# Pulmonale Infektionsmodelle

## 7. Workshop des Arbeitskreises „Vergleichende Pathologie und Pathophysiologie des respiratorischen Systems“ der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG) in Zusammenarbeit mit den Sektionen Infektiologie und Tuberkulose und Zellbiologie der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie (DGP) am 17.03.2005 in Berlin

P. Reinhold[1]
M. Rosenbruch[2]
D. Theegarten[3]
K. Dalhoff[4]

***Models of Pulmonary Infections. 7th Workshop of the working group “Comparative Pathology and Pathophysiology of the Respiratory System” of the German Veterinary Society in Co-Operation with Sections Infectiology & Tuberculosis and Cell Biology of the German Society for Pneumology, Berlin, March 17, 2005***





Pulmonale Infektionskrankheiten, die durch verschiedene Erreger bedingt sein können, sind in der humanmedizinischen Pneumologie nach wie vor von erheblicher Relevanz. Auch in der Tiermedizin stellen infektiös bedingte Atemwegs- und Lungenerkrankungen einen Schwerpunkt des tierärztlichen Aufgabenfeldes dar. Das Bindeglied zwischen den verschiedensten Spezies sind Tiermodelle, die in beiden Fachrichtungen genutzt werden, um einerseits die Pathogenese pulmonaler Infektionen aufzuklären und um andererseits therapeutische Interventionsmöglichkeiten zu evaluieren.

Der innerhalb des 46. Jahreskongresses der DGP durchgeführte interdisziplinäre Workshop über pulmonale Infektionsmodelle verfolgte das Ziel, den Informationsaustausch zwischen der Humanmedizin und Veterinärmedizin zum beiderseitigen wissenschaftlichen und praktischen Nutzen zu fördern. An unterschiedlichen Tierarten (Maus bis Großtier) wurden die Möglichkeiten und die Grenzen von *In-vivo*-Modellen beleuchtet. Komplettiert wurde das methodische Repertoire durch zukunftsweisende *In-vitro*-Techniken, wie Untersuchungen an lebenden Lungenschnitten oder Fish-Analysen von Biofilmen, mit denen Erreger-Wirt-Interaktionen studiert werden können. Insgesamt bot der Workshop vielfältige Möglichkeiten zum interdisziplinären Austausch und zur fachübergreifenden Kommunikation, die auch in Zukunft weiter gepflegt und ausgebaut werden sollten.

### Die Bedeutung von Tiermodellen als Mittler zwischen Forschung und Klinik

*C. Grohé, Universitätsklinikum Bonn, Medizinische Universitäts-Poliklinik*

Seit Beginn der Erforschung der pathophysiologischen Grundlagen von Atemwegserkrankungen spielen krankheitsbezogene Tiermodelle eine zentrale Rolle. Standen zu Anfang insbesondere infektiologische Fragestellungen im Vordergrund, hat sich in den letzten Jahren das Spektrum der Erforschung von akuten und chronischen pulmonalen Krankheitsprozessen mithilfe von Tiermodellen in großem Maße erweitert. Der gezielte Einsatz von Modellen wie dem Schwein, Kalb aber auch Nagetieren ermöglicht heute die Beantwortung relevanter infektiologischer, immunologischer und onkologischer Fragestellungen. Hier hat es sich in letzter Zeit bewährt, dass sowohl Großtier- als auch Kleintiermodelle zur Verfügung stehen, da aus ethischen Gründen Untersuchungen am Menschen nicht möglich sind. Die Korrelation der pulmonalen Pathologie des Menschen mit einem sorgfältig ausgewählten Tiermodell ermöglicht heute die Beantwortung wichtiger physiologischer Fragen und therapeutischer Ansätze.

Insbesondere ist in den letzten Jahren durch die Entwicklung von transgenen Tiermodellen eine gezielte Analyse von relevanten Kandidatengenen als Ursache von Erkrankungen wie den pulmonalen Neoplasien, aber auch der obstruktiven Atemwegserkrankungen möglich gemacht worden. Die gezielte Überexpression

**Institutsangaben**
[1]Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Standort Jena
[2]Bayer Health Care AG, PH-RD-T Pathologie, Pharmaforschungszentrum, Wuppertal
[3]Ruhr-Universität Bochum, Institut für Pathologie, Berufgenossenschaftliche Kliniken Bergmannsheil, Bochum
[4]Universitätsklinik Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, Med. III, Lübeck

**Korrespondenzadresse**
PD Dr. Dr. med. Petra Reinhold · Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Standort Jena · Naumburger Str. 96a · 07743 Jena · E-mail: petra.reinhold@fli.bund.de

**Bibliografie**
Pneumologie 2005; 59: 411–427 © Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York
DOI 10.1055/s-2004-830310
ISSN 0934-8387

Dieses Dokument wurde zum persönlichen Gebrauch heruntergeladen. Vervielfältigung nur mit Zustimmung des Verlages.

oder Ausschaltung von einzelnen Genen bzw. von Signalkaskaden in der Lunge transgener Tiere erfordert jedoch im *In-vivo*-Modell eine anschließende, umfassende Analyse der Mechanismen. Da in letzter Zeit insbesondere auf dem Gebiet der Entwicklung von transgenen Mausmodellen ein deutlicher Fortschritt erzielt worden ist, wurde eine Adaptation der entsprechenden Analyseparameter für diese Kleintier- bzw. Nagetiermodelle notwendig. Die Entwicklung von relevanten Lungenfunktionsparametern ebenso wie die weitergehende Beschreibung der Einzelzellanalysen, z. B. durch Durchflusszytometrie, aber auch durch chipbasierte Genprofilanalysen ermöglicht heute eine genauere Beschreibung der zugrunde liegenden Pathomechanismen. Die Kombination dieser Methoden eines krankheitsbezogenen Tiermodells, z. B. in der Ursachenerforschung der obstruktiven Atemwegserkrankungen, stellt heute eine komplexe Vernetzung verschiedener *Ex-vivo*- und *In-vivo*-Techniken dar. Die weitergehende Manipulation der zugrunde liegenden Modelle mittels Stimulation (z. B. durch Inhalation bzw. Injektion pathophysiologisch relevanter Noxen) führte ebenfalls zu einer Erweiterung des Spektrums.

Die Entwicklung neuer Lungenfunktionsanalyseparameter der murinen Modelle hat einen enormen Zuwachs an Informationen bedeutet. Dieser Zuwachs an Informationen bedarf jedoch in den nächsten Jahren einer weitergehenden Validierung und Bezugnahme auf die bereits gut etablierten Großtiermodelle.

Die Charakterisierung der krankheitsbezogenen Tiermodelle ist die Grundlage zur Entwicklung neuer therapeutischer Strategien. Insbesondere stehen nun Tiermodelle zur Verfügung, die eine gezielte Überprüfung eines therapeutischen Ansatzes, z. B. Untersuchung von pharmakologischen Agonisten bzw. Antagonisten gegen Rezeptoren oder Signalkaskaden möglich macht. Die weitere Analyse dieser therapeutischen Ansätze ist anschließend mittels der Lungenfunktionsanalyse bzw. von Einzelzellmessungen möglich. All diese Bemühungen unterstreichen die Bedeutung von Tiermodellen zur Planung und Optimierung therapeutischer Strategien der patientenbezogenen Forschung. Eine weitergehende Forschung der zugrunde liegenden Mechanismen dieser verschiedenen Krankheitsbilder ermöglicht die Entwicklung gezielter therapeutischer Strategien in Krankheitsbereichen, die weiterhin eine hohe Rezidivrate bzw. eine erhebliche Limitierung der Lebenserwartung bedeuten, wie z. B. den pulmonalen Neoplasien oder durch eine erhebliche Morbidität belastet sind wie die Pneumonien.

## Modelle pulmonaler Infektionen bei Großtieren – speziesspezifische Unterschiede

*P. Reinhold, Friedrich-Loeffler-Institut (FLI) – Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Standort Jena*

### Einleitung

Im Zeitalter der modernen Molekularbiologie werden interessante neue Ergebnisse auf zellulärer und molekularer Ebene gewonnen. Ob aus *In-vitro*-Systemen stammende Phänomene in gleicher Weise im Gesamtorganismus vorkommen und welche pathogenetische Relevanz ihnen *in vivo* zuzuschreiben ist, kann nur im integrierten Tiermodell erforscht werden.

Nicht nur in der pneumologischen Forschung sind Labornager, und hier insbesondere Mäuse, die zurzeit wohl am häufigsten verwendeten Spezies bei der Etablierung und Nutzung von Tiermodellen. Die Gründe hierfür sind unter anderem eine leichte Verfügbarkeit von genetisch definierten Versuchstieren, die relativ gute immunologische Charakterisierung, eine günstige Kosten-Nutzen-Rechnung sowie die schnelle Verfügbarkeit publizierbarer Ergebnisse.

Größere Tierarten bis hin zu landwirtschaftlichen Nutztieren werden hingegen weniger häufig für Forschungszwecke eingesetzt. Gerade letztere bieten aber folgende Vorteile:

- Spontan auftretende respiratorische Erkrankungen bei einer bestimmten Tierart sind in Ätiologie und Pathogenese oft vergleichbaren respiratorischen Erkrankungen des Menschen sehr ähnlich (z. B. Infektion mit Respiratorischen Synzytial Virus beim Kalb; Asthma der Katze; COPD des Pferdes), so dass von einem weniger artifiziellen Modell als beim Labornager ausgegangen werden kann.
- Tiere mit Körpermassen zwischen 50 und 100 kg (z. B. Kälber, Schweine, Schafe) weisen dem Menschen vergleichbare physiologische Bereiche für Kenngrößen der Lungenfunktion (Volumina, Atmungsstromstärken, Resistance etc.) auf.
- Durch moderne nicht-invasive diagnostische Methoden, die an Tier und Mensch gleichermaßen unter Spontanatmung anwendbar sind kann sichergestellt werden, dass im Tierexperiment identische Funktionsparameter erhoben werden wie auch am humanen Patienten (direkte Vergleichbarkeit!).
- Aufgrund der längeren Lebensdauer von Großtieren im Vergleich zum Labornager werden intra-individuelle Langzeituntersuchungen möglich – eine Voraussetzung zur Etablierung von Modellen für chronische Erkrankungen.

Bedingt durch speziesspezifische Besonderheiten in Struktur und Funktion des respiratorischen Systems wird letztendlich kein Tiermodell in der Lage sein, alle Charakteristika einer respiratorischen Erkrankung des Menschen widerzuspiegeln. Bei der Wahl einer bestimmten Spezies zur Etablierung von Tiermodellen sollten jedoch die nachfolgend aufgeführten anatomischen und funktionellen Unterschiede zwischen der Lunge des Menschen und den Lungen verschiedener Tierarten bekannt sein und – entsprechend der zu bearbeitenden Fragestellung – Beachtung finden.







Dieses Dokument wurde zum persönlichen Gebrauch heruntergeladen. Vervielfältigung nur mit Zustimmung des Verlages.

Tab. **1** Lungentypen auf Basis der Segmentanatomie und deren spezifische Charakteristika (modifiziert nach [2] und [6])

| | *Typ I* | *Typ II* | *Typ III* |
|---|---|---|---|
| | Rind, Schaf, Schwein | Hund, Katze, Affe | Pferd |
| Grad der Lobulierung | hoch | keine | unvollständig |
| Pleura | dick (nutritive Versorgung durch *Arteria bronchialis*) | dünn (nutritive Versorgung durch *Arteria bronchialis*) | dick (nutritive Versorgung durch *Arteria bronchialis*) |
| distale Atemwege | | | |
| terminale Bronchien | als dominierende distale Atemwege vorhanden | fehlen | vorhanden |
| respiratorische Bronchiolen | kaum entwickelt | vorhanden (sehr gut entwickelt) | vorhanden (aber weniger gut entwickelt) |
| kollaterale Ventilation | nicht vorhanden bei Rind und Schwein eingeschränkt vorhanden beim Schaf | sehr gut entwickelte kollaterale Atemwege | eingeschränkt vorhanden |
| Zirkulation | | | |
| Termination der Bronchialarterie | distale Atemwege | distale Atemwege | distale Atemwege & Alveolen |
| Shunts zwischen *Arteria bronchialis* und *Arteria pulmonalis* | vorhanden (beim Schwein allerdings nicht nachgewiesen) | nicht nachgewiesen | vorhanden |

## Morphologische Besonderheiten des respiratorischen Systems verschiedener Spezies

### Anatomie des Tracheobronchialbaumes

Das System der Atemwege unterliegt bei verschiedenen Säugetieren sehr unterschiedlichen Verzweigungsmustern. Während sich die Atemwege in der humanen Lunge (wie auch in der Lunge größerer Tierarten) irregulär dichotom verzweigen, weisen die Atemwegssysteme von Maus, Ratte und Hamster ein monopodiales Aufzweigungsmuster auf [1]. Eine Besonderheit bei Wiederkäuern (Rind, Schaf, Ziege) und Schweinen besteht darin, dass der zum rechten kranialen Lungenlappen führende Bronchus noch vor der Bifurkation direkt von der lateralen Seite der Trachea abzweigt.

### Segmentanatomie der Lunge

Entsprechend des Segmentierungsgrades der Lungen werden 3 Typen der Säugerlungen unterschieden [2], deren typische Charakteristika in Tab. **1** vergleichend dargestellt sind. Eine Ausnahme stellt die Lunge der Ziege dar, die einen geringen Lobulierungsgrad (nur in den kranialen Lungenlappen) und eine dünne Pleura aufweist [3]. Bezüglich der peripheren Atemwege sei angemerkt, dass das Fehlen respiratorischer Bronchiolen nicht für die Lungen von Schafen, Rindern und Schweinen, sondern auch für die meisten Nagerlungen (inkl. Kaninchen) charakteristisch ist [2].

