

**Forschungsvorhaben zur Bereitstellung wissenschaftlicher Entscheidungshilfe
für das Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft
und Verbraucherschutz (BMELV)**

„Ursachenermittlung der Bovinen Neonatalen Pancytopenie“

Projektträger

Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLV)
Förderkennzeichen: 2809HS025
Laufzeit des Forschungsvorhabens : 01.09.2010 – 28.02.2013

SCHLUSSBERICHT

Projektleiter

Prof. Dr. Klaus Doll, Justus-Liebig-Universität Gießen

Leiter(innen) der weiteren Arbeitsgruppen

Freie Universität Berlin

Prof. Dr. Kerstin E. Müller

Leibniz-Institut für Nutztierbiologie Dummerstorf

Priv.-Doz. Dr. Christa Kühn,

Justus-Liebig-Universität Gießen

Priv.-Doz. Dr. Natali Bauer, Prof. Dr. Andreas Moritz

Prof. Dr. Rolf Bauerfeind

Prof. Dr. Klaus Doll

Prof. Dr. Manfred Reinacher

Prof. Dr. Tillmann Rügenapf, Prof. Dr. Heinz-Jürgen Thiel

Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

Prof. Dr. Ottmar Distl

Ludwig-Maximilians-Universität München

Prof. Dr. Cornelia Deeg

Prof. Dr. Wolfgang Klee, Dr. Carola Sauter-Louis, PhD

Inhaltsverzeichnis

1.	Ziele und Aufgabenstellung des Vorhabens	3
1.1	Planung und Ablauf des Vorhabens	3
1.2	Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde	5
2.	Material und Methoden	5
3.	Ergebnisse	6
3.1	Darstellung der wichtigsten Ergebnisse	6
3.2	Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse	7
4.	Zusammenfassung	8
5.	Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen, mit Hinweisen zu weiterführenden Fragestellungen	9
6.	Literaturverzeichnis (s. a. Ausführungen der einzelnen Arbeitsgruppen)	9

Anhang

Schlussberichte der einzelnen Arbeitsgruppen

Schlussbericht der AG an der Klinik für Kleintiere der FU Berlin (Müller, Weber)	13
Schlussbericht der AG am FBN Dummerstorf (Kühn)	29
Schlussberichte der Arbeitsgruppen an der JLU Gießen	
- Zentrallabor (Bauer, Moritz)	41
- Institut für Hygiene u. Infektionskrankheiten (Bauerfeind)	46
- Klinik für Wiederkäuer (Doll)	62
- Institut für Veterinär-Pathologie (Reinacher)	73
- Institut für Virologie (Rümenapf, Thiel)	82
Schlussbericht der AG am Institut für Tierzucht der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover (Distl)	87
Schlussberichte der Arbeitsgruppen an der LMU München	
- Lehrstuhl für Physiologie (Deeg)	92
- Klinik für Wiederkäuer (Sauter-Louis, Klee)	103
Adressenverzeichnis	109

1. Ziele und Aufgabenstellung des Vorhabens

Gegenstand dieses Verbundprojektes war die Erforschung der Ursachen einer neuen Kälberkrankheit, welche seit dem Jahre 2006 in Milchviehbetrieben und in Mutterkuhherden mehrerer europäischer Länder beobachtet wurde. Charakteristische Befunde waren unstillbare innere und äußere Blutungen aufgrund einer hochgradigen Thrombozytopenie, in Verbindung mit einer ausgeprägten Leukopenie (Friedrich et al., 2008; 2009a,b,c; Pardon et al., 2009a; 2010; Penny et al., 2009; Bell et al., 2009a; Penny et al., 2009; Smolenaars u. Mars, 2009; Gentile et al., 2009; Brugère-Picoux, 2009; Corbière et al., 2009; Pardon et al., 2009a,b; Doll et al., 2009; Friedrich et al., 2008, 2009a,b,c; Kappe et al., 2010; Sánchez-Miguel et al., 2010). Die pathohistologische Untersuchung verendeter Kälber ergab stets eine hochgradige Depletion des Knochenmarks (Panmyelophthise).

Die betroffenen Rinderhalter waren aufgrund der spektakulären Erscheinungen dieses mysteriösen, meist tödlich endenden „Blutschwitzens“ zutiefst beunruhigt, und entsprechend groß war Resonanz in den Medien und in der Öffentlichkeit.

Zur Bereitstellung wissenschaftlicher Entscheidungshilfe für das Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz haben sich daher Einrichtungen der Freien Universität Berlin, der Justus-Liebig-Universität Gießen, der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, der Ludwig-Maximilians-Universität München sowie des Leibnitz-Instituts für Nutztierbiologie Dummerstorf, initiiert durch die Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung, zu einem Forschungsverbund zusammengeschlossen mit dem Ziel, die Ursache(n) dieser Bovinen Neonatalen Pancytopenie zu ermitteln. Dabei sollten folgende Schwerpunkte bearbeitet werden: Epidemiologie, Ätiologie und Pathogenese einschließlich experimenteller Reproduktion der Krankheit sowie Abklärung der möglicherweise bestehenden genetischen und molekulargenetischen Zusammenhänge.

1.1 Planung und Ablauf des Vorhabens

Auf einer vorbereitenden Projektbesprechung am 09. Juni 2010 in Hannover wurden die einzelnen Teilaufgaben (Arbeitspakete) an die einzelnen Arbeitsgruppen übertragen. Grundlage hierfür bildete die aus den Einzelanträgen und Stellungnahmen ersichtliche Expertise, unter Berücksichtigung der Vorgaben des BMELV und der BLE. Diese Aufgabenverteilung (s. u.) findet sich wieder in dem am 22.07.2010 bei der BLE eingereichten Gesamtantrag, für welchen am 01.10.2010 der Zuwendungsbescheid erteilt wurde. Die Laufzeit dieses Forschungsvorhabens war ursprünglich auf 25 Monate festgelegt (01.09.2010 bis 30.09.2012). Nachdem sich der Ablauf dieses Forschungsprojektes insbesondere aufgrund von Schwierigkeiten mit Stellenbesetzungen und Tierversuchsgenehmigungen verzögerte, hatten mehrere Projektbeteiligte Anträge auf kostenneutrale Laufzeitverlängerung gestellt. Mit Änderungsbescheid vom 09.02.2012 wurde daraufhin die Laufzeit zunächst um drei Monate bis 31.12.2012 verlängert, mit Änderungsbescheid vom Dezember 2012 nochmals um zwei Monate bis zum 28.02.2013.

Von den einzelnen Projektpartnern waren folgende Forschungsschwerpunkte zu bearbeiten:

Forschungsschwerpunkt 1: Epidemiologie

Arbeitspaket 1: Epidemiologische Fall-Kontroll-Studie, Erhebungen in Beständen mit hoher vs. niedriger BNP-Inzidenz (Klinik für Wiederkäuer, LMU München)

Arbeitspaket 2: Epidemiologische Fall-Kontroll-Studie, Untersuchungen zum Einfluss von Management-Faktoren auf die BNP-Inzidenz in zwei Milchviehbetrieben einer Agrargenossenschaft (Klinik für Klautiere, FU Berlin)

Forschungsschwerpunkt 2: Reproduktion der Krankheit

Arbeitspaket 1: Kälbermodell; Erhebung der Fälle mit hämorrhagischer Diathese für die Gewinnung von Kolostrum von Kühen mit bekannter Vorgeschichte, Genetische Analysen an dem Kälbermodell

(Institut für Tierzucht u. Vererbungs-forschung sowie weitere Einrichtungen der Stiftung TiHo Hannover)

Arbeitspaket 2: Serum-Übertragungsstudien an genetisch heterogenen Kälbern

(Einrichtungen der JLU Gießen: Klinik für Wiederkäuer, Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Institut für Virologie, Institut für Veterinär-Pathologie)

Arbeitspaket 3: Reproduktion der Erkrankung durch Verabreichung von Mischkolostrum, In-vitro-Versuche mit Übertragung des Serums von „Bluter-Müttern“ auf kultivierte Knochenmarkszellen sowie Gesamt-Genom-Assoziationsstudie

(Klinik für Klautiere, FU Berlin; FBN Dummerstorf)

Forschungsschwerpunkt 3: Nachweis von Alloantikörpern in Serum und Kolostrum

Arbeitspaket: Hyper-Immunsierungsversuche an BVDV-seronegativen Kühen

(Klinik für Wiederkäuer, Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Institut für Virologie, JLU Gießen)

Forschungsschwerpunkt 4: Analyse der Impfstoffe und der Impfstoff-induzierten Antikörper

Arbeitspaket: Vergleichende Proteom-Analyse verschiedener BVDV-Impfstoffe sowie Identifikation darin enthaltener Antigene, welche spezifische humorale Immunreaktionen induzieren (Institut für Virologie, JLU-Gießen)

Forschungsschwerpunkt 5: Nachweis der Bindung (kolostraler) Antikörper an Zielzellen und an Zielantigene

Arbeitspaket 1: Nachweis eines allo-immunvermittelten Geschehens bei BNP

(Klinik für Klautiere, FU Berlin)

Arbeitspaket 2: Untersuchung auf Transkriptom-Ebene (FBN Dummerstorf)

Arbeitspaket 3: Immunhistologischer Nachweis der Bindung von Alloantikörpern an Knochenmarkszellen (Institut für Veterinär-Pathologie, JLU Gießen)

Arbeitspaket 4: Identifikation der Spezifität der Autoantikörper von BNP-Überträgern, Identifikation der Kandidatenantigene mittels Massenspektrometrie, sowie Validierung der identifizierten Autoantigene mit gereinigten Kandidatenproteinen (Lehrstuhl für Tierphysiologie, LMU München)

Forschungsschwerpunkt 6: Sonstige zentrale Aufgaben

Arbeitspaket: Knochenmarkszytologie und Knochenmarkshistologie

(Klinische Laboratoriumsdiagnostik u. klinische Pathophysiologie - Zentrallabor sowie Institut für Veterinär-Pathologie der JLU Gießen).

1.2 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Aufgrund des zeitlichen Zusammenhanges zwischen der Aufnahme von Kolostrum und dem perakuten Auftreten der Erkrankung sowie aufgrund der klinischen, zytologischen und (histo-) pathologischen Befunde vermutete man bereits bei Etablierung dieses Entscheidungshilfeprojektes ein immunpathologisches Geschehen (Bauer et al., 2009; Doll et al., 2009 u. 2010; Friedrich et al., 2009 u. 2010), doch wurden alternative Ursachen, wie eine Beteiligung des Porcinen Circovirus Typ 2 (PCV-2) ebenfalls ernsthaft diskutiert (Kappe et al., 2010).

Die zu diesem Verbundprojekt zusammengeschlossenen Arbeitsgruppen hatten teilweise bereits über diese damals neue Kälberkrankheit gearbeitet und / oder verfügten über die entsprechende Expertise, um die gestellten Aufgaben erfolgreich bearbeiten zu können.

2. Material und Methoden

Die durchgeführten Untersuchungen beinhalteten epidemiologische Erhebungen (Fall-Kontroll-Studie, Kohortenstudie), klinisch-experimentelle Studien (Kolostrum-Fütterungsversuche, Serum-Transfusionsstudien), molekulargenetische Untersuchungen (Genom-Assoziationsstudien, Untersuchungen auf Transkriptom-Ebene) sowie umfangreiche hämatologische, immunologische und immunhistologische Untersuchungen sowie Untersuchungen auf Proteom-Ebene einschließlich der Analyse von Impfstoffen. Bezüglich der Details sei auf die Ausführungen der einzelnen Arbeitsgruppen im Anhang verwiesen.

3. Ergebnisse

3.1 Darstellung der wichtigsten Ergebnisse

Die *wichtigsten Ergebnisse* lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Die epidemiologischen Untersuchungen ergaben einen eindeutigen Zusammenhang zwischen der Impfung mit PregSure[®] BVD (Fa. Pfizer) und dem Auftreten von Boviner Neonataler Pancytopenie (BNP). Ein positiver Zusammenhang bestand zudem zwischen der Inzidenz von BNP einerseits und der Impfhäufigkeit (Grundimmunisierung und regelmäßige Auffrischungs-Impfungen) in den Betrieben sowie der Art der Kolostrumverabreichung (höhere Inzidenz bei Einsatz von Mischkolostrum) andererseits. In den Betrieben mit höherer BNP-Inzidenz waren auch die Verluste an sonstigen Kälberkrankheiten nach Auftreten des ersten BNP-Falles höher als in dem Zeitraum davor, was auf eine Immunsuppression subklinisch betroffener Kälber zurückzuführen sein könnte.
- Die BNP ließ sich durch Verabreichung des Kolostrums von „Bluter-Müttern“ an Kälber experimentell reproduzieren. Auch hierbei trat die Krankheit häufiger auf und verlief schwerer, wenn Mischkolostrum verabreicht wurde. Entsprechende hämatologische Veränderungen (und bei hohen Dosen auch eine hämorrhagische Diathese) fanden sich nach Transfusion des gepoolten Serums von „Bluter-Müttern“, wobei bislang nicht geklärt ist, ob für die letalen Verlaufsformen zusätzlich zu den Alloantikörpern weitere - im Kolostrum bestimmter „Bluter-Müttern“ vorhandene - Faktoren verantwortlich sind, oder ob es sich dabei allein um einen Dosis-Wirkungseffekt handelt.
- Bei Untersuchung von Rinderbeständen konnte gezeigt werden, dass ein hoher Prozentsatz der mit PregSure[®] BVD geimpften Kühe in Blut und Kolostrum Alloantikörper aufweist, welche an die Zelloberfläche von bovinen Leukozyten und Thrombozyten sowie an MDBK-Zellen (bei der Impfstoffherstellung verwendete Zelllinie) adsorbieren. Tiere mit hohen Alloantikörpertitern (d. h. potenzielle „Bluter-Mütter“) finden sich in der Population vergleichsweise selten, wohingegen sich bei den meisten Kälbern eine entsprechende Reaktivität der Leukozyten gegenüber solchen Alloantikörpern nachweisen lässt. Im Vergleich dazu konnten in Betrieben, in denen die BVD-Schutzimpfungen mit zwei anderen BVDV-Inaktivativakzinen durchgeführt worden waren, bei den Kühen keine oder nur sehr niedrige Alloantikörpertiter festgestellt werden.
- Bei der Proteom-Analyse des Impfstoffs PregSure[®] BVD fanden sich neben viralen Strukturproteinen auch Nichtstrukturproteine sowie zelluläre Proteine. Diese ließen sich auch in anderen BVDV-Inaktivativakzinen nachweisen, aber in wesentlich geringerer Konzentration. Analysen mittels Immunpräzipitation, Western Blot, Affinitätschromatografie und Massenspektrometrie haben gezeigt, dass BNP-assoziierte Alloantikörper an MHC-I-Moleküle von MDBK-Zellen und Leukozyten aus peripherem Kälberblut binden. Ferner konnten MHC I und mutmaßlich β_2 -Mikroglobulin in PregSure[®] BVD nachgewiesen werden. Beides stammt wahrscheinlich aus den zur Impfstoffherstellung verwendeten MDBK-

Zellen. Aus diesen Befunden wurde ein Pathogenese-Modell abgeleitet, welches nachfolgend auch von anderen Autoren beschrieben wurde. Demnach bildet ein Rind nach Impfung dann Alloantikörper, wenn es sich bezüglich MHC I von dem in der Vakzine enthaltenen MHC-I-Typ antigenetisch unterscheidet. Wenn das Kalb vom Vater den in der Vakzine enthaltenen MHC-I-Typ geerbt hat, entwickelt es nach Aufnahme kolostraler Alloantikörper die für BNP-typischen Veränderungen. Andere im Rahmen dieses Verbundprojekts ermittelte Ergebnisse (Hemmungstest mit monoklonalen Antikörpern, Immunhistologie, Western Blots, Massenspektrometrie, Transkriptom-Analyse, Transfusionsstudien) deuten jedoch darauf hin, dass den gegen eine klassische MHC-I-Variante gerichteten Alloantikörpern vermutlich doch nicht die entscheidende Rolle zukommt. Weitere potenziell ursächliche BNP-Antigene wurden identifiziert, doch ist deren funktionelle Relevanz noch nicht bestätigt. Gesichert ist, dass Bluter-Mütter Antikörper besitzen gegen mindestens ein Antigen, welches auch in MDBK-Zellen exprimiert wird. Hinsichtlich dieser Antigen-Expression, welche immunhistologischen Untersuchungen zufolge vor allem im Knochenmark und auf Blutzellen erfolgt – nicht jedoch auf anderen Organen wie Niere oder Leber –, gibt es erhebliche interindividuelle Unterschiede. Bei nur sehr wenigen Tieren ließ sich überhaupt keine Alloantikörper-Bindung im Knochenmark nachweisen. Nach gegenwärtiger Vorstellung handelt es sich dabei um potenzielle „Bluter-Mütter“.

