive Entzündungen der Atemwege zahlreiche Spezies betreffen, so z. B. Pferde (‘equine asthma’), Katzen (‘feline asthma’) oder Hunde. In der Nutztier-

praxis konzentrieren sich die Aufgabenstellungen seit Jahrzehnten auf das Verständnis, die Prophylaxe und die Therapie der multifaktoriell bedingten und ökonomisch bedeutsamen respiratorischen Erkrankungen bei Schweinen, Kälbern und Jungrindern (porcine respiratory disease complex, PRDC bzw. bovine respiratory disease complex, BRDC). Diesen Erkrankungskomplexen liegen pathophysiologische Interaktionen zwischen haltungsassoziierten Faktoren, diversen Erregern und Prädispositionen der Wirtstiere zugrunde. In das eigentliche Krankheitsgeschehen sind oft sowohl Viren als auch Bakterien – in tierartspezifischen Konstellationen – involviert, sodass das klinische Bild und die dafür verantwortlichen entzündlichen Veränderungen im Respirationstrakt bei beiden Tierarten erheblich variieren können (Confer 2009, Woolums et al. 2009, Hansen et al. 2010, Opriessnig et al. 2011, Kaske et al. 2012). Für entsprechende Infektionsmodelle werden Mäuse eher selten verwendet (wenn, dann im Rahmen der Grundlagenforschung), währenddessen die Modelltierart in der Regel der Zieltierart entspricht (homologes Modell). Aktuelle Beispiele für experimentelle Arbeiten zu verschiedenen Erregern und Co-Faktoren im Rahmen der BRD- bzw. PRD-Komplexe findet sich für Kälber bei Gershwin et al. (2015) oder für Schweine bei van Dixhoorn et al. (2016).

Ein weiterer Forschungsschwerpunkt konzentriert sich auf zwischen Tieren und Menschen wechselweise übertragbare Infektionen (Zoonosen), wobei stellvertretend für respiratorische Pathogene Influenza-Viren, Bakterien des Mtb-Komplexes (*Mycobacterium [M.] tuberculosis*, *M. bovis*) oder sogenannte ‚atypische‘ Bakterien wie Chlamydien zu nennen sind. Hierbei kommen in der Forschung sowohl Nutztier-Modelle als auch Nager-Modelle zum Einsatz (Knittler et al. 2014, Margine und Krammer 2014, Zhan et al. 2017).

Nicht zuletzt werden sowohl in der Human- als auch in der Tiermedizin immer wieder ‚emerging‘ oder ‚re-emerging‘ Situationen beschrieben, in die Viren oder Bakterien involviert sind, deren aktuelles Potenzial bezüglich Pathogenität, Virulenz oder Zoonose-Charakter noch nicht zuverlässig eingeschätzt werden kann.

TABELLE 1: Absolute und relative Anzahl an Tieren, deren Einsatz in Forschungsvorhaben zum respiratorischen System gemeldet wurde (Quelle: Versuchstierdaten BMEL)¹

Tierart	Grundlagenforschung		translationale und angewandte Forschung	
	2015	2016	2015	2016
Maus	40.040 (2,9 %)	21.739 (2,5 %)	11.945 (4,1 %)	13.935 (5,8 %)
Ratte	2.668 (3,0 %)	1.414 (3,450 %)	3.555 (6,8 %)	1.570 (4,7 %)
Meerschwein	31 (3,4 %)	128 (19,7 %)	1.670 (47,5 %)	555 (37,5 %)
andere Nager	-	74 (2,4 %)	11 (0,6 %)	-
Kaninchen	37 (2,1 %)	4 (0,3 %)	1 (0,1 %)	-
Katzen/Hunde	-	-	90 (8,8 %)	21 (1,9 %)
Frettchen	2 (3,6 %)	-	-	-
Pferde (u. a. Equiden)	31 (2,5 %)	292 (32,0 %)	-	-
Schweine	113 (3,5 %)	225 (6,3 %)	108 (2,6 %)	40 (0,5 %)
Schafe	-	14 (6,2 %)	23 (1,6 %)	-
Affen	42 (31,1 %)	60 (59,4 %)	32 (18,9 %)	3 (1,2 %)
Reptilien	30 (7,4 %)	-	-	-
Amphibien (Xenopus)	50 (0,7 %)	-	-	-
Fische	3 (0,01 %)	419 (0,3 %)	-	-
gesamt	43.053 (2,6 %)	24.369 (2,1 %)	17.435 (4,57 %)	16.124 (5,20 %)

¹ In der Grundlagenforschung wird keine Unterscheidung zwischen Human- und Veterinärmedizin vorgenommen. In der translationalen und angewandten Forschung bezieht sich die Meldung explizit auf respiratorische Erkrankungen des Menschen. Prozentuale Angaben beziehen sich auf die insgesamt für den jeweiligen Verwendungszweck (Grundlagenforschung bzw. translationale und angewandte Forschung) gemeldeten Tiere. Die Tabelle enthält keine Angaben zu Erkrankungen, die mit dem respiratorischen System assoziiert sein können (z. B. Tumoren, immunologische Erkrankungen, Allgemeinerkrankungen, Infektionen).

Ohne relevante Tiermodelle ist eine Beantwortung solcher offeneren Fragen nicht möglich. Als ein Beispiel hierfür seien Parachlamydien genannt, deren Pneumopathogenität zunächst für den Menschen und später auch für das Rind diskutiert wurde (Greub et al. 2003, Greub 2009, Lamoth und Greub 2010, Wheelhouse et al. 2013). Mit Blick auf immunsupprimierte, humane Patienten wurde sogar ein gesteigertes zoonotisches Potenzial von Parachlamydien postuliert (Borel et al. 2010, Michel 2011, Wheelhouse und Longbottom 2012). Im Mausmodell induzierten intratracheale bzw. intranasale Applikationen von *Parachlamydia acanthamoebae* deutliche Krankheitssymptome und erhebliche Mortalitätsraten, was die o.g. Einschätzung zunächst zu stützen schien (Casson et al. 2008, Pilloux et al. 2015). Bei Kälbern führte die intrabronchiale Inokulation von lebenden Parachlamydien selbst in sehr hohen Dosen (10^{10} Einschluss-bildende Einheiten von *P. acanthamoebae* je Kalb) lediglich zu milden Symptomen und moderaten Lungenveränderungen (Lohr et al. 2015, 2016). Im Vergleich zu experimentellen respiratorischen Chlamydien-Infektionen erwies *P. acanthamoebae* sich im bovinen Wirt als weitaus weniger pathogen (Reinhold et al. 2012, Lohr 2017).

Tabelle 1 weist aus, welche Versuchstierarten in welcher Quantität in den Jahren 2015/16 in Tierversuchen eingesetzt wurden, deren Versuchszwecke explizit dem respiratorischen System zugeordnet waren. Grob geschätzt dienen gegenwärtig ca. 2 % aller in der Grundlagenforschung eingesetzten Tiere und ca. 5 % für translationale und klinische Forschungsziele genutzten Tiere der Bearbeitung respiratorischer Probleme.

Strukturen und Funktionen des respiratorischen Systems im Spezies-Vergleich

Obgleich Tiermodelle nach wie vor ein essentieller Bestandteil medizinischer Forschung sind, um die Komplexität in einem lebenden Organismus sowie Interaktionen zwischen Organsystemen im gesunden wie im erkrankten Zustand zu verstehen, und obgleich

In-vivo-Modelle unverzichtbar sind, wenn es darum geht, Medikamente oder Impfstoffe zu entwickeln, stellt sich dennoch die Frage nach deren biologischer Relevanz. Das ‚Nachbilden‘ einer Erkrankung in Form eines Modells ist eine anspruchsvolle Herausforderung, die zunehmend aus politischen und ethischen Blickwinkeln hinterfragt wird. Letzteres gilt auch für die translationale Übertragbarkeit von in einem Modell gewonnenen Erkenntnissen. Insofern sollte der Grundsatz für biologisch relevante Forschungsansätze lauten: ‚So wenig artifiziell wie nötig und so nah an der Realität wie möglich‘.

Zwischen verschiedenen Säugetierarten existieren erhebliche, genetisch determinierte Unterschiede bezüglich der wirtsspezifischen körpereigenen Abwehrmechanismen. Für Interleukin-8 (IL-8), welchem eine Schlüsselrolle bei inflammatorischen Prozessen des Menschen zukommt, fehlt beispielsweise im Genom der Maus das entsprechende Gen. Im Genom von Hunden, Schweinen, Schafen und Rindern ist es hingegen vorhanden und das Protein, welches für IL-8 codiert, weist eine hohe Kreuz-Reaktivität zwischen den letztgenannten Spezies auf (Pastoret et al. 1998, Hein und Griebel 2003).

Innerhalb des Respirationstraktes weisen die großen Haustiere, wie Rind, kleine Wiederkäuer und auch das Schwein, eine dem Menschen sehr ähnliche Verteilung der lymphatischen Gewebe auf. Nasen-assoziiertes (NALT) und Bronchus-assoziiertes (BALT) lymphatisches Gewebe sind nicht konstitutiv vorhanden, aber induzierbar. Es ist als kleine Lymphknötchen in variablen Lokalisationen der Nasenschleimhaut bzw. der Bronchien und Bronchioli zu finden. Die Tonsillen des Waldeyerschen Rachenrings dagegen sind an definierten Lokalisationen bereits bei der Geburt angelegt (Liebler-Tenorio und Pabst 2006). Vergleichbare lokale Immunmechanismen der Lunge und eine dem Menschen ähnliche Zusammensetzung des epithelialen Oberflächenfilms der Atemwege lassen unter anderem das Schwein als ein geeignetes Modelltier für humane Atemwegserkrankungen erscheinen (Pabst und Binns 1994, Pabst 1996, Kozlova et al. 2005).

Auch strukturelle anatomische Voraussetzungen innerhalb der Lunge sind bei der Etablierung respiratorischer Modelle zu berücksichtigen. Die anatomischen Gegebenheiten in den Lungen größerer Säugetierarten ähneln – trotz Spezies-spezifischer Charakteristika – eher der Lungen- und Atemwegsanatomie des Menschen als die Lungen der Nager (McLaughlin et al. 1961, Magno 1990, McLaughlin 1983). Während das Atemwegssystem von Mäusen, Ratten und Hamstern einem simplen monopodalen Aufzweigungsmuster folgt, sind die Atemwege des Menschen und der größeren Säugetiere deutlich komplexer verzweigt (dichotom bzw. polychotom). Die Durchmesser der Atemwege variieren mit der Größe der Lunge, was zur Folge hat, dass kleine Bronchien und Bronchiolen der humanen Lunge mit einem Durchmesser <2 mm (die bei peripheren Atemwegserkrankungen oft die Hauptlokalisation der Entzündung darstellen) in der murinen Lunge nur auf der Ebene von Trachea und Hauptbronchien zu finden sind.

Das Vorhandensein oder Fehlen kollateraler bzw. akzessorischer Atemwege in der Lungenperipherie entscheidet darüber, wie sensitiv obstruktive Atemwegserkrankungen im Modell widergespiegelt werden. Während Hunde, Katzen und Kaninchen anatomisch sehr gut mit kollateralen Atemwegen ausgestattet sind, fehlen diese gänzlich in den Lungen von Rind und Schwein. Folglich korrelieren in porcinen und bovinen Lungen Dysfunktionen (ventilatorische Asynchronismen, Atelektasen) sehr deutlich mit dem Schweregrad obstruktiver Ventilationsstörungen, sodass diese Tierarten sehr sensitive Modelle darstellen können (Übersicht bei Kirschvink und Reinhold 2008).

Im Gefäßbett der Lunge korreliert die Reaktivität der pulmonalen Gefäße mit der Schichtdicke der Tunica muscularis in den kleinen Lungenarterien. Rinder weisen eine sehr ausgeprägte glatte Muskelschicht in den Lungenarterien auf, reagieren auf alveoläre Hypoxie mit einer stark ausgeprägten hypoxischen Vasokonstriktion und eignen sich deshalb sehr gut als Modell für pulmonale Vasokonstriktion oder pulmonale Hypertonie. Schweine reagieren weniger stark. Hunde, Katzen und Schafe entwickeln bei chronischer Hypoxie keine pulmonale Hypertension, während Pferde und Ziegen eine geringgradige vaskuläre Reaktion aufweisen (Cunningham und Klein 2007).

Diese wenigen ausgewählten Beispiele zeigen, dass Unterschiede in der Struktur des respiratorischen Systems bei verschiedenen Tierarten durchaus Auswirkungen auf die pulmonalen Funktionen haben, was bei der Entwicklung von Tiermodellen zu beachten ist.

Tiermodelle respiratorischer Erkrankungen

Natürliche Modelle respiratorischer Erkrankungen

Pulmonale Erkrankungen bei Tieren, denen eine ähnliche Pathophysiologie zugrunde liegt wie der vergleichbaren Erkrankung des Menschen, können durchaus als ‚natürliche Modelle‘ dienen. Ist es möglich, solche natürlichen Modelle disziplinübergreifend zu nutzen, so kann der Erkenntnisgewinn für Mensch und Tier zum beiderseitigen Nutzen für Human- und Veterinärmedizin sein.

Asthma bronchiale und COPD sind weit verbreitete und oft dramatisch verlaufende chronisch-entzündliche Atemwegserkrankungen des Menschen, die seit Jahr-

zehnten intensiv beforscht werden. Die üblicherweise etablierten Nagermodelle weisen erhebliche Limitationen bezüglich des Phänotyps der humanen Erkrankungsbilder auf (Bonniaud et al. 2018). Innerhalb des Tierreiches ist lediglich bei Pferden und Katzen bekannt, dass diese Tierarten auf natürliche Art und Weise eine Asthma-ähnliche Erkrankung entwickeln können, die dem humanen Phänotyp sehr ähnlich ist (Kirschvink und Reinhold 2008, Leclere et al. 2011b). Die bei beiden Tierarten über lange Zeiträume bis hin zu Jahren andauernden und progressiv verlaufenden Erkrankungsformen ermöglichen es, chronische Entzündungsprozesse und die daraus resultierenden strukturellen Veränderungen im natürlichen Verlauf zu studieren.

Insbesondere das Pferd stellt ein hervorragendes natürliches Modell zum Studium des ‚Remodellings‘ der Atemwege und der Reversibilität der Atemwegsentszündung dar (Bullone und Lavoie 2015). Der die zentralen und peripheren Atemwege betreffende Umbauprozess weist große Ähnlichkeiten zu dem bei menschlichen Asthmatikern bekannten ‚Remodelling‘ vergleichbarer Atemwegsgenerationen auf (Herszberg et al. 2006, Leclere et al. 2011a) und analoge Therapieprinzipien, wie Kortikosteroide oder Bronchodilatoren, zeigen vergleichbare Wirkungen. Zugleich konnte im equinen Modell nachgewiesen werden, dass die Umbauprozesse der glatten Atemwegsmuskulatur durch die derzeit verfügbaren Anti-Asthma-Medikationen nur teilweise reversibel sind (Leclere et al. 2012, Bullone et al. 2017). Ein weiterer Vorteil der Nutzung des equinen Asthmas als Modell für die humanmedizinische pneumologische Forschung besteht in der Möglichkeit, die Umgebung der Tiere so modulieren zu können, dass ein und dasselbe Tier in verschiedenen Erkrankungszuständen (persistierende Entzündung, Exazerbation, Remission) und über lange Zeiträume untersucht und beprobt werden kann.

Die für das equine Asthma getroffenen Aussagen treffen im Wesentlichen auch auf das allergische Asthma bei Katzen zu (Reinero et al. 2009, Kirschvink und Leemans 2011, Reinero 2011). Durch Kaltluft induzierte Atemwegsentszündungen bei Schlittenhunden eignen sich unter analogen Gesichtspunkten als natürliches Modell für ‚Ski-Asthma‘ (Davis et al. 2002, Davis et al. 2005).

Als weitere Beispiele für im Tierreich vorkommende natürliche Modelle nicht-infektiöser pulmonaler Erkrankungen seien die pulmonale Hypertonie bei der Höhenkrankheit des Rindes (Naeije 1997, Holt und Callan 2007, Hunter et al. 2010, Tian et al. 2012, Bartels et al. 2016) oder Schlaf-assoziierte Störungen der Atmung bei Englischen Bulldoggen bzw. bei adipösen Schweinen genannt (Hendricks et al. 1987, Lonergan et al. 1998). Frühgeborene Lämmer oder Schweine eignen sich als Modelltiere für das mit Surfactant-Mangel assoziierte Atemnotsyndrom (RDS, respiratory distress syndrome) von Neugeborenen (Niemarkt et al. 2014, Caminita et al. 2015).

Auch im Bereich infektiöser respiratorischer Erkrankungen finden sich zahlreiche Beispiele für ein natürliches Vorkommen vergleichbarer Infektionen bei Mensch und Tier. Blickt man auf respiratorische Viren, so weist die Infektion mit bovinem RSV erhebliche pathogenetische Ähnlichkeiten mit der humanen RSV-Infektion auf, weshalb sich Kälber als Modell für diese Virus-Infektion im translationalen Sinne eignen (Gershwin 2012). Die durch das Bakterium *Mycobacterium bovis* ausgelöste Tuberkulose der Rinder wird im Schrifttum

als Modell für die Tuberkulose des Menschen empfohlen (Van Rhijn et al. 2008). *M. bovis* und *M. tuberculosis* haben nicht nur eine sehr hohe (99 %) genetische Identität, sie verursachen auch ähnliche Wirtsantworten und Krankheitsprofile bei Rind und Mensch (Waters et al. 2014a, Waters und Palmer 2015).

Chronische, zum Teil subklinisch verlaufende, Infektionen mit sogenannten ‚atypischen‘ Bakterien (*Chlamydia* spp., *Mycoplasma* spp.) sind beim Menschen schwer zu untersuchen und im Tiermodell kaum nachzubilden. Vergleichbare Infektionen kommen jedoch im Tierreich vor und stellen natürliche Modelle dar, um Erreger-Wirt-Interaktionen auch über längere Zeiträume hinweg zu evaluieren und die langfristigen Folgen für den Wirt abzuschätzen. So führten gezielte Untersuchungen an Kälbern zu der durchaus auch für die Humanmedizin relevanten Erkenntnis, dass persistierende und rekurrende Chlamydien-Infektionen der Lunge – trotz klinischer Inapparenz – langfristig mit chronischen Atemwegsobstruktionen und einer daraus resultierenden erschwerten Atmung bzw. erhöhten Atemarbeit assoziiert sind (Jaeger et al. 2007); begleitet von einer Vielzahl gesundheitsbeeinträchtigender Effekte auf subklinischem Niveau (Reinhold et al. 2008a). Chronische Chlamydien-Infektionen der Lungen von Pferden werden als natürliches Modell einer *Chlamydia pneumoniae*-Infektion beim Menschen angesehen (Theegarten et al. 2008).

Ein weiteres Feld, in dem natürlich vorkommende Erkrankungen sehr gut als biologisches Modell genutzt werden können, ist die Ausbreitungsdynamik von Infektionen auf Populationsniveau. Hierfür können große Tierbestände sowie die Vergesellschaftung von naiven Sentinel-Tieren mit infizierten Tieren Studienpopulationen für empirische Modelle darstellen, von denen Rückschlüsse auf das Transmissionsverhalten und die Dynamik infektiöser Erkrankungen gezogen werden können (Lanzas et al. 2010).

Transgene Modelle respiratorischer Erkrankungen

Die Möglichkeit, Tiere genetisch zu verändern, ist schon lange nicht mehr nur auf Mäuse beschränkt. Mit der Verfügbarkeit genetisch modifizierter Nutztiere werden auch in größeren Tierarten transgene Modelle regelrecht ‚designt‘. Ein herausragendes Beispiel der modernen pneumologischen Forschung ist das Modell der zystischen Fibrose, welches im Schwein etabliert wurde (Rogers et al. 2008, Elferink und Beuers 2009, Welsh et al. 2009). Einer CF-Erkrankung des Menschen liegen autosomal-rezessiv vererbte Mutationen im CFTR-Gen zugrunde (das CFTR-Gen codiert für das Protein Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator), woraus im gesamten Organismus eine Fehlfunktion von Chloridkanälen resultiert. Die Schweine mit fehlendem CFTR-Gen entwickeln vergleichbare Störungen im Chlorid-Transport und typische klinische Symptome wie CF-Patienten (z. B. zäher bronchialer Mukus, durch Wassermangel eingedickte Sekrete der Bauchspeicheldrüse und anderer Organe). Dieser klinische Phänotyp konnte in murinen Modellen nie zuvor erreicht werden, sodass das porcine Modell heute weltweit als das überlegene akzeptiert ist (Hoegger et al. 2014, Yan et al. 2015).

Experimentelle Modelle respiratorischer Erkrankungen

Experimentelle Expositionen des Respirationstraktes umfassen z. B. Allergene, eine Vielzahl an abiotischen Noxen (Stäube, Schadgase etc.) und auch Infektions-

erreger. Hierbei können rein humanmedizinische bzw. rein veterinärmedizinische Fragestellungen im Vordergrund stehen; gerade im Zusammenhang mit respiratorischen Infektionen existieren aber deutliche Schnittmengen zwischen beiden Fachdisziplinen.

Ein klassisches Beispiel aus der auf humanmedizinische Fragestellungen fokussierten Pneumologie, bei dem Nutztiere zum Einsatz kommen, ist das durch *Ascaris suum* induzierte ovine Modell für allergische Atemwegserkrankungen (Asthma, Rhinitis), das – mit Blick auf COPD oder CF – auch interessante Einblicke in Dysfunktionen und Beeinflussbarkeit der mukoziliären Clearance bietet (Abraham 2008). Bei CF-Patienten trägt oft eine chronische Infektion mit *Pseudomonas (P.) aeruginosa* zur Steigerung der Morbidität und Mortalität bei. Ein entsprechendes Großtiermodell der segmentalen chronischen *P. aeruginosa*-Infektion wurde z. B. im Schaf etabliert (Collie et al. 2013). Berichte über akute *P. aeruginosa*-Infektionsmodelle liegen u. a. für die Tierart Schwein vor, zum Teil im Zusammenhang mit beatmungsinduzierten Lungenschäden oder Multiorganversagen (Sibila et al. 2007, Chevaleyre et al. 2016, Sperber et al. 2017, Ten Have et al. 2018). An Schafen und Schweinen wurden des Weiteren Modelle zum akuten Lungenversagen (acute respiratory distress syndrome, ARDS) oder zu MRSA-Infektionen der Lunge etabliert, die murinen Modellen deutlich überlegen sein sollen (Martinez-Olondris et al. 2010a, Pohlmann et al. 2011, Ballard-Croft et al. 2012, Soerensen et al. 2013). Auch in der Schock- und Sepsis-Forschung, in der das Lungenversagen ein wichtiger Parameter ist, werden bevorzugt Schweine als Modell-Tiere verwendet (Sadowitz et al. 2011, Chalkias et al. 2015).