### Pulmonales Gefäßbett

Bezüglich spezifischer Unterschiede und Besonderheiten im Verlauf und in der Struktur der pulmonalen Gefäße sei auf einen Übersichtsartikel von Kay [4] verwiesen. Insbesondere die Schichtdicke der glatten Muskulatur ist in den kleinen pulmonalen Arterien, Arteriolen und Venen der meisten Tierarten stärker ausgeprägt als beim Menschen, variiert aber zwischen verschiedenen Tierarten erheblich. Für Studien, in welchen die pulmonale Perfusion beurteilt werden soll, kann im Prinzip davon ausgegangen werden, dass die Struktur der Gefäße mit den funktionellen Eigenschaften des pulmonalen Gefäßbettes korreliert ist. Entsprechend der Empfindlichkeit, mit der die kleinen pulmonalen Arterien auf vasokonstriktorische Stimuli (inklusive der alveolären Hypoxie) reagieren, können verschiedene Tierarten wie folgt klassifiziert werden [5,6]:

- stark reagibel: Rind, Schwein, Frettchen
- moderat reagibel: Ratte, Kaninchen, Katze, Pferd, Ziege
- kaum reagibel: Meerschweinchen, Hund.

Für Schafe schwanken die Literaturangaben zwischen mild und moderat.

## Besonderheiten der Lungenbelüftung im speziesspezifischen Vergleich

### Atmungsmechanik

Je höher der Segmentierungsgrad einer Lunge ist, desto höher ist der Anteil bindegewebiger Strukturen innerhalb des Lungengewebes infolge bindegewebiger Septen zwischen den Segmenten. In der Konsequenz weisen höher segmentierte Lungen auch höhere resistive Gewebewiderstände und verminderte Dehnbarkeitseigenschaften (spezifische dynamische Compliance) auf. Folglich ist die spezifisch zu leistende Atemarbeit zur Überwindung der Widerstände beispielsweise bei Rindern und Schweinen schon unter Ruheatmung größer als bei Mensch, Pferd, Hund, Katze oder Ratte.

### Kollaterale Ventilation

Das Vorhandensein von kollateralen Atemwegen (Kohnsche Poren, Lambertsche Kanäle, Martinsche Kanäle) wurde für die Lunge des Menschen, sowie für die Lunge von Hund, Katze, Kaninchen, Frettchen, Schaf und Pferd beschrieben und von Mitzner [7] in einer Übersichtsarbeit zusammengefasst. Speziesspezifische Unterschiede bestehen dahingehend, dass die funktionelle kollaterale Ventilation bei Hund, Katze und Kaninchen sehr stark, jedoch bei Pferd und Schaf in deutlich geringerem Maße an der alveolären Belüftung beteiligt ist. Weil Rinder und Schweine nicht über die Möglichkeit verfügen, Alveolarbezirke,





Dieses Dokument wurde zum persönlichen Gebrauch heruntergeladen. Vervielfältigung nur mit Zustimmung des Verlages.

Tab. **2** Daten zur Gasaustauschkapazität und Belüftung der Lunge bei verschiedenen Tierarten (modifiziert entsprechend der Angaben von [28])

| | *Alveolaroberfläche pro kg Körpermasse* | *Alveolaroberfläche in Relation zum $O_2$-Verbrauch des Organismus* | *Atemzugvolumen ($V_t$) in Relation zum totalen Lungenvolumen* | *Atemzugvolumen ($V_t$) pro kg Körpermasse* | *Belüftungsrate (Atemminutenvolumen in Relation zum totalen Lungenvolumen)* |
|---|---|---|---|---|---|
| | [$m^2$/kg] | [$m^2$/ml $O_2$] | [%] | [ml/kg] | |
| *Mensch* | 1,15 | 0,0051 | 11,0 | 9,9 | 1,32 |
| *Katze* | 2,81 | 0,0054 | 7,5 | 9,8 | 1,54 |
| *Hund* | 2,91 | 0,0078 | 14,0 | 15,7 | 2,80 |
| *Ziege* | 3,00 | 0,0082 | 7,8 | 9,7 | 1,47 |
| *Pferd* | keine Angaben | keine Angaben | 14,3 | 15,4 | 1,57 |
| *Rind* | 0,64 | 0,0025 | 29,0 | 7,4 | 8,71 |

deren zuführender Bronchus verlegt ist, über kollaterale Atemwege zu belüften, sind in Rinder- und Schweinelunge häufig Atelektasen zu finden. In der Konsequenz neigen letztgenannte Tierarten zum Auftreten ventilatorischer Asynchronismen und regionaler Inhomogenitäten bei der alveolären Ventilation.

**Gasaustauschkapazität**

Wie Tab. **2** widerspiegelt, variiert die Alveolarfläche in Relation zur Körpermasse (KM) erheblich zwischen unterschiedlichen Spezies. Im Vergleich zum Menschen (1,1 $m^2$/kg) beträgt die Alveolarfläche pro kg KM beispielsweise beim Rind nur 0,6 $m^2$/kg; beim Hund jedoch 2,9 $m^2$/kg und bei der Ziege 3,0 $m^2$/kg.

Die funktionelle Konsequenz hieraus ist, dass bei Lungen mit geringerer Gasaustauschkapazität schon unter den Bedingungen der Ruheatmung ein relativ größerer Anteil der totalen Lungenkapazität ventiliert werden muss. So beträgt beispielsweise die Belüftungsrate der Lunge (ausgedrückt als das Verhältnis zwischen Atemminutenvolumen und totalem Lungenvolumen) beim Rind > 8, während sie bei anderen Säugern – wie Katze, Hund, Ziege, Mensch oder Pferd – zwischen 1,3 und 2,8 angegeben wird.

**Atmungsmuster**

Aufgrund einer im Verhältnis zur Körpermasse kleinen Lunge mit einer geringen spezifischen dynamischen Compliance können Rinder und Schweine nur eine geringe Atemtiefe realisieren. Demzufolge ist das mittlere Atemzugvolumen bezogen pro kg Körpermasse (Vt/kg) bei Rindern und Schweinen geringer als bei anderen Spezies (vgl. Tab. **2**). Bezogen auf die Körpermasse haben Jungtiere ein größeres Atemzugvolumen pro kg KM als adulte Tiere. Innerhalb der eigenen Arbeitsgruppe wurde für lungengesunde Kälber eine zum adulten Menschen vergleichbare Atemtiefe von etwa 9 – 11 ml/kg ermittelt [8 – 10].

Da das Atemminutenvolumen ($V_{min}$) ein Produkt aus Atemzugvolumen ($V_t$) und der Atmungsfrequenz ($f_R$) darstellt ($V_{min} = V_t \times f_R$), ist das Ventilationsmuster bei Spezies, deren Atemzugvolumen im Vergleich zu anderen Tierarten limitiert ist, durch eine höhere physiologische Atmungsfrequenz gekennzeichnet (beispielsweise 20 – 30 Atemzüge pro Minute beim Rind *versus* 12 – 16 Atemzüge pro Minute beim Pferd mit vergleichbarer KM).

**Totraumventilation**

Das Verhältnis zwischen Totraumvolumen ($V_d$) und Atemzugvolumen determiniert, welcher prozentuale Anteil des pro Atemzug inhalierten Volumens nicht am Gasaustausch teilnimmt. Dieses $V_d/V_t$-Verhältnis variiert erheblich zwischen verschiedenen Spezies. Beispielsweise sind beim Menschen – vergleichbar zu Hund und Meerschweinchen – etwa 30 – 40 % des inhalierten Volumens reines Totraumvolumen, so dass etwa 60 – 70 % von $V_t$ am Gasaustausch teilnehmen. Im Gegensatz dazu kann der Anteil des Totraumvolumens am Atemzugvolumen bei Großtieren (wie Rind oder Pferd) zwischen 50 % und 75 % betragen [11,12].

## Konsequenzen von Struktur und Funktion der Lunge für Tiermodelle

**Anteil bindegewebiger Strukturen in der Lunge**

Tierarten, deren Lunge durch einen ausgeprägten Segmentierungsgrad gekennzeichnet ist (z. B. Rind, Schwein und Schaf), weisen einen höheren Anteil bindegewebiger Strukturen innerhalb des Lungengewebes auf als Tierarten ohne ausgeprägte Segmentanatomie der Lunge (z. B. Hund und Katze). Bei der Auswertung bildgebender diagnostischer Verfahren sollten bei den zuerst genannten Tierarten auffällige interstitielle Strukturen folglich nicht irrtümlicherweise als Zeichen einer interstitiellen Pneumonie interpretiert werden.

**Lokalisation von Entzündungsprozessen**

Jedes broncho-pulmonale Segment stellt eine in sich geschlossene funktionelle Einheit dar, welche durch Bindegewebe vom Nachbarsegment abgegrenzt ist, über einen Segmentbronchus belüftet und über ein funktionell zugehöriges Blutsystem perfundiert wird. Stark segmentierte Lungen bieten den Vorteil, dass einzelne Segmente chirurgisch gut trennbar sind. Des Weiteren wird eine Ausbreitung von Entzündungen und Infektionen durch die bindegewebigen Septen zwischen einzelnen Segmenten und durch das Fehlen kollateraler Atemwege begrenzt. Folglich sind in den zum Typ I gehörigen Lungen (vgl. Tab. **1**) Erkrankungsherde meist stark lokal begrenzt und scharf vom gesunden







Dieses Dokument wurde zum persönlichen Gebrauch heruntergeladen. Vervielfältigung nur mit Zustimmung des Verlages.

Nachbargewebe abgegrenzt („Läppchenpneumonie"). Eine ausgeprägte Segmentanatomie der Lunge bietet demzufolge die Möglichkeit, lokale Expositionen zu induzieren und innerhalb desselben Tieres unbelastete Kontrollregionen der Lunge zu untersuchen (was jedoch systemisch vermittelte Reaktionen des gesamten Organsystems nicht ausschließt). Werden andererseits broncho-pulmonale Segmente einer Rinder- oder Schweinelunge lavagiert oder bioptiert, so ist der Befund lediglich für die gespülte Region repräsentativ, keinesfalls jedoch auf das gesamte Organsystem übertragbar.

Im Gegensatz dazu sind Lungen vom Typ II (z. B. Hund und Katze) dadurch charakterisiert, dass sich entzündliche Prozesse sehr leicht in das benachbarte Gewebe ausbreiten (aufgrund des Fehlens bindegewebiger Septen und der sehr gut entwickelten kollateralen Atemwege), so dass im Falle einer Pneumonie oft ganze Lungenlappen betroffen sind. Eine Übertragbarkeit der diagnostischen Befunde aus broncho-alveolärer Lavageflüssigkeit oder Bioptaten auf größere Lungenbezirke ist hingegen eher zulässig.

**Folgen obstruktiver Atemwegserkrankungen**

Speziesspezifische Variationen bezüglich der Lobulierung der Lunge und der kollateralen Ventilation ziehen im Falle von obstruktiven Atemwegserkrankungen sehr unterschiedliche pathophysiologische Konsequenzen nach sich. Die funktionelle Residualkapazität (FRC), das Vorhandensein atelektatischer Lungenbezirke und die Intensität von Gasaustauschstörungen aufgrund von Ventilations-Perfusions-Inhomogenitäten korrelieren eindeutig mit der kollateralen Ventilation.

Spezies mit stark lobulierten Lungen vom Typ I, denen die Möglichkeit zur kollateralen Ventilation gänzlich fehlt (z. B. Rind, Schwein), verfügen im Falle von Atemwegsobstruktionen über keine effektiven Kompensationsmechanismen zur Sicherstellung der alveolären Ventilation. Bei diesen Tierarten führen obstruktive Ventilationsstörungen in der Regel zu alveolärer Hypoventilation mit regionalen Atelektasen. In obstruktiv veränderten Lungenregionen bewirken hohe Atemwegswiderstände zu lange Zeitkonstanten während der Exspiration, so dass während der Exspirationszeit nur ein Teil des zu exhalierenden Gasgemisches abgeatmet werden kann. Durch die eingeschlossene Luft („trapped air") erhöht sich die FRC, Lungenregionen werden zunehmend überbläht und ein obstruktiv bedingtes Emphysem kann sich entwickeln. Ventilatorische Asynchronismen, zu denen die o. g. Tierarten neigen, sind dadurch gekennzeichnet, dass innerhalb einer Lunge überblähte und atelektatische Bezirke vergesellschaftet sind. Die Konsequenzen der sich ergebenden Ventilations-Perfusions-Inhomogenitäten sind Gasaustauschstörungen, die sich wie folgt manifestieren: Hypoxämie ($PaO_2\downarrow$), Hyperkapnie ($PaCO_2\uparrow$), erhöhte alveolo-arterielle $PO_2$-Differenz ($AaDO_2\uparrow$) und ein zunehmender Anteil an arterio-venösem Shuntblut.

Bei Spezies mit nicht lobulierten Lungen vom Typ II und sehr gut entwickelten kollateralen Atemwegen (z. B. Hund, Katze, Affe) wirkt die kollaterale Ventilation wie ein Bypass und sichert die alveoläre Belüftung distal der obstruktiv veränderten Atemwege. Demzufolge steigt FRC weder bei obstruktiven Atemwegserkrankungen noch bei induzierten Atemwegsobstruktionen – unspezifisch durch Histamin, Carbachol, Metacholin o. ä. oder spezifisch durch Antigene, Allergene – nennenswert an. Dank der geringen kollateralen Resistance ist die alveoläre Be- und Entlüftung mit so geringen Zeitkonstanten möglich, dass sich in der Regel weder Atelektasen noch ein obstruktiv bedingtes Emphysem entwickeln. Durch die kollaterale Ventilation werden Störungen des pulmonalen Gasaustausches infolge von Ventilations-Inhomogenitäten bzw. pulmonaler Shunts weitgehend vermieden. Dies erklärt das häufige Fehlen einer Hypoxämie in Modellen für milde bis moderate Atemwegserkrankungen bei Hund und Katze im Vergleich zu Menschen mit ähnlichem Obstruktionsgrad [6].

Für Hunde sei gesondert erwähnt, dass es im Falle von ausgeprägten Atemwegsobstruktionen (z. B. bei bronchialen Provokationstests) dennoch zu Ventilations-Perfusions-Inhomogenitäten kommen kann. Verantwortlich hierfür ist die geringe Reagibilität des pulmonalen Gefäßbettes, so dass die Umverteilung des pulmonalen Blutflusses von schlecht belüfteten zu besser ventilierten Lungenregionen durch den Mechanismus der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion nur unzureichend erfolgt.