- Transkriptom-Analysen an einer Ressourcenpopulation, in welcher BNP-Fälle gehäuft aufgetreten waren, fanden nach PregSure® BVD-Impfung differenziell exprimierte Gene mit Immunrelevanz - jedoch kein Hinweis, dass sich die unterschiedlich für BNP prädisponierten Kühe im Hinblick auf die klassischen MHC-Klasse-I-Gene unterscheiden: Es konnte kein bislang beschriebenes MHC-I-Allel als ursächlich für die Prädisposition bestimmter Kühe identifiziert werden, nach Impfung mit PregSure® BVD vermehrt Alloantikörper zu bilden. Diskutiert wird, ob hierfür nicht vielmehr ein partiell MHC-I-homologes Gen verantwortlich ist, in Verbindung mit vermehrter Expression bestimmter Interleukine.
- Im Hinblick auf die für die charakteristische Panzytopenie und Panmyelophthase verantwortlichen Mechanismen deuten die bisherigen Ergebnisse sowohl auf eine direkte komplementvermittelte Zytotoxizität alloreaktiver Immunglobuline als auch auf eine opsonierende Wirkung mit nachfolgender Zytophagozytose. Dieser Aspekt bedarf noch weiterer Forschung. Gleiches gilt für zahlreiche andere Facetten dieses komplexen immunpathologischen Geschehens, das Modellcharakter besitzt insbesondere für die Erforschung unerwünschter Impfnebenwirkungen durch zelluläre Kontaminanten und Adjuvanzen.

3.2 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Insgesamt kann festgestellt werden, dass die Aufklärung der Ursachen dieser Kälberkrankheit mit diesem Forschungsprojekt beschleunigt wurde. Dies war sicher mit ausschlaggebend für den Hersteller, auf Zulassung dieser Vakzine zu verzichten. Die von einzelnen Projekt-Arbeitsgruppen entwickelten innovativen Methoden wurden von anderen Forschergruppen übernommen und teilweise weiterentwickelt. Nach gegenwärtigem Kenntnisstand

präsentiert sich die BNP als ein komplexes, primär durch die Applikation eines speziellen Impfstoffes ausgelöstes Geschehen, dessen Genese von individuellen immunologischen und genetischen Faktoren beeinflusst wird. Die weitere Erforschung dieser Zusammenhänge erscheint wichtig im Hinblick auf die zukünftige Entwicklung, Zulassung und Anwendung von Impfstoffen. Mittlerweile verlangt das Paul-Ehrlich-Institut bei der Neuzulassung von Rinderimpfstoffen den Nachweis, dass diese keine Alloantikörperbildung induzieren – was hierfür geeignete Tests voraussetzt, wie sie auch im Rahmen dieses Entscheidungshilfeprojekts entwickelt wurden und weiter validiert werden müssen. Denn bislang ist immer noch nicht konkret geklärt, gegen welche Antigene die vakzinierten Rindern entsprechende Alloantikörper bilden und welche Rolle dabei dem in PregSure® BVD enthaltenden neuartigen Adjuvans zukommt. Und nicht zuletzt muss die funktionelle Relevanz der identifizierten (und mit den bisherigen Tests nachweisbaren) Alloantikörper *in vivo* belegt werden.

4. Zusammenfassung

Anhand epidemiologischer Studien, in Versuchen zur Reproduktion des Krankheitsgeschehens, durch Nachweis von Alloantikörpern in Serum und Kolostrum, mittels Analyse der Impfstoffe und der Impfstoff-induzierten Antikörper sowie in Untersuchungen über die Antikörperbindung an Zielzellen und Zielorgane sollte in diesem Verbundprojekt die Ursache der neuen Kälberkrankheit „Bovine Neonatale Pancytopenie“ (BNP) geklärt werden.

Epidemiologische Untersuchungen offenbarten einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Anwendung einer bestimmten Vakzine (PregSure® BVD, Fa. Pfizer) und dem Auftreten der BNP, wobei das Erkrankungsrisiko mit der Impfintensität zunahm. Die Verabreichung von Mischkolostrum erhöhte das BNP-Risiko, welches insbesondere vom genetischen Hintergrund der Tiere abhängig war.

In einem Kolostrum-Fütterungsmodell konnte die BNP zuverlässig reproduziert werden. Ergebnisse von Serum-Transfusionsstudien deuteten auf einen Zusammenhang zwischen den BNP-typischen hämatologischen Veränderungen und der Gesamtdosis an zugeführten Alloantikörpern.

Verantwortlich für die BNP sind auch diesen Untersuchungen zufolge gegen bestimmte Zellen eines Kalbes gerichtete Alloantikörper, welche nach Impfung genetisch prädisponierter weiblicher Rinder von diesen gebildet und von den Kälbern mit dem Kolostrum aufgenommen werden. Das Alloantikörper-induzierende Antigen stammt demnach aus einer bei der Vakzine-Herstellung verwendeten MDBK-Zelllinie. Für den pathogenetischen Effekt sind aber offensichtlich nicht oder nicht allein Alloantikörper gegen bovines MHC I verantwortlich. Die Ergebnisse weiterer Untersuchungen schließen eine klassische MHC-I-Variante als ursächliches Antigen eher aus. Weitere potenziell verantwortliche BNP-Antigene wurden identifiziert, jedoch noch nicht validiert.

Hinsichtlich der charakteristischen Pancytopenie und Panmyelophthise gab es Hinweise sowohl auf eine direkte komplementvermittelte Zytotoxizität alloreaktiver Immunglobuline als

auch auf eine opsonierende Wirkung mit nachfolgender Zytophagozytose. Dieser Aspekt bedarf noch weiterer Forschung, und gleiches gilt für zahlreiche andere Facetten dieses komplexen immunpathologischen Geschehens, dem aufgrund seines Modellcharakters hinsichtlich unerwünschter Impfstoff-Nebenwirkungen grundsätzliche Bedeutung zukommt.

5. Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen; Hinweise auf weiterführende Fragestellungen

Die vorgesehenen epidemiologischen Untersuchungen konnten wie geplant durchgeführt werden, und gleiches galt hinsichtlich der klinisch-experimentellen Untersuchungen mit Ausnahme der groß angelegten Impfstudie, welche an der fehlenden Genehmigung scheiterte. Im Hinblick auf die Erforschung der immunpathogenetischen Mechanismen, welche für dieses Krankheitsgeschehen verantwortlich sind, wurden wesentliche Fortschritte erzielt. Allerdings stellte sich der immunologische und genetische Hintergrund als außerordentlich komplex dar, so dass hier noch erheblicher Forschungsbedarf besteht. Aufgrund des Modellcharakters dieses Impfstoff-indizierten Geschehens kommt der Aufklärung dieser Zusammenhänge aber nicht nur in Bezug auf die zukünftige Entwicklung und Zulassung von Tierimpfstoffen, sondern darüber hinaus auch in vergleichender Hinsicht erhebliche Bedeutung zu.

6. Literaturverzeichnis

Bauer, N., L. Wenzel, A. Moritz, K. Doll (2009b): Entwicklung der Blutbild- und Knochenmarksbefunde bei Kälbern hämorrhagischer Diathese. Vortragszusammenfassungen 2. Tagung der Deutschen Buiatrischen Gesellschaft - DVG, Berlin, 23-29.

Bell CR, Scott PR, Penny CD (2009): Ten cases of „Bleeding Calf Syndrome“ in a Scottish beef herd: Epidemiology. Proceeding of the Satellite Symposium “Haemorrhagic Diathesis in Calves”. European Buiatrics Forum, Marseille, 5.rugère-Picoux, J. (2009): Bleeding disorder in young calves in France. Proc. Satellite Symp. “Haemorrhagic Diathesis in Calves”. Europ. Buiatrics Forum, Marseille, 10.

Corbière F., G. Foucras, C. Lacroux, G. Meyer, F. Schelcher (2009): Haemorrhagic diathesis syndrome: clinical and epidemiological findings of 48 suspected cases in France, 2007-2009. Proc. Satellite Symp. “Haemorrhagic Diathesis in Calves”. Europ. Buiatrics Forum, Marseille, 11-13.

Doll, K., L. Wenzel, M. König, H.-J. Thiel, M. Reinacher, E. Prenger-Bernighoff, R. Weiß, A. Moritz, N. Bauer (2009): Krankheitsverlauf bei Kälbern mit hämorrhagischer Diathese. Vortragszusammenfassungen 2. Tagung der Deutschen Buiatrischen Gesellschaft - DVG, Berlin, 20-22.

Doll, K., L. Wenzel, M. König, H.-J. Thiel, M. Reinacher, E. Prenger-Bernighoff, R. Weiß, A. Moritz, N. Bauer (2010): Clinical, haematological and bone marrow findings in calves with

haemorrhagic diathesis („Bleeding Calf Syndrome“). Proc. XIth Middle European Buiatrics Congress, Brno, 14-15.

Friedrich, A., G. Rademacher, J. Böttcher, E. Kappe, A. Hafner-Marx, B. Weber, W. Klee (2008): Gehäuftes Auftreten von hämorrhagischer Diathese bei Kälbern in süddeutschen Beständen. Vortragszusammenfassungen 7. Berlin-Brandenburgischer Rindertag, 71-72.

Friedrich, A., G. Rademacher, A. Carlin, W. Klee (2009a): Ein aktuelles Problem: gehäuftes Auftreten von hämorrhagischer Diathese bei jungen Kälbern. Klinik und Epidemiologie. Vortragszusammenfassungen 2. Tagung der Deutschen Buiatrischen Gesellschaft - DVG, Berlin, 17-19.

Friedrich, A., G. Rademacher, B.K. Weber, E. Kappe, A. Carlin, A. Assad, C. Sauter-Louis, A. Hafner-Marx, M. Büttner, J. Böttcher, W. Klee (2009b): Gehäuftes Auftreten von hämorrhagischer Diathese infolge Knochenmarkschädigung bei jungen Kälbern. Tierärztl. Umschau 64, 423-431.

Friedrich, A., A. Carlin, A. Assad, C. Sauter-Louis, G. Rademacher, W., Klee (2009c): Increase in the incidence of a bleeding disorder in young calves: Epidemiological data from Germany. Proc. Satellite Symp. „Haemorrhagic Diathesis in Calves“. Europ. Buiatrics Forum, Marseille, 15-16.

Friedrich, A., A. Carlin, A. Assad, M. Büttner, G. Rademacher, C. Sauter-Louis, W. Klee (2009d): Experimental production of the syndrome. Proc. Satellite Symp. „Haemorrhagic Diathesis in Calves“. Europ. Buiatrics Forum, Marseille, 27.

Friedrich, A., M. Büttner, B.K. Weber, M. Müller, A. Carlin, A. Assad, D. Schumann, G. Rademacher, C. Sauter-Louis, A. hafner-Marx, W. Klee (2010): Clinical signs of Bovine Neonatal Pancytopenia (Bleeding calf syndrome) and experimental production of the disease. Proc. XIth Middle European Buiatrics Congress, Brno, 15.

Gentile, A., C. Rosignoli, D. Pravettoni, S. Testoni, G. Bettini, A. Belloli (2009): Pancytopenia and haemorrhagic diathesis in calves: Italian experience. Proc. Satellite Symp. „Haemorrhagic Diathesis in Calves“. Europ. Buiatrics Forum, Marseille, 14.

Kappe, E.C., M.Y. Halami, B. Schade, M. Alex, D. Hoffmann, A. Gangl, K. Meyer, W. Dekant, B.A. Schwarz, R. Johne, J. Buitkamp, J. Böttcher, H. Müller (2010): Bone marrow depletion with haemorrhagic diathesis in calves in Germany: Characterization of the disease and preliminary investigations on its aetiology. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 123, 31-41.

Pardon, B., K. De Bleecker, L., Steukers, J. Dierick, V. Saey, S. Maes, G. Vercauteren, K. De Clercq, R. Ducatelle, P. Deprez (2009a): Neonatal haemorrhagic diathesis in Belgium: Epidemiology. Proc. Satellite Symp. „Haemorrhagic Diathesis in Calves“. Europ. Buiatrics Forum, Marseille, 8-9.

Pardon, B., V. Saey, J. Dierick, S. Maes, G. Vercauteren, K. De Clercq, R. Ducatelle, L. Steukers, K. De Bleecker, P. Deprez (2009b): Neonatal haemorrhagic diathesis in Belgium: Gross pathology and cytology of blood and the haematopoietic system. Proc. Satellite Symp. „Haemorrhagic Diathesis in Calves“. Europ. Buiatrics Forum, Marseille, 23-24.

Pardon, B., L. Steukers, J. Dierick, R. Ducatelle, V. Saey, S. Maes, G. Vercauteren, K. De Clercq, J. Callens, K. De Bleecker, P. Deprez P. (2010): Haemorrhagic diathesis in neonatal calves: an emerging syndrome in Europe. Transbound. Emerg. Dis. 57, 135-146.

Penny, C.D., C. Bell, L. Morrison, F. Howie, K. Willoughby (2009): Pancytopenia and haemorrhage in young beef calves. Vet. Rec. 164, 762.

Sánchez-Miguel, C., M. McElroy, E. Walsh (2010): Bovine neonatal pancytopenia in calves in Ireland. Vet. Rec. 166, 664.

Smolenaars, A.J.G., M.H. Mars (2009): Epidemiology and diagnostic results of haemorrhagic disease syndrome in The Netherlands. Proc. Satellite Symp. "Haemorrhagic Diathesis in Calves". Europ. Buiatrics Forum, Marseille, 7.

Weitere Literaturhinweise unter den Ausführungen der einzelnen Arbeitsgruppen

Anhang

**Forschungsvorhaben zur Bereitstellung wissenschaftlicher Entscheidungshilfe
für das Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucher-
schutz (BMELV)**

Ursachenermittlung bei der Bovinen Neonatalen Pancytopenie

Projektträger: Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE)
Förderkennzeichen: 2809HS025
Laufzeit: 01.09.2010 – 28.02.2013
Berichtszeitraum: 01.09.2010 – 28.02.2013

SCHLUSSBERICHT

der Arbeitsgruppe Müller und Weber

Freie Universität Berlin

Klinik für Kleintiere

Prof. Dr. med. vet. Kerstin E. Müller, Dr. med. vet. Corinna N. Weber
Königsweg 65, 14163 Berlin

Tel.: 030/83862261, -83862282, Fax: 030/83862512

E-mail: kerstin-elisabeth.mueller@fu-berlin.de, corinna.weber@fu-berlin.de

1. Ziele und Aufgabenstellung des Vorhabens

⇒ Planung und Ablauf des Vorhabens

Ziel des Projektes war die Ermittlung der Ursachen sowie der Klärung der Pathogenese der Bovinen Neonatalen Panzytopenie (BNP). Aufgrund der Ähnlichkeit mit bei neugeborenen Kindern vorkommenden Krankheitsbildern immunvermittelter Thrombozytopenien und Knochenmarksaplasien ist für die BNP die Kombination von einem immunvermittelten Phänomen mit einer Disposition der Mutter wahrscheinlich. Deshalb sollte die Studie klären, inwiefern auch die Pathogenese der BNP durch ein immunvermitteltes Geschehen bestimmt wird. Zu diesem Zweck wurden klinische, hämatologische und immunologisch-molekularbiologische Untersuchungen an Blut und Knochenmark von Kälbern mit BNP und entsprechenden Kontrolltieren ausgeführt. Ein weiterer Schwerpunkt sollte auf den Einflüssen der Elterntiere liegen, die zu einer gegen das Kalb gerichteten Immunreaktion führen. Die hierzu nötigen retrospektiven und prospektiven epidemiologischen Analysen konnten in einer Agrargenossenschaft in unmittelbarer Nachbarschaft der Klinik für Klauentiere der Freien Universität Berlin durchgeführt werden, deren Verfahrensabläufe über die QS-Zertifizierung standardisiert sind und deren Herdendaten der letzten Jahre über das Managementprogramm Herde (DSB Agrosoft) erfasst wurden.