In der Veterinärmedizin dominieren Modelle zu respiratorischen Mono- oder Mischinfektionen. Stehen Fragen zur Virulenz, Pathogenität und Transmission im Vordergrund, so wird meist im homologen System gearbeitet, d. h. Tiere der Spezies, für welche die Infektion relevant ist, werden zugleich Modell- bzw. Versuchstiere. Als Beispiele für experimentelle bakterielle Infektionen seien genannt: die durch *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* induzierte kontagiöse bovine Pleuropneumonie (syn. Lungenseuche) des Rindes bei Kälbern bzw. Junggrindern (Heller et al. 2007, Jores et al. 2008, Sacchini et al. 2011, Schubert et al. 2011), *Pasteurella*-, *Mycoplasma*- und *Chlamydia*-Infektionen der Lungen von Wiederkäuern und Schweinen (Erler et al. 1993, Oduibo et al. 2004, Sachse et al. 2004, Dagleish et al. 2007, 2010, Eamens et al. 2012, Hermeyer et al. 2012, Reinhold et al. 2012, Garcia-Morante et al. 2017), *Actinobacillus pleuropneumoniae*- und *Streptococcus suis*-Infektionen bei Läuferschweinen (Baums et al. 2006, 2009, Beineke et al. 2008, Menzel et al. 2014) oder *Rhodococcus equi*-Infektionen bei Fohlen (Caston et al. 2006, Jacks et al. 2007, Sanz et al. 2013, 2016). Experimentelle Arbeiten zu Virus-assoziierten respiratorischen Infektionen beziehen sich beim Schwein u. a. auf PRRS-Viren (Erreger des porcinen reproduktiven und respiratorischen Syndroms) oder porcine Circo-Viren (Wagner et al. 2011, Liu et al. 2017). Aufgrund der aktuellen Tierseuchenlage kamen in jüngster Vergangenheit Infektionsversuche mit dem Erreger der afrikanischen Schweinepest bei Haus- und Wildschweinen hinzu (Gers et al. 2011, de Carvalho Ferreira et al. 2013, Howey et al. 2013). Bei Rindern konzentrieren sich Infektionsmodelle mit respiratorischen Viren auf die in den BRD-Komplex involvierten, wie

TABELLE 2: Experimentelle respiratorische Infektionsmodelle in Nutztieren mit teilweiser Relevanz für humanmedizinische Fragestellungen und translationale Forschungsfelder (exemplarische Auswahl)

Respiratorische Infektionen	Modell-Spezies	Erreger in der Modell-Spezies	Erreger beim Menschen	Fragestellung	Referenzen
Virus-assoziiert					
Influenza	Schwein	Influenza A	Influenza A	Vakzine-Entwicklung	Arunorat et al. 2017
Respiratorisches Synzytial Virus (RSV)	Kalb	bRSV (b = bovin)	hRSV (h = human)	Pathogenese, Vakzine-Entwicklung	Otto et al. 1996 Gershwin et al. 1998 Meyer et al. 2008 Jordan et al. 2015
Bakterien-assoziiert					
Chlamydien	Schwein	<i>Chlamydia suis</i>	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Pathogenese, Biomarker	Sachse et al. 2004 Reinhold et al. 2005b, 2008b, 2010
	Kalb	<i>Chlamydia psittaci</i>	<i>Chlamydia psittaci</i>	Pathogenese, Diagnostik, Biomarker, Erregerausscheidung, Transmission, Therapie	Reinhold et al. 2012 Ostermann et al. 2013a,b, 2014 Prohl et al. 2015a,b,c, 2017
Mycobakterien des Tuberkulose-Komplexes (Mtb)	Rind	<i>Mycobacterium bovis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Mycobacterium bovis</i>	Pathogenese, Diagnostik, Biomarker, Vakzine-Entwicklung	Waters et al. 2010, 2014b
	Schwein	<i>Mycobacterium bovis</i>			Bolin et al. 1997
	Ziege	<i>Mycobacterium bovis</i>			Gonzalez-Juarrero et al. 2013
	Ziege	<i>Mycobacterium caprae</i>			de Val Pérez 2011
Mykoplasmen	Kalb	<i>Mycoplasma bovis</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Pathogenese, Diagnostik, Persistenz	Vanden Bush und Rosenbusch 2003 Hermeyer et al. 2012 White et al. 2012 Amrine et al. 2013
Parachlamydien	Kalb	<i>Parachlamydia acanthamoebae</i>	<i>Parachlamydia acanthamoebae</i>	Pathogenese, Diagnostik, Biomarker, Erregerausscheidung,	Lohr et al. 2015, 2016
Pasteurellen	Wiederkäuer	<i>Haemophilus somni</i> (ehemals <i>Haemophilus somnus</i>)	<i>Haemophilus influenzae</i> (<i>Haemophilus parainfluenzae</i>)	Pathogenese, Diagnostik	Groom et al. 1988 Confer 2009
Pseudomonaden	Schaf, Schwein	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pathogenese, Therapie	Collie et al. 2013, 2015 Sibila et al. 2007
Staphylokokken	Schaf, Schwein	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	Pathogenese, Diagnostik, Therapie	Enkhbaatar et al. 2008 Martinez-Olondris et al. 2010b Soerensen et al. 2013
Bakteriell-virale Mischinfektionen					
	Kalb/Jungrind	<i>Mycoplasma bovis</i> und bovines Herpesvirus (BHV-1)		Pathogenese, Erreger-Interaktionen	Prysljak et al. 2011
	Schwein	<i>Pasteurella multocida</i> und Influenza-Virus		Pathogenese, Akute-Phase-Reaktion	Pomorska-Mól et al. 2015

bovines RSV, BHV-1 (Bovines Herpesvirus Typ 1), PI-3 (Parainfluenza 3 Virus) oder BVDV (Virus der Bovinen Virusdiarrhoe) (Gershwin et al. 2015). Mit dem erstmaligen Auftreten der Blauzungenkrankheit im nördlichen Europa wurden Wiederkäuer zum Tiermodell für Infektionen mit Bluetongue-Virus (Coetzee et al. 2014).

Wenn Pathogene für eine Vielzahl von Wirten relevant sind, so ist es oft notwendig, mit verschiedenen Wirten zu arbeiten. Ein typisches Beispiel hierfür sind Infektionsmodelle mit Influenza-Viren bei verschiedensten Spezies, wie Geflügel (Blohm et al. 2016), Schwein (Pomorska-Mól et al. 2012, Brogaard et al. 2016), Hund (Yük et al. 2017), Frettchen (Belser et al. 2016) oder Hamster und Pferd (Daly et al. 2003). In diesen homologen Modellen werden in der Regel Fragen zur Pathogenese und Übertragungsmechanismen (insbesondere bei Erregern mit zoonotischem Potenzial auch für die Humanmedizin interessant) oder zu Prophylaxe- und Therapie-Strategien bearbeitet.

Im Sinne der komparativen Medizin stellt Speziesübergreifendes Wissen zur Pathogenese von respiratorischen Infektionen oft auch einen Erkenntnisgewinn für vergleichbare Infektionen beim Menschen dar. Tabelle 2 gibt einen Einblick in experimentelle Infektionsmodelle bei landwirtschaftlichen Nutztieren, die zugleich für humanmedizinische Fragestellungen interessant sind bzw. relevant sein können. Nachfolgend sollen einige der in Tabelle 2 aufgelisteten Beispiele genauer erläutert werden. Zur Prüfung von Impfstoffkandidaten bzw. von antiviralen Wirkstoffen haben sich insbesondere das RSV-Infektionsmodell im Kalb und das Influenza-Infektionsmodell im Schwein als geeignet erwiesen (Jordan et al. 2015, Arunorat et al. 2017). Eine kritische Evaluierung von Therapie-Strategien zur Bekämpfung akuter respiratorischer Chlamydien-Infektionen mit relevanten antimikrobiellen Wirkstoffen der Human- und Veterinärmedizin erfolgte im bovinen Modell der experimentellen respiratorischen Infektion mit *Chlamydia psittaci* (Prohl et al. 2015a, b). Darüber hinaus

konnte durch komplementäre Betrachtung dieses bovinen Modells mit diversen zuvor etablierten murinen Modellen ein neues und tiefgreifendes Verständnis für die Komplexität der Erreger-Wirt-Interaktionen bei der respiratorischen *C. psittaci*-Infektion erlangt werden (Knittler et al. 2014).

Ein weiteres sehr gutes Beispiel für translationalen Erkenntnisgewinn sind Mykobakterien-Infektionen, die bei Wiederkäuern nach einer Latenzphase zu ähnlichen Veränderungen – verkäsenden Granulomen und Kavernen – wie beim Menschen führen (de Val Pérez et al. 2011, Gonzalez-Juarrero et al. 2013). Neben Untersuchungen zur Pathogenese und Wirtsantwort lassen sich diese Modelle auch für die Entwicklung von Impfstoffen und Testung von Behandlungsregimen gegen die Lungentuberkulose des Menschen einsetzen (Balseiro et al. 2017). Im Speziellen sind Infektionsmodelle mit *M. bovis* im Rind bzw. experimentelle Infektionen mit anderen Mykobakterien bei Wiederkäuern für die Aufklärung der Immunpathogenese der Erkrankung, insbesondere des Infektionsweges, der infektiösen Dosis, des Krankheitsverlaufs, der Latenz, der Pathologie, der Granulombildung und der Immunreaktionen (dendritische Zellen und Makrophagen, T-Zell Subsets, Effektormechanismen) geeignet (Endsley et al. 2009, Waters et al. 2011, 2014a), sodass sich immunologische Parameter als Korrelate für Schutz oder als Indikatoren für Erkrankung überprüfen lassen.

Beschaffung geeigneter Tiere und Vorbereitung auf das Experiment

Für den Einsatz in experimentellen wissenschaftlichen Untersuchungen sind landwirtschaftliche Nutztiere nicht in der Qualität kommerziell verfügbar, die üblicherweise für Versuchstierhaltungen gilt. Bei der Tierart Schwein kann am ehesten noch auf SPF-Bestände zurückgegriffen werden. Insbesondere mit Blick auf geplante Infektionsversuche gilt für alle Tierarten, zunächst Herkunftsbestände mit einem sehr guten allgemeinen Gesundheitsstatus zu identifizieren und anschließend das Freisein von definierten unerwünschten Erregern durch gezielte Untersuchungen auf Bestands- und Einzeltierebene abzuklären.

Um einen Überblick über die aktuelle Tierseuchensituation und laufende Sanierungskonzepte in der Region zu erhalten, können Tiergesundheitsdienste und Amtstierärzte bei der Suche nach geeigneten Herkunftsbeständen für potenzielle Versuchstiere sehr hilfreiche Partner sein. Nachdem einige Tierbestände als mögliche Versuchstierlieferanten eingegrenzt wurden, empfiehlt sich ein intensiver fachlicher Kontakt mit den vor Ort tätigen Bestandstierärzten, um einerseits Informationen über Herden-spezifische Aspekte der Tiergesundheit sowie über Behandlungs- und Vakzinierungsprogramme zu erhalten und um andererseits gezielte Probennahmen vorzubereiten, die für das spätere Versuchsvorhaben diagnostisch relevant bzw. unerlässlich sind.

Respiratorische Erkrankungen multifaktorieller Genese bei Jungtieren sind bei vielen landwirtschaftlichen Nutztieren ein Problem, insbesondere in Kälber- und Schweinebeständen, und fakultativ pathogene Erreger besiedeln auch die Atemwege klinisch unauffälliger Tiere. Da selbst in Herden mit akzeptabler Tiergesundheit ein höherer Infektionsdruck herrscht und die Tiere

mehr Haltungs-assoziierten Stressoren ausgesetzt sind als in einer hygienisch überwachten Versuchstiereinrichtung, empfiehlt es sich, Jungtiere so frühzeitig wie möglich aus der Herde in die Versuchstiereinrichtung zu verbringen und sie dort hygienisch abgeschirmt aufzuziehen, selbst wenn die Versuche erst in einer späteren Altersphase geplant sind. Für Schweine ist dieser Zeitpunkt üblicherweise nach dem Absetzen im Alter von 3–4 Lebenswochen, für Kälber nach Erreichen eines Mindestalters von 14 Tagen (Tierschutztransportverordnung). Belässt man die Tiere in der Herde und überführt sie erst kurz vor Versuchsbeginn in die experimentelle Tierhaltung, so ist das Risiko für Co-Infektionen im Versuch (durch im Herkunftsbestand oder beim Transport akquirierte Erreger) und für nicht-versuchsbedingte Lungenläsionen ungleich höher. Die mit einer frühzeitigen Aufstallung und längerer Haltungsdauer einhergehenden höheren Kosten sind im Vergleich zu fehlgeschlagenen oder wenig aussagefähigen Experimenten infolge einer zu variablen gesundheitlichen Grundkonstitution der Versuchstiere durchaus gerechtfertigt.

Für den Transport vom Herkunftsbestand in den Versuchstierbestand gelten die einschlägigen gesetzlichen Grundlagen (Tierschutztransport-Verordnung, Viehverkehrs-Verordnung, Tierschutz-Versuchstier-Verordnung § 1, Tierschutzgesetz). Aus seuchenhygienischer und infektionsprophylaktischer Sicht ist zu beachten, dass der Transport der späteren Versuchstiere entweder in einem geeigneten Fahrzeug der Versuchseinrichtung oder des Herkunftsbetriebes – also ohne Kontakt zu Tieren aus anderen Beständen – sowie unter hygienisch risikoarmen Bedingungen erfolgen sollte (Reinigung und Desinfektion des Tiertransportfahrzeuges nach jedem Einsatz bzw. vor dem Wechsel der Tierart oder des Herkunftsbetriebes).

Mit Ankunft der Tiere in der Versuchseinrichtung empfiehlt sich ein tierartspezifisch definiertes Einstallungs-Monitoring. Nach langjähriger Erfahrungen der Autorinnen sollte die Charakterisierung auf Einzeltierbasis erfolgen und mindestens eine erste klinische Untersuchung, die Erfassung des Einstallungs-Gewichts, die Entnahme einer Blutprobe (Null-Probe) und die Gewinnung von diversen biologischen Proben (z. B. Kot, Rektaltupfer, Nasentupfer) für mikrobiologische und ggf. parasitologische Untersuchungen umfassen. Zum einen wird somit der Eintrag von potenziellen Erregern in die Versuchstiereinrichtung überwacht. Zum anderen wird die Besiedlung mit bzw. die Ausscheidung von Pathogenen auf Einzeltierbasis überprüft. Weitere Blutproben sollten im 2- bis 4-wöchigen Abstand zur Null-Probe bzw. versuchsbegleitend asserviert werden, um retrospektiv anhand serologischer Untersuchungen Antikörperverläufe einschätzen zu können, z. B. ob evtl. vorhandene Antikörper maternalen Ursprungs im Verlauf abnehmen oder ob neue/ansteigende Antikörpertiter auf evtl. Co-Infektionen im Versuch hinweisen. Entsprechende Empfehlungen zur mikrobiologischen Überwachung werden aktuell vom Fachausschuss ‚Landwirtschaftliche Nutztiere‘ der GV-SOLAS (Gesellschaft für Versuchstierkunde) tierartspezifisch erarbeitet.

Nach der Einnistung benötigen die Tiere eine angemessene Zeit, um den Transportstress zu überwinden und sich an die neuen Bedingungen zu gewöhnen (anderes Futterregime, neue Rangordnung, Adaptation an Haltungsform, neues Personal). Erfahrungsgemäß kann es wenige Tage nach Einnistung zu vorüberge-

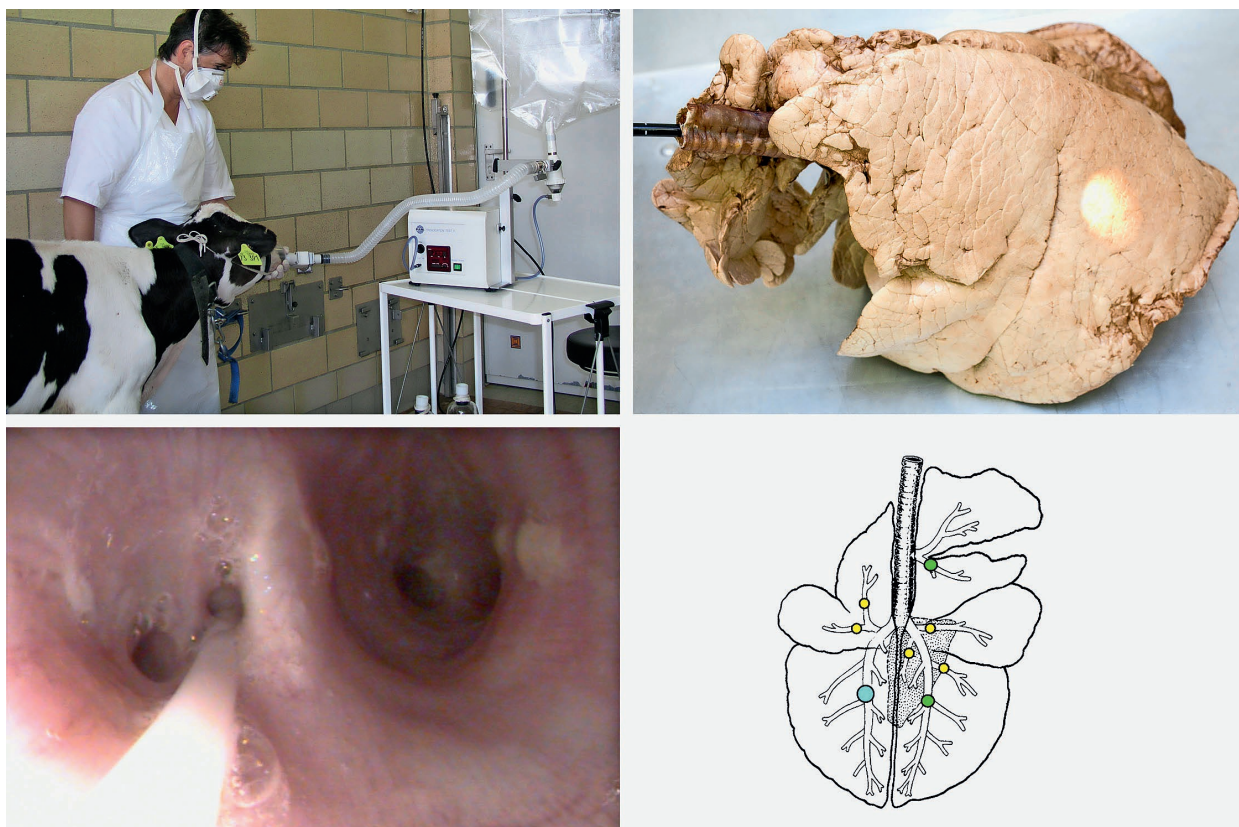


ABBILDUNG 1: Beispiele experimenteller Expositionen des Respirationstraktes beim Kalb (Fotos: FLI). Links oben: Inhalative Exposition durch Einatmung eines Erreger-haltigen Aerosols aus einem Reservoir (Gerät: Pari-Provocation Test II, Düsenvernebler, Volumen des Aerosol-Beutels: 10 Liter). Rechts oben: Lokalisation des Videobronchoskops in einem Modell der bovinen Lunge (Der Lichtfleck markiert die Spitze des Endoskops und damit die vorgesehene Applikationsstelle). Links unten: Videobronchoskopische Aufnahme beim Einführen des Endoskops in einen Bronchus und Absetzen einer definierten Menge von Erreger-haltiger Suspension. Rechts unten: Mögliche Depositionstellen für die intrabronchiale Applikation von Erreger-haltiger Suspension in der bovinen Lunge nach definiertem Schema am Beispiel des *Chlamydia psittaci*-Infektionsmodells; Depositionsvolumina: blau = 1,5 ml; grün = 1,0 ml; gelb = 0,5 ml (nach Reinhold et al. 2012).

henden Instabilitäten in der Tiergesundheit kommen, was sich unter anderem aus den Interaktionen zwischen Stress und bereits im Wirt vorhandenen potenziellen Pathogenen erklären lässt (Verbrugghe et al. 2012). Während der von den Autorinnen empfohlenen ‚Quarantänisierungsphase‘ von mindestens 2-3 Wochen ist der klinische Zustand täglich auf Einzeltierbasis zu überwachen. Zusätzlich ist – insbesondere bei Kälbern und Schweinen – auf eine adäquate Eisenversorgung vor Versuchsbeginn zu achten (Kontrolle des roten Blutbildes bzw. Analyse von Serum-Transferrin). Liegt Verdacht auf eine Eisenmangelanämie vor (rotes Blutbild: mikrozytär, hypochrom), so ist Eisen zu substituieren und vor Versuchsbeginn ausreichend Zeit für die Erythropoese einzuplanen. Da viele Infektionserreger dem Wirt Eisen für ihr eigenes Wachstum entziehen, sind Tiere mit Eisenmangelanämie nicht für Infektionsversuche geeignet. Selbiges gilt für Tiere, die nicht immunkompetent sind oder entzündliche Reaktionen unklarer Genese aufweisen. Um solche Zustände zu erkennen, empfiehlt es sich, vor Versuchsbeginn zumindest die Gesamt-Leukozytenzahl im peripheren Blut und ein Differenzialblutbild zu erheben. Darüber hinaus erfordert eine optimale, verantwortungsvolle und tierschutzgerechte Tierversuchsplanung im Rahmen der guten veterinär-

medizinischen Praxis eine individuelle Anpassung der bereits vor Versuchsbeginn zu erhebenden Parameter an die Fragestellung.

Ein Tierexperiment sollte erst dann beginnen, wenn alle zu involvierenden Tiere eine stabile Gesundheit und unauffällige Befunde bezüglich der versuchsrelevanten Basisparameter aufweisen.