Pferde wie auch Schafe nehmen eine gewisse Zwischenstellung ein. Beide Tierarten verfügen zwar über Möglichkeiten zur kollateralen Ventilation, diese sind jedoch gegenüber den Lungen von Hund oder Katze deutlich eingeschränkt [6]. Folglich reagieren auch Pferde und Schafe im Falle von Atemwegsobstruktionen mit FRC-Anstiegen und Gasaustauschstörungen, jedoch sind diese pathophysiologischen Konsequenzen graduell nicht so stark ausgeprägt wie beispielsweise bei Schwein oder Rind.

## Praktische Beispiele für Modelle pulmonaler Infektionen bei Großtieren

**Art der Infizierung**

Die am häufigsten im Schrifttum beschriebenen Applikationsorte bei einer experimentellen Infizierung sind: intranasal, intratracheal, intrabronchial (letzterer meist unter bronchoskopischer Sichtkontrolle) oder entsprechende Kombinationen. Eigene Erfahrungen zu experimentell induzierten respiratorischen Infektionen liegen für Kälber und Schweine vor, wobei sich bei diesen Tierarten die aerogene Infizierung durch Inhalation eines erregerhaltigen Aerosols als sehr praktikabel erwiesen hat. Während eine intratracheale oder intrabronchiale Bolus-Applikation gerade in den stark segmentierten Lungen von Rind und Schwein eher lokale Reaktionen in einem Lungenlappen oder in wenigen Segmenten erwarten lässt, sichert die Inhalation eines Aerosols, dass große Anteile des respiratorischen Epithels mit dem Infektionsstamm in Kontakt kommen.

In eigenen Studien zur RSV-Infektion bei Kälbern [13] oder zur Chlamydien-Infektion bei Schweinen [14] hat sich ein Düsenvernebler (Pari Provocation Test II, Pari GmbH, Starnberg) bewährt, durch welchen ein Aerosol mit einem Anteil von mindestens 80 % Teilchen ≤ 5 µm Durchmesser produziert wird. Die inhalierte Aerosolmenge wird dosiert, indem das zu infizierende Tier wiederholt je 10 Liter des Aerosols aus einem Reservoirbeutel abatmet. Hierbei ist das Tier mittels Atmungsmaske, Inspirationsventil und Faltenschlauch mit dem Aerosolgerät verbunden (Abb. **1**). Die Tiere sind nicht narkotisiert und atmen spontan. Während Kälber frei stehen können, sollten die weniger kooperativen





Dieses Dokument wurde zum persönlichen Gebrauch heruntergeladen. Vervielfältigung nur mit Zustimmung des Verlages.

Schweine in einer Art Hänge-Vorrichtung fixiert werden und sind ggf. leicht zu sedieren.

**Diagnostik von pulmonalen Dysfunktionen in kontrollierten Studien an Großtieren**

Die Erfassung der Konsequenzen einer experimentellen Infizierung für das Einzeltier stützte sich traditionell weitgehend auf klinische und pathologisch-anatomische Untersuchungsmethoden. Bildgebende Verfahren wie Bronchoskopie, Thoraxsonographie [10] oder Röntgendiagnostik sind am Großtier anwendbar, sofern die entsprechende Gerätetechnik zur Verfügung steht. Zum Erregernachweis *in vivo* werden meist Nasentupfer oder Nasenzellabstriche gewonnen. Zur Probengewinnung aus den Atemwegen distal des Nachen-Rachen-Raumes sind an verschiedensten Tierarten unter anderem die Aspiration von Tracheobronchialsekret, die Gewinnung von tracheo-bronchialen Spülproben und auch die broncho-alveoläre Lavage beschrieben.

In den letzten 10 – 15 Jahren wurden moderne Methoden der Lungenfunktionsdiagnostik an Großtieren etabliert, die eine sensitive Erfassung respiratorischer Dysfunktionen *in vivo* erlauben. Somit kann der Einfluss biotischer und abiotischer Faktoren auf das respiratorische System wiederholt untersucht und im Verlauf einer Studie zu unterschiedlichen Zeitpunkten beurteilt werden. Das am Tier anwendbare lungenfunktionsdiagnostische Methodenspektrum ist jedoch im Vergleich zu Verfahren der humanmedizinischen Pneumologie *per se* dahingehend eingeschränkt, dass alle von der aktiven Mitarbeit und Kooperationsbereitschaft des zu untersuchenden Individuums abhängigen Verfahren von vornherein ausscheiden. Unter dem Aspekt des Tierschutzes geraten auch invasive Methoden immer mehr in die Kritik.

Ohne Anspruch auf Vollständigkeit zu erheben, seien als Beispiele nachfolgend einige lungenfunktionsdiagnostische Methoden und Untersuchungsverfahren genannt, die **nicht-invasiv** und unter Spontanatmung am wachen Großtier im Rahmen kontrollierter Studien anwendbar sind:

- **Spirometrie:** z. B. Pneumotachographie oder Ultraschallspirometrie zur Erfassung von Kenngrößen der Ventilation unter Spontanatmung bei nahezu allen Tierarten
- **Forcierte Oszillometrie:** Validierung des Impuls-Oszillometrie-Systems (IOS) zur Analyse der Atmungsmechanik für Kälber [15 – 21]
- **Kapnographie bzw. Kapnovolumetrie:** Validierung für Pferde [22] und erste Anwendung an Kälbern [23]
- **Atemgasanalyse (NO, CO):** bislang vorwiegend an Pferden und Katzen angewandt [24]
- **Atemkondensat-Untersuchungen:** an Kälbern, Schweinen, Pferden, Katzen und Hunden beschrieben [25].

Dass sich die genannten nicht-invasiven Untersuchungstechniken in etablierte Infektionsmodelle an Großtieren integrieren lassen, soll anhand nachfolgender Beispiele exemplarisch belegt werden:

- Mithilfe der Kopplung von Spirometrie und IOS konnten bei den Modelltieren Kalb und Schwein Veränderungen in der Ventilation (Atmungsfrequenz und Atemvolumina) sowie in der Atmungsmechanik (Obstruktionen der Atemwege und/oder verminderte Dehnbarkeiten des Lunge-Thorax-Systems) infolge von experimentellen Infektionen sensitiv erfasst und quantifiziert werden [10, 26].
- Die Leukotrien $B_4$ ($LTB_4$)-Konzentration im Atemkondensat korreliert mit der Anzahl neutrophiler Granulozyten in der broncho-alveolären Lavageflüssigkeit und hat sich in Infektionsmodellen am Kalb als ein unspezifischer Marker für den Schweregrad einer Entzündung innerhalb der Atemwege erwiesen. Im Falle einer bakteriell bedingten Bronchopneumonie war eine signifikante Korrelation zwischen der Abnahme der Lungendehnbarkeit und dem Anstieg der $LTB_4$-Konzentration im Atemkondensat zu beobachten. Bei einer viral bedingten Infektion (RSV) stand die Erhöhung der $LTB_4$-Konzentration im Atemkondensat mit einer erhöhten unspezifischen Reaktivität der Atemwege in Beziehung [27].

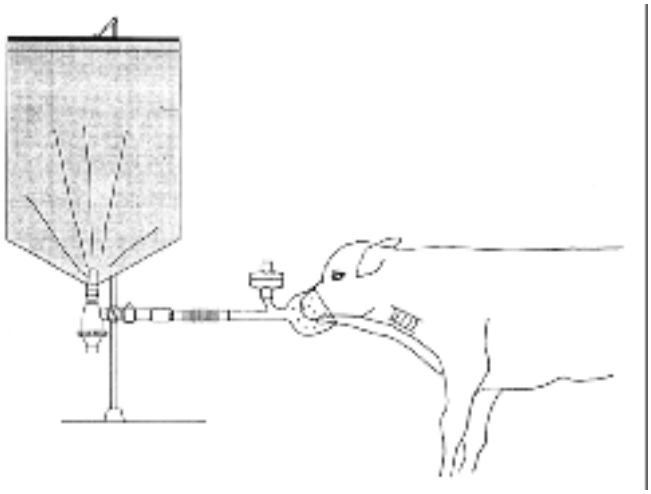

Abb. **1** Schematische Darstellung der experimentellen Infizierung eines Kalbes durch Inhalation eines erregerhaltigen Aerosols (aus [13]).

## Schlussfolgerung

Während gut definierte Labortiermodelle insbesondere zur Bearbeitung immunologischer und genetischer Fragestellungen unverzichtbar sind, bieten Großtiermodelle erhebliche Vorteile für die Erfassung von funktionellen Charakteristika des respiratorischen Systems mit einem zur Humanmedizin kompatiblen Methodenspektrum.

## Literatur


[1] Patra AL. Comparative anatomy of mammalian respiratory tracts: the nasopharyngeal region and the tracheobronchial region. J Toxicol Environ Health 1986; 17: 163 – 174

[2] McLaughlin RF, Tyler WS, Canada RO. A study of subgross pulmonary anatomy in various mammals. Am J Anat 1961; 108: 149 – 165

[3] Bakima M, Gustin P, Lekeux P et al. Mechanics of breathing in goats. Res Vet Sci 1988; 45: 332 – 336

[4] Kay JM. Pulmonary vasculature and nerves. Comparative morphological features of the pulmonary vasculature in mammals. Am Rev Resp Dis 1983; 128: S53 – S57

[5] Tucker A, McMurtry IF, Reeves JT et al. Lung vascular smooth muscle as a determinant of pulmonary hypertension at high altitude. Am J Physiol 1975; 228: 762 – 767

[6] Robinson NE. Some functional consequences of species differences in lung anatomy. Adv Vet Sci Comp Med 1982; 26: 1 – 33




Dieses Dokument wurde zum persönlichen Gebrauch heruntergeladen. Vervielfältigung nur mit Zustimmung des Verlages.

[7] Mitzner W. Collateral ventilation. The lung. In: Crystal RG, West JB et al. (eds). Scientific Foundations. New York: Raven Press Ltd, 1991: 1053 – 1063
[8] Reinhold P, Födisch G. Lungenfunktionsdiagnostik bei gesunden und an Pneumonie erkrankten Kälbern. Mh Vetmed 1993; 48: 113 – 117
[9] Elmer S. Auswirkungen der Umgebungstemperatur und der relativen Luftfeuchtigkeit auf den Organismus des Kalbes. Inaugural-Dissertation, Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig, 1999
[10] Reinhold P, Rabeling B, Günther H et al. Comparative evaluation of ultrasonography and lung function testing with the clinical signs and pathology of calves inoculated experimentally with Pasteurella multocida. Vet Rec 2002; 150: 109 – 114
[11] Timothy I, Musch TI, Friedmann DB et al. Arterial blood gases and acid-base status of dogs during graded dynamic exercise. J Appl Physiol 1986; 61: 1914 – 1919
[12] Gallivan GJ, McDonell WN, Forrest JB. Comparative ventilation and gas exchange in the horse and the cow. Research in Veterinary Science 1989; 46: 331 – 336
[13] Otto P, Elschner M, Reinhold P et al. A model for Respiratory Syncytial Virus (RSV) infection based on experimental aerosol exposure with bovine RSV in calves. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 1996; 19: 85 – 97
[14] Sachse K, Grossmann E, Berndt A et al. Respiratory chlamydial infection based on experimental aerosol challenge of pigs with Chlamydia suis. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 2004; 27: 7 – 23
[15] Reinhold P, MacLeod D, Lekeux P. Comparative evaluation of impulse oscillometry and a monofrequency forced oscillation technique in clinically healthy calves undergoing bronchochallenges. Res Vet Sci 1996; 61: 206 – 213
[16] Reinhold P, Smith H-J, Close R et al. Validation of Impulse Oscillometry in Friesian and Blue Belgian Calves with respect to changes in extrathoracic upper airway resistance. Res Vet Sci 1998a; 65: 93 – 102
[17] Reinhold P, Smith H-J, Langenberg A et al. Measurement of respiratory impedance in healthy calves using the impulse oscillation technique – physiological and methodological aspects. Vet J 1998b; 155: 27 – 38
[18] Klein C, Reinhold P. Analysis of respiratory mechanics by impulse oscillometry in non-sedated and diazepam-sedated swine. Res Vet Sci 2001; 70: 181 – 189
[19] Klein C, Smith H-J, Reinhold P. Respiratory mechanics in conscious swine: effects of face mask, head position and bronchoconstriction evaluated by Impulse Oscillometry. Res Vet Sci 2003; 75: 71 – 81
[20] Erck E van. Evaluation qualitative et quantitative des dysfunctions respiratoires chez le chval par la technique des oscillations a impulsions. (Qualitative and quantitative evaluation of equine respiratory dysfunctions by the impulse oscillometry technique). Université de Liège, Faculté de Médecine Vétérinaire, PhD-Thesis, 2002 – 2003
[21] Klein C, Smith H-J, Reinhold P. Measurement of Respiratory Impedance in Horses using Impulse Oscillometry: Effects of Sedation with Xylazine. Res Vet Sci 2005 (im Druck)
[22] Herholz C. Early detection of pulmonary dysfunction in the horse: a clinical approach to validate ultrasonic spirometry and capnography. Universität Bern, Veterinärmedizinische Fakultät, Habiliationsschrift, 2002
[23] Reißig S, Langenberg A, Smith H-J et al. Erste Erfahrungen beim Einsatz der Kapnovolumetrie am Kalb. Pneumologie 2004; 58: 870
[24] Marlin D, Deaton C, Reinhold P. Collection, Analysis, & Interpretation of Volatile Biomarkers in Exhaled Breath. American College of Veterinary Internal Medicine (ACVIM), 2005 (im Druck)
[25] Reinhold P, Deaton C, Marlin D. Potential for and limitations of exhaled breath analysis in animal models. World Scientific 2005a (im Druck)
[26] Reinhold P, Jaeger J, Melzer F et al. Evaluation of lung function in pigs either experimentally or naturally infected with Chlamydiaceae. Vet Res Comm 2005b; 29 (Suppl. 1): 125 – 150
[27] Reinhold P, Becher G, Rothe M. Evaluation of the measurement of leukotriene $B_4$ concentrations in exhaled condensate as a noninvasive method for assessing mediators of inflammation in the lungs of calves. Am J Vet Res 2000; 61: 742 – 749
[28] Veit HP, Farrell RL. The anatomy and physiology of the bovine respiratory system relating to pulmonary disease. Cornell Vet 1978; 68: 555 – 581

## Morphologie pulmonaler Infektionsmodelle bei unterschiedlichen Spezies und ihre Bewertung

*M. Rosenbruch, Bayer HealthCare AG – PH-R&D-T, Wuppertal*

Pulmonale Infektionsmodelle werden in der Grundlagenforschung und in der angewandten Forschung eingesetzt. Sie dienen in der Human- und Veterinärmedizin einmal zur Untersuchung der Pathogenese bakterieller oder viraler Infektionen, aber auch, um Wirkstoffe gegen diese Erreger zu entwickeln [1]. Je nach Fragestellung bzw. Anwendung der zu untersuchenden Wirkstoffe erfolgen die Studien an Nagern (Ratte, Maus) oder Nichtnagern (z. B. Hund, Schwein oder Rind). Untersuchungen an Nagern haben den Vorteil, dass sie einfacher in der Durchführung sind (z. B. Applikation/Exposition, Haltung, Sektion der Tiere) und dass mehr Vergleichsdaten aus der Literatur zur Verfügung stehen. Bezüglich der morphologischen Auswertung besteht darüber hinaus die Möglichkeit, die gesamte Nager-Lunge zu untersuchen, wohingegen bei den Nichtnager-Lungen immer eine Probenauswahl erfolgen muss. Die Versuchstiere werden im Regelfall intranasal oder intratracheal, in Einzelfällen auch intrabronchial [2] oder aerogen, infiziert, wobei die intranasale Applikation einfacher durchzuführen ist und einen geringeren Artefakt-Grad aufweist. Die Verbreitung der Infektionserreger im Respirationstrakt sowie gegebenenfalls auch systemische Effekte lassen sich nach intranasaler Applikation realitätsnäher mikrobiologisch und morphologisch untersuchen.