⇒ Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Seit dem Jahr 2007 kam es in Deutschland, Frankreich, Großbritannien, Italien, Belgien und den Niederlanden vermehrt zum Auftreten spontaner Hautblutungen bei neugeborenen Kälbern (European Buiatrics Congress Marseille, 2009). Darüber hinaus bluteten die Tiere aus den natürlichen Körperöffnungen und wiesen petechiale Blutungen und Ekchymosen an den Schleimhäuten auf (Friedrich et al., 2009a). In der Mehrzahl der Fälle starben die Kälber trotz intensiver Behandlung. Blutuntersuchungen ergaben eine hochgradige Thrombozytopenie sowie – abhängig vom Krankheitsstadium - eine Leukopenie und Anämie. Bei der Sektion wiesen die Tiere ausgedehnte Blutungen im Bereich der Unterhaut, subseröse Blutungen der inneren Organe sowie Blutungen in den Magen-Darmkanal auf. Histologisch wurde eine Depletion des Knochenmarks festgestellt, die alle Zellreihen (Erythropoese, Thrombopoese, Leukopoese) betraf (Friedrich et al., 2009a). Die Bovine Neonatale Panzytopenie betraf Kälber unter vier Wochen. Es wurde vermutet, dass es sich bei der BNP um ein multifaktorielles Geschehen handelt. In den meisten Fällen waren nur Einzeltiere eines Bestandes betroffen. In der Mehrzahl der betroffenen Betriebe wurde der Impfstoff PregSure (Pfizer) gegen BVD eingesetzt; Mütter, die bereits Kälbern mit BNP hatten, konnten in folgenden Kalbungen wieder BNP-Kälber

gebären; das Krankheitsbild konnte mit Kolostrum von BNP-Müttern im Experiment auch bei anderen Kälbern induziert werden (European Buiatrics Congress Marseille, 2009).

Vorangegangene Studien in dem von uns beobachteten Betrieb mit hoher BNP-Inzidenz machten deutlich, dass die Verfütterung von Mischkolostrum in der Häufigkeit und der Ausprägung des Krankheitsgeschehens eine entscheidende Rolle spielt (Witt et al. 2011). In den Wochen, in denen Kälber geboren wurden, die später an BNP erkrankten, konnte dabei eine Häufung von scheinbar gesunden Kälbern beobachtet werden, die einen Abfall der zirkulierenden Blutzellen aufwiesen. Sollten die Mütter der betroffenen Kälber Alloantikörper produzieren, die gegen Zelloberflächenstrukturen auf Knochenmarkszellen, Thrombozyten und Leukozyten ihres Nachwuchses gerichtet sind, wäre eine Verteilung und Weitergabe dieser Antikörper über das Kolostrum möglich; je nach Empfänglichkeit könnten auch fremde Kälber durch ein solches Kolostrum erkranken. Der Grund für das zeitlich gehäufte Auftreten von subklinisch und klinisch erkrankten Kälbern wurde daher der Vertränkung von Mischkolostrum zugeschrieben (Witt et al. 2011).

Die Bovine Neonatale Panzytopenie (BNP) zeigt große Ähnlichkeiten zu Erkrankungen neugeborener Kinder. Der Verlauf der bovinen neonatalen Thrombozytopenie und ihr Übergang in eine Panzytopenie ist im klinischen Verlauf einem anderen humanen Krankheitsbild, der kongenitalen amegakaryozytären Thrombozytopenie (CAMT), sehr ähnlich. Die CAMT ist ein autosomal rezessiv vererbte, schwere Thrombozytopenie mit Übergang in eine Panzytopenie. Das Krankheitsbild ist insbesondere im Kleinkindalter mit schweren Blutungen assoziiert (Dame, 2006). Ursache der CAMT ist eine eingeschränkte oder fehlende Expression oder Funktion des Rezeptors für den primären megakaryopoietischen Wachstumsfaktor Thrombopoietin (Tpo), c-Mpl (Ballmaier et al., 2001; Ihara et al., 1999). C-Mpl wird nicht nur auf den Thrombozyten und megakaryozytären Vorläuferzellen exprimiert, sondern auch auf hämatopoietischen Stammzellen und pluripotenten (nicht-linienspezifischen) Vorläuferzellen (Kaushansky, 2005; Dame, 2002). Der Verlust der Funktion von Tpo infolge der gestörten c-Mpl Funktion oder Expression gilt als Ursache für den Übergang der Erkrankung in eine Panzytopenie (Germeshausen, 2006). Beim Menschen unterscheidet man aufgrund des klinischen Verlaufs zwei Formen der CAMT: Bei der CAMT-I kommt es infolge eines kompletten Verlusts der Tpo-Rezeptor-Funktion immer zu einer schweren Thrombozytopenie mit frühem Übergang in eine Panzytopenie. Bei der CAMT-II erhalten missense-Mutationen eine Restfunktion des c-Mpl, was einen vorübergehenden Anstieg der Thrombozytenzahl in den subnormalen Bereich ermöglicht; eine schwere Panzytopenie entwickelt

sich gar nicht oder erst spät. Der Phänotyp bzw. klinische Verlauf ist mit unterschiedlichen Formen der MPL-Mutationen assoziiert. Die Mutationen betreffen beinahe alle kodierenden Exone des humanen MPL Gens, finden sich aber gehäuft in den Domänen, die die extrazelluläre Tpo-Bindungsstelle kodieren (Germeshausen, 2006).

Die Neonatale Allo-Immun-Thrombozytopenie (NAIT) des Menschen tritt in der Häufigkeit von 1:1000 Geburten auf und führt beim Fetus zu einer immunvermittelten Zerstörung von Thrombozyten und von Vorläuferzellen der Thrombopoese (Mahon et al., 1957). Die Erkrankung wird durch eine transplazentare Übertragung von mütterlichen Antikörpern verursacht, die gegen Thrombozyten-spezifische Antigene gerichtet sind (human platelet antigens, HPA). Sofern der Fetus vom Vater einen HPA Typ geerbt hat, der mit dem der Mutter inkompatibel ist, bildet die Mutter Antikörper. Aufgrund der innigen Verbindung zwischen der placenta materna und placenta fetalis des Menschen können diese Antikörper bereits während der Schwangerschaft übertreten und den Fetus schädigen (Deaver et al., 1986, Serrarens-Janssen et al., 2008). Beim Menschen sind bislang 24 verschiedene Thrombozyten-spezifische Alloantigene bekannt, bei denen fast immer ein Polymorphismus einer einzelnen Aminosäure (single nucleotide polymorphism, SNP) in einem Gen vorliegt, das ein relevantes Glykoprotein auf der Thrombozytenmembran kodiert (Metcalf et al., 2003). Die Mutter bildet Antikörper, die gegen die paternal vererbte Variante gerichtet sind. Die Immunisierung erfolgt entweder nach Übergang von fetalen Thrombozyten mit den paternal vererbten, veränderten Thrombozyten-Glykoproteinen in den mütterlichen Kreislauf, oder sie stellt eine immunologische Kreuzreaktion dar. Die maternalen Alloantikörper gelangen über die Plazenta wiederum in den fetalen Kreislauf, so dass die fetalen Thrombozyten nach Antigen-Antikörper-Kontakt abgebaut werden (Blanchette et al., 2000; Dame, 2006). In bestimmten Fällen reagieren die maternalen Alloantikörper auch mit den megakaryozytären Vorläuferzellen (Warwick et al., 1994). Die NAIT ist mit oft sehr schweren Thrombozytopenien (Thrombozytenzahl < 20/nl) assoziiert; in etwa 80% der Fälle fallen Blutungszeichen, insb. Petechien auf (Blanchette et al., 2000). Schwere intrakranielle Blutungen finden sich in 10% der Fälle mit manifester NAIT (Dame, 2006). Postnatal fallen die Thrombozytenzahl innerhalb der ersten 5 Tage kontinuierlich ab und normalisieren sich in den darauffolgenden 14 Tagen wieder mit abnehmender Alloantikörper-Konzentration (Blanchette et al., 2000). Im Gegensatz zum Menschen treten beim Rind maternale IgG nicht über die Plazenta in den fetalen Kreislauf. Stattdessen werden maternale Antikörper im Kolostrum konzentriert und in den ersten Stunden nach der Geburt mit der Kolostralmilch zum Kalb transferiert, welches die Antikörper über die Darmschleimhaut aufnimmt, weshalb eine durch maternale Antikörper

vermittelte Immunthrombozytopenie bei Kalb nicht während der Fetalzeit abläuft, sondern sich erst nach Geburt mit der Zufuhr von Kolostrum (Biestmilch) manifestiert.

2. Material und Methoden

Arbeitspaket 1.2: Epidemiologische Fall-Kontroll-Studie, Einfluss von Management-Faktoren auf die BNP-Inzidenz in zwei Milchviehbetrieben einer Agrargenossenschaft

Für die vorliegende Arbeit wurden epidemiologische Untersuchungen in einem aus zwei Betriebseinheiten bestehenden Milchviehbetrieb in Brandenburg mit einem ungewöhnlich hohen Vorkommen von BNP-Fällen durchgeführt. Da eine genaue Befragung der Mitarbeiter des Betriebes ergab, dass BNP-Fälle nun in beiden Betriebseinheiten auftraten und nicht wie ursprünglich festgestellt nur in einer der beiden, wurde die geplante Fall-Kontroll-Studie in Absprache mit Experten des Friedrich-Löffler-Instituts aufgegeben und dafür eine Kohortenstudie durchgeführt. Hierfür wurde retrospektiv ein Beobachtungszeitraum über drei Jahre (01.07.2007 bis 31.07.2010) gewählt, und die in diesem Zeitraum geborenen Kälber als Studienpopulation ($n_{\text{gesamt}} = 2214$) bestimmt.

Mit Hilfe des Herdenmanagementprogrammes „Herde“ (dsp Agrosoft, Ketzin, Version 5.4) konnten die Tier- und Managementdaten der Muttertiere der Studienpopulation ausgewertet und verglichen werden. Zusätzlich wurden neben allgemeinen Fragestellungen nach Alter- und Laktationsstruktur sowie Abgangs- und Verendungsdaten die Abstammungsdaten und die Impfdaten hinsichtlich Ähnlichkeiten untersucht. Für die Impfdaten wurden, soweit realisierbar, die genauen Impfzeitpunkte der Impfungen in Hinblick auf die Trächtigkeitzeitpunkte und Wiederholungsimpfungen analysiert. Anknüpfend an bisherige epidemiologische Forschungen wurden vorerst die an BNP erkrankten Kälber hinsichtlich des Vorkommens der Krankheit, der Symptomatik, Pathologie und Histologie, des Verlaufs, des monatlichen Auftretens und der Abstammung untersucht und beschrieben.

Durch die Teilung des Betriebes in zwei Betriebseinheiten wurde auf Abweichungen im Management geachtet. Dabei konnte festgestellt werden, dass aufgrund des überbetrieblichen Managements, welches nach QS-Zertifizierung standardisiert wurde, und der nahezu identischen Struktur mit Ausnahme des Kolostrum-Managements und der Kälberhaltung (Auslauf ja/nein) nur geringfügige Unterschiede zwischen den beiden Betriebsteilen bestand. Daher wurden für den Großteil der Analysen die Kälber beider Abteilungen gemeinsam betrachtet. Für statistische Berechnungen wurden der Fisher-Exakt-Test

(Signifikanztest) und das relative Risiko mit Konfidenzintervallen genutzt (PASW Statistics für Windows®, V. 18).

Arbeitspaket 5.1:

Nachweis eines allo-immunvermittelten Geschehens bei BNP

Aus dem Heparin-Blut gesunder neugeborener Kälber wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation mit Histopaque-1077 (Sigma) die mononukleären Zellen (PBMC; Lymphozyten und Monozyten) aufgereinigt und in RPMI 1640-Medium (Biochrome) mit 10 % fetalem Kälberserum (FKS; Biochrome) und 1 % PenStrep aufgenommen. Zur Kultivierung wurden die PBMC entweder nur mit Medium, mit Serum einer nicht gegen BVD geimpften, gesunden Kuh oder mit Serum einer gegen BVD geimpften Kuh, die bereits ein BNP-positives Kalb hatte, für jeweils 3 h bis 72 h inkubiert. Die Proliferationsrate wurde nach unspezifischer Co-Stimulation mit Concanavalin A (Sigma) über die Reduktion von AlamarBlue (Serotec) ermittelt. Die Apoptoserate in der Kultur wurde durchflusszytometrisch über die Annexin V-Bindung (Annexin V-FITC, Becton Dickinson) gegen die Propidiumjodid-Aufnahme (Sigma) der Zellen analysiert.

Aus den mit Serum einer gesunden Kuh bzw. Serum einer BNP-Mutter inkubierten Zellen neugeborener Kälber wurde die RNA isoliert (RNeasy, Qiagen) und durch Spektrophotometrie und Formalin-Gel-Elektrophorese auf die Reinheit und Integrität getestet. Die RNA wurde mittels Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben (Reverse Transcriptase Core Kit, Eurogentec), die dann mit spezifischen Primern (Tabelle 1) in der Real Time-PCR amplifiziert wurde (qPCR Mastermix Plus for SYBR-Green, Eurogentec). Die analysierten Gene waren Interleukin 2 (IL-2), Interleukin 6 (IL-6), Interleukin 10 (IL-10), Interferon γ (IFN- γ), Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF- α), Heat Shock-Protein 70 (Hsp70), Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) und Toll-like Rezeptor 2 (TLR-2). Die Expression dieser Gene wurde jeweils gegen die Expression sogenannter House Keeping-Gene durchgeführt. Die House-Keeping-Gene β -2-M, β -Actin und YWHAZ wurden anhand einer genorm-Analyse für die Anwendung in bovinen PBMC-Zellen als geeignet ausgewählt. Die Genexpression wurde jeweils relativ zum Zeitpunkt 0 berechnet. Die Auswertung erfolgte über die Software REST 2009.

Tabelle 1: Primer für die Real Time-PCR

mRNA target	Accession No.	Primersequenz [5' – 3']	
IL-2	M12791.1	forward	CCTCAACTCCTGCCACAATGTA
		reverse	AAATCCAGCAGCAATGACTTCA
IL-6	NM_173923	forward	TCCCGCTTCACAAGCGCCTTC
		reverse	AGGGGACCCGGGGTAGGGAA
IL-10	NM_173923	forward	TGACATCAAGGAGCACGTAA
		reverse	TCTCCACCGCCTTGCTCTT
IFN- γ	NM_174086	forward	CAAATTCCGGTGGATGATCTG
		reverse	TCTGACTTCTCGTCCGCTTTC
TNF- α	NM_173966	forward	GCCCACGTTGTAGCCGACATCA
		reverse	CACCGTTGGCCATGAGGGCA
GM-CSF	U22385	forward	TTGACTCCCAGGAACCAACGT
		reverse	CATCATGGTCAAGGAGCCCAT
TLR-2	NM_174197	forward	TGAGATGGTTGGATGGCATCA
		reverse	AACCTCATGGACTGCAGCACA
β -2-Microglobulin	NM_173893	forward	GAGCCGCTCACTCCGCCAC
		reverse	TGGAGGACGCTGGATGGCGT
β -Actin	NM_173979	forward	AGCAGATGTGGATCAGCAAG
		reverse	CAGCTAACAGTCCGCCTAGAA
YWHAZ	NM_174814	forward	ACTCCGGACACAGAACATCCAGTCA
		reverse	CCCTCCAAGATGACCTACGGGCT

Die Thrombopoietin-Expression im Serum von Kälbern und Kühen wurde mit Hilfe eines kommerziellen ELISA-Kits durchgeführt (bos taurus Thrombopoietin ELISA Kit, USCN). Für die Sequenzierung des bovinen *c-mpl* Gens (Gene ID: 528492) zur Detektion möglicher Genvarianten in den an der BNP erkrankten und vergleichbaren gesunden Kälbern sowie Muttertieren von BNP-Kälbern wurde genomische DNA aus dem Vollblut isoliert (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen). Die Amplifikation (GoTaq DNA Polymerase, Promega) erfolgte mit spezifischen Primern, die 12 Abschnitte der kodierenden Exone des bovinen *c-mpl* Gens detektieren (Tabelle 2). Das PCR-Produkt wurde anschließend mit der Kettenabbruch-Methode nach Sanger prozessiert und im Kapillar-Sequenzierer analysiert (Fa. GATC, Berlin).