Möglichkeiten experimenteller Expositionen

Die in der Literatur beschriebenen Applikationsarten für respiratorische Infektionsmodelle reichen von einfacher intranasaler Exposition bis hin zu intrabronchialer Deposition definierter Volumina und Erregerdosen. Tabelle 3 fasst die Vor- und Nachteile der unterschiedlichen Expositionsarten zusammen. Abbildung 1 veranschaulicht die aerogene Challenge durch Inhalation eines Erregerhaltigen Aerosols sowie die definierte intrabronchiale Deposition am Beispiel der bovinen Lunge.

Charakterisierung respiratorischer Modelle in vivo (‚Read out‘ Parameter)

Abbildung 2 verdeutlicht die verschiedenen Ebenen der Pathogenese – von der molekularen Reaktion innerhalb

TABELLE 3: Applikationsarten zur pulmonalen Exposition bei Großtieren (mit exemplarischen Anwendungsbeispielen)

Art der Applikation	Pathogen	Tierart	Vorteile	Nachteile	Referenzen
nasale Instillation (Tropfen oder Aerosol)	Virus (hRSV)	Primaten Schwein	einfache Handhabung	nur Exposition der extrathorakalen Atemwege	Grandin et al. 2015 Baums et al. 2006
intratracheale Inokulation	Pasteurellen <i>Haemophilus somni</i> (ehemals <i>H. somnus</i>) LPS	Rind (Kalb) Rind (Kalb) Primaten	definierte Inokulationsdosis	ggf. Induktion von spontanem Husten; undefinierte Verteilung und Deposition	Knobloch et al. 2010 Groom et al. 1988 Curths et al. 2014
intrabronchiale Inokulation (Sichtkontrolle)	Chlamydien Parachlamydien	Rind (Kalb)	definierte Inokulationsdosis an definierten Lokalisationen	Anästhesie erforderlich; hoher technischer Aufwand (Video-Bronchoskopie); geschultes Personal nötig; hoher Zeitaufwand	Reinhold et al. 2012 Prohl et al. 2014 Lohr et al. 2015
Aerosol-Inhalation	Virus (bRSV) Mykobakterien Mykoplasmen Virus (BHV-1) und <i>Mannheimia haemolytica</i> Chlamydien	Rind (Kalb) Rind Rind (Kalb) Rind (Kalb) Schwein	nichtinvasiv, Spontanatmung, Exposition der oberen und tieferen Atemwege	Depositionsmuster und Depositionsdosis bleiben unbekannt	Otto et al. 1996 Waters et al. 2014b Reinhold et al. 2006 Jericho und Kozub 2004 Sachse et al. 2004
parenterale Applikation (a) intramuskulär (b) intravenös	(a) Virus (PRRSV) (b) LPS	(a) Schwein (b) Schwein, Rind (Kalb)		(a) nur bei Erregern mit sehr hoher Affinität zum Respirationstrakt (b) für systemische Challenge	Wagner et al. 2011 Chalkias et al. 2015

einer Zelle bis hin zum klinischen Bild. Für die fundierte Validierung eines Tiermodells sollten alle Pathogenese-Ebenen betrachtet, charakterisiert und – bei experimentellen Expositionen – entsprechend einer Dosis-Wirkungs-Beziehung quantifiziert werden. Da klinische Symptome in der Regel erst dann sichtbar werden, wenn die Kompensationsmechanismen eines Organsystems oder Organismus überfordert sind, kann das klinische Bild in Frühphasen der Infektion oder bei subklinischen Verläufen keine ausreichenden Informationen liefern. Zur wissenschaftlich exakten Charakterisierung eines respiratorischen Modells gehören gleichermaßen die qualitative und quantitative Erfassung pulmonaler Dysfunktionen und zelluläre Reaktionsmuster innerhalb der verschiedenen Ebenen des Atmungstraktes.

Ein weiterer Aspekt betrifft die Anwendbarkeit von in der Humanmedizin gebräuchlichen diagnostischen Methoden im Tierexperiment. Eigene Erfahrungen und Literaturberichte belegen, dass lungenfunktionsdiagnostische Verfahren oder die Gewinnung von Probenmaterial aus der Lunge (broncho-alveoläre Lavage, Biopsie) an größere Tierarten – z. B. Katze, Hund, Ferkel bis hin zu adulten Wiederkäuern oder Pferden – problemlos adaptierbar sind, wodurch es möglich wird, komplexe Zusammenhänge im Einzeltier über längere Zeiträume zu untersuchen.

Klinisches Scoring

Bei der Verwendung von Großtieren als Modelltiere für respiratorische Infektionen sollte eine tägliche klinische Untersuchung inklusive einer speziellen Untersuchung des respiratorischen Systems eine veterinärmedizinische Selbstverständlichkeit sein. Versuchstierkundlich geschulte Tierpfleger sind eine starke Ressource im Tierversuch, denn die Menschen, welche die Tiere täglich pflegerisch betreuen, kennen ‚Eigenheiten‘ von Einzeltieren oft besser als die Versuchsleiter und sind gegenüber Veränderungen im Verhalten oder Gesundheitszustand der Tiere in der Regel sehr wachsam. Durch die Tierpfleger bzw. durch sonstiges geschultes Personal

mit tierartsspezifischer Sachkunde können – sinnvollerweise im Zusammenhang mit der gesetzlich vorgeschriebenen täglichen Inaugenscheinnahme eines jeden Tieres (TierSchVersV, §1) – ‚allgemeine‘ Befunde zu dessen Gesundheitszustand erhoben und dokumentiert werden (Allgemeinbefinden, Futteraufnahme, Rektaltemperatur, Ruhe-Atmungsfrequenz, Vorhandensein von Husten, Nasenausfluss, Augensekret oder Durchfall etc.). Spezielle bzw. Organ-spezifische tierärztliche Untersuchungen (z. B. Auskultation, Perkussion, Palpation) komplettieren die klinische Befunderhebung.

Um die Vielzahl der Einzelbefunde in ein quantifizierbares Maß zu überführen, hat es sich bewährt, (a) jedem Parameter eine Wichtung zuzuordnen und (b) Schweregrade zu verwenden, um Abweichungen der erhobenen Kenngrößen von der jeweiligen physiologischen Norm numerisch zu kategorisieren. Alle relevanten Befunde können anschließend in einem ‚klinischen Score‘ zusammengefasst und u. a. für statistische Auswertungen verwendet werden. Das Verhältnis zwischen dem aktuell für das Einzeltier erhobenen Score und dem maximal erreichbaren Score reflektiert den Schweregrad einer Erkrankung. Zugleich ist ein solches Scoring auch hilfreich, um Endpunkte und Abbruchkriterien im Tierversuch zu definieren. Beispiele für klinische Scores bei respiratorischen Erkrankungen bzw. für explizit ‚respiratorische‘ Scores finden sich im Schrifttum z. B. für Kälber (Reinhold et al. 2012, Ostermann et al. 2013a) oder Schweine (Püllen et al. 2015).

Blutgas-Analysen

Durch die im arteriellen Blut gemessenen Partialdrücke der beiden Atemgase Sauerstoff und Kohlendioxid (PaO_2 , PaCO_2) lässt sich beurteilen, ob der pulmonale Gasaustausch beeinträchtigt ist. Liegt eine respiratorische Insuffizienz vor, so ist in jedem Fall der PaO_2 vermindert. Ob dieser Hypoxämie jedoch primär eine Störung der O_2 -Diffusion zugrunde liegt oder ob vielmehr andere Beeinträchtigungen der äußeren Atmung, wie Belüftung der Lunge (Ventilationsstörung), Durch-

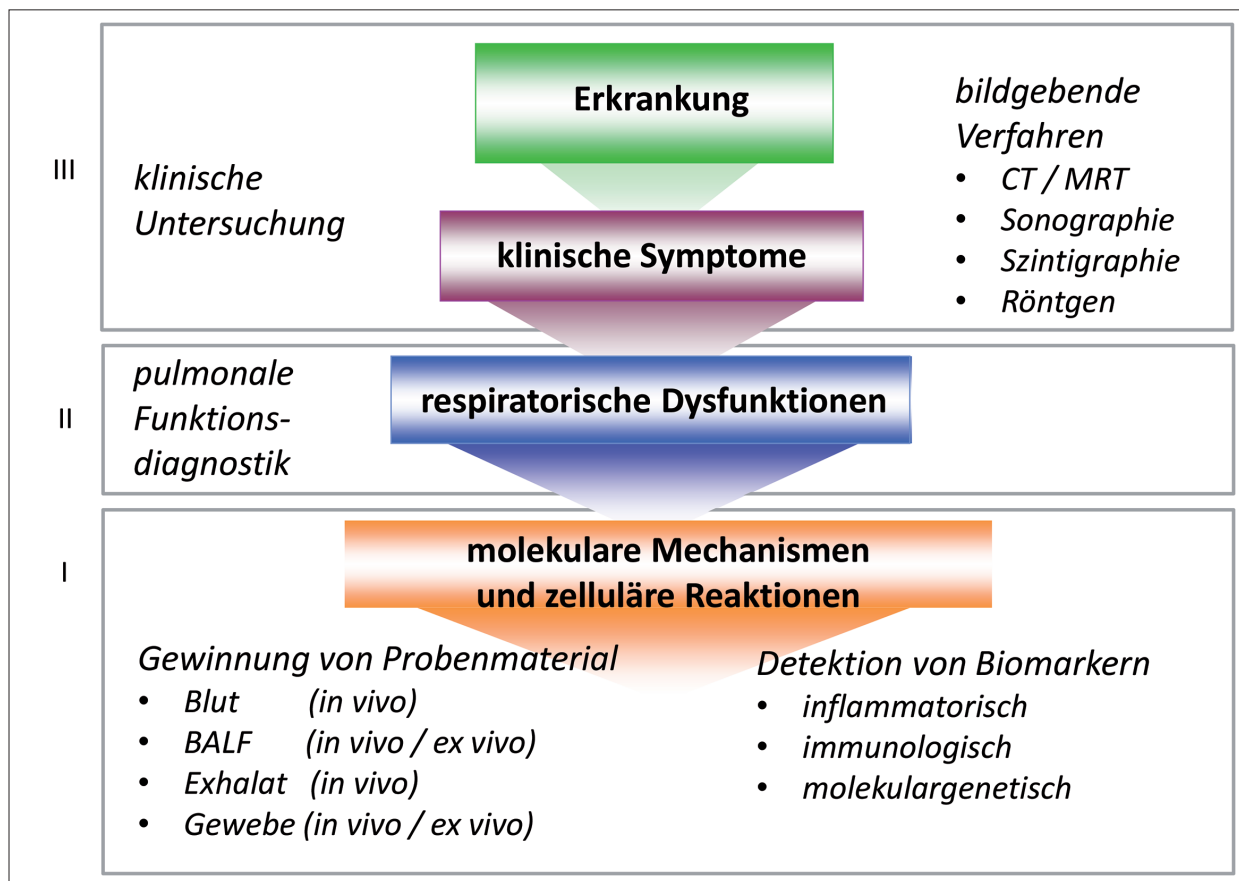


ABBILDUNG 2: Ebenen der Pathogenese einer respiratorischen Erkrankung. In der zeitlichen Abfolge beginnt eine respiratorische Erkrankung meist mit Veränderungen auf der molekularen/zellulären Ebene (I) bevor das betroffene Organsystem in seinen physiologischen Funktionen gestört ist (Ebene II). Die eigentliche Erkrankung wird in der Regel erst zu einem späteren Zeitpunkt durch klinische Symptome und Veränderungen des Gewebes sichtbar (Ebene III). Hierbei kann der zeitliche Ablauf – je nach Erkrankungstyp – zwischen wenigen Stunden bzw. Tagen bis hin zu Monaten oder Jahren variieren. Unter Berücksichtigung dieser ‚prinzipiellen‘ Ebenen von pathophysiologischen Reaktionen basiert eine wissenschaftlich fundierte Charakterisierung von respiratorischen Modellen darauf, dass neben den klinischen Symptomen, die das Krankheitsbild phänotypisch beschreiben, und den patho-morphologisch sichtbaren strukturellen Veränderungen auch Dysfunktionen des Organsystems und zelluläre Reaktionen (inkl. der zugehörigen molekularen Mechanismen) so gut wie möglich detektiert und quantifiziert werden. Eine Auswahl des Methodenspektrums, welches im Nutztiermodell zur Charakterisierung der jeweiligen pathogenetischen Ebene genutzt werden kann, ist in kursiver Schrift zugeordnet.

blutung der Lunge (Perfusionsstörung) oder eine lokale Inhomogenität zwischen Belüftung und Durchblutung (Distributionsstörung) für den Sauerstoffmangel im Blut verantwortlich sind, bleibt zunächst unerkannt (Tab. 4). Weiteren Aufschluss kann der arterielle CO₂-Partialdruck geben. Aufgrund der sehr guten Wasserlöslichkeit von CO₂ diffundiert dieses Atemgas selbst dann ungehindert aus dem Blut in den Alveolarraum, wenn die Diffusion für O₂ aus dem alveolären Gasgemisch in das Blut beeinträchtigt ist. Folglich wird es nur dann zu einem Anstieg von PaCO₂ (Hyperkapnie) kommen, wenn CO₂ infolge einer Ventilationsstörung nicht ausreichend gut abgeatmet werden kann. Im Gegensatz dazu mündet jede Hyperventilation in eine zu starke CO₂-Abatmung und folglich in eine Verarmung des Blutes an CO₂ (Hypokapnie). Der zusätzlich zu beiden Atemgasen messbare pH-Wert des Blutes lässt erste Rückschlüsse auf die Konsequenzen der Lungenbelüftung auf den Säuren-Basen-Status zu. Die alveolo-arterielle O₂-Partialdruckdifferenz (AaDO₂) erhöht sich bei primären Diffusions- und Perfusionsstörungen. Diese Kenngröße ist somit ein wei-

TABELLE 4: Differenzialdiagnostische Betrachtung der klinisch manifesten respiratorischen Insuffizienz auf Basis der arteriellen Blutgasanalyse (nach Reinhold 2001)

Ventilationsstörungen		Primäre Störung von		
a)	b)	Diffusion	Perfusion	Distribution
PaO ₂ ↓	PaO ₂ ↓	PaO ₂ ↓	PaO ₂ ↓	PaO ₂ ↓
PaCO ₂ ≈ od. ↓	PaCO ₂ ↑	PaCO ₂ ≈	PaCO ₂ ≈	PaCO ₂ ≈ od. ↑
pHa ≈ od. ↑	pHa ↓	pHa ≈	pHa ≈	pHa ↓
AaDO ₂ ≈	AaDO ₂ ≈	AaDO ₂ ↑	AaDO ₂ ↑	AaDO ₂ ↑

a) regionale alveoläre Hypoventilation mit kompensatorisch gesteigerter Hyperventilation noch gesunder Lungenabschnitte

b) alveoläre Hypoventilation (ohne kompensatorische Hyperventilation)

PaO₂: Sauerstoffpartialdruck im arteriellen Blut; PaCO₂: Partialdruck von Kohlendioxid im arteriellen Blut; pHa: pH-Wert des arteriellen Blutes; AaDO₂: Alveolo-arterielle Sauerstoff-Partialdruckdifferenz

≈: unverändert; ↓: vermindert; ↑: erhöht (Bezugsgröße ist jeweils der physiologischer Wert.)

terer hilfreicher Parameter, um Beeinträchtigungen des O₂-Transports von der Lunge in das Blut zu erkennen und bzgl. ihres Schweregrades zu quantifizieren.



ABBILDUNG 3: Nicht-invasive Lungenfunktionsdiagnostische Untersuchungen (Fotos: FLI). Links oben: Impulsoszillogometrie beim Schaf. Rechts oben: Rückatmungsmethode (Helium, CO) beim Kalb. Links unten: Kapnovolumetrie beim Schwein. Rechts unten: Atemgasanalyse bei der Ziege.

Aus methodischer Sicht ist die Gewinnung luftblasen-freien arteriellen Blutes von Großtieren je nach Tierart unterschiedlich schwierig. Unabhängig von der Punktionsstelle ist streng darauf zu achten, dass die Blutentnahme stets am ruhig atmenden Tier erfolgt. Im Falle einer Hyperventilation (z. B. bei Aufregung oder Verängstigung des Tieres) sind die Ergebnisse der Blutgasanalyse verfälscht. Für wiederholte Blutprobenentnahmen im Rahmen experimenteller Fragestellungen empfiehlt es sich deshalb, ein arterielles Gefäß zu katheterisieren und bei Blutentnahmen stets auf einen stressarmen Umgang mit dem Tier zu achten. Exemplarisch sei auf die Katheterisierung der Aorta abdominalis beim Kalb verwiesen, die erfolgreich in verschiedene respiratorische Infektionsmodelle implementiert wurde (Ostermann et al. 2013b, Lohr et al. 2016).

Da für Tierblutproben meist Blutgasanalysatoren aus der Humanmedizin verwendet werden, die bei Messtemperaturen von 37 °C arbeiten, ist es zwingend notwendig, die Messwerte für PO₂, PCO₂ und pH auf die tatsächliche Körpertemperatur des jeweiligen Tieres zu korrigieren. In grober Schätzung ist pro Grad Temperaturdifferenz mit einer Partialdruckdifferenz von etwa 0,5 kPa zu rechnen (Reinhold 2001), wobei die Partialdrücke für O₂ und CO₂ sich proportional zur Temperatur verhalten, während der pH-Wert mit steigender Temperatur absinkt. Damit wird klar: Jeder Blutgasanalyse hat die Messung der aktuellen Körpertemperatur des Einzeltieres vorauszugehen. Tierartabhängige Besonderheiten in Struktur und Funktion des Hämoglobins sind bekannt, werden aber bezüglich ihres Einflusses auf klinisch interpretierbare Ergebnisse der Blutgasanalyse als untergeordnet angesehen.

Ist ein arterieller Zugang aus versuchstechnischen Gründen nicht möglich oder angezeigt, so können selbst aus der Analyse venöser Blutproben einige Rückschlüsse auf den Säuren-Basen-Status, und im begrenzten Umfang auch über Sauerstoffdefizite im Organismus, gezogen werden, sofern diese erheblich sind (Berchtold et al. 2000). Dieser ‚vereinfachte‘ experimentelle Ansatz wurde u. a. in respiratorischen Infektionsmodellen an Schweinen und Kälbern belegt (Reinhold et al. 2010, Ostermann et al. 2014). Festzuhalten bleibt aber, dass die arterielle Blutgasanalyse nach wie vor der Goldstandard ist, um pulmonale Gasaustauschstörungen zu quantifizieren.

Nicht-invasive Methoden zur Einschätzung der arteriellen Sauerstoffversorgung des Blutes, wie Pulsoximetrie oder transkutane PO₂-Messungen, unterliegen an Tieren erheblichen messtechnisch bedingten Einschränkungen (Vorhandensein von Haaren und/oder Pigmentierungen der Haut, Bewegungsartefakte an wachen Tieren), sodass es im Experiment schwierig bis unmöglich ist, valide und reproduzierbare Messwerte zu generieren (Weber et al. 1992, Coghe et al. 1999).

Lungenfunktionsdiagnostik

Da funktionelle Störungen der äußeren Atmung mittels Blutgasanalyse nur ungenau differenziert werden können, ist eine weiterführende Lungenfunktionsdiagnostik erforderlich, um die vier Teilfunktionen der äußeren Atmung – Ventilation, Perfusion, Diffusion und Distribution – separat beurteilen zu können.

In der Humanmedizin verfügbare lungenfunktionsdiagnostische Verfahren sind dann an wachen (oder

TABELLE 5: Lungenfunktionsdiagnostische Verfahren und ihre Anwendung bei Wiederkäuern, Schweinen und Pferden

Messprinzip		Kenngrößen	Diagnostische Aussage	Tierart	Referenzen
Pneumotachografie Spirometrie (z. T. gekoppelt mit Gasanalyse)		Atemzugvolumen Atemfrequenz Atemminutenvolumen Atemstromstärke (Flow) z. T. Sauerstoff-Aufnahme	Atmungsmuster (Spontan- atmung) Atemzeit-Quotient spezifische Ventilation	Schwein Rind (Kalb) Schaf/Ziege Pferd	Gustin et al. 1988 Hildenbrand 2010 Klein und Reinhold 2001 Klein et al. 2003, 2006 Lohr et al 2016 Ostermann et al. 2014
Atmungs- mechanik	Forcierte Oszillations- Technik (FOT) Impuls-Oszillo- resistometrie- System (IOS)	Atemwiderstände: respiratorische Impedanz respiratorische Resistance respiratorische Reactance	Obstruktionen/Restrik- tionen (Strömungswiderstände, Dehnbarkeitswiderstände)	Schwein Rind (Kalb) Schaf/Ziege Pferd	Püllen et al. 2014, 2015 Reinhold 1997b Reinhold et al. 1998a,b Richard et al. 2009 Van Erck et al. 2006 Wagner et al. 2011 Young und Tesarowski 1994
	Unterbrecher- methode	Atemwegs-Resistance	Strömungswiderstand	Schaf	Ganter et al 1997
	Oesophagus- ballon-Methode	Atemwiderstände: pulmonale Resistance dynamische Compliance	Obstruktionen/Restrik- tionen (Strömungswiderstände, Dehnbarkeitswiderstände)	Schwein Rind (Kalb) Schaf/Ziege Pferd	Art und Lekeux 1988 Bakima et al 1988 Reinhold 1997a
Volumetrische Kapnografie		CO ₂ -Elimination Totraum- volumina	ventilatorische Vertei- lungsstörungen	Schwein Kalb Pferd	Wagner 2011 Reißig 2007 Herholz et al. 2003
Fremdgas- Rückatmung	Helium (Dilution)	Funktionelle Residual- kapazität (FRC)	„trapped air“ bzw. Emphysem	Schwein Kalb	Hildenbrand 2010 Kneucker 2008
	Kohlenmonoxid (Diffusion)	Transferfaktor der Lunge für CO	Diffusionskapazität der Lunge	Schaf Pferd	Reinhold et al. 2008b Bedenice et al. 2004 Hoffman et al. 2005 Mauderly 1974 McNeil et al. 1989, 1991

leicht sedierten) Tieren anwendbar, wenn auf ein willkürliches Atemmanöver verzichtet werden kann, d. h. wenn mitarbeiters unabhängig und unter Spontanatmung gearbeitet wird. Aus technischer Sicht sind entsprechende gerätetechnische Lösungen relativ unkompliziert an jene Tierarten adaptierbar, deren Lungenvolumina und Atemströme denen von Menschen (Kind bis Erwachsener) ähneln. Folglich sind pneumologische Untersuchungen an Tieren mit Körpermassen zwischen ca. 20 und 100 kg (Schweine, Kälber, Schafe, Ziegen) möglich. Die ermittelten diagnostischen Kenngrößen entsprechen direkt denen der humanen Patienten, was die Akzeptanz und Vergleichbarkeit der Ergebnisse aus Tierversuchen erhöht. Da das lungenfunktionsdiagnostisch zu untersuchende Tier lediglich eine geeignete Atemmaske tolerieren muss, welche die Verbindung zum Gerätesystem darstellt, aber den spontanen Atemfluss in keiner Weise beeinträchtigt, ist die eigentliche Untersuchung nicht-invasiv. Die meisten Tiere reagieren lediglich beim ersten Kontakt mit der Maske etwas nervös und gewöhnen sich dann sehr schnell daran. Folglich sollte im Experiment immer eine ‚Trainingsmessung‘ vorgeschaltet werden, bevor versuchsrelevante Daten generiert werden. Im Zusammenhang mit lungenfunktionsdiagnostischen Untersuchungen an Schafen zeigten die im Blut ermittelten Cortisol-Konzentrationen, dass dieses Stresshormon insbesondere dann anstieg, wenn das Prozedere für die Tiere noch neu war (Hildenbrand 2010).