### Planung

Möglichst vor Studienbeginn ist im Dialog der beteiligten Disziplinen festzulegen, welches Studien-Design angewandt werden soll, einschließlich der Modalitäten der pathomorphologischen Auswertung. Dazu sind folgende Fragen zu klären:

- Welche Applikationsmethode wird durchgeführt und wo werden Erreger-induzierte Veränderungen erwartet?
- Welche Organe sollen untersucht werden: nur Lungengewebe (wie detailliert?), der gesamte Respirationstrakt oder auch Organe/Gewebe außerhalb des Atmungstraktes?
- Wie häufig werden die Erreger verabreicht, welche Interim-Untersuchungstermine sind vorzusehen und ist eine Nachbeobachtungsphase (Recovery) geplant?
- Welche Kontrollgruppen werden mitgeführt (Negativ-, Vehikel- und/oder Positivkontrolle)?
- Soll die pathomorphologische Auswertung offen oder verblindet erfolgen?
- Welche Methoden (außer morphologische Untersuchungen) werden eingesetzt und können sich gegebenenfalls bezüglich des Probenmaterials, der anzuwendenden Methodik und der Ergebnisse gegenseitig beeinflussen (z. B. klinische Beobachtungen, Lungenfunktions-Analytik, broncho-alveoläre Lavage [BAL], Radiologie, klinische Chemie/Hämatologie, mikrobiologische Untersuchungen)?





Dieses Dokument wurde zum persönlichen Gebrauch heruntergeladen. Vervielfältigung nur mit Zustimmung des Verlages.

## Methodik

Die häufigsten seitens der Pathologie eingesetzten Methoden sind, im Anschluss an eine genaue makroskopische Beurteilung während der Sektion einschließlich der Bestimmung der Organgewichte, die konventionelle Lichtmikroskopie nach Paraffin-Einbettung. Neben der H&E-Färbung als Übersicht zur primären Orientierung können – je nach Notwendigkeit – zahlreiche Spezialfärbungen sowie immunhistochemische Methoden zur Darstellung bestimmter Strukturen angewandt werden. Bei speziellen Fragestellungen werden darüber hinaus elektronenmikroskopische Untersuchungen (Raster- und Transmissions-Elektronenmikroskopie), Proliferationsmarker (PCNA, BrdU) oder molekularbiologische sowie morphometrische Methoden eingesetzt. Die Anwendung spezieller morphologischer Methoden beinhaltet dabei die Möglichkeit, pulmonale Infektionsmodelle bis in den Bereich subzellulärer Befunde zu untersuchen bzw. sekundäre Effekte, wie eine meist lokal begrenzte, erhöhte Zellproliferation oder entzündungsassoziierte Mediatoren zu erfassen [3].

## Auswertung

Bezüglich der pathomorphologischen Auswertung pulmonaler Infektionsmodelle besteht einmal die Möglichkeit, rein qualitative Auswertungen vorzunehmen. Dabei kann die grundsätzliche Frage nach der Entwicklung von Entzündungsprozessen allgemein beantwortet werden. Weiterhin können detailliertere Befunde wie z. B. das Vorhandensein von Blutungen, Nekrosen, Thrombosen, interstitiellen Veränderungen oder die Beteiligung der Pleura erhoben werden [4, 5]. Auch bestimmte infektions- und entzündungsassoziierte morphologische Parameter, wie das (Nicht)-Vorhandensein bestimmter Zellen (neutrophile Granulozyten, Mastzellen) sowie z. B. von Fibrin oder Kollagenfasern sind relevante Parameter bei pulmonalen Infektionsmodellen. Die Lokalisation im Organ, z. B. hinsichtlich einer bevorzugten Ausprägung der Läsionen in bestimmten Lungenarealen/Lungenlappen ist dabei ebenso zu berücksichtigen wie die Lokalisation im Gewebe. Bei bakteriellen Infektionen dominieren Befunde in den Luftwegen sowie im Alveolarbereich (Abb. **1**) sowie speziesabhängig auch im Interstitium. Bei viralen Infektionsmodellen ist darüber hinaus häufig das bronchus-assoziierte lymphatische Gewebe (BALT) massiv im Sinne einer lymphatischen Hyperplasie (Abb. **2**) verändert [1, 5, 6].

Um die Möglichkeiten der Histopathologie möglichst optimal auszunutzen, ist es jedoch vorteilhaft, Art und Ausmaß sowie die zeitliche und gewebebezogene Entwicklung der Veränderungen semiquantitativ zu bewerten. Dabei erfolgt die pathomorphologische Auswertung, wenn möglich unter Verwendung eines entsprechenden Pathologie-Computer-Programms (z. B. PathData®), mit einer Graduierung der Befunde zwischen 0 und 3 oder 0 und 5 [2, 4]. Diese Vorgehensweise bietet die Möglichkeit, bei der Untersuchung mehrerer Lokalisationen Mittelwerte für die einzelnen Versuchstiere und später für die Behandlungsgruppen zu errechnen [7]. Der so ermittelte „Lung Inflammation Index" (LII) ist dabei als morphologische Maßzahl für die pulmonale Infektion zu sehen. Bei Studien zur Wirkstoffentwicklung dient er im Vergleich zur Kontrolle (meist unbehandelte Positivkontrolle) als Anhalt für den Effekt der anti-inflammatorischen

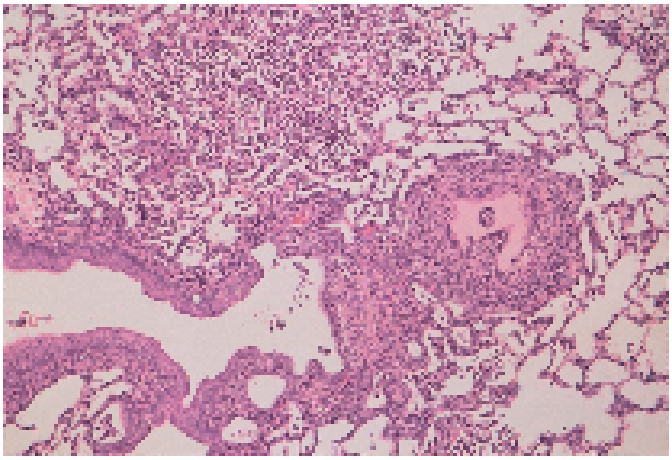

Abb. **1** Entzündliche Reaktion in den Luftwegen mit fokaler Epithel-Verdickung sowie massiver Entzündung im Alveolarbereich nach Applikation von bakteriellen Infektionserregern in Agar-Beads (Ratte, H&E-Färbung).

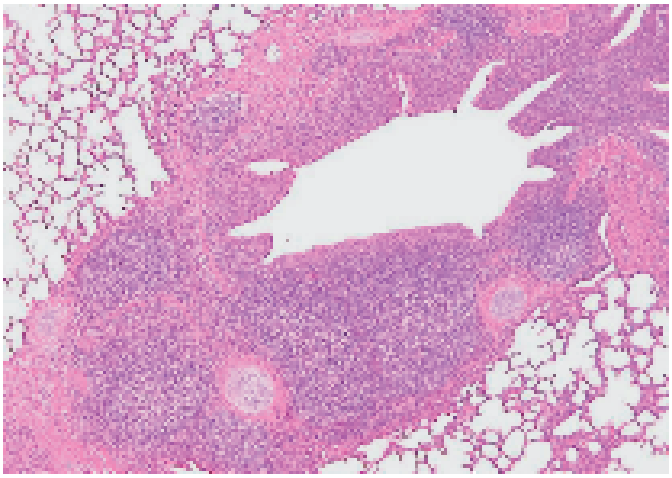

Abb. **2** Bronchiale und peribronchiale Entzündung sowie ausgeprägte lymphatische Hyperplasie des bronchus-assoziierten Gewebes (BALT) 14 Tage Infektion mit PI-3-Virus (Rind, H&E-Färbung).

Behandlung. Besonders zur Beurteilung geringgradig ausgeprägter Effekte ist es wichtig, dass entsprechende Kontrollgruppen mitgeführt werden. Die semiquantitative Erfassung morphologischer Befunde hat darüber hinaus den Vorteil, dass – ohne den Aufwand genauer morphometrischer Untersuchungen – sehr einfach Vergleiche mit den Daten anderer Disziplinen angestellt werden können, die primär quantitative Ergebnisse liefern (Lungenfunktions-Analytik, BAL).

Die Notwendigkeit morphometrischer Untersuchungen (von der Zählung einzelner Zellen bis hin zur Anwendung bildanalytischer Methoden) kann dann notwendig sein, wenn bezüglich der zu untersuchenden Parameter mit qualitativen oder semiquantitativen Methoden keine Effekte bzw. kein no-observed-effect level (NOEL) zu ermitteln ist, oder wenn verschiedene Modelle bzw. Substanzen hinsichtlich ihrer Wirksamkeit verglichen werden sollen.

Beim Vergleich verschiedener Modelle, Substanzen oder Studien ist die methodische Vergleichbarkeit jedoch eine unbedingte Vo-





Dieses Dokument wurde zum persönlichen Gebrauch heruntergeladen. Vervielfältigung nur mit Zustimmung des Verlages.

raussetzung: Durchführung und Auswertung pathomorphologischer Untersuchungen müssen bezüglich Sektionstechnik, Probennahme, Fixierung und Trimming bis hin zu den diagnostischen Kriterien, einschließlich der Terminologie, vergleichbar sein. Ein zumindest an die Grundsätze der „Guten Labor Praxis" (GLP) angepasstes Vorgehen erleichtert derartige Prozesse.

## Bewertung

Grundsätzlich ist bei der Bewertung struktureller Veränderungen zwischen Artefakten, Spontanbefunden, „Handling"-induzierten Läsionen und „wirklichen" Infektions- bzw. Substanz-Effekten zu unterscheiden. Neben den Kontrollen aus der aktuellen Studie muss in diesem Zusammenhang gegebenenfalls zusätzlich auf historische Kontrolldaten zurückgegriffen werden.

In Relation zu Art und Ausmaß der Veränderungen sind die morphologischen Befunde dahingehend zu bewerten, ob es sich beispielsweise um degenerative oder proliferative Effekte, um adaptive und möglicherweise reversible Veränderungen oder um spezies-spezifische Reaktionen handelt.

Die Ergebnisse morphologischer Untersuchungen bei der Etablierung pulmonaler Infektionsmodelle bzw. bei der Bewertung der Effektivität von Wirkstoffen haben wesentlichen Einfluss auf die Validität des Modells und tragen (mit)-entscheidend zur Klärung der Pathogenese einer Modellerkrankung bei. In der Substanzentwicklung sind die Resultate wichtig für das Prozedere von Forschung und Entwicklung, sowohl bezüglich der eventuell notwendigen Durchführung weiterer Studien wie auch hinsichtlich der (Nicht)-Entwicklung und der Einstufung einer Prüfsubstanz.

## Literatur


[1] Opriessnig T, Thacker EL, Yu S et al. Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by dual infection with mycoplasma hyopneumoniae and porcine circovirus type 2. Vet Pathol 2004; 41: 624 – 640

[2] Youssef SA, Clark ME, Caswell JL. Effect of bovine granulocyte colony-stimulating factor on the development of pneumonia caused by Mannheimia haemolytica. Vet Pathol 2004; 41: 649 – 657

[3] Malazdrewich C, Ames TR, Abrahamsen MS et al. Pulmonary expression of tumor necrosis factor alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-8 in the acute phase of bovine pneumonic pasteurellosis. Vet Pathol 2001; 38: 297 – 310

[4] Cho WS, Chae C. Expression of nitric oxide synthase 2 and cyclooxygenase-2 in swine experimentally infected with actinobacillus pleuropneumoniae. Vet Pathol 2004; 41: 666 – 672

[5] Schneider T. Untersuchungen zu experimentellen Parainfluenzavirus-Typ-3-Infektionen bei Rindern. Justus-von-Liebig-Universität Gießen, Fachbereich Veterinärmedizin, Dissertation, 1997

[6] Afshar A, Terlecki S. Experimental infection of goats with parainfluenza virus type 3. Zbl Vet Med B 1979; 26: 641 – 651

[7] Edingloh M, Rosenbruch M. The clinical efficacy of a single injection therapy with enrofloxacin in experimental bovine pasteurellosis. Punta Del Este (Uruguay): Poster, XXI World Buiatrics Congress, 2000


## Pneumokokkenpneumonie im Mausmodell


*S. Rosseau, Medizinische Klinik m.S. Infektiologie, Internistische Intensivmedizin, Pneumologie&Asthma-Poliklinik, Charité – Universitätsmedizin Berlin*


Die Pneumonie ist die häufigste lebensbedrohliche Infektionskrankheit in den Industrieländern. *Streptococcus (S.) pneumoniae* ist der wichtigste Pneumonieerreger; epidemiologischen Erhebungen zufolge sind Pneumokokken für 30 bis 70% aller Fälle von ambulant erworbener Pneumonie verantwortlich. Häufiger als bei anderen Pneumonieformen lässt sich bei der Pneumokokkenpneumonie eine Bakteriämie nachweisen. In diesen Fällen ist mit einem schweren Krankheitsverlauf zu rechnen, die Sterblichkeit beträgt in Abhängigkeit vom Alter zwischen 14% und 50%. Obwohl seit Jahrzehnten hochwirksame Antibiotika zur Verfügung stehen, hat sich die Letalität in der Frühphase der Erkrankung im Vergleich zur Prä-Antibiotikaära nicht vermindert. Diese Tatsache unterstreicht die herausragende Bedeutung der Erreger-Wirt-Interaktion und der durch sie hervorgerufenen Abwehrreaktion für den Krankheitsprozess der Pneumokokkenpneumonie. Das Verständnis dieser Mechanismen ist für die Entwicklung neuer Behandlungskonzepte von herausragendem Interesse.