Tabelle 2: Primer für die Amplifikation der Exonfragmente

Exonabschnitt	Primersequenz [5' – 3']	
EA 01	forward	GGCTGTATCTGACAGGAAC
	reverse	CCACTTTGCACTTCCCTCCC
EA 02	forward	GGGAGGGGAAGTGCAAAGTGG
	reverse	TGGAAGTGCCTCTGACAGG
EA 03	forward	CCTGTCAGAGGACTAGTCCA
	reverse	CTTCAAAGAGCACAGCTCG
EA 04	forward	GTGGTGCAGAACAGGATAAGG
	reverse	GGAATGCCCAAAGCATGGC
EA 05	forward	GAACTGAGTGTCTCTCCACAGG
	reverse	GTATCCAGATCATCTTTACACAC
EA 06	forward	GTGTGTAAAGATGATCTGGATAC
	reverse	CATTGGCGGATGAGAGCAT
EA 07	forward	TACATAGCATGAGAGAGAAAGC
	reverse	CTAAGCCCTTCTGTGCATG
EA 08	forward	GATACTTCTGACCCATGGCC
	reverse	CAGCCCAGACAGAGATACA
EA 09	forward	GATTCAAGGCGGTAGGATTGG
	reverse	GTAGGTCTGCACAACCTCA
EA 10	forward	TGAGGTTGTGCAGACCTAC
	reverse	CGTTCGAGTGTAAAGGAGGC
EA 11	forward	TCCACACCACTGACTTCAC
	reverse	CTGTGCAGAAAGGAGGGTT
EA 12	forward	AACCCTCCTTTCTGCACAG
	reverse	GAGCAAATGGGAGTTGGGAAG

3. Ergebnisse

⇒ Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse

Arbeitspaket 1.2: Epidemiologische Fall-Kontroll-Studie, Einfluss von Management-Faktoren auf die BNP-Inzidenz in zwei Milchviehbetrieben einer Agrargenossenschaft

Unsere Ergebnisse zeigten, dass in Bezug auf BNP besonders das bereits erwähnte Kolostrummanagement in den Betrieben, der genetische Hintergrund der Kälber, sowie bestimmte Impfmaßnahmen eine entscheidende Rolle spielen. Hinsichtlich des Kolostroms fiel eine deutliche höhere Anzahl von BNP-Fällen in dem Betriebsteil auf, der Mischkolostrum einsetzte ($n_1 = 26$; $n_2 = 14$, $p = 0,008$).

Bei der Betrachtung der Abstammung konnte festgestellt werden, dass alle BNP-Kälber von insgesamt 19 Bullen abstammten. Von diesen 19 Bullen wurden 5 Bullen besonders häufig mit BNP in Verbindung gebracht und für die statistische Analyse genutzt. Dabei stellte sich heraus, dass ein Bulle ein 12-fach höheres relatives Risiko hatte, ein BNP-Kalb zu zeugen, als andere Bullen. Ein weiterer Bulle besaß ein 8,1-fach erhöhtes relati-

ves Risiko für selbiges. Für beide Bullen war die Anzahl ihrer BNP-Kälber bezogen auf ihre gesamten Einsätze als Deckbullen hoch signifikant ($p < 0,01$). Dieses Ergebnis unterstreicht die Bedeutung der Abstammung väterlicherseits des Kalbes. Die Empfänglichkeit der Zellen des Kalbes für die maternalen Alloantikörper ist abhängig vom Genotyp des Vaters bzw. von den Zelloberflächenstrukturen, die vom Deckbullen vererbt werden.

Des Weiteren wurden die Impfzeitpunkte auf dem Betrieb gesondert untersucht. Dabei stellte sich hinsichtlich der BVD-Impfung heraus, dass das relative Risiko für eine BNP-Erkrankung bei Kälbern, deren Mütter im 6. Trächtigkeitsmonat geimpft worden waren, 6,3-mal so hoch war wie bei Kälbern, deren Mütter in anderen Trächtigkeitsmonaten bzw. nicht trächtig geimpft worden waren. Dieses Phänomen soll in folgenden Forschungen untersucht werden. Der durch andere Arbeitsgruppen dieses Projektes festgestellte kausale Zusammenhang mit der Impfung PregSure® BVD und dem Auftreten von BNP konnte in dem Milchviehbetrieb nicht untersucht werden, da beide Betriebsteile gleichermaßen diesen Impfstoff einsetzten. Mit dem Stoppen dieser Impfung und dem Schlachten von so geimpften Muttertieren ist jedoch in beiden Betriebsteilen die BNP-Inzidenz im Jahr 2012 deutlich zurückgegangen.

Die Impfungen gegen das Blauzungenvirus erfolgten gemäß den gesetzlichen Bestimmungen in den Jahren 2008 und 2009. Zu diesem Zeitpunkt waren die ersten BNP-Fälle in dem Betrieb bereits aufgetreten. Bei der Analyse wurde jedoch deutlich, dass Kälber der Mütter, die entweder im 6. oder im 8. Trächtigkeitsmonat gegen die Blauzungenerkrankung geimpft worden waren, jeweils 4-mal häufiger an BNP erkrankten als Kälber, deren Mütter in anderen Trächtigkeitsmonaten geimpft oder nicht geimpft worden waren. Eine zeitliche Korrelation zwischen der Impfung gegen BTV und gegen BVD scheint hinsichtlich dieses Ergebnisses möglich. Der Betrieb impfte im Jahr 2005 letztmalig gegen IBR. Kein BNP-Kalb wurde zum Zeitpunkt einer IBR-Impfung geboren.

Weiterhin fällt eine statistische Signifikanz bei der Geburt von BNP-Kälbern bei der ersten Abkalbung des Muttertieres auf ($p = 0,03$). Das relative Risiko ist mit dem Wert 0,43 in der ersten Laktation am niedrigsten, demnach ist das Risiko für Kälber von Erstkalbinnen, an BNP erkrankten, geringer als für Kälber von höherlaktierenden Müttern. Es wurde die Anzahl aller Totgeburten der Mütter der Studienpopulation und der Kälber, die an BNP erkrankten, ermittelt. Es traten keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Vorhandensein von Totgeburten der BNP-Mütter und der Tiere ohne BNP-Kälber auf. Mit dem Fisher-Exakt-Test konnte nachgewiesen werden, dass die Anzahl von weiteren verendeten Kälbern (BNP-Fälle ausgeschlossen) von BNP-Müttern in dem Beobachtungs-

zeitraum sich nicht signifikant von der Anzahl anderer Tiere der Studienpopulation mit verendeten Kälbern in diesem Zeitraum unterscheidet.

Hinsichtlich der jahreszeitlichen Verteilung der BNP-Fälle fällt eine Häufung in den Monaten Juli, August und September auf. 72,5 % aller BNP-Fälle wurden in diesen Monaten beobachtet, davon 30 % allein in dem Monat September. Ein Unterschied zwischen den beiden Betriebsteilen hinsichtlich des vorhandenen bzw. nicht vorhandenen Zugangs zu dem Auslauf ohne Überdachung und der Fliegenbekämpfung kann bei der monatlichen Verteilung der Fälle nicht festgestellt werden. Es traten alle BNP-Fälle in den Vektorreichen (d.h. stechinsektenreichen) Monaten Mai bis Oktober, in denen üblicherweise viele Insekten vorkommen, auf ($p < 0,001$).

Arbeitspaket 5.1:

Nachweis eines allo-immunvermittelten Geschehens bei BNP

In der Projektlaufzeit konnte umfangreiches Probenmaterial gewonnen und archiviert werden. Von Kälbern mit BNP, vergleichbaren gesunden Kälbern sowie Muttertieren wurden Serumproben archiviert und aus dem Vollblut mononukleäre Zellen sowie DNA- und stabilisierte RNA-Proben gewonnen. Zusätzlich wurden in neun Fällen Knochenmarksaspirate gewonnen, die aufgereinigt und archiviert wurden. Von zwei Kühen liegen Stammzellen aus dem Nabelschnurblut vor.

Um nachzuweisen, dass die BNP-Erkrankung reproduzierbar ist, erhielten acht neugeborene Kälber aus Kühen, die in der Vergangenheit BNP-Kälber hatten („BNP-Mütter“), in den ersten 24 Lebensstunden nur das Kolostrum ihrer Mütter. In fünf Fällen kam es zu deutlichen Hautblutungen, wobei nur drei der Tiere die für BNP-typischen hämatologischen Veränderungen zeigten und nachfolgend verendeten. Drei Kälber zeigten keine äußerlichen Anzeichen von Blutungen. *In vitro* wurde geschaut, ob die Inkubation mit Serum einer BNP-Mutter Einfluss auf kultivierte mononukleäre Blutzellen von neugeborenen Kälbern hat. Weder im Proliferationstest nach unspezifischer Stimulierung noch im Apoptose-Test ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen der Inkubation nur mit Medium (Kontrolle), der Inkubation mit Serum einer gesunden, nicht gegen BNP geimpften Kuh sowie mit Serum einer Mutter eines an BNP erkrankten und verendeten Kalbes.

In der quantitativen RT-Real Time-PCR aus PBMC gesunder neugeborener Kälber konnten weder nach 3, 6, 24 oder 48 h Inkubation mit Serum von BNP-Müttern signifikante Unterschiede in der Genexpression von Interleukin 2 (IL-2), Interleukin 6 (IL-6), Interleukin 10 (IL-10), Interferon γ (IFN- γ), Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF- α), Heat Shock-Protein 70 (Hsp70) oder dem Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) im Vergleich zur Inkubation mit Serum eines gesunden, nicht gegen BVD geimpften Tieres beobachtet werden. Die Expression des Toll-like Rezeptors 2 (TLR-2) war nach Inkubation mit BNP-positivem Serum signifikant niedriger als nach Inkubation mit Kontrollserum oder Medium ($p \leq 0,01$) (Abbildung 1).

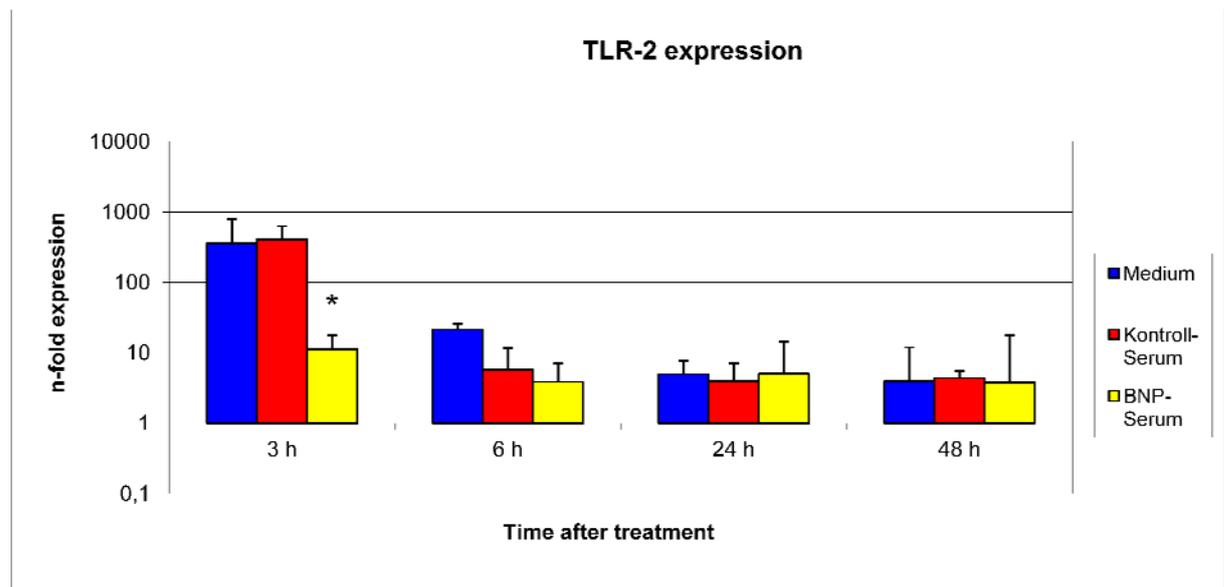


Abbildung 1: Relative Expression von TLR-2, bezogen auf den Zeitpunkt 0; n = 13.

Mittels ELISA konnte von uns gezeigt werden, dass Kälber, die später an BNP erkrankten, in ihrer ersten Lebenswoche signifikant höhere Serumspiegel von Thrombopoietin aufwiesen als gesunde Kälber vergleichbaren Alters, wohingegen bei den Muttertieren der BNP-Kälber kein Unterschied zu Kühen mit gesunden Kälbern beobachtet werden konnte ($p \leq 0,01$) (Abbildung 2).

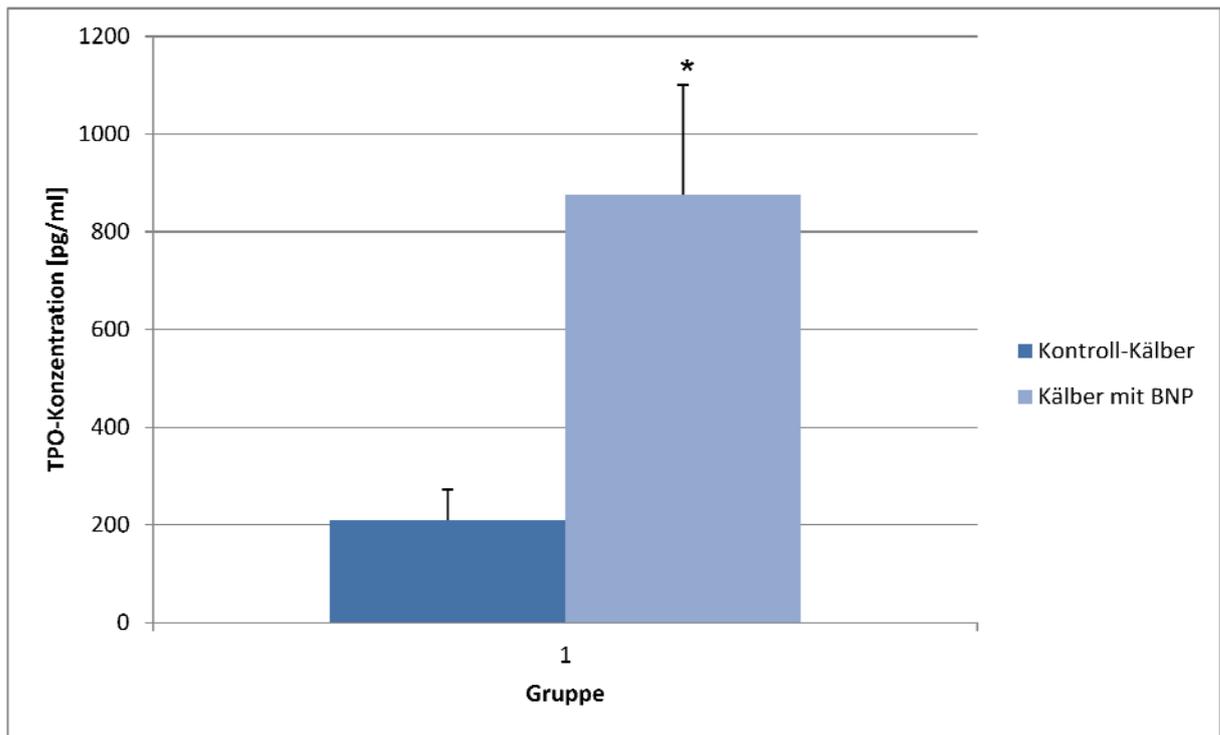


Abbildung 2: Durchschnittlicher Thrombopoietin-Gehalt im Serum von neugeborenen Kälbern, die wenig später BNP entwickelten (n = 7) und gleichaltrigen gesunden Kälbern (n = 11).

Ein BNP-ähnliches Krankheitsbild beim Menschen wird durch eine veränderte Expression oder Funktion des Thrombopoietin-Rezeptors c-Mpl verursacht, weshalb eine Sequenzierung von zwölf Abschnitten der codierenden Exone des bovinen c-Mpl durchgeführt wurde. Es konnten keine spezifischen Unterschiede im Sequenzmuster zwischen an BNP erkrankten Kälbern (n = 7; davon haben 4 Tiere überlebt), einem gesunden Kalb aus einer Kuh, die zuvor ein an BNP erkranktes Kalb hatte, gesunden vergleichbaren Kälbern (n = 3) sowie Müttern von BNP-Kälbern (n = 2) gefunden werden.

⇒ **Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse**

Aus unseren Ergebnissen können die folgenden Aussagen und prophylaktischen Maßnahmen abgeleitet werden:

1. Bei BNP handelt es sich um ein immun-vermitteltes Phänomen.
2. Es treten auch subklinische Formen der BNP auf.
3. Auch die Wahl des Bullen hat Einfluss auf das Auftreten von BNP.
4. Von Kühen, die bereits ein an BNP erkranktes Kalb hatten, sollte das Kolostrum nicht verwendet werden.