Die einfachsten Kenngrößen der Spontanatmung (Atemzugvolumen, Atemfrequenz, Atemminutenvolumen, Atemstromstärke) können mittels Spirometrie bzw. Pneumotachografie ermittelt werden. Wird parallel dazu die CO₂-Ausatemungskurve gegen das exhalierete Volumen aufgezeichnet (volumetrische Kapnografie), so kann zwischen Totraumbelüftung und alve-

olärer Belüftung differenziert werden. Rückatmungsmethoden unter Verwendung von Fremdgasen (Helium, Kohlenmonoxid) erlauben die Abschätzung des am Ende der Ausatmung in der Lunge verbliebenen Gasvolumens (FRC, funktionelle Residualkapazität) und der Diffusionskapazität der Lunge (CO-Transferfaktor). Atmungsmechanische Untersuchungen erlauben Rückschlüsse auf die in der Lunge vorherrschenden Strömungswiderstände und Dehnbarkeits-eigenschaften. Hierfür stehen verschiedene Messprinzipien zur Verfügung, von denen insbesondere das Impuls-Oszilloresistometrie-System (IOS) für die Anwendung an verschiedenen Nutztierspezies validiert wurde.

Tabelle 5 gibt einen Überblick über lungenfunktionsdiagnostische Verfahren, die an landwirtschaftlichen Nutztieren praktikabel sind und bislang im Zusammenhang mit respiratorischen Infektions-Modellen zum Einsatz kamen. Abbildung 3 veranschaulicht die praktische Durchführung von lungenfunktionsdiagnostischen Untersuchungen an landwirtschaftlichen Nutztieren, wobei alle dargestellten Verfahren prinzipiell bei allen genannten Tierarten anwendbar sind.

Die Nutzung der Ganzkörperplethysmografie als lungenfunktionsdiagnostisches Verfahren, welches häufig in experimentellen Modellen an Nagern eingesetzt wird, wird für landwirtschaftliche Nutztiere nicht empfohlen. Obwohl dieses ebenfalls nicht-invasive Messprinzip für Schweine (Halloy et al. 2004), Schafe (Hoffman et al. 2005), Katzen (Kirschvink et al. 2006), Hunde (Talavera et al. 2006) und selbst Pferde (Beadle 1985) beschrieben wurde, ist es unter tierexperimentellen Bedingungen wenig praktikabel, ein größeres Tier wiederholt in eine starre und luftdicht abgeschlossene Kabine bzw. Kammer zu verbringen und so lange darin zu belassen, bis eine repräsentative Anzahl auswertbarer Atemzüge aufgezeichnet wurde. Darüber hinaus ist die diagnostische

Aussage a priori eingeschränkt, da unter Spontanatmung lediglich das Atmungsmuster registriert werden kann. Der daraus resultierende Parameter ‚Penh‘ (enhanced pause) ist bezüglich seines Informationsgehaltes wenig spezifisch und keineswegs geeignet, um obstruktive Ventilationsstörungen (erhöhte Strömungswiderstände) oder Restriktionen (verminderte Dehnbarkeiten des Lunge-Thorax-Systems) zu differenzieren (Bates et al. 2004).

Ergometrie/Ergospirometrie

Da die Partialdrücke von O₂ und CO₂ im arteriellen Blut (sowie der zugehörige pH-Wert) die Regelgrößen der Ventilation darstellen, welche der Organismus unter allen Bedingungen im Normbereich zu halten versucht, werden die Kenngrößen der Blutgasanalyse erst dann abweichende Werte aufweisen, wenn die kompensatorischen Leistungen der äußeren Atmung überfordert sind. Deshalb bedeuten unter Ruhebedingungen im Normbereich liegende PaO₂- und PaCO₂-Werte noch nicht zwangsläufig Lungengesundheit. Im Gegenteil, eine klinisch latente respiratorische Insuffizienz lässt sich erst dann nachweisen, wenn der Sauerstoffverbrauch des Organismus ansteigt und dem respiratorischen System Leistungssteigerungen abverlangt werden, denen es nicht mehr vollständig gerecht werden kann. Folglich ist die definierte motorische Belastung (z. B. auf geeigneten Laufbändern) – kombiniert mit spirometrischen und blutgasanalytischen Untersuchungen – ein geeignetes Verfahren, um subklinische Dysfunktionen der äußeren Atmung bei scheinbar klinisch unauffälligen Tieren sicher zu detektieren. Bei Pferden mit Leistungsbeeinträchtigungen sind lungenfunktionsdiagnostische Untersuchungen vor und nach motorischer Belastung ein gängiger diagnostischer Ansatz. Unter experimentellen Bedingungen ist der diagnostische Zugewinn durch Laufbanduntersuchungen zur Erkennung von subklinisch Lungenkranken u. a. für Kälber beschrieben (Höchel 2003).

Bildgebende Verfahren

Bronchoskopie

Die Bronchoskopie bzw. bronchologische Endoskopie dient der adspektorischen Exploration des Tracheobronchialbaumes. Hierbei können Farbe und Gefäßinjektion der Tracheal- und Bronchialschleimhaut, das Aussehen und die Beschaffenheit von Sekreten oder Mukus sowie das eventuelle Vorhandensein von Fremdkörpern oder Neubildungen beurteilt werden.

Die Nutzung fiberoptischer Endoskope zur Tracheobronchoskopie bei den verschiedensten Tierarten hat seit den 1980er Jahren Eingang in die Veterinärmedizin gefunden. Der Einsatz dieser Technik kann unter optimalen Bedingungen am unsedierten Tier erfolgen, oft empfiehlt sich aber eine medikamentelle Ruhigstellung. Für bronchoskopische Untersuchungen an stehenden Kälbern, Ziegen oder adulten Schafen über den ventralen Nasengang wird im Schrifttum die Verwendung eines Endoskopes mit einem Durchmesser von 8 - 9 mm und eines anästhetisch wirkenden Nasensprays empfohlen. Endoskope mit einem Durchmesser von etwa 12 mm, die bei adulten Rindern durch den Nasengang passen, müssten bei Kälbern und kleineren Wiederkäuern allerdings über das Maul eingeführt werden, wofür eine Allgemeinanästhesie notwendig ist (Prohl et al. 2014).

Allgemein gilt die Bronchoskopie – trotz ihres semi-invasiven Charakters – bei Mensch und Tier als ein rela-

tiv komplikationsloses und wiederholbares Verfahren. An nicht-anästhesierten Tieren sind kaum Nebenwirkungen beschrieben und die Belastung der Tiere durch das Prozedere wird als mäßig eingeschätzt (Kahl und Hoffmann 1985a,b). Allerdings sollten Experimentatoren berücksichtigen, dass das Einbringen eines Endoskops in den Tracheo-Bronchialraum funktionelle Konsequenzen für das betreffende Tier nach sich ziehen kann. Nach Kenntnissen aus der Humanmedizin erzeugt jede Bronchoskopie eine vorübergehende unspezifische bronchiale Hyperreagibilität. Außerdem können Schleimhautirritationen und – über eine Verminderung der Zilienschlagfrequenz – auch eine Beeinträchtigung der mukoziliären Clearance auftreten, wodurch wiederum Atemwegsinfekte begünstigt werden (Petro et al. 1987). Folglich verbietet sich in einem guten Studiendesign die Aufeinanderfolge von bronchoskopischen und lungenfunktionsdiagnostischen Methoden an ein und demselben Tier.

Sonografie

Die Ultraschall-Untersuchung der Lunge ist aus physikalischer Sicht limitiert, denn Knochen und Luft sind für Ultraschallwellen undurchlässig und schallauslöschend. Deshalb lässt sich bei einer gesunden und gut belüfteten Lunge nur die Brustwand – einschließlich der Pleura – sonografisch darstellen. Veränderungen des Lungengewebes sind der transthorakalen Ultraschallbildgebung nur dann zugänglich, wenn sie mit einem verminderten Luftgehalt des Gewebes einhergehen und außerdem in ihrer räumlichen Ausdehnung bis an die Thoraxwand heranreichen (Heinritzi und Beisl 1995, Rabeling et al. 1998).

Vorteile der Sonografie sind ihre Nicht-Invasivität, die fehlende Strahlenbelastung und das meist transportable Equipment. Mit Hilfe eines geeigneten Ultraschall-Scanners ist es möglich, einzelne Interkostalräume systematisch zu durchmustern. Während Kälber im unsedierten Zustand untersucht werden können (Rabeling et al. 1998), ist die Anwendung der Sonografie am Ferkel bzw. Läuferschwein nur in Seitenlage, also entweder am tief sedierten (Klein 1999) oder anästhesierten (Heinritzi und Beisl 1995) Tier möglich.

Im direkten Vergleich von Sonografie und Lungenfunktionsdiagnostik an ein und demselben Tier konnte exemplarisch bei Kälbern nach experimentell induzierter Infektion der Lunge belegt werden, dass jede Methode erwartungsgemäß eine sehr spezifische Aussagekraft hat und dass kaum Korrelationen zwischen den jeweiligen Befunden bestehen. Während lungenfunktionsdiagnostische Verfahren die Eigenschaften der belüfteten Lungenanteile widerspiegeln, lokalisiert die Bildgebung Veränderungen des (in der Regel nicht oder minderbelüfteten) Lungengewebes in der räumlichen bzw. flächenhaften Ausdehnung (Reinhold et al. 2002). Beide Methoden liefern folglich in vivo komplementäre Informationen, die ihrerseits wiederum einen diagnostischen Mehrwert zur klinischen Untersuchung darstellen.

In Tierexperimenten bietet die Sonografie noch weitere Vorteile. Unter Sichtkontrolle können transthorakale Biopate für weiterführende Untersuchungen gewonnen (Heinritzi und Beisl 1995, Braun et al. 1999) oder Ultraschall-gestützte endoskopische lungenchirurgische Verfahren durchgeführt werden (Wolfram et al. 2014). Beim Vorhandensein eines Pneumothorax sind selbst kleinste intrapleurale Lufteinschlüsse mit hoher Genauigkeit zu

detektiert, wie in der experimentellen Pneumologie für die Tierart Schwein beschrieben (Oveland et al. 2013).

Klassisches Thorax-Röntgen und moderne Verfahren

Werden als bildgebendes Verfahren röntgenologische Thoraxaufnahmen in ein Studiendesign integriert, so sind zur Beurteilung bzw. Befundung solide Kenntnisse über tierartspezifische Besonderheiten der Lungenstruktur vonnöten. Beispielsweise ist die ausgeprägte Segmentanatomie von porcinen und bovinen Lungen mit auffälligen interstiellen Strukturen innerhalb der Lunge assoziiert (McLaughlin et al. 1961). Dieser – im Vergleich zur humanen Lunge oder zu den Lungen von Katzen und Hunden – große physiologische Anteil an Bindegewebe sollte nicht irrtümlicherweise als Zeichen einer interstiellen Pneumonie interpretiert werden.

Nach Untersuchungen von Slocombe et al. (1988) an Kälbern kann von thorakalen Röntgenbildern die beste diagnostische Qualität dann erwartet werden, wenn das in der Lunge enthaltene Luftvolumen so groß wie möglich ist (d. h. optimalerweise nach maximaler Inspiration). Solche Untersuchungsbedingungen sind jedoch bei Tieren nur unter Narkose und künstlicher Beatmung sicherzustellen.

Szintigrafie sowie Computer-, Magnetresonanz- und Positronen-Emissions-Tomografie (CT, MRT, PET) sind weitere bildgebende Verfahren, welche jedoch nur in sehr spezialisierten Forschungseinrichtungen bzw. in enger Kooperation mit der Humanmedizin an größeren Tierarten eingesetzt werden können (Hoffman et al. 2005).

Gewinnung biologischer Proben aus dem Respirations-trakt in vivo

Gewinnung von Probenmaterial aus dem Nasen-Rachen-Raum

Die häufigsten Indikationen zur Gewinnung von Probenmaterialien aus dem Nasen-Rachen-Raum sind mikrobiologische Untersuchungen. Die entsprechenden Untersuchungsmaterialien können in der Regel an nicht sedierten Tieren gewonnen werden. Ihre diagnostische Aussage ist auf die extra-thorakal gelegenen, oberen Atemwege limitiert.

- Ein Routineverfahren ist die Gewinnung von nasalen Tupferproben (umgangssprachlich: Nasentupfer). Nach Reinigung der Nasenöffnung (zur Vermeidung von Verunreinigungen und Fremdkontaminationen) wird ein steriler Tupferträger in den ventralen Nasengang eingeführt, leicht gedreht und anschließend zurückgezogen. Mit den traditionellen an einem Holzstab befestigten Zellstoff- oder Watte-Tupfern der beschriebenen Länge lässt sich lediglich Nasensekret gewinnen, welches für einfache bakteriologische Basis-Untersuchungen genutzt werden kann (Heckert et al. 1999).
- Ein gezielter Nachweis intrazellulärer Erreger (z. B. Viren, Chlamydien) erfordert die Gewinnung lebender Zellen durch tief intranasal oder naso-pharyngeal gewonnene Zellabstriche. Hierfür wird ein längerer flexibler Führungsstab mit rauem bzw. bürstenähnlichem Tupfer-Material verwendet. Am gut fixierten bzw. leicht sedierten Tier kann im hinteren ventralen Nasengang oder im Rachenbereich durch leichte Dreh- und Wischbewegungen ein Zellabrieb erreicht werden, wodurch sich der Tupfer leicht rosa färbt (Heckert et al. 1999).

- Als ein weiteres Verfahren zur Probengewinnung aus dem Bereich der Nasenhöhlen ist die Gewinnung nasaler Lavageflüssigkeit (welche zur mikrobiologischen wie auch zur zytologischen Untersuchung geeignet ist) durch nasale Spülung mittels NaCl-Lösung beschrieben (Wilkie und Markham 1981).

Gewinnung von Probenmaterial aus den großen Atemwegen

Probenmaterialien aus den großen Atemwegen repräsentieren im Wesentlichen die Verhältnisse in der Trachea sowie in den Haupt- und Segmentbronchien, wobei das Hauptziel der Probengewinnung ebenfalls die mikrobiologische Diagnostik ist. Bei größeren Tierarten stehen folgende Methoden zur Gewinnung von biologischen Materialien aus diesen teilweise extrathorakal und teilweise intrathorakal gelegenen Atemwegen zur Verfügung:

- Gewinnung von Trachealtupfern: Unter Verwendung eines Maulgatters, eines Röhrenspekulum, einer Lichtquelle und eines geeigneten Tupfer-Systems ist es möglich, unter sterilen Bedingungen einen Schleimhautabstrich im Bereich der oberen Trachea zu gewinnen. Dieses Probenmaterial repräsentiert vorwiegend tracheales Schleimhautsekret sowie abgestorbenes Zellmaterial und wird – bei gezielter Auswahl unterschiedlicher Tupfersysteme – sowohl für die bakteriologische als auch für die virologische Diagnostik als geeignet angesehen (Heckert et al. 1999).
- Die Gewinnung von Tracheo-Bronchialsekret (TBS) erfolgt durch Aspiration oder Absaugen von Sekret aus der Trachea und den großen Bronchien mittels einer Kanüle oder Sonde ohne eine vorherige Instillation von Flüssigkeit. Somit wird eine unverdünnte Probe des trachealen Mukus gewonnen. Die TBS-Gewinnung erfordert eine Sichtkontrolle und wird deshalb meist mit einer endoskopischen Untersuchung der Atemwege kombiniert. In dieser Form wurde die Gewinnung von TBS-Proben sowohl an Pferden (Hermann et al. 1988, Winder et al. 1990, Pellegrini et al. 1998, May und Gehlen 2009) als auch an Rindern (Scholz et al. 1987a, 1987b) beschrieben.
- Die Gewinnung von (trans)trachealer- oder tracheo-bronchialer Spülflüssigkeit kann erfolgen, indem ein bestimmtes Flüssigkeitsvolumen, welches in der Regel geringer gewählt wird als bei einer broncho-alveolären Lavage, in den kaudalen Teil der Trachea verbracht und anschließend wieder aspiriert wird. Eine endoskopische Sichtkontrolle ist nicht unbedingt erforderlich. Die Lokalisation der Probenherkunft wird durch die Vordringtiefe bzw. das Platzieren des zur Instillation der Spülflüssigkeit verwendeten Katheters bestimmt. Die Durchführung einer tracheo-bronchialen Lavage bei Fohlen und adulten Pferden ist vielfach dokumentiert (Whitwell und Greet 1984, Larson und Busch 1985, Crane et al. 1989, May und Gehlen 2009). Bei Kälbern und adulten Rindern sind transtracheale Spülungen ebenfalls beschrieben (Fischer et al. 1987, Pringle 1992, Heckert et al. 1999, Tortorelli et al. 2017). Um Kontaminationen aus dem Nasopharynx zu vermeiden, wird von den genannten Autoren übereinstimmend empfohlen, die Trachea – nach Reinigung, Rasur, Desinfektion und Anästhesie der Punktionsstelle – im mittleren Halsdrittel zwischen zwei Trachealringen zu punktieren. Durch die Kanüle kann das Vorschieben eines sterilen und flexiblen Kunststoff-

katheters in Richtung Luftröhrengabelung erfolgen. Sterile Spülflüssigkeit (meist 0,9 %ige NaCl-Lösung) wird instilliert und durch sofortiges Wiederansaugen rückgewonnen.

Gewinnung von Probenmaterial aus den peripheren Atemwegen und dem Lungengewebe

Das diagnostische Repertoire, um unter Sichtkontrolle biologische Proben aus den peripheren Atemwegen und dem Lungengewebe größerer Tierarten zu gewinnen, ist weitgehend identisch mit den in der Humanmedizin verwendeten Techniken. Entsprechende bronchoskopische Untersuchungen können an leicht sedierten Großtieren (Pferde, Rinder, Schafe, Ziegen) in stehender Körperhaltung durchgeführt werden; bei Schweinen, Hunden, Katzen empfiehlt sich eine Allgemeinanästhesie. Allerdings erfordert das Navigieren in der jeweiligen Lunge spezielle Kenntnisse über die tierart-spezifischen Aufzweigungen des Bronchialbaumes und die anatomischen Besonderheiten der Lungenstruktur. Entsprechende Beschreibungen für Schweine und Kälber finden sich bei Judge et al. (2014) und Prohl et al. (2014).

Im Gegensatz zu den Labornagern ist es bei den größeren Tierarten möglich, verschiedene biologische Proben zeitgleich aus unterschiedlichen Lokalisationen im Respirationstrakt zu gewinnen. Wie auch beim Menschen sind die Probennahmen wiederholbar, sodass intra-individuelle Änderungen im zeitlichen Ablauf einer Studie beurteilt werden können. Folgende Proben kommen in Betracht:

- Broncho-alveoläre Lavageflüssigkeit: Nach Einführung des Verfahrens der broncho-alveolären Lavage (BAL) durch Reynolds und Newball (1974) am Menschen ist dessen Stellenwert als diagnostisches Routineverfahren in der Humanmedizin aus heutiger Sicht unumstritten. Das Prinzip besteht darin, durch fraktioniertes Spülen peripherer Atemwege und der strukturell nachgeordneten Alveolarbezirke ein Probenmaterial zu gewinnen, welches geeignet erscheint, die Gegebenheiten des peripheren respiratorischen Systems widerzuspiegeln. Die rückgewonnene broncho-alveoläre Lavageflüssigkeit (BALF) wird mittels zytologischer, biochemischer, mikrobiologischer oder molekularbiologischer Untersuchungstechniken weitergehend analysiert, um Rückschlüsse auf strukturelle Veränderungen und/oder funktionelle Eigenschaften der Lungenperipherie ziehen zu können. Da Videoendoskope heutzutage auch für die Veterinärmedizin verfügbar sind, ist die Methodik der segmentalen BAL unter Sichtkontrolle an alle Tierarten adaptierbar. Variationen ergeben sich aus der Wahl des verwendeten Spülmediums und der instillierten Menge an Spülflüssigkeit. Vergleichende Betrachtungen mit Blick auf experimentelle Fragestellungen und methodische Aspekte zur BAL beim Menschen und bei diversen Tierarten (Nager, landwirtschaftliche Nutztierarten wie Schwein, Rind und Schaf, Hund und Katze, Pferd) standen bei einem interdisziplinären Workshop im Fokus, dessen Inhalte in der Zeitschrift ‚Pneumologie‘ publiziert wurden (Reinhold et al. 2005a). Eine Video-Publikation jüngeren Datums veranschaulicht das methodische Vorgehen bei der BAL am anästhesierten Kalb (Prohl et al. 2014). Erwähnenswert für die Tierarten Schwein und Rind ist, dass BALF-Befunde zwar die Gegeben-

heiten im gespülten Lungensegment widerspiegeln, dass diese Befunde – aufgrund der stark segmentierten Feinstruktur der Lungen dieser beiden Tierarten (McLaughlin et al. 1961) – jedoch keineswegs als repräsentativ für andere Lungenbereiche oder gar das ganze Organsystem angesehen werden dürfen. Aus diesem Grunde besteht bei der Durchführung einer BAL ohne Sichtkontrolle bei den o. g. Spezies die Gefahr, dass – selbst bei Tieren mit klinisch manifester Pneumonie – ein Bereich der Lunge gespült wird, der gar nicht in das Entzündungsgeschehen involviert ist. Hieraus resultieren Ergebnisse, die zwar für den lavagierten Bereich zutreffen, aber bezogen auf das klinische Geschehen als ‚falsch negativ‘ zu bewerten sind (Reinhold et al. 1992).