In den letzten Jahren konnten zahlreiche Virulenzfaktoren von *S. pneumoniae* identifiziert werden. Die Bedeutung dieser Faktoren für den Krankheitsverlauf der Pneumokokkenpneumonie ist jedoch noch weitgehend unbekannt. Einige zentrale Mechanismen der Interaktion zwischen *S. pneumoniae* mit verschiedenen Wirtszellen unterschiedlicher Organsysteme können zwar an isolierten Zellen untersucht werden, die Analyse der hochkomplexen und dynamischen Wechselwirkung zwischen Pneumokokken und Wirt macht jedoch Untersuchungen am Ganztiermodell unerlässlich. Insbesondere die Frage, welche Bedeutung die Immunreaktion des Wirtes für den Krankheitsverlauf spielt, kann nur mithilfe eines Ganztiermodells beantwortet werden.

Beim Menschen wird die Diagnose „Pneumonie" beim Auftreten klinischer Symptome wie Fieber, Husten und Luftnot zusammen mit dem radiologischen Nachweis eines Lungeninfiltrates gestellt. Das Lungeninfiltrat wird durch den Einstrom neutrophiler Granulozyten in den Alveolarraum und das begleitende, entzündliche Ödem hervorgerufen. Auf der einen Seite soll die Rekrutierung dieser hochpotenten Phagozyten die pulmonale Erregerelimination unterstützen, auf der anderen Seite kann die rasche Ansammlung dieser entzündlich aktivierten Zellen auch schädliche Effekte auf die Gasaustauschfunktion der Lunge haben und zu einem akuten Lungenversagen führen. Die Bedeutung des inflammatorischen Granulozyteneinstroms für den Krankheitsverlauf der Pneumokokkenpneumonie und die Abgrenzung zu direkten, toxischen Effekten bestimmter Pneumokokkenfaktoren lässt sich deshalb nur mithilfe komplexer Tiermodelle klären, in denen ein entzündlicher Neutrophileneinstrom in die Lunge induziert werden kann.

Bei der Untersuchung der Pathogenese menschlicher Infektionskrankheiten hat sich das Mausmodell vielfach bewährt. Trotz einiger Unterschiede hat das Immunsystem der Maus viele Gemeinsamkeiten mit dem menschlichen Immunsystem; häufig






Dieses Dokument wurde zum persönlichen Gebrauch heruntergeladen. Vervielfältigung nur mit Zustimmung des Verlages.

können Mäuse mit den gleichen Pathogenen wie der Mensch, oder aber mit sehr ähnlichen Krankheitserregern infiziert werden. Dieser Umstand ermöglicht die Analyse der Immunreaktion gegenüber einer Vielzahl menschlicher Krankheitserreger. Auf der anderen Seite hat der Befund einer angeborenen Immunität bestimmter Mausstämme gegenüber verschiedenen menschlichen Pathogenen zur Identifizierung genetischer Resistenzfaktoren z. B. gegenüber *Mycobacterium tuberculosis* oder *Legionella pneumophila* beigetragen. In gleicher Weise hat der Befund einer Hyporesponsivität des C3H/HeJ-Mausstammes gegenüber Lipopolysacchariden zur Identifizierung des „Endotoxin-Rezeptors" TLR-4 geführt. Viele Mausinzuchtstämme zeigen eine erhöhte Vulnerabilität gegenüber menschlichen Pathogenen. Die geno- und phänotypische Analyse ihres Immundefektes hat die Bedeutung bestimmter Faktoren oder Immunzellen für den Verlauf dieser Erkrankungen ermitteln können. Die verschiedenen Mausinzuchtstämme können daher dazu genutzt werden, die Erreger-Wirt-Interaktion in einem Infektionsmodell zu charakterisieren. Darüber hinaus ermöglicht der Einsatz gendefizienter und transgener Mäuse in einzigartiger Weise die gezielte Analyse bestimmter Faktoren oder Zellen im Hinblick auf ihre Funktion in der Pathogenese von Infektionskrankheiten.

Auch die Pathogenese der Pneumokokkenpneumonie lässt sich am Mausmodell untersuchen. Mäuse können durch transnasale Tröpfcheninfektion oder intratracheale Injektion von Pneumokokken infiziert werden. Nach der Infektion kann die Kinetik der entzündlichen Abwehrreaktion sowie ihre Auswirkung auf den klinischen Verlauf detailliert analysiert werden. Mithilfe von Microarray-Techniken lässt sich die entzündliche Abwehrreaktion gegenüber *S. pneumoniae* in der Lunge umfassend charakterisieren; durch den gezielten Vergleich mit anderen Pneumonieformen können die spezifischen Reaktionsmuster bei der Pneumokokkenpneumonie identifiziert werden. Die pro- und antiinflammatorische Zytokinantwort und die Produktion von Chemokinen in der Lunge kann mittels immunologischer Techniken quantifiziert werden. Mithilfe der Durchflusszytometrie lässt sich sowohl der Zeitpunkt als auch das Ausmaß der Rekrutierung unterschiedlicher Immunzellen in die Lunge nachweisen. Darüber hinaus kann mit dieser Technik der Aktivierungsstatus eingewanderter und ortsständiger Zellen beurteilt werden. Die histologische Analyse des Lungengewebes gibt Aufschluss über die räumliche Verteilung der eingewanderten Immunzellen bzw. die Umverteilung ortsständiger Zellen. Sie ermöglicht zudem eine Beurteilung der pulmonalen Gewebezerstörung. Schließlich gibt die Quantifizierung der Erregerdichte in der Lunge Aufschluss über die pulmonale Abwehrkompetenz. Parallel zur Analyse der inflammatorischen Abwehrreaktion lassen sich wichtige klinische Daten erheben. Neben dem Endpunkt „Letalität" und den für die prospektive Beurteilung des Krankheitsverlaufs wichtigen Messungen von Körpertemperatur und Körpergewicht, können die Folgen der Erreger-Wirt-Interaktion für die respiratorische Funktion im Detail analysiert werden. Mithilfe der Messung von Compliance und Resistance lässt sich die Lungenfunktion beurteilen, die Gasaustauschfunktion kann mittels Blutgasanalyse und Bestimmung des Oxygenierungsindex erfasst werden. Darüber hinaus lässt sich der Beginn und der Schweregrad des entzündlichen Permeabilitätsödems mittels immunologischer oder fluoreszenzbasierter Techniken nachweisen. Gleichzeitig kann durch die Analyse von Blutbild und C-reaktivem Protein der Beginn der systemischen Entzündungsreaktion bestimmt werden, die Analyse der Erregerlast im Blut detektiert den Beginn der Bakteriämie. Die Messung hämodynamischer Parameter und die Bestimmung der Blutlaktatspiegel erfassen die Ausbildung einer Pneumokokkensepsis. Die Analyse von Leberenzymen und Nierenretentionswerten gibt Aufschluss über die Ausbildung eines Multiorganversagens.

Der Kontakt mit Pneumokokken löst nicht in jedem Fall eine Erkrankung aus. Bei 40 % aller Kinder und 10 – 20 % aller Erwachsenen lässt sich eine symptomfreie Besiedelung des Nasenrachenraumes nachweisen. Es ist unklar ob, wann und wodurch es schließlich zur Ausbildung einer Erkrankung kommt, die sich entweder als Pneumonie, Otitis media, Meningitis oder direkt als Sepsis manifestiert. Mithilfe von Mausmodellen ist es möglich, die Erreger-Wirt-Interaktion auch im Rahmen der Besiedelung des oberen Respirationstraktes zu analysieren. Es konnte gezeigt werden, dass Wirtsfaktoren, wie z. B. die Expression von TLR-4, für die Ausprägung und Dauer der Besiedelung sowie für die Auslösung einer Erkrankung von Bedeutung sind. Die Anwendung fluoreszenzmarkierter Erreger hat darüber hinaus den Nachweis erbracht, dass verschiedene Serotypen von *S. pneumoniae* unterschiedliche Organpräferenzen aufweisen. Im Gegensatz zu Serotyp 3, der in der Maus eine Pneumonie mit Bakteriämie auslöst, lässt sich nach transnasaler Tröpfcheninfektion mit Serotyp 2 primär eine Sepsis mit Meningitis beobachten. Mittels umfangreicher Genom- und Proteomanalysen wird derzeit nach Stamm- bzw. Subtyp-spezifischen Pathogenitätsfaktoren gefahndet. Nach gezielter Herstellung gentechnisch veränderter Pneumokokken lässt sich dann am Tiermodell die Bedeutung bestimmter Virulenzfaktoren für die Auslösung einer invasiven Erkrankung und für die jeweilige Organspezifität analysieren.

Das Mausmodell eignet sich damit in idealer Weise zur Untersuchung der Pathogenese der Pneumokokkenpneumonie; es lassen sich hochkomplexe und dynamische Wechselwirkungen zwischen Erreger und Wirt erfassen und gleichzeitig deren Bedeutung für den Krankheitsprozess ermitteln. Die Verfügbarkeit sowohl gentechnisch veränderter Tiere als auch gentechnisch veränderter Pneumokokken wird das Verständnis der Erreger-Wirt-Interaktion rasch erweitern und die Entwicklung neuer, spezifischer Therapiekonzepte und effizienter Prophylaxemaßnahmen ermöglichen.







Dieses Dokument wurde zum persönlichen Gebrauch heruntergeladen. Vervielfältigung nur mit Zustimmung des Verlages.

## Pathogen-induzierte Immunmodulation durch Toll-Like Rezeptoren im Tiermodell

*G. Baumgarten, Universität Bonn, Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und spezielle Intensivmedizin*

Infektionsimmunologische Untersuchungen sind bisher hauptsächlich auf die Rolle des Immunsystems bei der Abwehr von Mikroorganismen fokussiert. Im Unterschied hierzu sind die Auswirkungen mikrobieller Erreger auf den Wirt ebenfalls wichtige Determinanten der Immunregulation. Die dadurch induzierte Immunmodulation ist aber bisher nur wenig erforscht. Derartige Interaktionen können mannigfaltige Folgen haben, wie z. B. die Induktion einer systemischen Immuntoleranz, welche über das eigentliche Zielantigen hinausgeht, oder die Durchbrechung von Toleranz mit der Folge einer Autoimmunität, eine infektbedingte Organdysfunktion oder Immunparalyse, chronische Besiedlungen sowie auch eine veränderte Suszeptibilität für Zweit- oder Co-Infektionen.

Das Immunsystem des Menschen reagiert auf eine durch Mikroben verursachte Stimulation mit entweder erlernten oder aber mit angeborenen Mechanismen [1]. Diese Mechanismen werden entweder durch die innate (angeborene) oder aber durch die adaptive (erworbene) Immunität vermittelt. Sie stehen dabei sowohl hinsichtlich der Effektorfunktion als auch der Immunregulation in enger Wechselwirkung. Das innate Immunsystem dient dazu, fremde Strukturen rasch zu erkennen und solange zu bekämpfen, bis eine adaptive Immunantwort entwickelt ist, um ein beliebiges Pathogen effizient und spezifisch zu eliminieren. Vermittelt werden die Funktionen und Reaktionen der innaten Immunität durch eine Gruppe erst kürzlich beschriebener Rezeptoren, den so genannten „mustererkennenden Rezeptoren" (pattern recognition receptor, PRR) [2]. Diese erkennen Pathogene über Strukturen, die typisch für die jeweiligen Mikroorganismen sind, aber im Säugetierorganismus nicht vorkommen, sog. PAMPs („pathogen-associated-molecular patterns") [3]. Zur Gruppe der PRR gehören die Toll-Like Rezeptoren (TLR), von denen zurzeit 11 verschiedene beschrieben, wenn auch nicht alle im Detail charakterisiert sind, sowie der membranständige Rezeptor CD14. Die TLRs werden auf einer Vielzahl von Zelltypen, auf Immun- und Nicht-Immunzellen, exprimiert. Bekannt ist z. B., dass der TLR4 den Hauptvirulenzfaktor gramnegativer Bakterien, das Lipopolysaccharid, erkennt [4]. Der TLR2 erkennt die Lipoteichonsäure und das Peptidoglykan, welches von grampositiven Bakterien stammt, und TLR9 diskriminiert charakteristische Bestandteile bakterieller DNA [5]. Neben diesen charakteristischen Strukturen von Mikroorganismen binden aber auch weitere Substanzen physiologischer und nicht physiologischer Herkunft an TLRs. So konnte gezeigt werden, dass an den TLR4 auch Fibronektin, Fragmente der Hyaluronsäure, lösliche Bestandteile des Heparins, reaktive Sauerstoffspezies, Elastase und „Heat Shock Proteine" binden [6 – 9]. Von besonderem Interesse ist die Beobachtung, dass auch TLR-exprimierende Gewebezellen zu innaten Effektorfunktionen in der Lage sind, beispielsweise Epithelzellen zur Sekretion von Defensinen, Nierentubulus- und Darmepithelzellen, aber auch Herzmuskel- und Alveolarepithelzellen [10 – 15].