5. In Betrieben sollte möglichst auf den Einsatz von Mischkolostrum verzichtet werden, um das Krankheitsbild der BNP nicht bei anderen neugeborenen Kälbern auszulösen.
6. Im 6. Trächtigkeitsmonat sollte nicht gegen BVD geimpft werden.

4. Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen

Arbeitspaket 1.2: Epidemiologische Fall-Kontroll-Studie, Einfluss von Management-Faktoren auf die BNP-Inzidenz in zwei Milchviehbetrieben einer Agrargenossenschaft

Die für dieses Arbeitspaket geplanten Ziele wurden vollständig erreicht. Abweichend zu den im Antrag formulierten Zielen wurde statt der Fall-Kontroll-Studie allerdings eine Kohorten-Studie durchgeführt, da im Jahr 2010 BNP-Fälle in beiden von uns untersuchten Betriebsteilen auftraten und somit die Bedingungen für die Fall-Kontroll-Studie nicht mehr gegeben waren. Die Ergebnisse des hämatologischen und klinischen Monitorings wurden bereits publiziert (K. Witt et al., 2011). Eine Publikation der weiteren Ergebnisse ist in Vorbereitung.

Arbeitspaket 5.1: Nachweis eines allo-immunvermittelten Geschehens bei BNP

1. Induktion des Krankheitsbildes:

Die Induktion des Krankheitsbildes durch die Vertränkung von Kolostrum von Kühen, die bereits BNP-Kälber hatten, an neugeborene Kälber wurde wie geplant durchgeführt, um Probenmaterial für hämatologische, klinisch-chemische und immunologische Untersuchungen zu sammeln. Die im Antrag beschriebenen Immunisierungsversuche mit dem vom Markt genommenen Impfstoff PregSure (Pfizer) und dem isolierten Adjuvans wurden wegen Problemen mit der Genehmigung nicht durchgeführt.

2. Nachweis eines immun-vermittelten Geschehens:

Der Nachweis eines immun-vermittelten Geschehens bei BNP konnte von mehreren Arbeitsgruppen geführt werden; auch wir konnten zeigen, dass Serumantikörper von Kühen, die ein an BNP erkranktes Kalb hatten, an Leukozyten gesunder Kälber binden können.

3. Einfluss auf die Apoptose-Rate und der Zytokin-Ausschüttung:
Wir hatten die Vermutung, dass es bei der BNP zu einer Zerstörung der Zellen des Knochenmarks und des Blutes und dadurch über Ausschüttung von Zytokinen zu einer Fas-vermittelten Einleitung der Apoptose und entsprechend zum Zelltod kommt. Unsere in vitro-Versuche zeigten weder einen Unterschied in der Genexpression ausgewählter Zytokine und des Heat Shock-Proteins 70 noch in der Apoptoserate bei PBMC, die mit Serum eines BNP-Muttertiers oder einer gesunden und nicht gegen BVD geimpften Kuh inkubiert wurden; nur die Expression des Toll-like Rezeptors 2 (TLR-2) ist 3 h nach Inkubation mit BNP-Serum deutlich erniedrigt.
4. Serumspiegel von Thrombopoietin (TPO):
Bei Menschen konnte gezeigt werden, dass das TPO im Serum von Patienten mit CAMT stark erhöht vorliegt, aber biologisch funktional ist. Dieses konnte von uns auch bei Kälbern, die später BNP entwickelten, beobachtet werden. Die Funktionalität des Thrombopoietin wurde von uns nicht untersucht.
5. Identifizierung des Zielmoleküls:
Unser erstes vermutetes Zielmolekül war der bovine Thrombopoietin-Rezeptor (c-Mpl). Wir konnten allerdings über Sequenzierungen keine Mutationen in den untersuchten 12 Abschnitten der codierenden Exone des bovinen Thrombopoietin-Rezeptors (c-Mpl) feststellen. Erste Versuche in der Durchflusszytometrie ergaben auch keinen Anhaltspunkt auf Beteiligung des Glycoproteins IIb/IIIa (CD41/61).
6. Glykosylierung des c-Mpl:
Im Antrag formulierten wir die Alternativhypothese, dass nicht nur ein Polymorphismus in der Aminosäureabfolge, sondern auch in der Glykosylierung des Thrombopoietin-Rezeptors (c-Mpl) verantwortlich für die Immunogenität sein könnte. Die Glykosylierung wurde nicht mehr untersucht, da durch die Schwangerschaft der im Projekt eingesetzten Doktorandin ein erheblicher Zeitverzug eingetreten ist. Die für die Glykosylierungsanalysen beantragten Mittel wurden nicht abgerufen.

5. Literaturverzeichnis

Assad A, Amann B, Friedrich A, Deeg CA (2012): Immunophenotyping and characterization of BNP colostrum revealed pathogenic alloantibodies of IgG1 subclass with specificity to platelets, granulocytes and monocytes off all maturation stages. *Vet Immunol Immunopathol* 147:25.

Ballmaier M, Germeshausen M, Schulze H, Cherkaoui K, Lang S, Gaudig A, Krukemeier S, Eilers M, Strauss G, Welte K (2001): C-mpl mutations are the cause of congenital amegakaryocytic thrombocytopenia. *Blood* 97:139.

Bastian M, Holsteg M, Hanke-Robinson H, Duchow K, Cussler K (2011): Bovine Neonatal Pancytopenia: Is this alloimmune syndrome caused by vaccine-induced allereactive antibodies? *Vaccine* 29:5267.

- Blanchette VS, Johnson J, Rand M (2000): The management of alloimmune neonatal thrombocytopenia. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* 13:365.
- Bridger PS, Bauerfeind R, Wenzel L, Bauer N, Menge C, Thiel H-J, Reinacher M, Doll K (2011): Detection of colostrum-derived alloantibodies in calves with bovine neonatal pancytopenia. *Vet Immunol Immunopathol* 141:1.
- Dame C (2002): Developmental biology of thrombopoietin in the human fetus and neonate. *Acta Paediatr Suppl* 91:54.
- Dame C (2006): Thrombozytopenien des Neugeborenen. In: Gadner H, Gaedicke G, Niemeyer C, Ritter J, eds: *Pädiatrische Hämatologie und Onkologie*. Heidelberg: Springer; 290.
- Deaver JE, Leppert PC, Zaroulis CG (1986): Neonatal Alloimmune Thrombocytopenic Purpura. *Am J Perinat* 3:127.
- Deutskens F, Lamp B, Riedel CM, Wentz E, Lochnit G, Doll K, Thiel H-J, Rümenapf T (2011): Vaccine-induced antibodies linked to bovine neonatal pancytopenia (BNP) recognize cattle major histocompatibility complex class I (MHC I). *Vet Res* 42:97.
- Doll K, Wenzel L, König M, Thiel HJ, Reinacher M, Prenger-Berninghoff E, Weiß R, Moritz A, Bauer N (2009): Krankheitsverlauf bei Kälbern mit Hämorrhagischer Diathese. In: *Proceedings of the DVG-Fachtagung Buiatrik*, Berlin, Germany 2009;20.
- Foucras G, Corbière F, Tasca C, Picheraux C, Caubet C, Trumel C, Lacroux C, Franchi C, Burlet-Schiltz O, Schelcher F (2011): Alloantibodies against MHC Class I: A Novel Mechanism of Neonatal Pancytopenia Linked to Vaccination. *J Immunol* 187:6564.
- Friedrich A, Rademacher G, Weber BK, Kappe E, Carlin A, Assad A, Sauter-Louis C, Hafner-Marx A, Büttner M, Böttcher J, Klee W (2009a): Increase in the incidence of a bleeding disorder in young calves due to bone marrow damage. *Tierarzt Umschau* 64:423.
- Friedrich A, Carlin A, Assad A, Büttner M, Rademacher G, Sauter-Louis C, Klee W (2009b): Experimental production of the syndrome. In: *Proceedings of the Satellite Symposium Haemorrhagic Diathesis in Calve*, European Buiatrics Forum, Marseille, France:27.
- Friedrich A, Büttner M, Rademacher G, Klee W, Weber BK, Müller M, Carlin, A, Assad A, Hafner-Marx A, Sauter-Louis CM (2011): Ingestion of colostrum from specific cows induces Bovine Neonatal Pancytopenia (BNP) in some calves. *BMV Vet Res* 7:10.
- Germeshausen M, Ballmaier M, Welte K (2006): MPL mutations in 23 patients suffering from congenital amegakaryocytic thrombocytopenia: the type of mutation predicts the course of the disease. *Hum Mut* 27:296.
- Ihara K, Ishii E, Eguchi M, Takada H, Suminoe A, Good RA, Hara T (1999): Identification of mutations in the c-mpl gene in congenital amegakaryocytic thrombocytopenia. *Proc Natl Acad Sci* 96:3132.
- Kappe EC, Halami MY, Schade B, Alex M, Hoffmann D, Gangl A, Meyer K, Dekant W, Schwarz B-A, Johne R, Buitkamp J, Böttcher J, Müller H (2010): Bone marrow depletion with haemorrhagic diathesis in calves in Germany: Characterization of the disease and preliminary investigations on its aetiology. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 123:31.
- Kasonta R, Sauter-Louis C, Holsteg M, Duchow K, Cussler K, Bastian M (2012): Effect of the vaccination scheme on PregSure BVD induced alloreactivity and the incidence of Bovine Neonatal Pancytopenia. *Vaccine* 30:6649.
- Kaushansky K (2005): The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. *J Clin Invest* 115:3339.
- L'Abbe D, Tremblay L, Filion M, Busque L, Goldman M, Decary F, Chartrand P (1992): Alloimmunization to platelet antigen HPA-1a (PIA1) is strongly associated with both HLA-DRB3*0101 and HLA-DQB1*0201. *Hum Immunol* 34:107.
- Mateo A, Pintado CO, Perez de la Lastra J, Dusinsky R, Simon M, Naessens J, Llanes D (1996): Ruminant cluster CD41/CD61. *Vet Immunol Immunopathol* 52:251.

Metcalfe P, Watkins NA, Ouwehand WH, Kaplan C, Newman P, Kekomaki R, De Haas M, Aster R, Shibata Y, Smith J, Kiefel V, Santoso S (2003): Nomenclature of human platelet antigens. *Vox Sang* 85:240.

Mizuno NS, Perman V, Bates FW, Sautter JH, Schultze MO (1959): Life span of thrombocytes and erythrocytes in normal and thrombocytopenic calves. *Blood* 14:708.

Mueller KE, Weber CN, Meyer J, Gruber A (2009) Monitoring of health and selected parameters of blood biochemistry and haematology in neonates and their dams on a farm with bovine haemorrhagic syndrome. In: Proceedings of the Satellite Symposium Haemorrhagic Diathesis in Calve, European Buiatrics Forum, Marseille, France:18.

Nthale JM, Syfrig J, Pearson TW, Naessens J (1995): Characterization of Monoclonal-Antibodies to the Alpha(lib)Beta(3) Integrin on Bovine Platelets. *Scand J Immunol* 42:524.

Pardon B, Stuyven E, Stuyvaert S, Hostens M, Dewulf J, Goddeeris BM, Cox E, Deprez P (2011): Sera from dams of calves with bovine neonatal pancytopenia contain alloimmune antibodies directed against calf leukocytes. *Vet Immunol Immunopathol* 141:293.

Satellite Symposium Haemorrhagic Diathesis in Calves, European Buiatrics Forum, Marseille, France 2009.

Scheuer BH, Zbinden Y, Schneiter P, Tappy L, Blum JW, Hammon HM (2006): Effects of colostrum feeding and glucocorticoid administration on insulin-dependent glucose metabolism in neonatal calves. *Domest* 31:227.

Schröter P, Kuiper H, Holsteg M, Puff C, Haas L, Baumgärtner W, Ganter M, Distl O (2011): Reproduzierbarkeit der bovinen neonatalen Panzytopenie (BNP) über die Verabreichung von Kolostrum. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* 124:390.

Serrarens-Janssen VML, Semmekrot BA, Novotny VMJ, Porcelijn L, Lotgering FK, Delemarre FMC, Steegers EAP (2008): Fetal/neonatal allo-immune thrombocytopenia (FNAIT): Past, present, and future. *Obstet Gynecol Surv* 63:239.

Simon M, Dusinsky R, Horovska L, Bilka F, Hluchy S (1996): Immunohistochemical reactivity of anti-platelet monoclonal antibodies. *Vet Immunol Immunopathol* 52:377.

Stafford P, Garner SE, Rankin A, Kekomaki R, Watkins NA, Ouwehand WH (2008): A single-nucleotide polymorphism in the human ITGB3 gene is associated with the platelet-specific alloantigen Va(a) (HPA-17bw) involved in fetal maternal alloimmune thrombocytopenia. *Transfusion* 48:1432.

Vigon I, Mornon JP, Cocault L, Mitjavila MT, Tambourin P, Gisselbrecht S, Souyri M. (1992): Molecular cloning and characterization of MPL, the human homolog of the v-mpl oncogene: identification of a member of the hematopoietic growth factor receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci* 89:5640.

Warwick RM, Vaughan J, Murray N, Lubenko A, Roberts I (1994): In vitro culture of colony forming unit-megakaryocyte (CFU-MK) in fetal alloimmune thrombocytopenia. *Br J Haematol* 88:874.

Witt K, Weber CN, Meyer J, Buchheit-Renko S, Mueller KE (2011): Haematological analysis of calves with bovine neonatal pancytopenia. *Vet Rec* 169:228.

Forschungsvorhaben zur Bereitstellung wissenschaftlicher Entscheidungshilfe für das
Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV)

Ursachenermittlung bei der Bovinen Neonatalen Pancytopenie

Projektträger: Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE)

Förderkennzeichen: 2809HS025

Laufzeit: 01.09.2010 – 28.02.2013

Berichtszeitraum: 01.09.2010 – 28.02.2013

SCHLUSSBERICHT der Arbeitsgruppe Kühn

FBN Dummerstorf

Leibniz-Institut für Nutztierbiologie (FBN)
FB Molekularbiologie

Priv.-Doz. Dr. Christa Kühn
Wilhelm-Stahl-Allee 2, D-18196 Dummerstorf
Tel.: 038208-68709, Fax 038208-68702, E-mail: kuehn@fbn-dummerstorf.de

1 Ziele und Aufgabenstellung des Vorhabens

1.1 Planung und Ablauf des Vorhabens

Aufbauend auf den Vorarbeiten zum Projekt waren laut Arbeitsplan (Zeitplan S. 42 Projektantrag) im FBN Dummerstorf folgende Arbeitsschritte durchzuführen:

Herdenmonitoring / Epidemiologie: Aufgrund der Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der Bovinen Neonatalen Panzytopenie (BNP) und der Impfung mit dem BVDV-Impfstoff PregSure® wurde zunächst das Impfschema der Kühe in der Charolais x Deutsche Holstein-Kreuzungspopulation (SEGFAM) im FBN Dummerstorf näher analysiert. Die SEGFAM-Population wird unter einheitlichen Fütterungs- und Haltungsbedingungen gehalten, segregiert für das Auftreten von BNP und stellt die Basis für die im Projekt durchgeführten Untersuchungen dar. Als Voraussetzung für die weiteren Analysen zur Ermittlung der genetischen Ursachen der BNP war zunächst eine exakte Klassifizierung von Kühen hinsichtlich der Pathogenität ihres Kolostrums erforderlich. Daher wurde ein konsequentes klinisches und hämatologisches Monitoring aller im FBN Dummerstorf geborenen Kälber, die ausschließlich maternales Kolostrum erhielten, vorgenommen.

Ergänzung des Probenmaterials: Für die beim Projektpartner TiHo vorgesehene Genomweite Assoziationsstudie wurden entsprechend Arbeitspaket 3 des Forschungsschwerpunktes 2 Blut- und Milchproben von Müttern, deren Kälber nach Kolostrum-Gabe an BNP erkrankten, sowie von Müttern, deren Kälber nach Kolostrum-Gabe nicht an BNP erkrankten, im Sinne einer Case-Control-Studie zusammengestellt. Für die unter unter Arbeitspaket 2 des Forschungsschwerpunktes 5 vorgesehene Transkriptomanalyse wurden drei Gruppen an Kühen mit unterschiedlicher Pathogenität des Kolostrums zusammengestellt, von denen vor und nach einer Booster-Impfung mit PregSure® BVD, die in Kooperation mit dem Projektpartner FU Berlin stattfand, Blutproben entnommen wurden.