Wie bereits erwähnt, können die Atemwege durch Intubationen und bronchoskopische Manipulationen mechanisch irritiert werden (Puyo et al. 2008). Auch der pulmonale Gasaustausch und die Sauerstoffversorgung des arteriellen Blutes vermindern sich nach Bronchoskopie und BAL (Golpe und Mateos 2005). Des Weiteren ist bekannt, dass im gespülten Lungenbereich das Surfactant-System beeinträchtigt und ein Einstrom von neutrophilen Granulozyten induziert wird, sodass eine inflammatorische Reaktion entsteht, die über mindestens vier Tage persistiert (Muggenburg et al. 1972, Killingsworth et al. 1987, Sweeney et al. 1994, Lakritz et al. 1997). Aus all den genannten Gründen verbieten sich in einem guten Studiendesign zeitnahe lungenfunktionsdiagnostische Untersuchungen und die wiederholte Gewinnung von BALF an aufeinander folgenden Tagen aus demselben Lungensegment. Für Pferde ist beschrieben, dass der zeitliche Abstand zwischen zwei aufeinanderfolgenden BAL mindestens 72 Stunden betragen sollte (McGorum und Dixon 1994); die o. g. Tatsachen spreche eher für längere Intervalle.

Als unerwünschte Nebenwirkung einer BAL und als Ausdruck der o. g. induzierten Entzündungsantwort kann in Einzelfällen auch eine transiente Erhöhung der Körpertemperatur im Sinne eines kurz andauernden, nicht behandlungsbedürftigen Fiebers auftreten (Fey 2005).

• Biopate:

- a) Bei der Asservierung von endobronchialen Biopsiematerial nutzt man den Arbeitskanal des Bronchoskops, um Instrumente wie Bürsten oder Zangen innerhalb des Lumens der Atemwege so zu platzieren, dass eine Probenentnahme aus dem Bronchiallumen bzw. von der inneren Bronchialwand ermöglicht wird. Bürstenbiopate für nachfolgende zytologische Untersuchungen werden gewonnen, indem ein Bereich von etwa 3–4 cm² des die Atemwege auskleidenden Epithels mechanisch abgebürstet und der entsprechende Zellabstrich entweder auf einem Objektträger ausgestrichen oder in ein flüssiges Trägermedium überführt wird. Bei der Zangenbiopsie wird an einer Bifurkation von Bronchien das umgebende Lungenparenchym mittels einer ‚Krokodilzange‘ erfasst und als Biopat entnommen (Beschreibung für beide Probennahmen beim Kalb bei Prohl et al. 2014).
- b) Mittels transbronchialer Biopsie-Methoden lässt sich Probenmaterial auch außerhalb des Atemwegslumens gewinnen. Bei der transbronchialen Zangenbiopsie wird an einer Bifurkation von kleineren Bronchiolen das umgebende Lungenparenchym mittels einer ‚Krokodilzange‘ erfasst und als Biopat entnommen.

Letzteres stammt folglich aus tieferen Atemwegsgenerationen und enthält außerdem auch subepitheliale Strukturen. Mit der Verfügbarkeit ultradünner Fibero bronchoskope für die Humanmedizin kann mit dieser Methode bis in die peripherer gelegenen Atemwege der 13. Atemwegsgeneration vorgedrungen werden (Kikawada et al. 1998). Bei Großtieren ist die Beurteilung und Beprobung tieferer Atemwegsgenerationen dadurch erschwert, dass kaum ausreichend lange Endoskope mit geeignetem Durchmesser zur Verfügung stehen.

- c) Eine in der Humanmedizin verbreitete Methode, welche transbronchial, transösophageal oder transthorakal ausgeführt werden kann, ist die Feinnadel- oder Aspirationsbiopsie (fine needle aspiration), welche aber ausschließlich unter Sichtkontrolle mittels Ultraschall oder Computertomografie möglich ist. Die hierbei verwendeten Punktionsnadeln sind so dünn, dass einzelne Zellen durch Ansaugen gewonnen werden können (Fritscher-Ravens 2000). Der Vorteil gegenüber anderen Verfahren besteht in der geringeren Komplikationsrate (Strausz et al. 1998, Obata et al. 1999). Sind die entsprechenden methodischen Voraussetzungen gegeben, kann auch dieses schonende Verfahren in Tierexperimente implementiert werden.
- d) Die Bezeichnungen perthorakale Biopsie oder perkutane transthorakale Biopsie charakterisieren eine Gewinnung von Gewebeproben aus dem respiratorischen System, die mittels einer Nadel via Punktion der Thoraxwand erfolgt. Werden transthorakale Lungenbiopsien nicht mit den bereits erwähnten feinen Aspirationsnadeln, sondern mit schneidenden Nadeln durchgeführt, so ist die Entnahme größerer Gewebeverbände möglich. Dieses Verfahren ist innerhalb des veterinärmedizinischen Schrifttums für die Tierart Rind am häufigsten beschrieben (Pringle 1992, Braun et al. 1999). Aus diagnostischer Sicht ist der Wert eines ‚blind‘ (d. h. ohne Sichtkontrolle) entnommenen Biopates aus dem Lungengewebe von Rindern oder Schweinen eher als gering einzuschätzen, da die Segmentanatomie dieser Lungentypen (McLaughlin et al. 1961) es nicht erlaubt, Befunde des lokal beprobten Lungensegments auf andere Segmente oder gar auf das ganze Organsystem zu übertragen. Der höchste diagnostische Wert ist beim Vorhandensein von generalisierten Lungenerkrankungen (z. B. bei interstitieller Pneumonie) zu erwarten (Pringle 1992). Um gezielt transthorakale Lungenbiopate am lebenden Tier zu gewinnen, bedarf es sowohl beim Rind als auch beim Schwein einer Ultraschallkontrolle (Heinritzi und Beisl 1995, Braun et al. 1999), was insbesondere im Spitzenlappenbereich nur eingeschränkt möglich ist. Obwohl von den meisten Autoren als eine für das Tier sichere diagnostische Methode eingeschätzt, besteht trotzdem ein nicht unerhebliches Risiko für Nachblutungen, Pneumothorax oder Kreislaufkollaps (Pringle 1992), sodass in tierexperimentellen Studien den weniger invasiven bronchoskopischen Verfahren der Vorzug gegeben werden sollte.

Exhalierte Biomarker

Die während eines jeden Atemzyklus ausgeatmete ‚Luft‘ beinhaltet nicht nur das expiratorische Gasgemisch, sondern auch vom Oberflächenfilm der Atemwege

mitgerissene Partikel, flüchtige organische Substanzen (volatile organic compounds, VOC) und Flüssigkeitsbestandteile, welche im dampfförmigen Zustand von den Atemwegen an die Umgebung abgegeben werden. Die Suche nach exhalierten Biomarkern ist ein hochaktueller Forschungsgegenstand in der Human- wie auch Veterinärmedizin. Der aktuelle Stand dieses diagnostischen Ansatzes sowie der weitere Forschungsbedarf sind jüngst von einer Task Force der European Respiratory Society (ERS) zusammengefasst worden (Horvath et al. 2017).

Im translationalen Kontext trugen insbesondere Untersuchungen an Kälbern, Schweinen und Ziegen entscheidend dazu bei, verschiedenste physiologische Ursachen für die Variabilität exhalierten Substanzen aufzuklären, die für Mensch und Tier gleichermaßen relevant sind und deren Kenntnis von entscheidender Bedeutung für eine standardisierte Gewinnung dieses interessanten Probenmaterials ist (Reinhold und Knobloch 2010, Fischer et al. 2015a,b). Die Gewinnung und Analyse von Exhalat wurde selbst für das ‚klassische‘ Versuchstier Maus etabliert und in experimentellen Modellen bakterieller respiratorischer Infektionen angewandt (Bean et al. 2014, 2015). Für Rückschlüsse auf metabolische Marker in der Ausatemluft liegen Berichte an zahlreichen Tierspezies vor, von der Maus (Kistler et al. 2014, 2016) über das Pferd (Chan et al. 2016) bis zum Delphin (Aksenov et al. 2014, Zamuruyev et al. 2016). Hinweise für exhalierte Marker von Mykobakterien-Infektionen stammen aus caprinen Modellen (Purkhart et al. 2011, Bergmann et al. 2015).

Wird das Konzept, Biomarker von Erkrankungen sicher in der Ausatemluft detektieren zu können, eines Tages praxisreif, so steht für Tiere und Menschen eine nicht-invasive und wiederholbare diagnostische Methode zur Verfügung, die sowohl für den klinischen Einsatz als auch für die Charakterisierung experimenteller Modelle geeignet ist. Abbildung 3 veranschaulicht die Gewinnung von Exhalat an der Ziege unter experimentellen Bedingungen. Ein Prototyp zur Atemgasanalyse in Echtzeit und dessen Anwendung an landwirtschaftlichen Nutztieren wurde kürzlich beschrieben (Küntzel et al. 2018)

Charakterisierung respiratorischer Modelle nach Beendigung der In-vivo-Phase

Das Ende eines Tierversuches ist in vielen Fällen durch die Euthanasie und Sektion der Versuchstiere geprägt. Der Vollständigkeit halber sei erwähnt, dass nur zugelassene Tötungsmethoden angewandt werden dürfen (TierSchVersV).

Die nachfolgenden Ausführungen fassen den gängigen Wissensstand zur pathologischen Befundung und Beprobung gezielt unter versuchstierkundlichen Aspekten zusammen.

Gewinnung von BALF an der frisch exenterierten Lunge

Broncho-alveoläre Lavageflüssigkeit für nachfolgende zytologische, biochemische, mikrobiologische oder molekulargenetische Untersuchungen kann auch im Zusammenhang mit der Euthanasie des betreffenden Tieres gewonnen werden. Um jegliche Aspirationen von Blut oder Futterbestandteilen in die Lunge (und damit Verunreinigungen der BALF) sicher zu vermeiden, ist



ABBILDUNG 4: Vorbereitung und Durchführung einer broncho-alveolären Lavage an der exenterierten bovinen Lunge (Fotos: FLI). Links oben: Abklemmen der Trachea. Rechts oben: Durchführung der broncho-alveolären Lavage. Links unten: Rückgewinnung der broncho-alveolären Lavageflüssigkeit (BALF) inkl. Erfassung des rückgewonnenen Flüssigkeitsvolumens je Spülvorgang. Rechts unten: Optische Kontrolle der Qualität der BALF und Asservierung für nachfolgende Untersuchungen.

es unabdingbar, dass unter tiefer Allgemeinanästhesie und möglichst in einer Inspirationsphase die Trachea des betreffenden Tieres zunächst durch Abklemmen verschlossen wird (Reinhold et al. 1992; Abb. 4), bevor die finale Euthanasie bzw. der Blutentzug folgen. Eine BAL kann anschließend in zuvor definierten Lungenbereichen unter Sichtkontrolle durchgeführt werden, wobei die Lunge nach Öffnung des Thorax entweder in ihrer Position verbleibt oder exenteriert wird (Abb. 4). Protokolle dieser Art von BAL sind z. B. für porcine Lungen (Reinhold et al. 2008a) und für Lungen von Kälbern (Jaeger et al. 2007, Reinhold et al. 2012, Lohr et al. 2015) beschrieben.

Wie bereits erwähnt, verfügen insbesondere bovine und porcine Lungen über eine ausgeprägten Segmentanatomie (McLaughlin et al. 1961). Da sich entzündliche Prozesse nicht über die bindegewebigen Segmentgrenzen ausbreiten, sondern in der Regel innerhalb dieser Grenzen räumlich begrenzt bleiben, gilt insbesondere für Rind und Schwein, dass unterschiedliche Entzündungsformen innerhalb einer Lunge vorkommen können. Um letztere separat zu charakterisieren, kann es hilfreich sein, verschiedene Lungensegmente separat zu lavagieren bzw. ergänzend zu beproben.

Erhebung und Quantifizierung pathologischer Befunde

Anlässlich der Sektion können alle Anteile des Respirationstrakts von der Nase bis zur Lunge untersucht werden. Da der größte Teil dieser Gewebe von Knochen

des Kopfes bzw. der Brusthöhle umgeben ist, müssen sie zunächst freigelegt werden. Dies ist im Vergleich zu Labornagern technisch wesentlich aufwändiger. Für die diagnostische Untersuchung von Groß- bzw. Nutztieren sind Sektionsverfahren beschrieben (King et al. 2014), die – den Fragestellungen des jeweiligen Experiments entsprechend – zu modifizieren und anzupassen sind.

Eine makroskopische Untersuchung ist nur an der unfixierten Lunge uneingeschränkt möglich. Daher ist abzuwägen, ob makroskopische Befunde oder eine rasche Fixierung Priorität haben. Bei der makroskopischen Untersuchung werden u. a. die Intaktheit der Schleimhäute und mögliche Sekrete in den Luftwegen erfasst. Für die Beurteilung des Lungengewebes ist neben Konsistenz, Farbe und Beschaffenheit der Serosa das Kollabieren bei Eröffnung der Brusthöhle (Punktion der Pleura) besonders relevant, da dies für eine hohe Elastizität und fehlenden Inhalt in den Luftwegen spricht (King et al. 2014).

Sollten Veränderungen vorhanden sein, so können Verteilung, Ausdehnung und Beschaffenheit deskriptiv, schematisch und fotografisch dokumentiert werden. Besonders die schematische Darstellung ist eine einfache und für spätere Vergleiche bzw. Quantifizierungen hilfreiche Methode. Zur Objektivierung der makroskopischen Befunde können verschiedene Bewertungsschemata verwendet werden. Für verschiedene respiratorische Erkrankungen, die zu umschriebenen Veränderungen führen, wurden unterschiedliche Bewer-

tungsschemata entwickelt. Bei einigen werden lediglich Anzahl, Ausdehnung und Art der Veränderung in der Lunge insgesamt (Turner 1961, Fraile et al. 2010, Leruste et al. 2012, DiProvvido et al. 2018) oder in jedem Lungenlappen individuell (Thomson et al. 1975) erfasst. Die meisten Bewertungssysteme berücksichtigen die Größe der einzelnen Lungenlappen. Um als Ergebnis den prozentualen Anteil der Lungenveränderungen zu erhalten, wird entweder der Anteil des veränderten Gewebes in der gesamten Lunge geschätzt (Jericho und Langford 1982, Groom et al. 1988) oder es wird die prozentuale Ausdehnung der Veränderung in jedem einzelnen Lappen erfasst und mit dem proportionalen Anteil des jeweiligen Lungenlappens am Volumen oder Gewicht der Lunge multipliziert (Morrison et al. 1985, Straw et al. 1986, Christensen et al. 1999, Fajt et al. 2003, Reinhold et al. 2012, White et al. 2012, Amrine et al. 2013). Der prozentuale Anteil der einzelnen Lungenlappen kann u. a. durch die Immersionsmethode bestimmt werden (Weibel et al., 1966, Tab. 6). Diese Methode ist auch als Referenzmethode für die Impfstofftestung durch die Europäische Pharmakopöa dokumentiert (EDQM 2007). Beim Schwein wird als weitere Methode der „consolidated lung lesion score“ angewandt, bei dem die Lunge in Dreiecke aufgeteilt wird, wobei Dreiecke mit Veränderungen Punkte erhalten, die nach der Größe des Lungenlappens unterschiedlich verrechnet werden (Hannan et al. 1982). Schließlich kann auch die Bildanalyse anhand von Fotos der Lunge genutzt werden. Hierbei werden die Lungen von dorsal und/oder ventral fotografiert und die Fläche des veränderten Lungengewebes wird in das Verhältnis zur Gesamtlungenfläche gesetzt. Vergleichende Untersuchungen von Lungen mit verschiedenen Bewertungssystemen zeigten sowohl für die prozentuale als auch die Punktbewertung eine relativ gute Übereinstimmung mit der Referenzmethode (Garcia-Morante et al. 2016). Lediglich die Bildanalyse nach dorsaler Fotografie zeigte Abweichungen, da hierbei die ventrale Ausdehnung und die Beteiligung des akzessorischen Lungenlappens nur unzureichend berücksichtigt werden (Sibila et al. 2014, Garcia-Morante et al. 2016).

Entsprechende Bewertungsschemata sind auch für andere Teile des Respirationstrakts, wie z. B. die Nase bei Rhinitis atrophicans des Schweines, entwickelt worden (Done et al. 1984). Sie ermöglichen eine statistische Analyse, bieten aber insgesamt wenig Vorteile im Vergleich zur subjektiven Beurteilung (De Jong 2006).

Gewinnung von Gewebeproben

Bei der Sektion können Gewebeproben aus allen Teilen des Respirationstraktes für weiterführende Untersuchungen gewonnen werden.

Für morphologische Untersuchungen ist die Fixiermethode von größter Bedeutung, da sowohl der Weg der Fixierung (Immersion, Instillation oder vakuläre Perfusion) als auch die Fixierlösung großen Einfluss auf den Strukturverlust der Lunge haben (Hausmann et al. 2004, Braber et al. 2010). Hierzu gibt es eine offizielle Stellungnahme von ATS (American Thoracic Society) und ERS, die insbesondere bei quantitativer Erfassung von Lungenstrukturen zu beachten ist (Hsia et al. 2010). Das Fixierungsprotokoll muss unter Berücksichtigung des jeweiligen Untersuchungszieles sorgfältig ausgewählt und optimiert werden. Während die vaskuläre Perfusion einen sehr guten Erhalt des Parenchyms, der Luftwege und der Alveolaroberfläche erzielt, werden bei

TABELLE 6: Prozentualer Anteil der Lungenlappen am Gesamtvolumen der Lunge

	Schwein (nach Pointon et al. 1986)	Kalb (Alter: 2–3 Monate) (nach Lambertz 2011)
Spitzenlappen links, pars cranialis	10 %	5 %
Spitzenlappen links, pars caudalis	10 %	5 %
Basislappen links	25 %	34 %
Spitzenlappen rechts, pars cranialis	10 %	7 %
Spitzenlappen rechts, pars caudalis	10 %	5 %
Mittellappen	nicht vorhanden	8 %
Basislappen rechts	25 %	35 %
Anhangslappen (Lobus accessorius)	10 %	1 %

der Instillation der Luftwege mit Fixierlösung die Inter-alveolarepten und die Kapillaren besonders gut präserviert. Bei beiden Methoden ist der Druck, mit dem die Lösungen infundiert werden, entscheidend. So ist bei der Instillationsfixierung einerseits auf ausreichenden Druck zu achten, um eine gleichmäßige Durchdringung der Lunge mit Fixierflüssigkeit zu gewährleisten, andererseits ist eine Überdehnung der Alveolen zu vermeiden. Als optimal wird ein Druck von 20–25 cm H₂O über dem höchsten Punkt der Lunge angesehen (Hsia et al. 2010, Wagner et al. 2011).

Bei beiden o. g. Fixationsmethoden ergeben sich die Probleme, dass die Lunge insgesamt fixiert wird, nur ein Fixiermedium eingesetzt werden kann und keine nativen Proben aus demselben Tier gewonnen werden können. Daher wird bei Groß- und Nutztieren häufig nicht die Lunge insgesamt fixiert, sondern aus der nativen Lunge werden Gewebescheiben entnommen. Dies kann an vordefinierten Lokalisationen zur repräsentativen Beprobung der gesamten Lunge erfolgen oder in Bereichen, an denen für definierte Erreger Veränderungen beschrieben bzw. wo makroskopisch Veränderungen zu erkennen sind (Reinhold et al. 2012). Aliquots der Gewebescheiben können steril für die mikrobiologische Untersuchung entnommen, eingefroren, schockgefroren und in verschiedene Fixierflüssigkeiten eingelegt werden. Als Fixierlösungen kommen neben Formaldehyd-Lösungen und Bouinscher Lösung auch spezielle Lösungen (wie z. B. Azeton/Perjodat-Lysin-Paraformaldehyd) zum Einsatz, um den Erhalt von Antigenen für nachfolgende immunhistochemische Reaktionen zu verbessern (Hall et al. 1987). Hierdurch sind vergleichende Untersuchungen mit verschiedenen Methoden möglich.

Beim Schockgefrieren von Gewebeproben für morphologische Untersuchungen ist zu beachten, dass der Gefrierprozess bei ca. –70 °C in einem flüssigen Medium (z. B. 2-Methylbutan) sehr schnell ablaufen muss. Direktes Einbringen der Proben in flüssigen Stickstoff (–196 °C) eignet sich nicht, da das Gewebe sehr spröde wird und sich schlecht schneiden lässt. Außerdem ist der Strukturverlust aufgrund des Leydenfrost’schen Phänomens nicht optimal (Liebler et al. 1991). Ist das veränderte Lungengewebe durch Zell- oder Flüssigkeitseinlagerungen verdichtet, so erhält man qualitativ sehr hochwertige Gefrierschnitte, in denen sich Epitope auf Entzündungszellen, andere Wirtsantigene, aber auch pathogen-assoziierte Antigene markieren lassen. Hierdurch kann der direkte Zusammenhang zwischen Erreger und Wirtsreaktion sichtbar gemacht werden. Für die Darstellung von lufthaltigem Lungengewebe ist eine

bessere Verarbeitung nach Infiltration mit Agarose möglich (Halbower et al. 1994).