Mittels verschiedener Tiermodelle und unterschiedlicher molekularbiologischer Techniken konnte gezeigt werden, dass die Anbindung der Liganden an den Rezeptor und eine damit verbundene Aktivierung der jeweiligen Signaltransduktionswege zu einer sehr spezifischen Immunantwort durch die Expressionsregulation wesentlicher Mediatoren, wie z. B. von Zytokinen führt. Des Weiteren wird über eine Aktivierung der TLR eine Vielzahl von nicht immunologisch aktiven Zellen in ihrer Funktion beeinflusst, die Expression relevanter PRR reguliert und die Reaktivität des innaten Immunsystems moduliert. So führt die Aktivierung des TLR4 durch den Virulenzfaktor gramnegativer Bakterien, das Lipopolysaccharid, in einer Vielzahl von Organen zur Expression inflammatorischer Mediatoren. Der Tumor Nekrose Faktor $\alpha$ und Interferon-$\gamma$ können ihrerseits dann die Expression von TLR2 in Lungenepithelzellen induzieren [16]. Dies konnte sowohl in Sepsismodellen nach intraperitoneale- als auch infolge einer nasalen Applikation des Virulenzfaktors gezeigt werden. Für spezifische Motive bakterieller DNA, den so genannten CpG's, konnte ebenfalls eine TLR abhängige Regulation relevanter Mediatoren für ein akutes Lungenversagen nachgewiesen werden [5]. In verschiedenen Allergiemodellen wurde demonstriert, dass insbesondere dendritische Zellen nach Stimulierung eine veränderte Expression von TLR aufweisen [17].

In eigenen tierexperimentellen Untersuchungen konnten wir bisher die besondere Bedeutung von TLR2, TLR4 und TLR9 anhand von Maus-KO-Modellen für die Herz- und Lungenfunktion untersuchen. So konnten wir zeigen, dass die jeweiligen Rezeptoren nicht nur die kardiomyozytäre Kontraktilität in verschiedenen Sepsisstudien mit bestimmen, sondern auch im Rahmen von Okklusions-/Reperfusionsuntersuchungen für die Infarktgrößenentwicklung mit verantwortlich zu sein scheinen. In einem weiteren Ganztier-Mausmodell wird von uns zurzeit die Bedeutung der jeweiligen Rezeptoren für die Entwicklung eines ALI/ARDS im Rahmen von verschiedenen Beatmungsverfahren untersucht.

Von besonderer Bedeutung für unsere Untersuchungen ist die Beobachtung, dass die Aktivierung des TLR4 über die NAPDH-Oxidase zu einer veränderten Expression von TLR2 in Endothelzellen führt [18]. Dies zeigt, dass eine mikrobielle Aktivierung bzw. die „Pathogen induzierte Immunmodulation" auch das angeborene Immunsystem in seiner Reaktionsfähigkeit modulieren kann und somit wesentlichen Einfluss auf den klinischen Verlauf einer Vielzahl von Erkrankungen nimmt.

Erste klinische Phase-II-Studien zur Bedeutung eines TLR4-Antagonisten mit der Bezeichnung E5564 wurden bei Sepsispatienten und zur Verhinderung einer inflammatorischen Reaktion während Bypass- und Klappenoperationen bereits durchgeführt. Ergebnisse sind noch nicht publiziert. Eigene tierexperimentelle Untersuchungen mit dieser Substanz haben gezeigt, dass die kardiodepressive Wirkung von LPS durch eine zeitgleiche Applikation von E5564 nahezu vollständig verhindert wird.





Dieses Dokument wurde zum persönlichen Gebrauch heruntergeladen. Vervielfältigung nur mit Zustimmung des Verlages.

## Literatur

[1] Hoebe K, Janssen E, Beutler B. The interface between innate and adaptive immunity. Nat Immunol 2004; 5: 971 – 974
[2] Fraser IP, Stuart L, Ezekowitz RA. TLR-independent pattern recognition receptors and anti-inflammatory mechanisms. J Endotoxin Res 2004; 10: 120 – 124
[3] Janssens S, Beyaert R. Role of Toll-like receptors in pathogen recognition. Clin Microbiol Rev 2003; 16: 637 – 646
[4] Beutler B. Tlr4: central component of the sole mammalian LPS sensor. Curr Opin Immunol 2000; 12: 20 – 26
[5] Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. Nature 2000; 408: 740 – 745
[6] Johnson GB, Brunn GJ, Kodaira Y et al. Receptor-mediated monitoring of tissue well-being via detection of soluble heparan sulfate by Toll-like receptor 4. J Immunol 2002; 168: 5233 – 5239
[7] Ohashi K, Burkart V, Flohe S et al. Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. J Immunol 2000; 164: 558 – 561
[8] Okamura Y, Watari M, Jerud ES et al. The Extra Domain A of Fibronectin Activates Toll-like Receptor 4. J Biol Chem 2001; 276: 10229 – 10233
[9] Smiley ST, King JA, Hancock WW. Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4. J Immunol 2001; 167: 2887 – 2894
[10] Becker MN, Diamond G, Verghese MW et al. CD14-dependent lipopolysaccharide-induced beta-defensin-2 expression in human tracheobronchial epithelium. J Biol Chem 2000; 275: 29731 – 29736
[11] Anders HJ, Banas B, Schlondorff D. Signaling danger: toll-like receptors and their potential roles in kidney disease. J Am Soc Nephrol 2004; 15: 854 – 867
[12] Yu Y, Sitaraman S, Gewirtz AT. Intestinal epithelial cell regulation of mucosal inflammation. Immunol Res 2004; 29: 55 – 68
[13] Frantz S, Kobzik L, Kim YD et al. Toll4 (TLR4) expression in cardiac myocytes in normal and failing myocardium. J Clin Invest 1999; 104: 271 – 280
[14] Baumgarten G, Knuefermann P, Nozaki N et al. In vivo expression of proinflammatory mediators in the adult heart after endotoxin administration: the role of toll-like receptor-4. J Infect Dis 2001; 183: 1617 – 1624
[15] Knuefermann P, Nemoto S, Misra A et al. CD14-deficient mice are protected against lipopolysaccharide-induced cardiac inflammation and left ventricular dysfunction. Circulation 2002; 106: 2608 – 2615
[16] Homma T, Kato A, Hashimoto N et al. Corticosteroid and cytokines synergistically enhance toll-like receptor 2 expression in respiratory epithelial cells. Am J Respir Cell Mol Biol 2004; 31: 463 – 469
[17] Han X, Fan Y, Wang S et al. Dendritic cells from Chlamydia-infected mice show altered Toll-like receptor expression and play a crucial role in inhibition of allergic responses to ovalbumin. Eur J Immunol 2004; 34: 981 – 989
[18] Fan J, Kapus A, Marsden PA et al. Regulation of Toll-like receptor 4 expression in the lung following hemorrhagic shock and lipopolysaccharide. J Immunol 2002; 168: 5252 – 5259




# Pulmonale Infektionen im humanen Lungengewebsmodell


*D. Drömann[1], J. Rupp[2], T. Goldmann[3], M. Maass[2], E. Vollmer[3], P. Zabel[1,4], K. Dalhoff[4]*

*[1]Medizinische Klinik, Forschungszentrum Borstel*
*[2]Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck*
*[3]Klinische und experimentelle Pathologie, Forschungszentrum Borstel*
*[4]Medizinische Klinik III, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck*



## Zusammenfassung

*In-vitro*-Infektionsmodelle humaner Lungenschnitte bieten eine sinnvolle Ergänzung zu Zellkultur- und Tiermodellen. Die Charakterisierung der durch *C. pneumoniae* induzierten Inflammation ist bei dem obligat intrazellulär und häufig vorkommenden respiratorischen Erreger von besonderem Interesse. Humane Lungenschnitte wurden über 48 h mit *C. pneumoniae* infiziert und in einem neuartigen Fixativ (HOPE) für immunhistochemische Analysen und *In-situ*-Hybridisierung fixiert. Der für die Detektion von *C. pneumoniae* wichtige Toll-like-Rezeptor 2 wird von Alveolarmakrophagen und Typ-II-Pneumozyten exprimiert. In der akuten *In-vitro*-Infektion zeigt sich hauptsächlich eine Infektion der Alveolarmakrophagen, bei *C.-pneumoniae*-DNA-positivem Lungengewebe von COPD-Patienten findet sich ein deutlich höherer Anteil infizierter Epithelzellen.

Das *In-vitro*-Infektionsmodell bietet neue Möglichkeiten zur Untersuchung der Interaktion von Erregern und pulmonalen Wirtszellen in der frühen Infektionsphase.


## Einleitung

Eine Vielzahl von Zelltypen des Lungengewebes bestimmt durch die Interaktion mit infektiösen Pathogenen sowie durch Kommunikation untereinander den Ablauf einer pulmonalen Infektion. Zur Erforschung von infektiösen Lungenerkrankungen werden häufig Zellkultur- und Tiermodelle eingesetzt, die zur Charakterisierung funktioneller Zusammenhänge geeignet sind. Da komplexe Vorgänge im menschlichen Lungengewebe auf diese Weise jedoch nur schwer zu simulieren sind, erscheinen Untersuchungen an humanen Gewebekulturen sinnvoll. Die Verwendung solcher Kulturen als funktionale Modellsysteme geht auf David Thomson aus dem Jahre 1914 zurück [1], dessen Technik seither entscheidend weiterentwickelt wurde [2]. Das kombinierte Verfahren der kurzzeitigen Kultur menschlichen Lungengewebes mit *In-vitro*-Infektion sowie die Nutzung der Möglichkeiten zur Gewebefixierung mittels der HOPE-Technik ermöglichen eine Differenzierung verschiedener Zelltypen und Erkenntnisse über deren Beteiligung an pathophysiologischen Vorgängen.

## Material und Methoden

Das Lungengewebe wurde aus tumorfreien Arealen aus OP-Präparaten gewonnen und nach Kultur mit HOPE-Fixativ fixiert.



Dieses Dokument wurde zum persönlichen Gebrauch heruntergeladen. Vervielfältigung nur mit Zustimmung des Verlages.

Die *In-vitro*-Infektion erfolgte mit *C. pneumoniae* CWL029 (ATCC VR-1310) [3]. Immunhistochemie sowie die *In-situ*-Hybridisierung wurden nach bereits publiziertem Protokoll durchgeführt [4,5]. Verwendete Antikörper: TLR2 (clone TL2.1, eBiosciences, San Diego, Calif., USA), chlamydiales LPS (CF-2; Washington Research Foundation, WA, USA) und chlamydiales heat 109 shock protein-60 (cHSP60; Affinity BioReagents, CO, USA). *In-situ*-Hybridisierung (ISH) wurde nach dem random-primed-Verfahren mit Digoxigenin (DIG)-markierten Antikörpern (DIG HighPrime, Roche) durchgeführt.

## Ergebnisse

Positive Signale für Toll-like-Rezeptor-2 (TLR2) zeigten sich in Typ-II-Pneumozyten und Alveolarmakrophagen (AM) immunhistochemisch (Abb. **1**) und in der ISH. Die Resultate der ISH wurden durch RT-PCR weiter verifiziert. Vitale Lungenschnitte konnten mit *C. pneumoniae* bis zu 48 h infiziert werden. Nach 48 h zeigte sich hauptsächlich eine Infektion der Alveolarmakrophagen (AM) (Abb. **2**). Die Ergebnisse der Immunhistochemie wurden in der ISH bestätigt. In *C.-pneumoniae*-DNA positiv getestetem Lungengewebe von COPD-Patienten zeigte sich ein Infektionsmuster mit deutlich höherem Anteil infizierter Epithelzellen (Abb. **2**). Hierbei handelt es sich größtenteils um Typ-II-Pneumozyten.

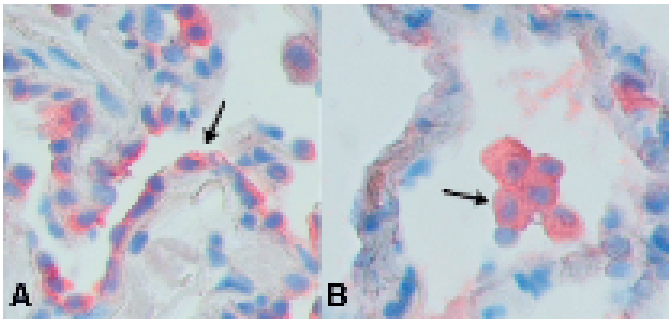


Abb. **1** Immunhistochemische Färbung von Toll-like-Rezeptor 2 mit TL2.1 AK in Typ- II-Pneumozyten (**A**) und Alveolarmakrophagen (**B**) nach HOPE-Fixierung (LSAB-AP-Neu-fuchsin; 600 ×).

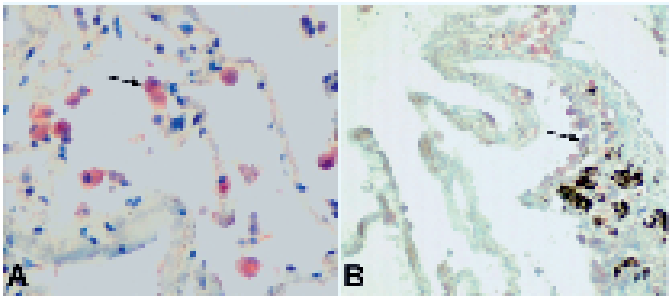


Abb. **2** In-situ-Hybridisierung auf Chlamydia-pneumoniae-DNA in vitro infizierter Lunge (**A**) und in Lungengewebe eines COPD-Patienten (**B**) (Anti-DIG-AP-Neu-fuchsin; 600 ×).

## Diskussion

Das Verfahren zur kurzzeitigen Kultur menschlicher Lungengewebe in Verbindung mit den Möglichkeiten der Gewebefixierung mittels HOPE-Technik ermöglicht die Charakterisierung der erregerinduzierten Entzündungsreaktion in einem *In-vitro*-Infektionsmodell. Die HOPE-Fixierung mit unmittelbar folgender Paraffineinbettung ergibt eine exzellente Erhaltung der Protein- und Antigenstrukturen sowie DNA und RNA für die Immunhistochemie und *In-situ*-Hybridisierung.