Zusätzlich wurden außerdem Blutproben von 11 Muttertieren aus den Transkriptomversuchsgruppen der AG Prof. Dr. Rümenapf / JLU Gießen zur Verfügung gestellt, die die Leukozytenantigene dieser Tiere auf Reaktivität mit einem BNP-Standardserum untersuchte.

Im gesamten Projektzeitraum wurden bei allen weiteren Muttertieren aus der Charolais x Deutsche Holstein-Kreuzungspopulation (SEGFAM) im FBN Dummerstorf am 28. Tag nach Abkalbung Serum-Proben entnommen sowie eine Kolostrum-Bank angelegt, um Material für etwaige zukünftige Proteomanalysen zu gewinnen.

Transkriptom-Analyse: Die unter unter Arbeitspaket 2 des Forschungsschwerpunktes 5 geplante Transkriptom-Analyse nutzte die unter den Punkten Herdenmonitoring /Epidemiologie bzw. Ergänzung des Probenmaterials gewonnenen Erkenntnisse bzw. Proben. Die Transkriptom-Analyse bestand in dem holistischen Vergleich der quantitativen und qualitativen Variation der RNA-Expression von different genetisch für BNP prädisponierten Kühen

durchgeführt. Dazu wurde entsprechend der Projektplanung ein RNAseq-Experiment mit RNA aus Blutproben vorgenommen. In Ergänzung zu den bei Projektbeantragung geplanten Arbeiten wurde der Transkriptomanalyse der Rinderblutzellen die Untersuchung des Transkriptoms der bovinen Nierenepithelzelllinie MDBK hinzugefügt, u.a. um die Komplementarität von Oberflächenantigenen zu vergleichen. Zur Absicherung aussagefähiger Ergebnisse waren abweichend von der Projektplanung sowohl eine Verlängerung der Leseweite der Transkripte als auch eine Erhöhung der Zahl der Reads pro Probe erforderlich.

Für die Arbeiten im Projektzeitraum konnte vom 01.03.2011 bis zum 30.09.2012 eine Tierärztin aus Projektmitteln beschäftigt werden, die in Zusammenarbeit mit institutseigenen Mitarbeiterinnen Arbeiten zur Probennahme, Erstellung und Überprüfung von Bibliotheken zur Next-Generation-Sequencing-Analyse sowie entsprechende Datenauswertungen durchführte.

1.2 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Seit dem Jahr 2007 wurden deutschland- und europaweit bei neugeborenen Kälbern vermehrt Fälle beobachtet, die Symptome einer hämorrhagischen Diathese zeigten (Friedrich et al., 2009). Die als Bovine Neonatale Panzytopenie (BNP) bezeichnete Erkrankung weist bei betroffenen Kälbern eine hohe Letalität auf. Eine Reproduzierbarkeit der Erkrankung konnte nachgewiesen werden, indem Kälber aus bisher nicht von BNP-betroffenen Beständen Kolostrum von Muttertieren erhielten, die zuvor mindestens ein BNP-Kalb gehabt hatten (Friedrich et al., 2011). Epidemiologische Untersuchungen zeigten einen starken Zusammenhang zwischen BNP und einer bestimmten inaktivierten BVDV (Bovine Virusdiarrhoe-Virus)-Vakzine. Alle Muttertiere betroffener Kälber waren mit dieser Vakzine geimpft worden (Friedrich et al., 2011). Andere Untersuchungen wiesen auf eine durch immunologische Reaktion ausgelöste Pathogenese hin. Unabhängige Studien zeigten, dass die inaktivierte BVDV-Vakzine die Bildung von Alloantikörpern bei Kühen induzieren kann (Bridger et al., 2011, Pardon et al., 2011), die dann über das Kolostrum auf ein empfängliches Kalb übertragen werden können. Eine Bindung von IgG1-Antikörpern an verschiedene Blutzellen wie beispielsweise an Thrombozyten oder Leukozyten konnte kürzlich nachgewiesen werden (Assad et al., 2012), was die Hypothese untermauert, dass die Antikörper-Bindung an periphere Blutzellen sowie möglicherweise auch an Stammzellen des Knochenmarks zu einer Phagozytose dieser Zellen und daraus resultierender Panzytopenie und Panmyelophthise führt. Ferner ergaben sich Hinweise für eine mögliche genetische Prädisposition für BNP. In vorherigen Untersuchungen am FBN Dummerstorf war gezeigt worden, dass eine extreme familiäre Häufung von Müttern mit klinischen BNP-Kälbern in einer F2-Vollgeschwisterfamilie innerhalb der Ressourcenpopulation SEGFAM des FBN Dummerstorf auftrat (Krappmann et al., 2011). Da neben dem Auftreten von klinischen BNP-Fällen von einer weitaus größeren Anzahl an subklinischen Fällen aus der Praxis berichtet wurde (Witt et al., 2011), ergab sich daraus zum einen

die Frage, inwieweit auch subklinische BNP-Fälle in der SEGFAM-Ressourcen-Population auftreten und ob diese Fälle ebenfalls so wie die klinischen BNP-Fälle gehäuft in der bisher von BNP-betroffenen Familie auftreten. Die zweite Zielstellung des Projektes bestand in der Untersuchung der Ursachen für die genetische Prädisposition der BNP-Mütter. Dies sollte mittels Transkriptomanalysen aus Blutproben von mit PregSure® geimpften Kühen erfolgen, deren BNP-Prädisposition im ersten Teil des Projektes noch einmal bestätigt worden war. Im Verlaufe des Projektes ergaben sich Hinweise auf möglicherweise antigen wirkende MHC-Klasse I-Allele im Impfstoffstoff (Deutskens et al., 2011), deren Ursprung in der zur Virusanzucht eingesetzten bovinen Nierenepithelzelllinie MDBK vermutet wurde. Daher bestand eine dritte, im Verlauf des Projektes zusätzlich definierte Zielstellung in einem Transkriptom-Vergleich der MDBK-Zelllinie sowie der Blutproben von Kühen verschiedener BNP-Prädisposition.

2 Material und Methoden

Die Ressourcenpopulation SEGFAM des FBN Dummerstorf bildete die Grundlage für zwei experimentelle Ansätze. Alle in diesen Versuch einbezogenen Muttertiere hatten mindestens eine Grundimmunisierung mit der unter Verdacht stehenden BVDV-Vakzine erhalten. Im ersten Versuchsansatz wurden alle neugeborenen Kälber der Ressourcenpopulation SEGFAM aus dem Rinderbestand des FBN Dummerstorf direkt nach der Geburt von den Muttertieren getrennt und erhielten innerhalb von zwei Stunden nach Geburt Kolostrum, ausschließlich von der eigenen Mutter. Die Fütterung mit Muttermilch wurde bis zum fünften Lebensstag fortgeführt, bevor auf eine Milchaustauscherdiät umgestellt wurde. Alle Kälber wurden am ersten bis fünften, siebten und vierzehnten Tag nach Geburt klinisch auf Anzeichen von BNP untersucht. Gleichzeitig wurden zu diesen Zeitpunkten Blutproben für hämatologische Untersuchungen entnommen und ausgewertet, wobei insbesondere Verläufe und Abweichungen in Thrombozyten-, Leukozyten- und Erythrozytenzahlen verfolgt wurden.

In einem zweiten Versuchsansatz wurden drei Gruppen von Muttertieren (insgesamt 11 Tiere) aus der Ressourcenpopulation des FBN Dummerstorf einer Booster-Vakzinierung mit PregSure® unterzogen. Die Gruppen der Muttertiere waren so zusammengestellt, dass sie Kühe enthielten, die a) mindestens ein klinisch erkranktes BNP-Kalb gehabt hatten und aus der von BNP stark betroffenen Familie stammten (Gruppe1), b) die ebenfalls aus der von BNP stark betroffenen Familie stammten, deren Kälber jedoch nicht klinisch oder subklinisch erkrankten sondern lediglich Blutbildveränderungen im Vergleich zu Kälbern aufwiesen, die aus einer Kontrollpopulation stammten (Gruppe 2) oder c) Kontrolltiere mit alternativer Abstammung repräsentierten, bei denen noch nie klinische oder subklinische BNP beobachtet worden war (Gruppe 3). Jeweils zum Zeitpunkt Null und vierzehn Tage nach Vakzinierung wurden Blutproben entnommen, die zur Isolierung von RNA und anschließendem Aufbau von mRNA-Bibliotheken verwendet wurden. Darüber hinaus wurden mRNA-Bibliotheken einer MDBK-Zelllinie, die von der AG Rümenapf (JLU Gießen) zur Verfügung gestellt worden

war, erstellt. Alle Bibliotheken wurden vor der eigentlichen Next-Generation-Sequenzierung durch partielle Klonierung in einen Plasmid-Vektor sowie nachfolgende Einzelklon-Sequenzierung auf ihre Struktur und Eignung für die nachfolgenden Schritte getestet. Die Next-Generation-Sequenzierläufe wurden an einem Illumina Genome Analyzer Ix in einem 2 x 61 bp paired-end-Ansatz durchgeführt. Mittels Next-Generation-Sequencing (RNAseq) wurden die Proben auf quantitative und strukturelle Expressionsunterschiede zwischen den Muttertieren untersucht. Die bioinformatischen Datenauswertungen erfolgten zunächst mit Hilfe von FastQC (www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/) sowie der Bowtie/TopHat/Cufflinks-Pipeline (Trapnell et al., 2012), wobei die Assembly UMD3.1 (Zimin et al., 2009) als bovines Referenzgenom diente. Weitere bioinformatische Analysen zur differentiellen Expression sowie Pathway-Analysen erfolgten mittels edgeR (McCarthy et al., 2012), GOseq (Young et al., 2010), DAVID (Young et al., 2009), PermutMatrix (Caraux and Pinloche, 2005) sowie IPA (Ingenuity® Systems, www.ingenuity.com).

3 Ergebnisse

3.1 Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse

Epidemiologie:

Aufgrund der Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der BNP und der Impfung mit dem BVDV-Impfstoff PregSure® wurde das Impfschema der Kühe in der SEGFAM-Resourcenpopulation näher analysiert. Nach einer initialen Bestandsimpfung mit Boosterung im März/April 2006 wurden alle weiblichen Tiere im FBN exakt im Alter von 12 und 13 Monaten mit dem Impfstoff PregSure® erstgeimpft und dann nachfolgend jeweils jährlich im Rahmen einer Bestandsimpfung. Eine Besamung der Tiere erfolgte nicht vor dem 16. Lebensmonat. Der erste Fall von BNP trat im FBN im Mai 2007 auf, 15 Monate vor der Erstimpfung gegen Bluetongue-Virus. Bei den Müttern, die an BNP erkrankte Kälber hatten, lag die letzte Impfung vor der Abkalbung zwischen 41 und 356 Tage vor dem entsprechenden Abkalbetag. Eine Häufung von BNP-Fällen in einer bestimmten Jahreszeit war im vorliegenden Datenmaterial nicht nachweisbar. Ebenso konnte kein bei allen BNP-Müttern übereinstimmend vorliegendes Impfdatum nachgewiesen werden, da z.B. das erste BNP-Kalb bereits vor der Geburt der jüngsten Mutter mit einem BNP-Kalb geboren wurde.

Genetische BNP-Prädisposition:

Die Hypothese einer genetischen Prädisposition für klinische bovine neonatale Panzytopenie (BNP) konnte bestätigt und die genetische Prädisposition auch für das Auftreten der subklinischen BNP nachgewiesen werden. Die Ergebnisse des Herdenmonitorings aller neugeborenen Kälber im SEGFAM-Bestand des FBN Dummerstorf zeigten, dass von 48 klinisch und hämatologisch untersuchten Kälbern im Projektzeitraum nur ein Kalb eine subklinische BNP entwickelte. Dieses Kalb stammte ebenfalls aus der von BNP betroffenen Familie. Weiterhin

entwickelten während des Beprobungszeitraumes zwei Kälber, die ebenfalls aus der von BNP betroffenen Familie abstammten, eine klinische BNP. Darüber hinaus führte in dieser Familie mit nachgewiesener genetischer Prädisposition die Aufnahme von maternalem Kolostrum auch bei klinisch unauffälligen Nachkommen von Nicht-BNP-Müttern zu hämatologischen Veränderungen im Vergleich zu Tieren aller anderen Familien. Innerhalb der genetisch prädisponierten Familie löst offensichtlich das Kolostrum aller Mütter Blutbildveränderungen bei den Nachkommen aus. Allerdings hat das Kolostrum unterschiedlich pathogenes Potential. In nicht-genetisch prädisponierten Familien löste das Kolostrum der Mütter keinerlei Blutbildveränderungen aus.

Transkriptom-Analyse:

Für die Analyse der Ursachen der unterschiedlichen genetischen Prädisposition der Kühe hinsichtlich BNP wurde eine Transkriptom-Analyse mittels RNAseq aus Blutproben unterschiedlich prädisponierter Mütter nach Boostervakzinierung mit PregSure® BVD durchgeführt. Die Gruppen der Muttertiere waren so zusammengestellt, dass sie Kühe enthielten, die a) mindestens ein klinisch erkranktes BNP-Kalb gehabt hatten und aus der von BNP stark betroffenen Familie stammten (Gruppe1), b) die ebenfalls aus der von BNP stark betroffenen Familie stammten, deren Kälber jedoch nicht klinisch oder subklinisch erkrankten sondern lediglich Blutbildveränderungen im Vergleich zu Kälbern aufwiesen, die aus einer Kontrollpopulation stammten (Gruppe 2) oder c) Kontrolltiere mit alternativer Abstammung repräsentierten, bei denen noch nie klinische oder subklinische BNP beobachtet worden war (Gruppe 3). Vor und nach Vakzinierung wurden Blutproben entnommen, die mittels Next-Generation-Sequencing (RNAseq) auf quantitative und strukturelle Expressionsunterschiede zwischen den Muttertieren untersucht wurden.

Im Vergleich des Transkriptoms der Blutzellen vor und nach Impfung zeigte sich eine umfangreiche Immunantwort. Von besonderem Interesse ist eine hochsignifikante Aufregulation nach Impfung mit PregSure® BVD eines bislang weder beim Rind noch in anderen Säugergenomen beschriebenen Genortes. Bioinformatische Analysen ergaben einen Hinweis auf ein proteincodierendes Potential des entsprechenden Transkripts.

In Bezug auf die Impfreaktion ergab die Transkriptom-Analyse signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Die Versuchsgruppen der genetisch prädisponierten Kühe mit klinisch (Gruppe1) oder hämatologisch betroffenen (Gruppe2) Kälbern reagierten wesentlich intensiver auf die Booster-Impfung als die Kühe der Kontrollgruppe (Gruppe3), die aus Tieren ohne genetische Prädisposition bestand.

Im direkten Gruppenvergleich zeigten die Kühe mit klinisch oder hämatologisch betroffenen Kälbern signifikant weniger Transkripte eines bislang funktionell nicht charakterisierten, aber dem MHC class I partiell homologen Gens, das auch in der MDBK-Zelllinie exprimiert wird. Darüber hinaus wurde eine signifikant differentielle Expression weiterer immunrelevanter sowie bislang noch völlig unbekannter Gene nachgewiesen.

Die weitere Schlussfolgerung aus den Ergebnissen der Transkriptom-Analyse ist, dass zwar ein klassisches MHC class I Allel als allein ursächliches Antigen für die BNP ausgeschlossen

werden kann. Hingegen ergeben sich Hinweise auf eine Beteiligung eines zumindest MHC-ähnlichen Proteins sowie weiterer zurzeit noch unbekannter, nicht funktional charakterisierter Gene.

3.2 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Die im Projekt gewonnenen Informationen bestätigen die Hypothese einer genetischen Prädisposition sowohl für eine klinische wie subklinische BNP. Es gibt keine Anhaltspunkte für ein bislang unerkanntes, weit verbreitetes Auftreten subklinischer BNP.

Aus den Projektergebnissen kann weiter abgeleitet werden, dass die unterschiedliche genetische Prädisposition von Kühen zur Bildung von BNP auslösendem Kolostrum mit einer quantitativ und qualitativ unterschiedlichen Immunantwort auf die Impfung mit PregSure® in Zusammenhang steht. Im Rahmen des Projektes konnten unter anderem eine Reihe beim Rind bislang unbekannter Genorte mit differentieller Expression nachgewiesen werden. Die weitere Charakterisierung der entsprechenden Transkripte kann neue Erkenntnisse auf die je nach genetischer Prädisposition unterschiedlichen Immunreaktionen im Rahmen der Impfung mit der PregSure®-Vakzine hervorbringen. Dies ist in Hinblick auf die spezifische Zusammensetzung des Impfstoffes möglicherweise auch weit über diese BVDV-Vakzine hinaus von Bedeutung zur Vermeidung zukünftiger unerwünschter Impfreaktionen.