Für ultrastrukturelle Untersuchungen sind besondere Präparationsmethoden erforderlich. Die gebräuchlichsten Fixiermittel sind Glutaraldehyd oder Glutaraldehyd/Paraformaldehydmischungen (Robinson et al. 1987). Da das Durchdringungsvermögen dieser Fixierlösungen jedoch gering ist, muss das Gewebe für die Immersionsfixierung in Würfel von etwa 1 mm Kantenlänge zerkleinert werden. Eine Alternative ist die Entnahme von einzelnen Lungenlappen und anschließende vaskuläre Perfusion mit Fixierlösung (Roberts et al. 1990). Die elektronenmikroskopische Untersuchung ermöglicht Einblicke in subzelluläre Strukturen der Wirtszellen sowie der Erreger und die Interaktion von Erregern mit ihrem Wirt. Dies ist besonders aufschlussreich für die Untersuchung intrazellulärer Erreger, wie z. B. Viren, aber auch Chlamydien, Coxiellen oder Mykobakterien.

Danksagung

Unser ausdrücklicher Dank gilt Herrn Wolfram Maginot für die Bildbearbeitung und Frau Anja Patotzki für die Unterstützung bei der technischen Fertigstellung des Manuskriptes.

Conflict of interest

Es bestehen keine geschützten, finanziellen, beruflichen oder anderen persönlichen Interessen an einem Produkt, Service und/oder einer Firma, welche die im oben genannten Manuskript dargestellten Inhalte oder Meinungen beeinflussen könnten.

Ethical approval

Da es sich um eine Übersicht handelt, war kein ethisches Votum nötig.

Funding

Keine externe Finanzierung.

Authors contribution

Alle Autoren trugen zu gleichen Teilen zur Erstellung des Manuskriptes bei. (All authors contributed equally.)

Literatur

Abraham WM (2008): Modeling of asthma, COPD and cystic fibrosis in sheep. *Pulm Pharmacol Ther* 21: 743–754.

Aksenov AA, Yeates L, Pasamontes A, Siebe C, Zrodnikov Y, Simmons J, McCartney MM, Deplanque JP, Wells RS, Davis CE (2014): Metabolite content profiling of bottlenose dolphin exhaled breath. *Anal Chem* 86: 10616–10624.

Amrine DE, White BJ, Larson R, Anderson DE, Mosier DA, Cernicchiaro N (2013): Precision and accuracy of clinical illness scores, compared with pulmonary consolidation scores, in Holstein calves with experimentally induced *Mycoplasma bovis* pneumonia. *Am J Vet Res* 74: 310–315.

Art T, Lekeux P (1988): Pulmonary mechanics during treadmill exercise in race ponies. *Vet Res Commun* 12: 245–258.

Arunorat J, Charoenvisal N, Woonwong Y, Kedkovid R, Jittimannee S, Sitthicharoenchai P, Kesdangsakonwut S, Poolperm P, Thanawongnuwech R (2017): Protection of human influenza vaccines against a reassortant swine influenza virus of pandemic H1N1 origin using a pig model. *Res Vet Sci* 114: 6–11.

Bakima M, Gustin P, Lekeux P, Lomba F (1988): Mechanics of breathing in goats. *Res Vet Sci* 45: 332–336.

Ballard-Croft C, Wang D, Sumpter LR, Zhou X, Zwischenberger JB (2012): Large-animal models of acute respiratory distress syndrome. *Review Ann Thorac Surg* 93: 1331–1339.

Balseiro A, Altuzarra R, Vidal E, Moll X, Espada Y, Sevilla IA, Domingo M, Garrido JM, Juste RA, Prieto M, Pérez de Val B. (2017): Assessment of BCG and inactivated *Mycobacterium bovis* vaccines in an experimental tuberculosis infection model in sheep. *PLoS One* 12: e0180546.

Bartels K, Brown RD, Fox DL, Bull TM, Neary JM, Dorosz JL, Fonseca BM, Stenmark KR (2016): Right ventricular longitudinal strain is depressed in a bovine model of pulmonary hypertension. *Anesth Analg* 122: 1280–1286.

Bates J, Irvin C, Brusasco V, Drazen J, Fredberg J, Loring S, Eidelman D, Ludwig M, Macklem P, Martin J, Milic-Emili J, Hantos Z, Hyatt R, Lai-Fook S, Leff A, Solway J, Lutchen K, Suki B, Mitzner W, Paré P, Pride N, Sly P (2004): The use and misuse of Penh in animal models of lung disease. *Am J Respir Cell Molecul Biol* 31: pp. 373–374.

Baums CG, Kaim U, Fulde M, Ramachandran G, Goethe R, Valentin-Weigand P (2006): Identification of a novel virulence determinant with serum opacification activity in *Streptococcus suis*. *Infect Immun* 74: 6154–6162.

Baums CG, Kock C, Beineke A, Bennecke K, Goethe R, Schröder C, Waldmann KH, Valentin-Weigand P (2009): *Streptococcus suis* bacterin and subunit vaccine immunogenicities and protective efficacies against serotypes 2 and 9. *Clin Vaccine Immunol* 16: 200–208.

Beadle RE (1985): Experience with whole-body plethysmography in horses with obstructive pulmonary disease. In: Deegen E, Beadle RE (eds.), *International Symposium „Lung function and respiratory diseases in the horse“*, 27. – 29. Juni 1985, Hannover, Hippiafrika Verlagsgesellschaft mbH Calw, Deutschland, 67–70.

Bean HD, Zhu J, Sengle JC, Hill JE (2014): Identifying methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) lung infections in mice via breath analysis using secondary electrospray ionization-mass spectrometry (SESI-MS). *J Breath Res* 8(4): 041001.

Bean HD, Jiménez-Díaz J, Zhu J, Hill JE (2015): Breathprints of model murine bacterial lung infections are linked with immune response. *Eur Respir J* 45: 181–190.

Bedenice D, Bar-Yishay E, Ingenito EP, Tsai L, Mazan MR, Hoffman AM (2004): Evaluation of head-out constant volume body plethysmography for measurement of specific airway resistance in conscious, sedated sheep. *Am J Vet Res* 65: 1259–1264.

Beineke A, Bennecke K, Neis C, Schröder C, Waldmann KH, Baumgärtner W, Valentin-Weigand P, Baums CG (2008): Comparative evaluation of virulence and pathology of *Streptococcus suis* serotypes 2 and 9 in experimentally infected growers. *Vet Microbiol* 128: 423–430.

Belser JA, Eckert AM, Tumpey TM, Maines TR (2016): Complexities in ferret influenza virus pathogenesis and transmission models. *Microbiol Mol Biol Rev* 80: 733–744.

Berchtold J, Hartmann H, Hofmann W (2000): Bedeutung respiratorischer Kompensationsvorgänge bei Azidosen des Kalbes. *Dtsch Tierärztl Wochenschr* 107: 10–16.

- Bergmann A, Trefz P, Fischer S, Klepik K, Walter G, Steffens M, Ziller M, Schubert JK, Reinhold P, Köhler H, Miekisch W (2015):** In vivo volatile organic compound signatures of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. PLoS One 10(4): e0123980.
- Blohm U, Weigend S, Preisinger R, Beer M, Hoffmann D (2016):** Immunological competence of different domestic chicken breeds against Avian Influenza infection. Avian Dis 60(1 Suppl): 262–268.
- Bolin CA, Whipple DL, Khanna KV, Risdahl JM, Peterson PK, Molitor TW (1997):** Infection of swine with *Mycobacterium bovis* as a model of human tuberculosis. J Infect Dis 176: 1559–1566.
- Bonnaud P, Fabre A, Frossard N, Guignabert C, Inman M, Kuebler WM, Maes T, Shi W, Stampfli M, Uhlig S, White E, Witzernath M, Bellaye PS, Crestani B, Eickelberg O, Fehrenbach H, Guenther A, Jenkins G, Joos G, Magnan A, Maitre B, Maus U, Reinhold P, Vernooij JHJ, Richeldi L, Kolb M (2018):** Optimizing experimental research in respiratory diseases: an ERS statement. Europ Respir J 51: 1702133. doi.org/10.1183/13993003.02133-2017.
- Borel N, Pospischil A, Greub G (2010):** *Parachlamydia acanthamoebae* and its zoonotic risk. Clin Microbiol Newsletter 32: 185–191.
- Braber S, Verheijden KA, Henricks PA, Kraneveld AD, Folkerts G (2010):** A comparison of fixation methods on lung morphology in a murine model of emphysema. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 299: L843–851.
- Braun U, Estermann U, Feige K, Sydler T, Pospischil A (1999):** Percutaneous lung biopsy in cattle. J Am Vet Med Assoc 215: 679–681.
- Brogaard L, Heegaard PMH, Larsen LE, Mortensen S, Schlegel M, Dürrwald R, Skovgaard K (2016):** Late regulation of immune genes and microRNAs in circulating leukocytes in a pig model of influenza A (H1N2) infection. Sci Rep 6: 21812.
- Bullone M, Lavoie JP (2015):** Asthma “of horses and men” – how can equine heaves help us better understand human asthma immunopathology and its functional consequences? Mol Immunol 66: 97–105.
- Bullone M, Vargas A, Elce Y, Martin JG, Lavoie JP (2017):** Fluticasone/salmeterol reduces remodelling and neutrophilic inflammation in severe equine asthma. Sci Rep 7: 8843.
- Caminita E, van der Merwe M, Hance B, Krishnan R, Miller S, Buddington K, Buddington RK (2015):** A preterm pig model of lung immaturity and spontaneous infant respiratory distress syndrome. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 308(2): L118–129.
- Casson N, Entenza JM, Borel N, Pospischil A, Greub G (2008):** Murine model of pneumonia caused by *Parachlamydia acanthamoebae*. Microb Pathog 45: 92–97.
- Caston SS, McClure SR, Martens RJ, Chaffin MK, Miles KG, Griffith RW, Cohen ND (2006):** Effect of hyperimmune plasma on the severity of pneumonia caused by *Rhodococcus equi* in experimentally infected foals. Vet Ther 7: 361–375.
- Chalkias A, Spyropoulos V, Koutsovasilis A, Papalois A, Kouskouni E, Xanthos T (2015):** Cardiopulmonary arrest and resuscitation in severe sepsis and septic shock: A research model. Shock 43: 285–291.
- Chan GH, Ho EN, Leung DK, Wong KS, Wan TS (2016):** Targeted metabolomics approach to detect the misuse of steroidal aromatase inhibitors in equine sports by biomarker profiling. Anal Chem 88: 764–772.
- Chevaleyre C, Riou M, Bréa D, Vandebrouck C, Barc C, Pezant J, Melo S, Olivier M, Delaunay R, Boulesteix O, Berthon P, Rossignol C, Burlaud Gaillard J, Becq F, Gauthier F, Si-Tahar M, Meurens F, Berri M, Caballero-Posadas I, Attucci S. (2016):** The pig: A relevant model for evaluating the neutrophil serine protease activities during acute *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. PLoS One 11(12): e0168577.
- Christensen G, Sorensen V, Mousing J (1999):** Diseases of the respiratory system. In: Straw BE, D’Allaire S, Mengeling W, Taylor DJ (eds.), Diseases of Swine. 8th ed, Iowa State University Press, Ames, 913–940.
- Coetzee P, van Vuuren M, Venter EH, Stokstad M (2014):** A review of experimental infections with bluetongue virus in the mammalian host. Virus Res 182: 21–34.
- Coghe J, Uystepuyst C, Bureau F, Lekeux P (1999):** Non-invasive assessment of arterial haemoglobin oxygen saturation in cattle by pulse oximetry. Vet Rec 145: 666–669.
- Collie D, Govan J, Wright S, Thornton E, Tennant P, Smith S, Doherty C, McLachlan G (2013):** A lung segmental model of chronic *Pseudomonas* infection in sheep. PLoS ONE 8(7): e67677.
- Collie D, Glendinning L, Govan J, Wright S, Thornton E, Tennant P, Doherty C, McLachlan G (2015):** Lung microbiota changes associated with chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection and the impact of intravenous colistimethate sodium. PLoS One 10(11): e0142097.
- Confer AW (2009):** Update on bacterial pathogenesis in BRD. Anim Health Res Rev 10: 145–148.
- Crane SA, Ziemer EL, Sweeney CR (1989):** Cytologic and bacteriologic evaluation of tracheobronchial aspirates from clinically normal foals. Am J Vet Res 50: 2042–2048.
- Cunningham JG, Klein BG (2007):** Pulmonary blood flow. In: Textbook of veterinary physiology. Saunders Elsevier, St. Louis, 578–585.
- Curths C, Wichmann J, Dunker S, Windt H, Hoymann HG, Laustenstein HD, Hohlfeld J, Becker T, Kaup FJ, Braun A, Knauf S (2014):** Airway hyper-responsiveness in lipopolysaccharide-challenged common marmosets (*Callithrix jacchus*). Clin Sci (Lond) 126: 155–162.
- Dagleish MP, Hodgson JC, Ataei S, Finucane A, Finlayson J, Sales J, Parton R, Coote JG (2007):** Safety and protective efficacy of intramuscular vaccination with a live *aroA* derivative of *Pasteurella multocida* B:2 against experimental hemorrhagic septicemia in calves. Infect Immun 75: 5837–5844.
- Dagleish MP, Finlayson J, Bayne C, MacDonald S, Sales J, Hodgson JC (2010):** Characterization and time course of pulmonary lesions in calves after intratracheal infection with *Pasteurella multocida* A:3. J Comp Pathol 142: 157–169.
- Daly JM, Yates RJ, Browse G, Swann Z, Newton JR, Jessett D, Davis-Poynter N, Mumford JA (2003):** Comparison of hamster and pony challenge models for evaluation of effect of antigenic drift on cross protection afforded by equine influenza vaccines. Equine Vet J 35: 458–462.
- Davis MS, McKiernan B, McCullough S, Nelson S (Jr), Willard M, Dorsey K (2002):** Racing Alaskan sled dogs as a model of “Ski Asthma”. Am J Respir Crit Care Med 166: 878–882.
- Davis M, Williamson K, McKenzie E, Royer C, Payton M, Nelson S (2005):** Effect of training and rest on respiratory mechanical properties in racing sled dogs. Med Sci Sports Exerc 37: 337–341.
- de Carvalho Ferreira HC, Weesendorp E, Quak S, Stegeman JA, Loeffen WL (2013):** Quantification of airborne African swine fever virus after experimental infection. Vet Microbiol 165: 243–251.

- De Jong MF (2006):** Progressive and nonprogressive atrophic rhinitis. In: Straw BE, Zimmerman JJ, D'Allaire S, Taylor DJ (eds), Diseases of Swine. 9th ed., Blackwell Publishing, 577–602.
- de Val Pérez B, López-Soria S, Nofrarias M, Martín M, Vordermeier HM, Villarreal-Ramos B, Romera N, Escobar M, Solanes D, Cardona PJ, Domingo M (2011):** Experimental model of tuberculosis in the domestic goat after endobronchial infection with *Mycobacterium caprae*. Clin Vaccine Immunol 18: 1872–1881.
- Di Provvido A, Di Teodoro G, Muuka G, Marruchella G, Scacchia M (2018):** Lung lesion score system in cattle: proposal for contagious bovine pleuropneumonia. Trop Anim Health Prod 50: 223–228.
- Done JT, Upcott DH, Frewin DC, Hebert CN (1984):** Atrophic rhinitis: snout morphometry for quantitative assessment of conchal atrophy. Vet Rec 114: 33–35.
- Eamens GJ, Gonsalves JR, Whittington AM, Turner B (2012):** Evaluation of serovar-independent ELISA antigens of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs following vaccination or experimental challenge with respiratory pathogens and natural A. pleuropneumoniae serovar 1 challenge. Aust Vet J 90: 490–498.
- EDQM (2007):** Porcine *Actinobacillus* vaccine (inactivated) 01/2005:1360. Eur Pharmacopeia 5th ed, 50/1: 784–785.
- Elferink RO, Beuers U (2009):** Are pigs more human than mice? J Hepatol 50: 838–841.
- Endsley JJ, Waters WR, Palmer MV, Nonnecke BJ, Thacker TC, Jacobs WR Jr, Larsen MH, Hogg A, Shell E, McAlauy M, Scherer CF, Coffey T, Howard CJ, Villareal-Ramos B, Estes DM (2009):** The calf model of immunity for development of a vaccine against tuberculosis. Vet Immunol Immunopathol 128: 199–204.
- Enkhbaatar P, Joncam C, Traber L, Nakano Y, Wang J, Lange M, Connelly R, Kulp G, Saunders F, Huda R, Cox R, Schmalstieg F, Herndon D, Traber D (2008):** Novel ovine model of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-induced pneumonia and sepsis. Shock 29: 642–649.
- Erler W, Schimmel D, Jacob B (1993):** Zur Wirkung des Toxins aus *Pasteurella multocida* Typ D beim Kalb in vivo. Berl Münch Tierärztl Wochenschr 106: 83–84.
- Fajt VR, Apley MD, Roth JA, Frank DE, Brogden KA, Skogerboe TL, Shostrom VK, Chin YL (2003):** The effects of danofloxacin and tilmicin on neutrophil function and lung consolidation in beef heifer calves with induced *Pasteurella (Mannheimia) haemolytica* pneumonia. J Vet Pharmacol Ther 26: 173–179.
- Fey K (2005):** Der klinische Nutzen zytologischer Untersuchungen von bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit bei der Differenzierung chronischer Bronchitiden des Pferdes. Justus-Liebig-Universität Gießen, FB Veterinärmedizin, Klinik für Pferde, Habilitationsschrift <http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2005/2431/>.
- Fischer S, Bergmann A, Steffens M, Trefz P, Ziller M, Miekisch W, Schubert JS, Köhler H, Reinhold P (2015a):** Impact of food intake on in vivo VOC concentrations in exhaled breath assessed in a caprine animal model. J Breath Res 9: 047113.
- Fischer S, Trefz P, Bergmann A, Steffens M, Ziller M, Miekisch W, Schubert JS, Köhler H, Reinhold P (2015b):** Physiological variability in volatile organic compounds (VOCs) in exhaled breath and released from faeces due to nutrition and somatic growth in a standardized caprine animal model. J Breath Res 9: 027108.
- Fischer W, Amtsberg G, Luitjens B, Binder A, Kirchhoff H (1987):** Vergleichende Untersuchungen zur Keimbeseidlung der Nasen- und Tracheobronchialschleimhaut bei bronchopneumonisch erkrankten Kälbern und Jungrindern. Tierärztl Umschau 42: 476–480.
- Fraille L, Alegre A, Lopez-Jimenez R, Nofrarias M, Segales J (2010):** Risk factors associated with pleuritis and cranio-ventral pulmonary consolidation in slaughter-aged pigs. Vet J 184: 326–333.
- Fritscher-Ravens A (2000):** Bronchialkarzinom: Endosonographische Abklärung mediastinaler Raumforderungen. Atemwegs- und Lungenkr 26: 573–576.
- Ganter M, Worku TM, Perez E (1997):** Klinische Lungenfunktionsuntersuchungen bei Schafen. Dtsch Tierärztl Wochenschr 104: 369–374.
- Garcia-Morante B, Segalés J, Fraille L, Pérez de Rozas A, Maiti H, Coll T, Sibila M (2016):** Assessment of *Mycoplasma hyopneumoniae*-induced pneumonia using different lung lesion scoring systems: a comparative review. J Comp Pathol 154: 125–134.
- Garcia-Morante B, Segalés J, Serrano E, Sibila M (2017):** Determinants for swine mycoplasmal pneumonia reproduction under experimental conditions: A systematic review and recursive partitioning analysis. PLoS One 12(7): e0181194.
- Gers S, Vosloo W, Drew T, Lubisi AB, Pardini A, Williams M (2011):** Experimental infection of common warthogs (*Phacochoerus africanus*) and bushpigs (*Potamochoerus larvatus*) with classical swine fever virus II: A comparative histopathological study. Transbound Emerg Dis 58: 135–144.
- Gershwin LJ, Schelegle ES, Gunther RA, Anderson ML, Woolums AR, Larochele DR, Boyle GA, Friebertshausen KE, Singer RS (1998):** A bovine model of vaccine enhanced respiratory syncytial virus pathophysiology. Vaccine 16: 1225–1236.
- Gershwin LJ (2012):** Immunology of bovine respiratory syncytial virus infection of cattle. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 35: 253–257.
- Gershwin LJ, Van Eenennaam AL, Anderson ML, McEligot HA, Shao MX, Toaff-Rosenstein R, Taylor JF, Neiberghs HL, Womack J (2015):** Bovine Respiratory Disease Complex Coordinated Agricultural Project Research Team. Single Pathogen Challenge with Agents of the Bovine Respiratory Disease Complex. PLoS One 10(11): e0142479.
- Golpe R, Mateos A (2005):** Effect of body position on gas exchange after bronchoalveolar lavage. Respir Med 99:1061–1063.
- Gonzales-Juarrero M, Bosco-Lauth A, Podell B, Soffler C, Brooks E, Izzo A, Sanchez-Campillo J, Bowen R (2013):** Experimental aerosol *Mycobacterium bovis* model of infection in goats. Tuberculosis (Edinb) 93(5): 558–564.
- Greub G, Berger P, Papazian L, Raoult D (2003):** Parachlamydiaceae as rare agents of pneumonia. Emerg Infect Dis 9: 755–756.
- Greub G (2009):** *Parachlamydia acanthamoebae*, an emerging agent of pneumonia. Clin Microbiol Infect 15: 18–28.
- Groom SC, Little PB, Rosendal S (1988):** Virulence differences among three strains of *Haemophilus somnus* following intratracheal inoculation of calves. Canad J Vet Res 52:349–354.
- Gustin P, Dhem AR, Lomba F, Lekeux P, Van de Woestijne KP, Lándsér FJ (1988):** Measurement of total respiratory impedance in calves by the forced oscillation technique. J Appl Physiol 64: 1786–1791.
- Grandin C, Lucas-Hourani M, Clavel M, Taborik F, Vabret A, Tangy E, Contamin H, Vidalain PO (2015):** Evidence for an intranasal immune response to human respiratory syncytial virus infection in cynomolgus macaques. J Gen Virol 96: 782–792.
- Halbower AC, Mason RJ, Abman SH, Tudor RM (1994):** Agarose infiltration improves morphology of cryostat sections of lung. Lab Invest 71: 149–153.