Entscheidend für die initiale Interaktion zwischen Erregerstrukturen und pulmonalen Abwehrzellen sowie Ausbildung einer adäquaten proinflammatorischen Immunantwort sind so genannte pattern recognition Rezeptoren (PRR), zu denen die Gruppe der Toll-like-Rezeptoren (TLR) gerechnet wird. Sie dienen als wichtige Schlüsselmoleküle in der Erkennung der so genannten pathogen associated molecular patterns (PAMP's) [6]. Ihre Expression wurde bislang in unterschiedlicher Ausprägung bei Monozyten, dendritischen Zellen und B-Zellen sowie von unserer Arbeitsgruppe auf Alveolarmakrophagen (AM) und Typ-II-Pneumozyten charakterisiert und lässt eine essenzielle Rolle für die Kontrolle der lokalisierten inflammatorischen Reaktion vermuten [4]. Typ-II-Pneumozyten spielen eine wichtige Rolle als integrativer Teil der Alveole, zumal sie für die Kontrolle der Rekrutierung und Aktivierung verschiedener Zellen als Antwort auf einen inflammatorischen Stimulus ideal positioniert sind [7]. Die intrazelluläre Signalverarbeitung nach TLR-Aktivierung wird vorwiegend über den Transkriptionsfaktor NFκB vermittelt und führt zur Anschaltung einer Reihe inflammatorischer Zytokine, Chemokine, Adhäsionsmoleküle und reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies [6]. Die Regulation der TLR-Antwort auf mikrobielle Stimulation hängt darüber hinaus davon ab, ob es sich um einen Erstkontakt mit dem entsprechenden Liganden oder um eine repetitive Stimulation handelt [8].

Als obligat intrazelluläre Erreger für die Induktion einer Inflammation ist *C. pneumoniae* von besonderem Interesse und in unserem Infektionsmodell etabliert. Über die Wirtszellen einer akuten *C.-pneumoniae*-Infektion ist bisher wenig bekannt. Die *In-vitro*-Infektion humaner Lungenschnitte zeigt in erster Linie die Infektion von Makrophagen und in geringerem Ausmaß von Alveolarepithelzellen. Dabei finden sich vergleichbare Ergebnisse für IHC und ISH. Die akute *In-vitro*-Infektion geht einher mit einer verstärkten Expression des chlamydialen HSP60, welches die Pathogenvirulenz anzeigt. Vergleicht man die akute *In-vitro*-Infektion mit in der PCR Chlamydien-positiv getesteten Lungenschnitten von COPD-Patienten, finden sich vermehrt infizierte Epithelzellen, größtenteils Typ-II-Pneumozyten. Hieraus ergeben sich unterschiedliche Infektionsmuster der akuten und persistierenden Infektion.

## Schlussfolgerung

Das *In-vitro*-Infektionsmodell bietet neue Möglichkeiten zur Untersuchung der Interaktion von Erregern und pulmonalen Wirtszellen in der frühen Infektionsphase. Die Gewebekonservierung mit dem HOPE-Fixativ verbessert dabei die Analyse von Genom- und Proteinstrukturen. Hierdurch können Voraussetzungen zur Entwicklung innovativer Therapiekonzepte geschaffen werden.





Dieses Dokument wurde zum persönlichen Gebrauch heruntergeladen. Vervielfältigung nur mit Zustimmung des Verlages.

## Literatur


[1] Thomson D. Controlled growth en masse (somatic growth) of embryonic chick tissue in vitro. Proc Roy Soc Med 1914; 7: 21 – 46
[2] Fell HB. The development of organ culture. In: Balls M, Monnickendam MA (eds.), Organ culture in biomedical research. Cambridge: University Press Cambridge, 1976: UK, pp 1 – 13
[3] Rupp J, Droemann D, Goldmann T et al. Alveolar epithelial cells type II are major target cells for C. pneumoniae in chronic but not in acute respiratory infection. FEMS Immunol Med Microbiol 2004; 41 (3): 197 – 203
[4] Droemann D, Goldmann T, Branscheid D et al. Toll-like Receptor 2 (TLR2) is expressed by alveolar type 2 cells and macrophages in the human lung. Histochem Cell Biol 2003; 119: 103 – 108
[5] Goldmann T, Wiedorn KH, Kühl H et al. Assessment of transcriptional gene activity in situ by application of HOPE-fixed, paraffin-embedded tissues. Pathol Res Pract 2002; 198: 91 – 95
[6] Imler JL, Hoffmann JA. Toll receptors in innate immunity. Trends Cell Biol 2001; 11: 304 – 311
[7] Fehrenbach H. Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited. Respir Res 2001; 2: 33 – 46
[8] Nomura F, Akashi S, Sakao Y et al. Endotoxin Tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with downregulation of surface toll-like receptor 4 expression. J Immunol 2000; 164: 3476 – 3479


## Modell der Mekoniumaspiration beim Ferkel


*I. Reiss, Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin, Abteilung für Allgemeine Pädiatrie und Neonatologie (komm. Leiter. Dr. Joachim Gerhard Kreuder), Gießen*


Bei ca. 10% aller reifen Neugeborenen liegt mekoniumhaltiges Fruchtwasser vor. Mekonium ist ein Gemisch aus gastrointestinalen Sekreten des Feten, abgeschilferten Epithelien, Vernix, Blut, fetalem Urin und einer Vielzahl anderer Komponenten. In Situationen der fetalen Hypoxie, bei der es bereits intrauterin zu einer Mangelversorgung des Feten kommt, wird Mekonium auch vor der Geburt zu unterschiedlichen Zeitpunkten abgesetzt. Das Mekonium wird im Fruchtwasser quantitativ verdünnt und kann schon vor Geburt mit den großen Atemwegen in Kontakt kommen, nach der Geburt durch tiefe Atemzüge aspiriert und somit in die kleinen Atemwege und in den Alveolarraum gelangen. Die Inzidenz des Mekoniumaspirationssyndroms (MAS) liegt je nach Bevölkerung bei 1 : 3000 – 1 : 5000 bei einer Mortalität von 1‰. Zur Diagnose eines MAS gehören respiratorische Symptome bei typischen radiologischen Befunden. Die Pathophysiologie des MAS ist komplex und primär durch eine von Mekoniumbestandteilen induzierte toxische Pneumonitis. Aspiriertes Mekonium vermag den pulmonalen Surfactantfilm zu destabilisieren. Mekonium selbst und das nach Aspiration auftretende Lungenödem inhibieren sowohl die Funktion des vorhandenen, aber auch des exogen zugeführten Surfactants. Im Rahmen der Erkrankung kommt es zur Ausbildung von intrapulmonalen Shunts mit Ausbildung einer persistierenden pulmonalen Hypertension.

Tierexperimentelle Untersuchungen zum MAS belegen, dass durch Instillation von Surfactant eine deutliche Verbesserung der Oxygenierung zu erzielen ist, insbesondere bei sehr hohen Mengen an Surfactant. Ein Effekt auf die Mortalität konnte jedoch in klinischen Untersuchungen nicht gezeigt werden. Aufgrund bisheriger Untersuchungen und vor dem Hintergrund des hohen inflammatorischen Potentials im alveolaren Kompartiment beim MAS, stellte sich die Frage, inwieweit die intratracheale Applikation eines gentechnisch hergestellten SP-C Surfactants den Gasaustausch, die Lungenfunktion und die Histomorphometrie beim Mekoniumaspirationssyndrom des Ferkels beeinflusst. Weiterhin sollte der Frage nachgegangen werden, inwieweit der rekombinante SP-C Surfactant in der Lage ist, die pulmonale Entzündungsreaktion auf molekularer Ebene zu modifizieren.

Die Untersuchungen erfolgten an 24 Ferkeln. Das Gewicht betrug im Median 2200 g (Bereich 1900 – 2500) bei einem Alter im Median von 6 (Bereich 1 – 11 Tage) Tagen. Mekonium wurde von gesunden Neugeborenen mit fehlendem Nachweis einer Infektion gewonnen, lyophilisiert und bei – 80 C gelagert. Zur Induktion des Lungenversagens wurden 5 ml/kg Körpergewicht (KG) Mekonium 20% in 4 Aliquots innerhalb von 2 – 3 Minuten intratracheal unter laufender maschineller Beatmung verabreicht. Dreißig Minuten nach Applikation von Mekonium kam es zu einer deutlichen Gasaustauschstörung mit einem arteriellen $O_2$-Partialdruck ($PaO_2$) < 9 kPa, sowie den radiologischen Zeichen eines MAS mit Atelektasen, überblähten Lungenarealen und beidseits infiltrativen Veränderungen. Die Gasaustauschstörung stellte den Ausgangswert für ein stabiles Lungenversagen beim MAS dar. Nach Induktion des Lungenversagens erfolgte die Randomisierung der Tiere in eine von 3 Behandlungsgruppen (Kontrollgruppe mit physiologischer Kochsalzlösung, natürlichem bovinen Surfactant und rekombinantem SP-C Surfactant mit einer Konzentration von jeweils 75 mg/kg KG).

Es kann gezeigt werden, dass sowohl rekombinantes SP-C Surfactant als auch das natürliche bovine Surfactant zu einer deutlichen Verbesserung der Oxygenierung und der Lungenfunktion führten, die Effekte für das rekombinante Surfactant jedoch deutlich ausgeprägter erschienen. Im Hinblick auf histomorphometrische Charakteristika alveolärer und interstitieller Inflammationsprozesse konnte eine signifikante Verbesserung dieser Variablen in den mit rekombinantem Surfactant behandelten Tieren erzielt werden. Ergänzend durchgeführte raster- und transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen unterstützten diese Beobachtungen. Um den zugrunde liegenden Regulationsmechanismus dieser unterschiedlichen Wirksamkeit der Surfactantpräparationen weiter zu untersuchen, wurde die mRNA-Expression pro- und antiinflammatorischer Zytokine (IL-1β, IL-6, IL-10, TGF-β) im Lungengewebe mittels einer quantitativen TaqMan™-PCR-Technik analysiert. Nach intratrachealer Gabe von rekombinantem Surfactant konnte eine signifikant reduzierte Expression des proinflammatorischen Zytokins IL-1β im Vergleich zur mit natürlichem bovinen Surfactant behandelten Gruppe wie auch zur der mit Kochsalzlösung behandelten Kontrollgruppe gezeigt werden. Eine vermehrte Expression des antiinflammatorisch wirksamen IL-10 wurde in beiden behandelten Surfactantgruppen beobachtet. Es ist zu spekulieren, ob das positive Wirkspektrum des rekombinanten SP-C Surfactants im experimentellen Mekoniumaspirationssyndrom auf einer Modulation der Transkription pro- und antiinflammatorischer Zytokine beruht. Vor dem Hintergrund der im Rahmen der Entwicklung einer chronischen Lungenerkrankung nach Atemnotsyndrom bedeutsam erscheinenden Inflammationsprozesse könnte dieser Eigenschaft eines rekombinanten SP-C Surfactants eine wesentliche Bedeutung in der klinischen Anwendung beim neonatalen Lungenversagen zukommen.





Dieses Dokument wurde zum persönlichen Gebrauch heruntergeladen. Vervielfältigung nur mit Zustimmung des Verlages.

## Kleine FIS(c)He: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung in der mikrobiologischen Diagnostik

*A. Moter, D. Kovacevic, C. Mallmann, U. B. Göbel, Charité Universitätsmedizin Berlin, Institut für Mikrobiologie und Hygiene*

Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) erlaubt gleichzeitig Visualisierung, Identifikation und Lokalisierung von einzelnen Mikroorganismen in ihrem natürlichen Habitat. Sie findet breite Anwendung bei umfassenden mikrobiologischen Fragestellungen in Umwelt- und Biotechnologie sowie in der Human- und Veterinärmedizin und wird zunehmend auch zu diagnostischen Zwecken in der medizinischen Mikrobiologie eingesetzt [1–3].

Das Prinzip der FISH von Bakterien beruht auf der spezifischen Hybridisierung von fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonden an ihre Zielsequenz, meist ribosomale RNA, im morphologisch intakten Mikroorganismus [2,4]. Hierfür werden die Proben zunächst fixiert, um den Sonden die Diffusion in die Bakterienzelle zu ermöglichen und RNAsen am Abbau der 16S rRNA zu hindern. Die ribosomale RNA eignet sich deswegen sehr gut für die FISH, weil sie aufgrund ihrer Präsenz in jedem bekannten, wie auch unbekannten Bakterium, der hohen Kopiezahl, sowie ihrer evolutionär konstanten und variablen Bereiche ein ideales Zielmolekül für das Design spezies- oder genus-spezifischer bzw. bakterieller, d.h. alle Bakterien erfassender Sonden bildet. Nach der Fixierung der Probe wird ein Schnitt- oder Ausstrichpräparat hergestellt und mit dem Sonden-Puffergemisch hybridisiert. Nach einem Waschschritt wird das Präparat mit Eindeckmedium und Deckglas versehen und am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

Da man mit dieser Technik Bakterien nicht nur visualisieren und identifizieren kann, sondern auch Informationen über ihre Anzahl und räumliche Verteilung erhält, hat sich die FISH als wertvolles Werkzeug bei der Analyse komplexer Habitate in der Umwelt etabliert [5].

Forschungsergebnisse der letzten Jahre weisen darauf hin, dass die natürliche Lebensform der meisten Bakterien nicht das einzelne, planktonische Vorkommen ist, sondern dass sie vielmehr in komplexen, sessilen Lebensgemeinschaften, so genannten Biofilmen existieren, deren Architektur sich in idealer Weise mit der FISH darstellen lässt [6–9]. Bakterielle Biofilme haben nicht nur in der Umwelt, sondern gewinnen auch im medizinischen Bereich eine zunehmend größere Bedeutung. Ein gut untersuchtes Beispiel für hochkomplexe Biofilme ist die supragingivale bzw. subgingivale Plaque der Mundhöhle [10,11]. Aus molekularbiologischen Analysen wissen wir von der hohen Diversität der Mundflora, die bis zu 500 Spezies umfasst, von denen bisher allerdings nur ca. die Hälfte kultivierbar ist [12]. Molekular-epidemiologische Untersuchungen zeigten insbesondere eine hohe Prävalenz von bisher nicht kultivierten, oralen Treponemen, welche sich dann in großer Zahl durch die FISH darstellen ließen [13,14]. Während die reine Prävalenz die Pathogenität eines Mikroorganismus noch nicht beweist, kann seine Visualisierung in Gewebsschnitten wichtige Indizien für seine Invasivität liefern. So konnte exemplarisch für die *Dermatitis digitalis,* eine bakterielle Klauenerkrankung beim Rind, gezeigt werden, dass bisher nicht kultivierte Treponemen zu den Vorreitern in tieferen Gewebsschichten gehörten [15].