4 Zusammenfassung

Im Rahmen des Projektes wurden Untersuchungen zur Ermittlung der Ursachen für die Bovine Neonatale Panzytopenie (BNP) durchgeführt. Epidemiologische Untersuchungen und ein Herdenmonitoring innerhalb einer unter standardisierten Bedingungen gehaltenen Charolais x Deutsche Holstein Ressourcenpopulation belegten eine genetische Prädisposition der Kühe zur Bildung von BNP-auslösendem Kolostrum. Darüber hinaus konnte die Hypothese einer weit verbreiteten subklinischen BNP nicht bestätigt werden.

Für die weitere Identifizierung der Grundlagen der offensichtlichen genetischen Prädisposition wurde eine holistische Transkriptom-Analyse an Blutzellen von Kühen durchgeführt. Ein RNAseq-Ansatz verglich das quantitative und qualitative Transkript-Expressionsprofil von Kühen, deren Kolostrum BNP ausgelöst hatte mit dem von Kontrolltieren, bei denen weder in der eigenen Nachkommenschaft noch in der Verwandtschaft BNP aufgetreten war. In Bezug auf die Impfreaktion ergab die Transkriptom-Analyse signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Die Versuchsgruppen der genetisch prädisponierten Kühe mit klinisch oder hämatologisch von BNP betroffenen Kälbern reagierten wesentlich intensiver auf die Booster-Impfung als die Kühe der Kontrolltiere. Im direkten Gruppenvergleich zeigten die Kühe mit klinisch oder hämatologisch betroffenen Kälbern signifikant weniger Transkripte eines bislang funktionell nicht charakterisierten, aber dem MHC class I partiell homologen

Gens, das auch in der MDBK-Zelllinie exprimiert wird. Darüber hinaus wurde eine signifikant differentielle Expression weiterer immunrelevanter sowie bislang noch völlig unbekannter Gene nachgewiesen. Abweichend von der ursprünglichen Hypothese einer Kausalität eines MHC class I-Antigens konnte kein bisher beschriebenes klassisches MHC class I-Allel als ursächlich für die unterschiedliche genetische Prädisposition identifiziert werden. Die Schlussfolgerung aus den Ergebnissen ist, dass zwar ein klassisches MHC class I Allel als allein ursächliches Antigen für die BNP ausgeschlossen werden kann. Hingegen ergeben sich Hinweise auf eine Beteiligung eines zumindest MHC-ähnlichen Proteins sowie weiterer zurzeit noch unbekannter, nicht funktional charakterisierter Gene.

5 Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen; ggf. mit Hinweisen auf weiterführende Fragestellungen

Zur ersten Zielstellung des Projektes, der Prüfung der Hypothese eine genetischen Prädisposition konnte ein eindeutiges Ergebnis erzielt werden: sowohl klinische als auch subklinische BNP unterliegen einer genetischen Prädisposition. Die zweite Zielstellung des Projektes bestand in der Untersuchung der Ursachen für die genetische Prädisposition der BNP-Mütter. Hier konnte die Hypothese einer alleinigen Ursache eines aus der MDBK-Zelllinie stammenden klassischen MHC class I Allels für die Entstehung der BNP nicht bestätigt werden. Stattdessen besteht weiterer Forschungsbedarf zu den ursächlichen Mechanismen der unterschiedlichen Prädisposition. Dieser ergibt sich aus den nachgewiesenen signifikanten Unterschieden zwischen unterschiedlich für BNP prädisponierten Kühen hinsichtlich ihrer quantitativen und qualitativen Immunantwort auf die Impfung mit PregSure® mit z.T. bislang beim Rind völlig unbekanntem exprimierten Genorten.

6 Literaturverzeichnis

- Friedrich, A. et al. 2009: Gehäuftes Auftreten von hämorrhagischer Diathese infolge Knochenmarksschädigung bei jungen Kälbern. Tierärztl. Umschau 64, 423-431
- Friedrich, A. et al. 2011: Ingestion of colostrum from specific cows induces Bovine Neonatal Pancytopenia (BNP) in some calves. BMC Vet Res. 2011, 7:10
- Bridger, P.S. et al. 2011: Detection of colostrum-derived alloantibodies in calves with bovine neonatal pancytopenia. Vet. Immunol. Immunopathol. 141, 1-10
- Pardon, B. et al. 2011: Sera from dams of calves with bovine neonatal pancytopenia contain alloimmune antibodies directed against calf leukocytes. Vet. Immunol. Immunopathol. 141, 293-300
- Assad, A. et al. 2012: Immunophenotyping and characterization of BNP colostrum revealed pathogenic alloantibodies of IgG1 subclass with specificity to platelets, granulocytes and monocytes of all maturation stages. Vet. Immunol. Immunopathol. 147, 25-34
- Krappmann, K. et al. 2010: A genetic predisposition for bovine neonatal pancytopenia is not due to mutations in coagulation factor XI. Vet J. 190, 225-229

- Witt, K. et al. 2011: Haematological analysis of calves with bovine neonatal pancytopenia. Vet Rec. 169, 228
- Deutskens, F. et al., 2011: Vaccine-induced antibodies linked to bovine neonatal pancytopenia (BNP) recognize cattle major histocompatibility complex class I (MHC I). Vet. Res. 42, 97.
- Trapnell, C. et al. 2012: Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. Nature Protoc. 7, 562-578
- Zimin, A.V. et al., 2009: A whole-genome assembly of the domestic cow, Bos Taurus. Genome Biol. 10, R42
- McCarthy D.J. et al. 2012. Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation. Nucl. Acids Res. 40, 4288-4297
- Young, M.D., et al. 2010: Gene ontology analysis for RNA-seq: accounting for selection bias, Genome Biol., 11, 2, Feb 2010, R14
- Huang, D.W. et al. 2009: Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. Nature Protoc. 4, 44-57.
- Caraux G, and Pinloche S. 2005: "PermutMatrix: a graphical environment to arrange gene expression profiles in optimal linear order." Bioinformatics 21, 1280-1281.

AG Kühn, FBN Dummerstorf

Darstellung, Wertung und Anwendung der Ergebnisse für Zwecke des BMELV

6.1 Darstellung der Ergebnisse:

Epidemiologie:

Aufgrund der Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der Bovinen Neonatalen Pancytopenie (BNP) und der Impfung mit dem BVDV-Impfstoff PregSure® wurde das Impfschema der Kühe in der unter standardisierten Bedingungen gehaltenen und gefütterten SEGFAM-Ressourcenpopulation, einer Charolais x Deutsche Holstein Kreuzung am FBN Dummerstorf, näher analysiert. Nach einer initialen Bestandsimpfung mit Boosterung im März/April 2006 wurden alle weiblichen Tiere im FBN exakt im Alter von 12 und 13 Monaten mit dem Impfstoff PregSure® erstgeimpft und dann nachfolgend jeweils jährlich im Rahmen einer Bestandsimpfung. Der erste Fall von BNP trat im FBN im Mai 2007 auf, 15 Monate vor der Erstimpfung gegen Bluetongue-Virus. Bei den Müttern, die an BNP erkrankte Kälber hatten, lag die letzte Impfung vor der Abkalbung zwischen 41 und 356 Tage vor dem entsprechenden Abkalbetag. Eine Häufung von BNP-Fällen in einer bestimmten Jahreszeit war im vorliegenden Datenmaterial nicht nachweisbar. Ebenso konnte kein bei allen BNP-Müttern übereinstimmend vorliegendes Impfdatum nachgewiesen werden.

Genetische BNP-Prädisposition:

Die Hypothese einer genetischen Prädisposition für klinische BNP konnte bestätigt und die genetische Prädisposition auch für das Auftreten der subklinischen BNP nachgewiesen werden (Demasius et al., eingereicht). Die Ergebnisse des Herdenmonitorings aller neugeborenen Kälber im SEGFAM-Bestand des FBN Dummerstorf zeigten, dass von 48 klinisch und hämatologisch untersuchten Kälbern im Projektzeitraum nur ein Kalb eine subklinische BNP entwickelte. Dieses Kalb stammte aus der Familie der SEGFAM-Population, die bereits vor Projektbeginn ausschließlich von BNP betroffen gewesen war (Krappmann et al., 2010a,b). Weiterhin entwickelten zwei Kälber, die ebenfalls aus der von BNP betroffenen Familie abstammten, eine klinische BNP. Darüber hinaus führte in dieser Familie mit nachgewiesener genetischer Prädisposition die Aufnahme von maternalem Kolostrum auch bei klinisch unauffälligen Nachkommen von Nicht-BNP-Müttern zu hämatologischen Veränderungen im Vergleich zu Tieren aller anderen Familien. Innerhalb der genetisch prädisponierten Familie löst offensichtlich das Kolostrum aller Mütter Blutbildveränderungen bei den Nachkommen aus. Allerdings hat das Kolostrum unterschiedlich pathogenes Potential.

6.2 Anwendung der Ergebnisse

Die im Projekt gewonnenen Informationen bestätigen die Hypothese einer genetischen Prädisposition sowohl für eine klinische wie subklinische BNP. Aus den vorliegenden Ergebnissen kann vermutet werden, dass es sich bei der relativ zur Zahl der eingesetzten Impfdosen relativ seltenen klinischen BNP nicht um einen Sonderfall einer in der Population weit verbreiteten subklinischen BNP handelt. Es gibt keine Anhaltspunkte für ein bislang unerkanntes, weit verbreitetes Auftreten subklinischer BNP.

Die Hypothese einer alleinigen Ursache eines aus der MDBK-Zelllinie stammenden klassischen MHC class I Allels für die Entstehung der BNP konnte nicht bestätigt werden. Allerdings kann aus den Projektergebnissen abgeleitet werden, dass die unterschiedliche genetische Prädisposition von Kühen zur Bildung von BNP auslösendem Kolostrum mit einer quantitativ und qualitativ unterschiedlichen Immunantwort auf die Impfung mit PregSure® in Zusammenhang steht. Im Rahmen des Projektes konnten unter anderem eine Reihe beim Rind bislang unbekannter Genorte mit differentieller Expression nachgewiesen werden. Die weitere Charakterisierung der entsprechenden Transkripte kann neue Erkenntnisse auf die je nach genetischer Prädisposition unterschiedlichen Immunreaktionen im Rahmen der Impfung mit der PregSure®-Vakzine hervorbringen. Die Kenntnis der offensichtlich komplexen Ursachen für unterschiedliche genetische Prädisposition ist aufgrund der spezifischen Zu-

sammensetzung des Impfstoffes möglicherweise auch weit über diese BVDV-Vakzine hinaus von Bedeutung zur Vermeidung zukünftiger unerwünschter Impfreaktionen.

Literatur

Krappmann, K. et al. (2010a): A genetic predisposition for bovine neonatal pancytopenia is not due to mutations in coagulation factor XI. *Vet J.* 190, 225-229

Krappmann, K. et al., (2010b) Exclusion Of The Bovine Factor XI Gene As Genetic Background Of Bovine Neonatal Pancytopenia In Calves -.9th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Leipzig, Germany.

Demasius, W., Weikard, R.; Hadlich, F., Müller, K.E., Kühn, Ch (2013). Monitoring response to vaccination with an inactivated BVDV vaccine by RNAseq transcriptome analysis in cattle. *Journal of Dairy Science*, Volume 96, E-Supplement 1, 479-480

Demasius, W., Weikard, R., Kromik, A., Wolf, C., Müller, K. & Kühn, Ch. Bovine neonatal pancytopenia (BNP): novel insights into the incidence, epidemiological factors and a potential genetic predisposition for clinical and subclinical cases . Publikation eingereicht

Demasius, W., Weikard, R.; Hadlich, F., Müller, K.E., Kühn, Ch.: Monitoring the immune response to vaccination with an inactivated vaccine associated to bovine neonatal pancytopenia by deep sequencing transcriptome analysis in cattle. Publikation eingereicht

7 Kurzfassung

Im Rahmen des Projektes wurden Untersuchungen zur Ermittlung der Ursachen für die Bovine Neonatale Panzytopenie (BNP) durchgeführt. Epidemiologische Untersuchungen und ein Herdenmonitoring innerhalb einer unter standardisierten Bedingungen gehaltenen Charolais x Deutsche Holstein Ressourcenpopulation belegten eine genetische Prädisposition der Kühe zur Bildung von BNP-auslösendem Kolostrum. Darüber hinaus konnte die Hypothese einer weit verbreiteten subklinischen BNP nicht bestätigt werden.

Für die weitere Identifizierung der Grundlagen der offensichtlichen genetischen Prädisposition wurde eine holistische Transkriptom-Analyse an Blutzellen von Kühen durchgeführt. Ein RNAseq-Ansatz verglich das quantitative und qualitative Transkript-Expressionsprofil von Kühen, deren Kolostrum BNP ausgelöst hatte mit dem von Kontrolltieren, bei denen weder in der Nachkommenschaft noch in der Verwandtschaft BNP aufgetreten war. In Bezug auf die Impfreaktion ergab die Transkriptom-Analyse signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen.

**Forschungsvorhaben zur Bereitstellung wissenschaftlicher Entscheidungshilfe
für das Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucher-
schutz (BMELV)**

Ursachenermittlung bei der Bovinen Neonatalen Pancytopenie

Projektträger: Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE)
Förderkennzeichen: 2809HS025
Laufzeit: 01.09.2010 – 28.02.2013
Berichtszeitraum: 01.09.2010 – 28.02.2013

SCHLUSSBERICHT der Arbeitsgruppe Bauer und Moritz

Justus-Liebig-Universität Gießen, Fachbereich Veterinärmedizin

Klinikum Veterinärmedizin, Klinische Laboratoriumsdiagnostik und klini-
sche Pathophysiologie - Zentrallabor

Priv.-Doz. Dr. Natali Bauer u. Prof. Dr. A. Moritz

Frankfurter Str. 126, 35392 Gießen

Tel: 0641/99-38663, Fax: 0641/99-38609

E-Mail: natalie.bauer@vetmed.uni-giessen.de, Andreas.Moritz@vetmed.uni-giessen.de

Forschungsschwerpunkt 2: Reproduktion der Krankheit, Arbeitspaket 2: Serum-Übertragungsstudien an genetisch heterogenen Kälbern

Forschungsschwerpunkt 6: Sonstige zentrale Aufgaben

Studiendesign

Ziel der Serumübertragungsstudie war die Untersuchung der Reproduzierbarkeit der Bovinen Neonatalen Panzytopenie (BNP) mittels Serumtransfusion von einem Serumpool („Bluter-Serum“) von „Bluter-Müttern“ (Kühe, die zuvor Bluterkälber geboren hatten) und die Reaktivität hinsichtlich der zuvor getesteten Reaktivität der Leukozyten und MHC I gegenüber BNP-Serum-Alloantikörpern. Im Rahmen dieses Teilprojektes der Serumübertragungsstudie sollten Laborparameter (Hämatologie, Gerinnung, Serum Amyloid A (SAA), Fibrinogen als akute Phase Proteine sowie die Enzyme Laktatdehydrogenase (LDH) und Aspartataminotransferase (AST) als Marker des zellulären Schadens) untersucht werden. Zudem war die Reaktion des Knochenmarks von Interesse, die mittels zytologischer Untersuchung von einer verblindeten Untersucherin ausgewertet wurde. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte im Zusammenhang mit einer Kontrollgruppe, die Serum von Kühen erhielt, die keine Bluter-Kälber geboren hatten „Nicht-Bluter-Mütter“.

Entsprechend ihrer Reaktivität (positive oder negative Reaktion der Leukozyten auf Alloantikörper bzw. MCH I positiv oder negativ) erfolgte eine Zuordnung der Kälber in folgende Gruppen:

Gruppe I: Leukozyten positiv / MCH I positiv

Gruppe II: divergierende Reaktivität gegenüber Leukozyten und MCH I

Gruppe III: Leukozyten negativ / MCH I negativ

In Abhängigkeit der Zugehörigkeit in die Studien- (Kürzel „s“)- oder Kontrollgruppe (Kürzel „k“) wurden die Gruppen folgendermaßen benannt: Is, Ik; IIs, IIk; IIIs, IIIk.