- Hall PA, Stearn PM, Butler MG, D'Ardenne AJ (1987):** Acetone/periodate-lysine-paraformaldehyde (PLP) fixation and improved morphology of cryostat sections for immunohistochemistry. *Histopathology* 11: 93–101.
- Halloy DJ, Kirschvink NA, Vincke GL, Hamoir JN, Delvaux FH, Gustin PG (2004):** Whole body barometric plethysmography: a screening method to investigate airway reactivity and acute lung injuries in freely moving pigs. *Vet J* 168: 276–284.
- Hannan PC, Bhogal BS, Fish JP (1982):** Tylosin tartrate and tiامتulin effects on experimental piglet pneumonia induced with pneumonic pig lung homogenate containing mycoplasmas, bacteria and viruses. *Res Vet Sci* 33: 76–88.
- Hansen MS, Pors SE, Jensen HE, Bille-Hansen V, Bisgaard M, Flachs EM, Nielsen OL (2010):** An investigation of the pathology and pathogens associated with Porcine Respiratory Disease Complex in Denmark. *J Comp Pathol* 143: 120–131.
- Hausmann R, Bock H, Biermann T, Betz P (2004):** Influence of lung fixation technique on the state of alveolar expansion – a histomorphometrical study. *Leg Med (Tokyo)* 6: 61–65.
- Heckert HP, Rohn M, Hofmann W (1999):** Diagnostische Probenentnahmen bei infektiösen Atemwegserkrankungen der Rinder. *Prakt Tierarzt* 78: 562–565.
- Hein WR, Griebel PJ (2003):** A road less travelled: large animal models in immunological research. *Nat Rev Immunol* 3: 79–84.
- Heinritz K, Beisl J (1995):** Untersuchungen zur Verwendbarkeit der Sonographie beim Schwein. *Dtsch Tierärztl Wochenschr* 102: 4–15.
- Heller M, Sachse K, Schubert E (2007):** Die Lungenseuche der Rinder – eine fast vergessene Erkrankung? *Dtsch Tierärztl Wochenschr* 114: 43–49.
- Hendricks JC, Kline LR, Kovalski RJ, O'Brien JA, Morrison AR, Pack AI (1987):** The English bulldog: a natural model of sleep-disordered breathing. *J Appl Physiol* 63: 1344–1350.
- Herholz CP, Gerber V, Tschudi P, Straub R, Imhof A, Busato A (2003):** Use of volumetric capnography to identify pulmonary dysfunction in horses with and without clinically apparent recurrent airway obstruction. *Am J Vet Res* 64: 338–345.
- Hermann M, Grüning G, Bracher V, Howald B, Winder C, Hürlimann J, Von Fellenberg R (1988):** Eosinophile Granulozyten im Tracheobronchialsekret von Pferden: Anhaltspunkt für eine parasitäre Lungenerkrankung? *Schweiz Arch Tierheilkd* 130: 19–28.
- Hermeyer K, Buchenau I, Thomasmeyer A, Baum B, Sperser J, Rosengarten R, Hewicker-Trautwein M (2012):** Chronic pneumonia in calves after experimental infection with *Mycoplasma bovis* strain 1067: characterization of lung pathology, persistence of variable surface protein antigens and local immune response. *Acta Vet Scand* 54: 9.
- Herszberg B, Ramos-Barbon D, Tamaoka M, Martin JG, Lavoie JP (2006):** Heaves, an asthma-like equine disease, involves airway smooth muscle remodeling. *J Allergy Clin Immunol* 118: 382–388.
- Hildenbrand A (2010):** Variabilität und Reproduzierbarkeit lungenfunktionsdiagnostischer Kenngrößen klinisch gesunder Schafe. Berlin, FU, Fachbereich Veterinärmedizin, Diss.
- Höchel P (2003):** Auswirkungen motorischer Belastungen auf den Atemgasaustausch bei klinisch gesunden und respiratorisch erkrankten Kälbern. Berlin, FU, Fachbereich Veterinärmedizin, Diss.
- Hoegger MJ, Fischer AJ, McMenimen JD, Ostedgaard LS, Tucker AJ, Awadalla MA, Moninger TO, Michalski AS, Hoffman EA, Zabner J, Stoltz DA, Welsh MJ (2014):** Impaired mucus detachment disrupts mucociliary transport in a piglet model of cystic fibrosis. *Science* 345(6198): 818–822.
- Hoffman A, Tsai L, Mazan M, Bellardine C, Bell A, Lutchen K, Ingenito E (2005):** Pulmonary function tests versus computed tomography in sheep with experimental emphysema. *Exp Lung Res* 31: 497–512.
- Holt TN, Callan RJ (2007):** Pulmonary arterial pressure testing for high mountain disease in cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 23: 575–596, vii.
- Horváth I, Barnes PJ, Loukides S, Sterk PJ, Högman M, Olin AC, Amann A, Antus B, Baraldi E, Bikov A, Boots AW, Bos LD, Brinkman P, Bucca C, Carpagnano GE, Corradi M, Cristescu S, de Jongste JC, Dinh-Xuan AT, Dompeling E, Fens N, Fowler S, Hohlfeld JM, Holz O, Jöbsis Q, Van De Kant K, Knobel HH, Kostikas K, Lehtimäki L, Lundberg J, Montuschi P, Van Muylem A, Pennazza G, Reinhold P, Ricciardolo FLM, Rosias P, Santonico M, van der Schee MP, van Schooten FJ, Spanevello A, Tonia T, Vink TJ (2017):** A European Respiratory Society technical standard: exhaled biomarkers in lung disease. *Eur Respir J* 49: 1600965. doi: 10.1183/13993003.00965-2016.
- Howey EB, O'Donnell V, de Carvalho Ferreira HC, Borca MV, Arzt J (2013):** Pathogenesis of highly virulent African swine fever virus in domestic pigs exposed via intraoropharyngeal, intranasopharyngeal, and intramuscular inoculation, and by direct contact with infected pigs. *Virus Res* 178: 328–339.
- Hsia CCW, Hyde DM, Ochs M, Weibel ER (2010):** An official Research Policy Statement of the American Thoracic Society/ European Respiratory society: standards for quantitative assessment of lung structure. *Am J Respir Crit Care Med* 181: 394–418.
- Hunter KS, Albiez JA, Lee PF, Lanning CJ, Lammers SR, Hofmeister SH, Kao PH, Qi HJ, Stenmark KR, Shandas R (2010):** In vivo measurement of proximal pulmonary artery elastic modulus in the neonatal calf model of pulmonary hypertension: development and ex vivo validation. *J Appl Physiol* 108: 968–975.
- Jacks S, Giguère S, Crawford PC, Castleman WL (2007):** Experimental infection of neonatal foals with *Rhodococcus equi* triggers adult-like gamma interferon induction. *Clin Vaccine Immunol* 14: 669–677.
- Jaeger J, Liebler-Tenorio E, Kirschvink N, Sachse K, Reinhold P (2007):** A clinically silent respiratory infection with *Chlamydomphila* spp. in calves is associated with airway obstruction and pulmonary inflammation. *Vet Res* 38: 711–728.
- Jericho KWF, Langford EV (1982):** Aerosol vaccination of calves with *Pasteurella haemolytica* against experimental respiratory disease. *Canad Vet J* 46: 287–292.
- Jericho KW, Kozub GC (2004):** Experimental infectious respiratory disease in groups of calves: lobar distribution, variance, and sample-size requirements for vaccine evaluation. *Can J Vet Res* 68: 118–127.
- Jordan R, Shao M, Mackman RL, Perron M, Cihlar T, Lewis SA, Eisenberg EJ, Carey A, Strickley RG, Chien JW, Anderson ML, McEligot HA, Behrens NE, Gershwin LJ (2015):** Antiviral efficacy of a respiratory syncytial virus (RSV) fusion inhibitor in a bovine model of RSV infection. *Antimicrob Agents Chemother* 59: 4889–4900.
- Jores J, Nkando I, Sterner-Kock A, Haider W, Poole J, Unger H, Muriuki C, Wesonga H, Taracha EL (2008):** Assessment of in vitro interferon-gamma responses from peripheral blood mononuclear cells of cattle infected with *Mycoplasma mycoides* ssp. *mycoides* small colony type. *Vet Immunol Immunopathol* 124: 192–197.

- Judge EP, Hughes JM, Egan JJ, Maguire M, Molloy EL, O'Dea S (2014):** Anatomy and bronchoscopy of the porcine lung: A model for translational respiratory medicine. *Am J Respir Cell Mol Biol* 51: 334–343.
- Kahl D, Hoffmann W (1985a):** Bronchoskopie beim Rind. 1. Mitteilung: Zur Methodik bronchoskopischer Untersuchungen beim Rind. *Tierärztliche Umschau* 40: 339–343.
- Kahl D, Hoffmann W (1985b):** Bronchoskopie beim Rind. 2. Mitteilung: Gewinnung und Untersuchung von Tracheal- und Bronchialspülproben von gesunden Rindern. *Tierärztliche Umschau* 40: 589–592.
- Kaske M, Kunz HJ, Reinhold P (2012):** Die Enzootische Bronchopneumonie des Kalbes – ein Update. *Prakt Tierarzt* 93: 232–245.
- Kikawada M, Ichinose Y, Minemura K, Takasaki M, Toyama K (1998):** A study of peripheral airway findings using ultrathin bronchofibrescope and bronchoalveolar lavage fluid with diffuse panbronchiolitis. *Respiration* 65: 433–440.
- Killingsworth CR, Slocombe RF, Alnoor SA, Robinson NE, Derksen FJ (1987):** Pulmonary dysfunction in neonatal calves after intratracheal inoculation of small volumes of fluid. *Am J Vet Res* 48: 1589–1593.
- King JM, Roth-Johnson L, Dodd DC, Newsom ME (2014):** The Necropsy Book – A guide for Veterinary students, residents, clinicians, pathologists and biological researchers. <http://hdl.handle.net/1813/37948>, Professorial Post Scripts Collection: <http://ecommons.library.cornell.edu/handle/1813/37929>, The Internet-First University Press: <http://ecommons.library.cornell.edu/handle/1813/62>.
- Kirschvink N, Leemans J, Delvaux F, Snaps F, Marlin D, Sparkes A, Clercx C, Gustin P (2006):** Non-invasive assessment of growth, gender and time of day related changes of respiratory pattern in healthy cats by use of barometric whole body plethysmography. *Vet J* 172: 446–454.
- Kirschvink N, Reinhold P (2008):** Use of alternative animals as asthma models. *Curr Drug Targets* 9: 470–484.
- Kirschvink N, Leemans J (2011):** Feline allergic asthma and experimental models: the sky is the limit. *Vet J* 190: 9–10.
- Kistler M, Szymczak W, Fedrigo M, Fiamoncini J, Höllriegl V, Hoeschen C, Klingenspor M, Hrabě de Angelis M, Rozman J (2014):** Effects of diet-matrix on volatile organic compounds in breath in diet-induced obese mice. *J Breath Res* 8: 016004.
- Kistler M, Muntean A, Szymczak W, Rink N, Fuchs H, Gailus-Durner V, Wurst W, Hoeschen C, Klingenspor M, Hrabě de Angelis M, Rozman J (2016):** Diet-induced and mono-genetic obesity alter volatile organic compound signature in mice. *J Breath Res* 10: 016009.
- Klein C (1999):** Sonographie der Lunge und Analyse der Atmungsmechanik mittels Impuls-Oszilloresistometrie beim lungengesunden und pneumoniekranke Ferkel und Läufer Schwein. Universität Leipzig, Veterinärmedizinische Fakultät, Diss.
- Klein C, Reinhold P (2001):** Analysis of respiratory mechanics by impulse oscillometry in non-sedated and diazepam-sedated swine. *Res Vet Sci* 70: 181–189.
- Klein C, Smith HJ, Reinhold P (2003):** Respiratory mechanics in conscious swine: effects of face mask, head position and bronchoconstriction evaluated by Impulse Oscillometry. *Res Vet Sci* 75: 71–81.
- Klein C, Smith HJ, Reinhold P (2006):** The use of Impulse Oscillometry for separate analysis of inspiratory and expiratory impedance parameters in horses: Effects of sedation with xylazine. *Res Vet Sci* 80: 201–208.
- Kneucker A (2008):** Funktionelle Residualkapazität und Diffusionskapazität der Lunge bei Kalb und Schwein. Berlin, FU, Fachbereich Veterinärmedizin, Diss.
- Knittler MR, Berndt A, Böcker S, Dutow P, Hänel F, Heuer D, Kägebein D, Klos A, Koch S, Liebler-Tenorio E, Ostermann C, Reinhold P, Saluz HP, Schöfl G, Sehnert P, Sachse K (2014):** *Chlamydia psittaci*: new insights into genomic diversity, clinical pathology, host-pathogen interaction and anti-bacterial immunity. *Int J Med Microbiol* 304: 877–893.
- Knobloch H, Schroedl W, Turner C, Chambers M, Reinhold P (2010):** Electronic nose responses and acute phase proteins correlate in blood using a bovine model of respiratory infection. *Sensors & Actuators: B. Chemical* 44: 81–87.
- Kozlova I, Vanthanoouvong V, Almgren B, Högman M, Roomans GM (2005):** Elemental composition of airway surface liquid in the pig determined by x-ray microanalysis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 32: 59–64.
- Küntzel A, Oertel P, Trefz P, Miekisch W, Schubert J, Köhler H, Reinhold P (2018):** Animal science meets agricultural practice: An innovative technical approach for exhaled breath analysis in cattle under field conditions. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* 131. doi 10.2376/0005-9366-17101.
- Lakritz J, Wilson WD, Watson JL, Hyde DM, Mihalyi J, Plopper C (1997):** Effect of treatment with erythromycin on bronchoalveolar lavage fluid cell populations in foals. *Am J Vet Res* 58: 56–61.
- Lambertz J (2011):** Untersuchungen zur Pathologie und Pathogenese der experimentellen aerogenen Infektion von Kälbern mit *Chlamydia psittaci* (nicht aviärer Herkunft). Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Diss.
- Lamoth F, Greub G (2010):** Amoebal pathogens as emerging causal agents of pneumonia. *FEMS Microbiol Rev* 34: 260–280.
- Lanzas C, Ayscue P, Ivanek R, Gröhn YT (2010):** Model or meal? Farm animal populations as models for infectious diseases of humans. *Nat Rev Microbiol* 8: 139–148.
- Larson VL, Busch RH (1985):** Equine tracheobronchial lavage: Comparison of lavage cytologic and pulmonary histopathologic findings. *Am J Vet Res* 46: 144–146.
- Leclere M, Lavoie-Lamoureux A, Gelinas-Lymburner E, David E, Martin JG, Lavoie JP (2011a):** Effect of antigenic exposure on airway smooth muscle remodeling in an equine model of chronic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 45: 181–187.
- Leclere M, Lavoie-Lamoureux A, Lavoie JP (2011b):** Heaves, an asthma-like disease of horses. *Respirology* 16: 1027–1046.
- Leclere M, Lavoie-Lamoureux A, Joubert P, Relave F, Setlakew EL, Beauchamp G, Couture C, Martin JG, Lavoie JP (2012):** Corticosteroids and antigen avoidance decrease airway smooth muscle mass in an equine asthma model. *Am J Respir Cell Mol Biol* 47: 589–596.
- Leruste H, Brscic M, Heutinck LE, Visser EK, Wolthuis-Fillerup M, Bokkers EA, Stockhofe-Zurwieden N, Cozzi G, Gottardo F, Lensink BJ, van Reenen CG (2012):** The relationship between clinical signs of respiratory system disorders and lung lesions at slaughter in veal calves. *Preventive Vet Med* 105: 93–100.
- Liebler EM, Waschbüsch J, Pohlenz JE, Moennig V, Liess B (1991):** Distribution of antigen of noncytopathogenic and cytopathogenic bovine virus diarrhoea virus biotypes in the intestinal tract of calves following experimental production of mucosal disease. *Arch Virol Suppl.* 3:109–124.
- Liebler-Tenorio EM, Pabst R (2006):** MALT structure and function in farm animals. *Vet Res* 37: 257–280.

- Liu S, Li W, Wang Y, Gu C, Liu X, Charreyre C, Fan S, He Q (2017):** Coinfection with *Haemophilus parasuis* serovar 4 increases the virulence of porcine circovirus type 2 in piglets. *Virology* 14: 227. doi: 10.1186/s12985-017-0890-6.
- 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.
- Lohr M, Prohl A, Ostermann C, Diller R, Greub G, Reinhold P (2016):** Pulmonary dysfunction induced by an experimental *Parachlamydia acanthamoebae* lung infection in calves. *Vet J* 213: 9–15.
- Lohr M (2017):** Evaluierung der Pathogenität von *Parachlamydia acanthamoebae* durch eine experimentell induzierte, respiratorische Infektion im bovinen Wirt. Berlin, FU, Fachbereich Veterinärmedizin, Diss.
- Loneragan RP 3rd, Ware JC, Atkinson RL, Winter WC, Suratt PM (1998):** Sleep apnea in obese miniature pigs. *J Appl Physiol* 84: 531–536.
- Magno M (1990):** Comparative anatomy of the tracheobronchial circulation. *Eur Respir J Suppl* 12: 557s–62s; discussion 62s–63s.
- Margine I, Kramer F (2014):** Animal Models for Influenza Viruses: Implications for Universal Vaccine Development. *Pathogens* 3: 845–874.
- Martinez-Olondris P, Rigol M, Torres A (2010a):** What lessons have been learnt from animal models of MRSA in the lung? *Eur Respir J* 35: 198–201.
- Martinez-Olondris P, Sibila O, Agusti C, Rigol M, Soy D, Esquinas C, Piner R, Luque N, Guerrero L, Quera MA, Marco F, de la Bellacasa JP, Ramirez J, Torres A (2010b):** An experimental model of pneumonia induced by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in ventilated piglets. *Eur Respir J* 36: 901–906.
- Mauderly JL (1974):** Evaluation of the grade pony as a pulmonary function model. *Am J Vet Res* 35: 1025–1029.
- May A, Gehlen H (2009):** Durchführung, Analyse und Aussagekraft von Tracheobronchialsekret (TBS) und bronchoalveolärer Lavage (BAL) bei Pferden mit Lungenerkrankungen. *Pferdeheilkunde* 25: 310–320.
- McGorum BC, Dixon PM (1994):** The analysis and interpretation of equine bronchoalveolar lavage fluid (BALF) cytology. *Equine Vet J* 6: 203–209.
- McLaughlin RF (1983):** Bronchial artery distribution in various mammals and in humans. *Am Rev Respir Dis* 128: S57–S58.
- McLaughlin RF, Tyler WS, Canada RO (1961):** A study of the subgross pulmonary anatomy in various mammals. *Am J Anat* 108: 149–165.
- McNeil JS, Torrington KG, Mundie TG, Banks RA, Phillips YY, Ripple GR (1991):** Prediction of carbon monoxide diffusing capacity of the lung in splenectomized sheep. *Lab Anim Sci* 41: 63–65.
- McNeil JS, Torrington KG, Mundie TG, Ripple GR, Phillips YY (1989):** A steady state method of measuring carbon monoxide diffusing capacity of the lung of sheep. *Lab Anim Sci* 39: 33–36.
- Menzel A, Beyerbach M, Siewert C, Gundlach M, Hoeltig D, Graage R, Seifert H, Waldmann KH, Verspohl J, Hennig-Pauka I (2014):** *Actinobacillus pleuropneumoniae* challenge in swine: diagnostic of lung alterations by infrared thermography. *BMC Vet Res* 10: 199. doi: 10.1186/s12917-014-0199-2.
- Meyer G, Deplanche M, Schelcher F (2008):** Human and bovine respiratory syncytial virus vaccine research and development. *Comp. Immunol Microbiol Infect Dis* 31: 191–225.
- Michel R (2011):** Umweltchlamydien mit medizinischer Bedeutung. *Dtsch Med Wochenschr* 136: 2100–2105.
- Morrison RB, Hilley HD, Leman AD (1985):** Comparison of methods for assessing the prevalence and extent of pneumonia in market weight Swine. *Canad Vet J* 26: 381–384.
- Muggenburg BA, Mauderly JL, Pickrell JA, Chiffelle TL, Jones RK, Luft UC, McClellan RO, Pflieger RC (1972):** Pathophysiological sequelae of bronchopulmonary lavage in the dog. *Am Rev Respir Dis* 106: 219–232.
- Naeije R (1997):** Pulmonary circulation at high altitude. *Respiration* 64: 429–434.
- Niemarkt HJ, Kuypers E, Jellema R, Ophelders D, Hütten M, Nikiforou M, Kribs A, Kramer BW (2014):** Effects of less-invasive surfactant administration on oxygenation, pulmonary surfactant distribution, and lung compliance in spontaneously breathing preterm lambs. *Pediatr Res* 76: 166–170.
- Obata K, Ueki J, Dambara T, Fukuchi Y (1999):** Repeated ultrasonically guided needle biopsy of small subpleural nodules. *Chest* 116: 1320–1324.
- Oduibo MO, Odama LE, Umoh JU, Lombin LH (2004):** The comparative pathogenicity of strains of eight serovars and untypable strains of *Mannheimia haemolytica* in experimental pneumonia of sheep. *Vet Res* 35: 661–669.
- Opriessnig T, Giménez-Lirola LG, Halbur PG (2011):** Polymicrobial respiratory disease in pigs. *Anim. Health. Res. Rev.* 12: 133–148.
- Ostermann C, Rüttger A, Schubert E, Schrödl W, Sachse K, Reinhold P (2013a):** Infection, disease, and transmission dynamics in calves after experimental and natural challenge with a Bovine *Chlamydia psittaci* isolate. *PLoS One* 8: e64066.
- Ostermann C, Schroedl W, Schubert E, Sachse K, Reinhold P (2013b):** 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.
- 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(1): 10. Erratum in: *Multidiscip Respir Med* 9(1): 42.
- Otto P, Elschner M, Reinhold P, Köhler H, Streckert HJ, Philippou S, Werchau H, Morgenroth K (1996):** A model for respiratory syncytial virus (RSV) infection based on experimental aerosol exposure with bovine RSV in calves. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 19: 85–97.
- Oveland NP, Søreide E, Lossius HM, Johannessen F, Wemmelund KB, Aagaard R, Sloth E (2013):** The intrapleural volume threshold for ultrasound detection of pneumothoraces: an experimental study on porcine models. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med* 21: 11.
- Pabst R (1996):** The respiratory immune system of pigs. *Vet Immunol Immunopathol* 54: 191–195.
- Pabst R, Binns RM (1994):** The immune system of the respiratory tract in pigs. *Vet Immunol Immunopathol* 43: 151–156.
- Pastoret PP, Griebel P, Bazin H, Govaerts A (Eds) (1998):** Handbook of Vertebrate Immunology. Academic Press, London.
- Pellegrini A, Kalkinc M, Hermann M, Grünig B, Winder C, Von Fellenberg R (1998):** Equinins in equine neutrophils: quantification in tracheobronchial secretions as an aid in the diagnosis of chronic pulmonary disease. *Vet J* 155: 257–262.
- Petro W, Zimmermann W, Forker W, Konietzko N (1987):** Mikrotrauma durch Bronchoskopie. Auswirkung auf Lungenfunktion und Ziliarfrequenz. Atemwegs- und Lungenkrankheiten 13: 430–432.