Neben der Erforschung komplexer mikrobieller Habitate hat die FISH zunehmend Anwendung in der mikrobiologischen Diagnostik gefunden. So wurde sie erfolgreich für die Differenzierung von Erregern in positiven Blutkulturen eingesetzt. Bei der Sepsisdiagnostik ist eine schnelle und möglichst gezielte Therapie von entscheidender Bedeutung [16]. Die diagnostische Routine umfasst momentan ein Grampräparat zur groben Einordnung des Erregers mit nachfolgender Kultivierung über Nacht und biochemischer Differenzierung. So werden bis zur endgültigen Speziesdifferenzierung in der Regel 1–2 Tage benötigt. Mit der FISH kann bereits in weniger als 3 Stunden eine Speziesdifferenzierung herbeigeführt werden (Abb. **1**) [17–19]. Weitere Vorteile gegenüber anderen molekularbiologischen Verfahren (Nukleinsäure-Amplifikationstechniken) sind neben dem geringeren personellen und gerätetechnischen Aufwand auch erheblich geringere Kosten. Auch eine Raumtrennung ist wegen der geringeren Kontaminationsgefahr nicht nötig. Als Nachteil der Technik muss die allen mikroskopischen Methoden eigene, relativ niedrige Sensitivität genannt werden. Daher findet diese Methode zurzeit vor allen Dingen bei Krankheitsbildern Anwendung, bei denen mit hohen Keimzahlen gerechnet werden kann.

In der Pneumologie spielen bakterielle Biofilme, z.B. bei der zystischen Fibrose, eine wichtige Rolle. In Sputumproben solcher Patienten wurden semiquantitativ erfolgreich *Pseudomonas aeruginosa* und qualitativ *Stenotrophomonas maltophilia, Burkholderia cepacia, Haemophilus influenzae, Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes* sowie *Candida albicans* mit Erfolg nachgewiesen [20]. So erlaubt die FISH eine schnelle Diagnostik akuter Exazerbationen und ein früheres therapeutisches Einschreiten. Eine weitere diagnostische Anwendung besteht bei anspruchsvollen oder langsam wachsenden Spezies, bei welchen die biochemische Differenzierung aufwendig ist. Bei positiven Kulturen gelingt die Abgrenzung des *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplexes gegenüber anderen Mykobakterien zurzeit nur mit langwierigen biochemischen oder relativ aufwendigen, teuren NAT-Techniken. FISH stellt hier eine schnelle und günstige Alternative dar. Allerdings penetrieren die üblicherweise für die FISH benutzten Oligonukleotidsonden die mykolsäurehaltige Zellwand der Mykobakterien nur sehr schlecht oder gar nicht. Hier finden PNA (peptide nucleid acid)-Sonden Anwendung, welche wegen ihres ungeladenes Rückrats ungehindert in Mykobakterien eindringen können [21,22].

Ein häufiges Problem der mikrobiologischen Diagnostik ist die negative Kultur bei positivem Keimnachweis im mikroskopischen Präparat. Dafür kann u.a. die bei Probennahme bereits begonnene Antibiotikatherapie verantwortlich sein. An kulturnegativen Herzklappen von Endokarditispatienten konnten mittels FISH ausgeprägte bakterielle Biofilme visualisiert und mit genusspezifischen Sonden als Streptokokken identifiziert werden (Abb. **2**). So könnte diese Technik in Zukunft einen wertvollen Beitrag zur Endokarditisdiagnostik leisten und auch den Nachweis schwer kultivierbarer Mikroorganismen, wie z.B. *Tropheryma whipplei,* erlauben [23].





Dieses Dokument wurde zum persönlichen Gebrauch heruntergeladen. Vervielfältigung nur mit Zustimmung des Verlages.

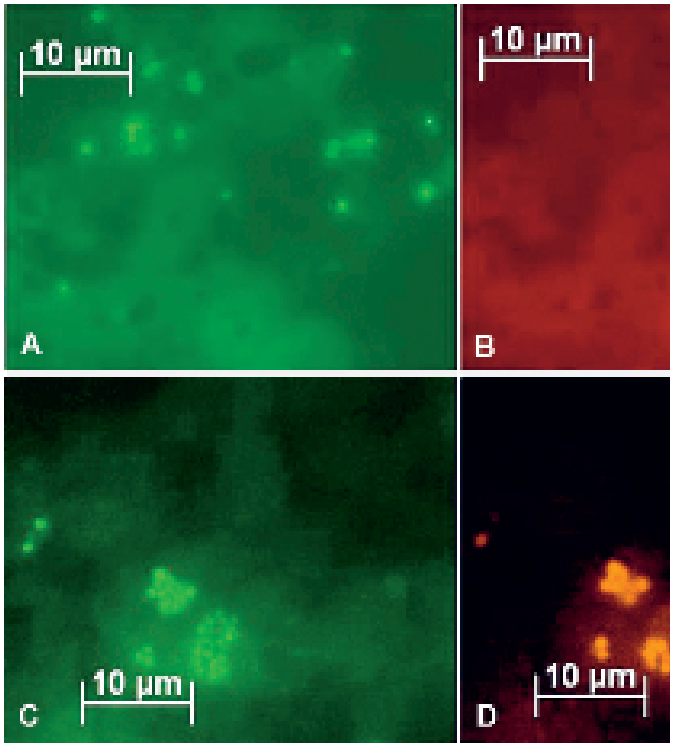


Abb. **1** FISH von Ausstrichen zweier positiver Blutkulturen (**A**/**B** und **C**/**D**). Hybridisierung mit einer *Staphylococcus* genusspezifischen Sonde (**A** und **C**, grün) und simultan mit einer *S. aureus* spezifischen Sonde (B und D, orange) erlaubt die Differenzierung von *S. aureus* (**C** und **D**) gegenüber koagulasenegativen Staphylokokken (**A** und **B**).

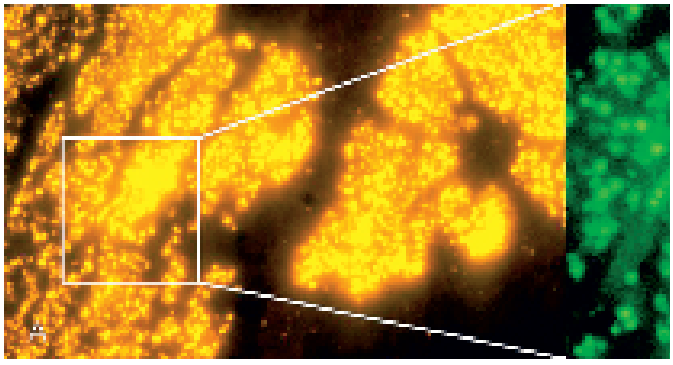

Abb. **2** FISH eines Schnittes einer kulturnegativen Aortenklappe. Hybridisierung mit einer bakteriellen Sonde (orange) zeigt einen ausgeprägten Biofilm (**A**), welcher sich ebenfalls mit einer *Streptococcus* genusspezifischen Sonde (grün) darstellen lässt (**B**).

Ein weiteres Beispiel für einen bisher nicht erfolgreich *in vitro* kultivierbaren Mikroorganismus ist *Treponema pallidum,* der Erreger der Syphilis. Auch diese Spirochäten lassen sich mit der FISH darstellen und identifizieren [3].

Der kulturunabhängige Nachweis von Mikroorganismen hat neben den genannten Vorteilen jedoch den Nachteil, dass keine Aussage über die Sensibilität gegenüber Antibiotika getroffen werden kann. Eine Ausnahme hiervon bildet die Clarithromycin-Resistenz von *Helicobacter pylori,* welche im 23S rRNA-Gen kodiert ist. Durch die Kombination einer speziesspezifischen 16S rRNA gerichteten Sonde mit Sonden, die Punktmutationen in der 23S rRNA erkennen, konnte *H. pylori* nicht nur identifiziert, sondern gleichzeitig direkt in Magenbiopsien auch seine Sensibilität gegenüber Clarithromycin zuverlässig bestimmt werden [24,25]. Da es zurzeit nur wenige kommerzielle FISH-Kits für den Nachweis von Bakterien gibt, bleibt diese Methode bisher Laboratorien vorbehalten, die über ausreichende molekulargenetische Expertisen in Sondendesign und -optimierung, sowie die Auswahl von Positiv- und Negativkontrollen verfügen.

FISH ist ein viel versprechendes Verfahren, das sich zu einem wertvollen Instrument für die mikrobiologische Routinediagnostik entwickeln kann. Sie schlägt eine Brücke zwischen Molekulargenetik und konventioneller Fluoreszenzmikroskopie und eignet sich damit auch für den Einsatz in den Laboratorien, die nicht die räumlichen, personellen und auch finanziellen Voraussetzungen für eine zuverlässige und kosteneffiziente molekulargenetische Diagnostik erfüllen.

## Literatur


[1] Amann R, Fuchs BM, Behrens S. The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridisation. Curr Opin Biotechnol 2001; 12 (3): 231 – 236

[2] Wagner M, Horn M, Daims H. Fluorescence in situ hybridisation for the identification and characterisation of prokaryotes. Curr Opin Microbiol 2003; 6 (3): 302 – 309

[3] Schweickert B, Moter A, Lefmann M et al. Let them fly or light them up: matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry and fluorescence in situ hybridization (FISH). Apmis 2004; 112 (11 – 12): 856 – 885

[4] Moter A, Gobel UB. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. J Microbiol Methods 2000; 41 (2): 85 – 112

[5] Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol Rev 1995; 59 (1): 143 – 169

[6] Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE et al. Microbial biofilms. Annu Rev Microbiol 1995; 49: 711 – 745

[7] Wagner M, Assmus B, Hartmann A et al. In situ analysis of microbial consortia in activated sludge using fluorescently labelled, rRNA-targeted oligonucleotide probes and confocal scanning laser microscopy. J Microsc 1994; 176 (Pt 3): 181 – 187

[8] Manz W, Wendt-Potthoff K, Neu TR et al. Phylogenetic Composition, Spatial Structure, and Dynamics of Lotic Bacterial Biofilms Investigated by Fluorescent in Situ Hybridization and Confocal Laser Scanning Microscopy. Microb Ecol 1999; 37 (4): 225 – 237

[9] Kuehn M, Hausner M, Bungartz HJ et al. Automated confocal laser scanning microscopy and semiautomated image processing for analysis of biofilms. Appl Environ Microbiol 1998; 64 (11): 4115 – 4127

[10] Gmur R, Wyss C, Xue Y et al. Gingival crevice microbiota from Chinese patients with gingivitis or necrotizing ulcerative gingivitis. Eur J Oral Sci 2004; 112 (1): 33 – 41

[11] Gmur R, Thurnheer T. Direct quantitative differentiation between Prevotella intermedia and Prevotella nigrescens in clinical specimens. Microbiology 2002; 148 (Pt 5): 1379 – 1387

[12] Paster BJ, Boches SK, Galvin JL et al. Bacterial diversity in human subgingival plaque. J Bacteriol 2001; 183 (12): 3770 – 3783

[13] Moter A, Hoenig C, Choi BK et al. Molecular epidemiology of oral treponemes associated with periodontal disease. J Clin Microbiol 1998; 36 (5): 1399 – 1403

[14] Wecke J, Kersten T, Madela K et al. A novel technique for monitoring the development of bacterial biofilms in human periodontal pockets. FEMS Microbiol Lett 2000; 191 (1): 95 – 101

[15] Moter A, Leist G, Rudolph R et al. Fluorescence in situ hybridization shows spatial distribution of as yet uncultured treponemes in biopsies from digital dermatitis lesions. Microbiology 1998; 144 (Pt 9): 2459 – 2467




Dieses Dokument wurde zum persönlichen Gebrauch heruntergeladen. Vervielfältigung nur mit Zustimmung des Verlages.

[16] Munson EL, Diekema DJ, Beekmann SE et al. Detection and treatment of bloodstream infection: laboratory reporting and antimicrobial management. J Clin Microbiol 2003; 41(1): 495 – 497
[17] Kempf VA, Trebesius K, Autenrieth IB. Fluorescent In situ hybridization allows rapid identification of microorganisms in blood cultures. J Clin Microbiol 2000; 38 (2): 830 – 838
[18] Jansen GJ, Mooibroek M, Idema J et al. Rapid identification of bacteria in blood cultures by using fluorescently labeled oligonucleotide probes. J Clin Microbiol 2000; 38 (2): 814 – 817
[19] Oliveira K, Procop GW, Wilson D et al. Rapid identification of Staphylococcus aureus directly from blood cultures by fluorescence in situ hybridization with peptide nucleic acid probes. J Clin Microbiol 2002; 40 (1): 247 – 251
[20] Hogardt M, Trebesius K, Geiger AM et al. Specific and rapid detection by fluorescent in situ hybridization of bacteria in clinical samples obtained from cystic fibrosis patients. J Clin Microbiol 2000; 38 (2): 818 – 825
[21] Stender H, Lund K, Petersen KH et al. Fluorescence In situ hybridization assay using peptide nucleic acid probes for differentiation between tuberculous and nontuberculous mycobacterium species in smears of mycobacterium cultures. J Clin Microbiol 1999; 37 (9): 2760 – 2765
[22] Padilla E, Manterola JM, Rasmussen OF et al. Evaluation of a fluorescence hybridisation assay using peptide nucleic acid probes for identification and differentiation of tuberculous and non-tuberculous mycobacteria in liquid cultures. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2000; 19 (2): 140 – 145
[23] Fredricks DN, Relman DA. Localization of Tropheryma whippelii rRNA in tissues from patients with Whipple's disease. J Infect Dis 2001; 183 (8): 1229 – 1237
[24] Trebesius K, Panthel K, Strobel S et al. Rapid and specific detection of Helicobacter pylori macrolide resistance in gastric tissue by fluorescent in situ hybridisation. Gut 2000; 46 (5): 608 – 614
[25] Feydt-Schmidt A, Russmann H, Lehn N et al. Fluorescence in situ hybridization vs. epsilometer test for detection of clarithromycin-susceptible and clarithromycin-resistant Helicobacter pylori strains in gastric biopsies from children. Aliment Pharmacol Ther 2002; 16 (12): 2073 – 2079





Dieses Dokument wurde zum persönlichen Gebrauch heruntergeladen. Vervielfältigung nur mit Zustimmung des Verlages.