- Pilloux L, Casson N, Sommer K, Klos A, Stehle JC, Pusztaszeri M, Greub G (2015):** Severe pneumonia due to *Parachlamydia acanthamoebae* following intranasal inoculation: a mice model. *Microbes Infect.* 17: 755–760.
- Pohlmann JR, Brant DO, Daul MA, Reoma JL, Kim AC, Osterholzer KR, Johnson KJ, Bartlett RH, Cook KE, Hirschl RB (2011):** Total liquid ventilation provides superior respiratory support to conventional mechanical ventilation in a large animal model of severe respiratory failure. *ASAIO J* 57: 1–8.
- Pointon AM, Mercy AR, Backstrom L, Dial GD (1986):** Disease surveillance at slaughter. In: Leman AD et al. (eds.), *Diseases of Swine*. 7th ed., ISU Press, Ames, 968–987.
- Pomorska-Mól M, Markowska-Daniel I, Kwit K (2012):** Immune and acute phase response in pigs experimentally infected with H1N2 swine influenza virus. *FEMS Immunol Med Microbiol* 66: 334–342.
- Pomorska-Mól M, Markowska-Daniel I, Kwit K, Stępniewska K, Pejsak Z (2015):** Profile of the porcine acute-phase proteins response following experimental co-infection with H3N2 swine influenza virus and *Pasteurella multocida*. *Biomarkers* 20: 189–195.
- Pringle JK (1992):** Ancillary testing for the ruminant respiratory system. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 8: 243–256.
- 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. *JVis Exp* 89: doi: 10.3791/51557.
- Prohl A, Lohr M, Ostermann C, Liebler-Tenorio E, Berndt A, Schroedl W, Rothe M, Schubert E, Sachse K, Reinhold P (2015a):** 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.
- Prohl A, Lohr M, Ostermann C, Liebler-Tenorio E, Berndt A, Schroedl W, Rothe M, Schubert E, Sachse K, Reinhold P (2015b):** 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, Wolf K, Weber C, Müller KE, Menge C, Sachse K, Rödel J, Reinhold P, Berndt A (2015c):** Kinetics of Local and Systemic Leucocyte and Cytokine Reaction of Calves to Intrabronchial Infection with *Chlamydia psittaci*. *PLoS One* 10: e0135161.
- Prohl A, Ostermann CH, Rummel CD, Roth J, Reinhold P (2017):** Circulating and broncho-alveolar interleukin-6 in relation to body temperature in an experimental model of bovine *Chlamydia psittaci* infection. *PLoS One* 12: e0189321.
- Prysliaik T, van der Merwe J, Lawman Z, Wilson D, Townsend H, van Drunen Littel-van den Hurk S, Perez-Casal J (2011):** Respiratory disease caused by *Mycoplasma bovis* is enhanced by exposure to bovine herpes virus 1 (BHV-1) but not to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) type 2. *Can Vet J* 52: 1195–1202.
- Püllen C, Becker S, Smith HJ, Reinhold P, Reiner G (2014):** Evaluation of impulse oscillometry in pigs of unknown disease status originating from the field. *Vet J* 201: 78–82.
- Püllen C, Becker S, Reinhold P, Smith HJ, Reiner G (2015):** Relationship between clinical signs and results of impulse oscillometry in pigs originating from the field. *Res Vet Sci* 98: 106–111.
- Purkhart R, Köhler H, Liebler-Tenorio E, Meyer M, Becher G, Kikowatz A, Reinhold P (2011):** Chronic intestinal Mycobacteria infection: discrimination via VOC analysis in exhaled breath and headspace of feces using differential ion mobility spectrometry. *J Breath Res* 5: 027103.
- Puyo CA, Tricomi SM, Dahms TE (2008):** Early biochemical markers of inflammation in a swine model of endotracheal intubation. *Anesthesiology* 109: 88–94.
- Rabeling B, Rehage J, Döpfer D, Scholz H (1998):** Ultrasonographic findings in calves with respiratory disease. *Vet Rec* 143: 468–471.
- Reinero CR (2011):** Advances in the understanding of pathogenesis, and diagnostics and therapeutics for feline allergic asthma. *Vet J* 190: 28–33.
- Reinero CR, DeClue AE, Rabinowitz P (2009):** Asthma in humans and cats: is there a common sensitivity to aeroallergens in shared environments? *Environ Res* 109: 634–640.
- Reinhold P, Müller G, Kreutzer B, Gerischer A, Putsche R (1992):** Diagnostische Aussagefähigkeit biochemischer und zytologischer Parameter in der Lungenspülflüssigkeit gesunder und pneumoniekranke Kälber. *J Vet Med A* 39: 404–418.
- Reinhold P (1997a):** Atmungsmechanik beim Tier. 1. Mitteilung: Physiologische Grundlagen und konventionelle Untersuchungsmethoden. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* 110: 251–256.
- Reinhold P (1997b):** Atmungsmechanik beim Tier. 2. Mitteilung: Die forcierte Oszilloresistometrie. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* 110: 257–266.
- Reinhold P, Steinbach G, Langenberg A, Lekeux P (1998a):** Atmungsmechanik beim Tier. 3. Mitteilung: Methodische und physiologische Aspekte bei der Anwendung des Impuls-Oszilloresistometrie-Systems (IOS). *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* 111: 253–261.
- Reinhold P, Langenberg A, Lekeux P (1998b):** Atmungsmechanik beim Tier. 4. Mitteilung: Die diagnostische Aussagefähigkeit von Untersuchungen mit dem Impuls-Oszilloresistometrie-System (IOS) beim Kalb. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* 111: 262–267.
- Reinhold P (2001):** Untersuchungen zur Bestimmung pulmonaler Funktionen beim Kalb. Berlin, FU, Fachbereich Veterinärmedizin, Habilitationsschrift.
- 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, Costabel U, Hamacher J, Theegarten D, Rosenbruch M (2005a):** Vergleichende Aspekte der broncho-alveolären Lavage bei Mensch und Tier. *Pneumologie* 59: 485–501.
- Reinhold P, Jaeger J, Melzer F, Sachse K (2005b):** Evaluation of lung function in pigs either experimentally or naturally infected with Chlamydiaceae. *Vet Res Commun* 29 (Suppl.1): 125–150.
- Reinhold P, Schubert E, Liebler-Tenorio E, Schröder C, Reißig S, Reichel T, Sachse K (2006):** Respiratory Model of *Mycoplasma bovis* Infection in Calves. Proceedings of the 16th International Congress of the International Organization for Mycoplasmatology (IOM), Cambridge (UK), 09.–14. July 2006, 50.
- Reinhold P, Jaeger J, Liebler-Tenorio E, Berndt A, Bachmann R, Schubert E, Melzer F, Elschner M, Sachse K (2008a):** Impact of latent infections with *Chlamydoxiphila* species in young cattle. *Vet J* 175: 202–211.
- Reinhold P, Kirschvink N, Theegarten D, Berndt A (2008b):** An experimentally induced *Chlamydia suis* infection in pigs results in severe lung function disorders and pulmonary inflammation. *Vet Res* 39: 35.
- Reinhold P, Hartmann H, Constable PD (2010):** Characterisation of acid-base abnormalities in pigs experimentally infected with *Chlamydia suis*. *Vet J* 184: 212–218.

- Reinhold P, Knobloch H (2010):** Exhaled breath condensate: lessons learned from veterinary medicine. *J Breath Res* 4: 017001.
- Reinhold P, Ostermann C, Liebler-Tenorio E, Berndt A, Vogel A, Lambertz J, Rothe M, Rüttger A, Schubert E, Sachse K (2012):** A bovine model of respiratory *Chlamydia psittaci* infection: challenge-dose titration. *PLoS ONE* 7: e30125.
- Reißig S (2007):** Validierung der volumetrischen Kapnographie zur Erfassung klinisch inapparenter Lungenfunktionsstörungen beim Kalb. Berlin, FU, Fachbereich Veterinärmedizin, Diss.
- Reynolds HY, Newball HH (1974):** Analysis of proteins and respiratory cells obtained from human lungs by bronchial lavage. *J Lab Clin Med* 84: 559–573.
- Richard EA, Fortier GD, Denoix JM, Art T, Lekeux PM, Van Erck E (2009):** Influence of subclinical inflammatory airway disease on equine respiratory function evaluated by impulse oscillometry. *Equine Vet J* 41: 384–389.
- Roberts JC, McCrossan MV, Jones HB (1990):** The case for perfusion fixation of large tissue samples for ultrastructural pathology. *Ultrastruct Pathol* 14: 177–191.
- Robinson DG, Ehlers U, Herken R, Herrmann, Mayer F, Schürmann FW (1987):** Methods of preparation for electron microscopy. Springer Verlag Berlin Heidelberg
- Rogers CS, Stoltz DA, Meyerholz DK, Ostedgaard LS, Rokhlina T, Taft PJ, Rogan MP, Pezzulo AA, Karp PH, Itani OA, Kabel AC, Wohlford-Lenane CL, Davis GJ, Hanfland RA, Smith TL, Samuel M, Wax D, Murphy CN, Rieke A, Whitworth K, Uc A, Starner TD, Brogden KA, Shilyansky J, McCray PB Jr, Zabner J, Prather RS, Welsh MJ (2008):** Disruption of the CFTR Gene Produces a Model of Cystic Fibrosis in Newborn Pigs. *Science* 321: 1837–1841.
- Sacchini F, Naessens J, Awino E, Heller M, Hlinak A, Haider W, Sterner-Kock A, Jores J (2011):** A minor role of CD4+ T lymphocytes in the control of a primary infection of cattle with *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*. *Vet Res* 42: 77.
- Sachse K, Grossmann E, Berndt A, Schütt Ch, Henning K, Theegarten D, Anhenn O, Reinhold P (2004):** Respiratory chlamydial infection based on experimental aerosol challenge of pigs with *Chlamydia suis*. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 27: 7–23.
- Sadowitz B, Roy S, Gatto LA, Habashi N, Nieman G (2011):** Lung injury induced by sepsis: lessons learned from large animal models and future directions for treatment. *Expert Rev Anti Infect Ther* 9: 1169–1178.
- Sanz M, Loynachan A, Sun L, Oliveira A, Breheny P, Horohov DW (2013):** The effect of bacterial dose and foal age at challenge on *Rhodococcus equi* infection. *Vet Microbiol* 167: 623–631.
- Sanz MG, Loynachan A, Horohov DW (2016):** *Rhodococcus equi* hyperimmune plasma decreases pneumonia severity after a randomised experimental challenge of neonatal foals. *Vet Rec* 178: 261.
- Scholz H, Amtsberg G, Westermilies U, Binder A, Kirchhoff H (1987a):** Untersuchungen zur Bronchopneumonie des Rindes – 1. Mitteilung: Versuchsanstellung und mikrobieller Status von Nasen- und Tracheobronchialsekret. *Tierärztl Umschau* 42: 272–280.
- Scholz H, Currie M, Fischer W (1987b):** Untersuchungen zur Bronchopneumonie des Rindes – 2. Mitteilung: Endoskopische, Tracheobronchialsekret- und Blutgasuntersuchungen. *Tierärztl Umschau* 42: 371–378
- Schubert E, Sachse K, Jores J, Heller M (2011):** Serological testing of cattle experimentally infected with *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*. Small Colony using four different tests reveals a variety of seroconversion patterns. *BMC Vet Res* 7: 72.
- Sibila O, Agustí C, Torres A, Baquero S, Gando S, Patrón JR, Morato JG, Goffredo DH, Bassi N, Luna CM (2007):** Experimental *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia: evaluation of the associated inflammatory response. *Eur Respir J* 30: 1167–1172.
- Sibila M, Aragón V, Fraile L, Segalés J (2014):** Comparison of four lung scoring systems for the assessment of the pathological outcomes derived from *Actinobacillus pleuropneumoniae* experimental infections. *BMC Vet Res* 10: 165.
- Slocombe RF, Robinson NE, Derksen FJ, Carrig CB (1988):** Thoracic radiographic appearance during lung inflation in neonatal calves. *Vet Res Commun* 12: 259–272.
- Soerensen KE, Olsen HG, Skovgaard K, Wiinberg B, Nielsen OL, Leifsson PS, Jensen HE, Kristensen AT, Iburg TM (2013):** Disseminated intravascular coagulation in a novel porcine model of severe *Staphylococcus aureus* sepsis fulfills human clinical criteria. *J Comp Pathol* 149: 463–474.
- Sperber J, Nyberg A, Lipcsey M, Melhus Å, Larsson A, Sjölin J, Castegren M (2017):** Protective ventilation reduces *Pseudomonas aeruginosa* growth in lung tissue in a porcine pneumonia model. *Intensive Care Med Exp* 5: 40. doi: 10.1186/s40635-017-0152-3.
- Strausz J, Bölskei P, Repa I (1998):** Percutaneous fine needle biopsy of pulmonary disease. In: Strausz J (ed.), *Pulmonary endoscopy and biopsy techniques*. *Eur Respir Monograph* 3, Nr 9, Chapter 8: 124–134.
- Straw BE, Bäckström L, Leman AD (1986):** Examination of swine at slaughter. Part II. Findings at slaughter and their significance. *Comp Contin Edu Pract Vet* 8: 106–112.
- Sweeney CR, Rossier Y, Ziemer EL, Lindborg SR (1994):** Effect of prior lavage on bronchoalveolar lavage fluid cell population of lavaged and unlavaged lung segments in horses. *Am. J. Vet. Res.* 55: 1501–1504.
- Talavera J, Kirschvink N, Schuller S, Garrères AL, Gustin P, Dettelleux J, Clercx C (2006):** Evaluation of respiratory function by barometric whole-body plethysmography in healthy dogs. *Vet J* 172: 67–77.
- Ten Have GAM, Deutz RCI, Engelen MPKJ, Wolfe RR, Deutz NEP (2018):** Characteristics of a *Pseudomonas aeruginosa* induced porcine sepsis model for multi-organ metabolic flux measurements. *Lab Anim* 52:163–175.
- Theegarten D, Sachse K, Mentrup B, Fey K, Hotzel H, Anhenn O (2008):** *Chlamydophila* spp. infection in horses with recurrent airway obstruction: similarities to human chronic obstructive disease. *Resp Res* 9: 14.
- Thomson RG, Chander S, Savan M, Fox ML (1975):** Investigation of factors of probable significance in the pathogenesis of pneumonic pasteurellosis in cattle. *Canad J Comp Med* 39: 194–207.
- Tian L, Lammers SR, Kao PH, Albietz JA, Stenmark KR, Qi HJ, Shandas R, Hunter KS (2012):** Impact of residual stretch and remodeling on collagen engagement in healthy and pulmonary hypertensive calf pulmonary arteries at physiological pressures. *Ann Biomed Eng* 40: 1419–1433.
- Tortorelli G, Carrillo Gaeta N, Mendonça Ribeiro BL, Miranda Marques L, Timenetsky J, Gregory L (2017):** Evaluation of Mollicutes microorganisms in respiratory disease of cattle and their relationship to clinical signs. *J Vet Intern Med* 31: 1215–1220.
- Turner AW (1961):** Preventive tail-tip inoculation of calves against bovine contagious pleuropneumonia. *Australian Vet J* 37: 259–264.
- Vanden Bush TJ, Rosenbusch RF (2003):** Characterization of the immune response to *Mycoplasma bovis* lung infection. *Vet Immunol Immunopathol* 94: 23–33.

- van Dixhoorn ID, Reimert I, Middelkoop J, Bolhuis JE, Wisselink HJ, Groot Koerkamp PW, Kemp B, Stockhofe-Zurwieden N (2016):** Enriched housing reduces disease susceptibility to co-infection with porcine reproductive and respiratory virus (PRRSV) and *Actinobacillus pleuropneumoniae* (*A. pleuropneumoniae*) in young pigs. *PLoS One* 11: e0161832.
- Van Erck E, Votion D, Art T, Lekeux P (2006):** Qualitative and quantitative evaluation of equine respiratory mechanics by impulse oscillometry. *Equine Vet J* 38: 52–58.
- Van Rhijn I, Godfroi J, Michel A, Rutten V (2008):** Bovine tuberculosis as a model for human tuberculosis: advantages over small animal models. *Microbes Infect* 10: 711–715.
- Verbrugge E, Boyen F, Gaastra W, Bekhuis L, Leyman B, Van Parys A, Haesebrouck F, Pasmans F (2012):** The complex interplay between stress and bacterial infections in animals. *Vet Microbiol.* 155: 115–127.
- Wagner JM (2011):** Einfluss von PRRSV-Infektionen auf die Lungenfunktion des Schweines. Berlin, FU, Fachbereich Veterinärmedizin, Diss.
- Wagner J, Kneucker A, Liebler-Tenorio E, Fachinger V, Glaser M, Pesch S, Murtaugh MP, Reinhold P (2011):** Respiratory function and pulmonary lesions in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet J* 187: 310–319.
- Waters WR, Whelan AO, Lyashchenko KP, Greenwald R, Palmer MV, Harris BN, Hewinson RG, Vordermeier HM (2010):** Immune responses in cattle inoculated with *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis*, or *Mycobacterium kansasii*. *Clin Vaccine Immunol* 17: 247–252.
- Waters WR, Palmer MV, Thacker TC, Davis WC, Sreevatsan S, Coussens P, Meade KG, Hope JC, Estes DM (2011):** Tuberculosis immunity: opportunities from studies with cattle. *Clin Dev Immunol* 768542, doi: 10.1155/2011/768542.
- Waters WR, Maggioli MF, McGill JL, Lyashchenko KP, Palmer MV (2014a):** Relevance of bovine tuberculosis research to the understanding of human disease: historical perspectives, approaches, and immunologic mechanisms. *Vet Immunol Immunopathol* 159: 113–132.
- Waters WR, Thacker TC, Nelson JT, DiCarlo DM, Maggioli MF, Greenwald R, Esfandiari J, Lyashchenko KP, Palmer MV (2014b):** Virulence of two strains of *Mycobacterium bovis* in cattle following aerosol infection. *J Comp Pathol* 151: 410–419.
- Waters WR, Palmer MV (2015):** *Mycobacterium bovis* infection of cattle and white-tailed deer: Translational research of relevance to human tuberculosis. *ILAR J* 56: 26–43.
- Weber O, Reinhold P, Steinbach G, Lachmann G (1992):** Methodische Untersuchungen zur transmukösen Sauerstoffpartialdruckmessung an Kalb und Hund. *Berl Münch Tierärztl Wschr* 105: 267–271.
- Weibel ER, Kistler GS, Scherle WF (1966):** Practical stereological methods for morphometric cytology. *J Cell Biol* 30: 23–38.
- Welsh MJ, Rogers CS, Stoltz DA, Meyerholz DK, Prather RS (2009):** Development of a porcine model of cystic fibrosis. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 120: 14–62.
- 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.
- White BJ, Anderson DE, Renter DG, Larson RL, Mosier DA, Kelly LL, Theurer ME, Robért BD, Walz ML (2012):** Clinical, behavioral, and pulmonary changes in calves following inoculation with *Mycoplasma bovis*. *Am J Vet Res* 73: 490–497.
- Whitwell KE, Greet TRC (1984):** Collection and evaluation of tracheobronchial washes in the horse. *Equine Vet J* 16: 499–508.
- Wilkie BN, Markham RJ (1981):** Bronchoalveolar washing cells and immunoglobulins of clinically normal calves. *Am J Vet Res* 42: 241–243.
- Winder NC, Hermann M, Grünig G, Hulliger C, Von Fellenberg R (1990):** Comparison of bronchoalveolar lavage and respiratory secretion cytology in horses with clinically diagnosed chronic pulmonary disease. *Schweiz Arch Tierheilkd* 132: 505–510.
- Wolfram F, Boltze C, Schubert H, Bischoff S, Lesser TG (2014):** Effect of lung flooding and high-intensity focused ultrasound on lung tumours: an experimental study in an ex vivo human cancer model and simulated in vivo tumours in pigs. *Eur J Med Res* 19: 1.
- Woolums A, Chase C, Fulton R, Rosenbusch R, Tremblay R (2009):** Proceedings of the 2009 Bovine Respiratory Disease (BRD) Symposium. *Animal Health Research Reviews* 10: 99–167.
- Yan Z, Stewart ZA, Sinn PL, Olsen JC, Hu J, McCray PB Jr, Engelhardt JF (2015):** Ferret and pig models of cystic fibrosis: prospects and promise for gene therapy. *Hum Gene Ther Clin Dev* 26: 38–49.
- Young SS, Tesarowski D (1994):** Respiratory mechanics of horses measured by conventional and forced oscillation techniques. *J Appl Physiol* 76: 2467–2472.
- Yuk SS, Lee DH, Park JK, Tseren-Ochir EO, Kwon JH, Noh JY, Song CS (2017):** Experimental infection of dogs with highly pathogenic avian influenza virus (H5N8). *J Vet Sci* 18(S1): 381–384.
- Zamuruyev KO, Aksenov AA, Baird M, Pasamontes A, Parry C, Foutouhi S, Venn-Watson S, Weimer BC, Delplanque JP, Davis CE (2016):** Enhanced non-invasive respiratory sampling from bottlenose dolphins for breath metabolomics measurements. *J Breath Res* 10: 046005.
- Zhan L, Tang J, Sun M, Qin C (2017):** Animal Models for Tuberculosis in Translational and Precision Medicine. *Front Microbiol* 8: 717.

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Dr. Petra Reinhold
 Institut für molekulare Pathogenese
 Friedrich-Loeffler-Institut (FLI)
 Naumburger Str. 96a
 07743 Jena
 petra.reinhold@fli.de