Studienprotokoll und labordiagnostische Analysen

Die Testung der Reaktivität der Leukozyten erfolgte im Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig-Universität Giessen (IHIT, Ag Bauerfeind) und des Instituts für Virologie (Ag Thiel; verfügbar von Juli 2012-November 2012). Kälber, die nach November 2012 eine positive Reaktivität der Leukozyten aufwiesen, wurden der Gruppe II zugeordnet (Gruppe IIs: 0/6; Gruppe II k: 4/6).

Die Beprobung erfolgte wie in Tab. 1 beschrieben (siehe Anhang)

Die hämatologische Untersuchung wurde mittels des Hämatologiegerätes ADVIA 2120 (Siemens Diagnostics GmbH, Eschborn) mit spezies-spezifischer Softwareeinstellung für die Tierart Rind durchgeführt, wobei folgende Parameter zur Auswertung herangezogen wurden: Leukozytenzahl (WBC), Differentialblutbild, Hämatokritwert (HCT) sowie die Thrombozytenzahl (PLT).

Die Gerinnungsanalyse erfolgte automatisiert mittels des Gerinnungsanalysegerätes STA compact (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim).

Für die Messung von SAA und der Enzyme LDH und AST fand das automatische Analysegerät Pentra 400 (ABX, Horiba, Montpellier, Frankreich) Verwendung.

Statistische Analyse

Aufgrund der zum Zeitpunkt des Abschlussberichts noch geringen Fallzahlen in den Gruppen IIs und IIk wurden zur statistischen Auswertung mittels zweifaktorieller Varianzanalyse und Bonferroni post Test lediglich die Gruppen I und II herangezogen. Aus technischen Gründen (zu große Datenmenge für kommerziell erhältliche Statistikprogramme) erfolgte die Analyse nur von Daten der Messzeitpunkte 9; 15; 19; 33; 42; 20; 24; 28; 30 und 42.

Die Untersuchung potentieller Unterschiede in der Häufigkeit des Vorkommens von Makrophagen mit Zytophagie im Knochenmark bzw. des Auftretens von Zytopenien in den verschiedenen Gruppen erfolgte mittels Chi-Square Test.

Für die Auswertung der hämatologischen Parameter (Detektion von Zytopenien) wurden für den ADVIA 120 publizierte Referenzwerte zugrunde gelegt (Brun-Hansen et al. 2006). Folgende Publikationen wurden für die Auswertung der übrigen Parameter herangezogen: Fibrinogen (Knowles et al. 2000), Enzyme (Egli und Blum 1998) sowie SAA (Alsemgeest 1994).

Probanden

Insgesamt lagen zum Auswertzeitpunkt Ergebnisse von 8 Kälbern der Gruppe Is, 6 Kälbern der Gruppe Ik, 6 Kälbern der Gruppe IIs, 5 Kälbern der Gruppe Ilk sowie 2 Kälbern der Gruppe IIIs und 1 Kalb der Gruppe Ik vor.

Hämatologie

Die Transfusion von „Bluter-Serum“ führte bei den Kälbern der Gruppen Is und IIs zu einer hochsignifikanten Verminderung der Thrombozyten- und Lymphozytenzahl. Die Zahl der Thrombozyten- und Lymphozyten war signifikant niedriger in der Gruppen Is im Vergleich zu Ik; Is im Vergleich zu Ilk sowie IIs im Vergleich zu Ik. Zusätzlich war eine signifikant niedrigere Thrombozytenzahl in der Gruppe IIs im Vergleich zu Ilk nachweisbar. Es konnte ein signifikant häufigeres Auftreten einer Lymphopenie in den Studiengruppen beobachtet werden (Tabelle 2) Dagegen war kein signifikanter Effekt auf die Zahl neutrophiler Granulozyten feststellbar. Es zeigte sich jedoch ein signifikanter Gruppenunterschied bezüglich des Auftretens einer Neutropenie (Tabelle 2). In allen Gruppen war zum Ende der Studie im Vergleich zu den Anfangszeitpunkten eine signifikant höhere Monozytenzahl (Zeitpunkte 9;15; 20; 24; 30 versus Zeitpunkt 42) nachweisbar.

Insgesamt wies die Gruppe Ik einen signifikant niedrigeren Hämatokritwert als die übrigen Gruppen auf. Ein signifikanter Effekt der Transfusion von „Bluter-Serum“ war jedoch nicht nachweisbar.

Tabelle 2: Häufigkeit des Auftretens von Zytopenien in den verschiedenen Gruppen

Parameter (unterer Referenzbereich)	Gruppe Is	Gruppe Ik	Gruppe IIs	Gruppe Ilk	P-Wert
WBC ($<4,7 \times 10^9/L$)	6/8 (75%)	3/6 (50%)	4/6 (67%)	2/5 (40%)	$<0,0001$
Neu ($<1,3 \times 10^9/L$)	6/8 (75%)	3/6 (50%)	4/6 (67%)	2/5 (40%)	$<0,0001$
Lymph ($<1,9 \times 10^9/L$)	8/8 (100%)	4/6 (67%)	6/6 (100%)	3/5 (60%)	$<0,0001$
PLT ($<200 \times 10^9/L$)	5/8 (63%)	4/6 (67%)	6/6 (100%)	3/5 (60%)	0,224
HCT ($<0,23 \times L/L$)	5/8 (63%)	6/6 (100%)	5/6 (63%)	2/5 (40%)	$<0,0001$

Abkürzungen: HCT=Hämatokritwert; PLT=Thrombozytenzahl; Lymph=Lymphozyten;
Neu=neutrophile Granulozyten

Gerinnungsparameter

Die Gruppe IIk wies im Vergleich zur Gruppe Is eine signifikant längere aPTT auf, jedoch war der Unterschied insgesamt gering und klinisch nicht relevant. Ein ähnliches Resultat war für die PT feststellbar. Hier wiesen Kälber der Gruppe IIk eine signifikant längere Gerinnungszeit auf als Kälber der Gruppe Ik, jedoch war der absolute Unterschied der medianen Gerinnungszeiten zwischen den Gruppen sehr gering.

Insgesamt zeigte lediglich eines der Kälber zu einem Zeitpunkt eine hochgradige Abweichung der Gerinnungszeiten die den Referenzbereich und den Messbereich des Gerätes überschritt, was als Ausreißer gewertet wurde, da sich die Gerinnungszeiten am nächsten Messzeitpunkt wieder im Referenzbereich befanden.

Akute Phase Proteine

Das akute Phase Protein SAA blieb bei den Kälbern insgesamt in dem für Kälber beschriebenen physiologischen Bereich. Die Gruppe IIs wies jedoch im Vergleich zu der Gruppe IIk signifikant höhere SAA-Serumkonzentrationen auf.

Die Fibrinogenplasmakonzentration war in allen Gruppen zum letzten Untersuchungszeitpunkt (Zeitpunkt 42, Tabelle 1) signifikant höher als zu den Zeitpunkten 15 und 19 (Mitte und Ende der Serumtransfusion, Tabelle 1), blieb jedoch in dem für Kälber beschriebenen physiologischen Bereich.

Enzyme

Die Serumtransfusion hatte in allen Gruppen keinen signifikanten Effekt auf die LDH. In der Gruppe II konnte eine signifikant niedrigere AST in der Studiengruppe als in der Kontrollgruppe nachgewiesen werden.

Knochenmarkuntersuchungen

Die Kälber wiesen zu allen Untersuchungszeitpunkten ein aktives Knochenmark auf mit einer medianen Zellularität von 70 % Zellen zu Fettanteil. Die Zellreihen wurden überwiegend als physiologisch beurteilt, jedoch war bei den Kälbern häufig eine geringgradige Steigerung der Myelopoese feststellbar.

Zytophagie konnte in ca. 30 % der zur Untersuchung vorliegenden Knochenmarkausstriche nachgewiesen werden, jedoch war kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen feststellbar.

Klinische Schlussfolgerung und Diskussion

Die im Rahmen der Studie gewonnenen Resultate zeigen, dass die Erkrankung mittels Serumtransfusion reproduzierbar ist, jedoch mit weniger ausgeprägtem Schweregrad als das klinische Bild. Wie erste Pilotstudien vermuten lassen, scheint der Schweregrad der Erkrankung jedoch von der verwendeten Dosis des Serums abzuhängen.

Basierend auf unseren Untersuchungen sind die empfindlichste Zellpopulation die Lymphozyten und Thrombozyten. Das aktive, zellreiche Knochenmark der Kälber zu den Untersuchungszeitpunkten erklärt die nur transiente Lymphopenie und Thrombozytopenie. Die Serumtransfusion hatte keinen Effekt auf die Gerinnungsreaktion und die untersuchten Entzündungsparameter. Die Messungen der Enzyme LDH und AST ergaben keinen Hinweis auf einen vermehrten Zelluntergang (insbesondere Myozyten und Hepatozyten) in den Studiengruppen.

Die in allen Gruppen zum Ende der Studie beobachtete signifikante Anstieg von Fibrinogen und der Monozyten ist ein Hinweis auf eine subakute Entzündungsreaktion, die jedoch nicht im Zusammenhang mit der Verabreichung von „Bluter-Serum“ steht, da er in Studien- und Kontrollgruppen auftritt.

Die Untersuchungen zeigen auch, dass die vorherige Untersuchung der Reaktivität der Lymphozyten bzw auf MCH I keine Vorhersage über die Reaktion der labordiagnostischen Parameter erlauben.

Forschungsvorhaben zur Bereitstellung wissenschaftlicher Entscheidungshilfe für das Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV)

Ursachenermittlung bei der Bovinen Neonatalen Pancytopenie

Projektträger: Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE)
Förderkennzeichen: 2809HS025
Laufzeit: 01.09.2010 – 28.02.2013
Berichtszeitraum: 01.09.2010 – 28.02.2013

SCHLUSSBERICHT der Arbeitsgruppe Bauerfeind

Justus-Liebig-Universität Giessen

Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere

Prof. Dr. med.vet. Rolf Bauerfeind,
Dr. med.vet. Katharina Kerner, TÄin Monika Beyer

Frankfurter Str. 85-89, 35392 Giessen

Tel.: 0641-9938303, Fax: 0641-9938309

E-Mail: Rolf.Bauerfeind@vetmed.uni-giessen.de

1. Ziele und Aufgabenstellung des Vorhabens

1.1 Planung und Ablauf des Vorhabens

Das Teilprojekt hatte zunächst zum Ziel, Labormethoden zu entwickeln, mit denen der Alloantikörper (Allo-AK)-Gehalt in Serum- und Kolostrumproben von Rindern sowie die Allo-AK-Dekoration von Blutzellen des Rindes *ex vivo* und *in vitro* quantifiziert werden konnten. Mit diesen Methoden waren dann die Versuche vorzubereiten und zu begleiten, die von der AG Doll zur tierexperimentellen Reproduktion der BNP¹ (Serumübertragungstudien gemäß Arbeitspaket 2 im Forschungsschwerpunkt 2 des Antrags) sowie zur Allo-AK-Induktion mit der BVDV-Vakzine PregSure[®] BVD (Hyperimmunisierungsversuch gemäß Forschungsschwerpunkt 3) durchzuführen waren. Ferner dienten die Methoden dazu, Allo-AK-positive und Allo-AK-negative Serumproben zu identifizieren, die von der AG Rümenapf/Thiel zur Analyse der BVDV-Impfstoffe und der Impfstoff-induzierten Antikörper (Forschungsschwerpunkt 4) genutzt werden konnten. Zusätzlich wurden Untersuchungen zur Korrelation des Allo-AK-Gehaltes in Serumproben mit dem BVDV-Impfstatus sowie die nähere Charakterisierung der gegen die bovinen Leukozyten gerichteten Allo-AK in den Arbeitsplan aufgenommen.

Die zur Etablierung erforderlichen EDTA-Blutproben von gesunden Spenderkälbern sowie die Serum- und Kolostrumproben von Rindern aus Milchviehbetrieben mit unterschiedlichem BVDV-Status und -Impfregime wurden durch die AG Doll bereitgestellt. Die Durchflusszytometrie bildete die methodische Plattform zum Nachweis von Allo-AK in Serum- und Kolostrumproben sowie auf Kälber-Blutzellen.

Im Detail gliederten sich die Arbeiten der AG Bauerfeind in die folgenden Schritte:

1. Aufbau einer Probenbank mit bovinen Serum- und Kolostrumproben
2. Etablierung von standardisierten Arbeitsvorschriften zum Durchflusszytometrie-basierten Nachweis von Allo-AK beim Rind
3. Untersuchung der Serumproben aus verschiedenen Milchviehbetrieben mit unterschiedlichem BVDV-Status und -Impfregime
4. Vergleichende Untersuchung von Rinderkolostrum- und -serumproben auf Allo-AK
5. Vorbereitende Untersuchungen für die Hyperimmunisierungsversuche an Rindern
6. Vorbereitende und begleitende Untersuchungen bei der Serumübertragungsstudie an Kälbern
7. Charakterisierung der Allo-AK in Rinderserumproben (Immunglobulin-Klassen und -subtypen, MHC-I-Bindung, zytotoxische, apoptose- und nekroseinduzierende und zytophagozytosesteigernde Wirkung)

¹ Bovine Neonatale Panzytopenie

1.2 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Zum Zeitpunkt des Projektbeginns legten Fallberichte und epidemiologische Untersuchungen die Vermutung nahe, dass es sich bei der BNP um eine Immunerkrankung bei hierfür empfänglichen Kälbern handelt. Das auslösende Agens schienen maternale, alloreaktive Antikörper zu sein, die von den Kälbern mit dem Kolostrum oral aufgenommen werden (Friedrich et al., 2011). Da BNP-Ausbrüche eng mit dem Einsatz des BVD-Impfstoffes PregSure® BVD assoziiert sind, lag es nahe, einen kausalen Zusammenhang zwischen der Impfung und der Bildung alloreaktiver Antikörper bei geimpften Färsen und Kühen anzunehmen (Friedrich et al., 2011). Unser Arbeitsplan knüpfte insbesondere an Ergebnisse an, die wir in vorangegangenen eigenen Untersuchungen erzielt hatten. Hierbei besaßen Serumproben von sog. „BNP-Müttern“, d.h. Kühen, die ein Kalb geboren hatten, das nachfolgend an BNP erkrankt war, hochsignifikant größere Alloreaktivität als Sera von Kühen, die nicht gegen BVDV geimpft worden waren und die in vorherichtlich BNP-freien Herden standen (Bridger et al., 2011). Die Alloreaktivität war mit der Durchflusszytometrie nachweisbar und zeigte sich an der vermehrten Bindung von bovinem IgG an die Zelloberfläche von zellulären Testantigenen, bei denen es sich um Lymphozyten und Monozyten handelte, die aus dem peripheren Blut von Spenderkälbern isoliert und *in vitro* mit den fraglichen Serumproben koinkubiert worden waren. Unter Einsatz ähnlicher Methoden bestätigten andere Untersucher diese Befunde (Bastian et al., 2011; Foucras et al., 2011; Pardon et al., 2011). Außerdem war es uns möglich, Allo-AK *ex vivo* auf den Leukozyten von neugeborenen Kälbern nachzuweisen, wenn diese zuvor mit Kolostrum von BNP-Müttern getränkt worden waren und später an BNP erkrankten (Bridger et al., 2011). Ob die mit BNP-Ausbrüchen assoziierten Allo-AK auch mit anderen Zellen des Kalbes, insbesondere Thrombozyten reagieren, war Ende 2010 noch nicht bekannt. Ebenso war offen, ob die alloreaktiven Immunglobuline auch an immortalisierte Zellen boviner Zelllinien binden, was im positiven Fall den labor diagnostischen Nachweis der BNP-assoziierten Allo-AK und die Suche nach den involvierten Antigenen hätte erleichtern können.

Im Verlauf des Projektes entdeckte die AG Rümenapf/Thiel, dass sich MHC-I-Moleküle von MDBK-Zellen mit PregSure® BVD-assoziierte Allo-AK präzipitieren ließen (Deutskens et al., 2011). Deshalb erweiterten wir unseren Arbeitsplan, und versuchten die Hypothese, wonach MHC-I-Moleküle in der BNP-Pathogenese als Alloantigene maßgeblich sind („MHC-I-Hypothese“), zu prüfen. Ähnlich wie Foucras et al. (2011) unternahmen wir hierzu in unseren Testsystemen Hemmversuche mit MHC-I-spezifischen, monoklonalen Antikörpern.

Eine weitere Zielrichtung des Vorhabens betraf den molekularen oder zellulären Mechanismus, mit dem die maternalen Allo-AK bei Kälbern die dramatische BNP-Panzytopenie und -Panmyeloptose verursachen (Bauer et al., 2009; Friedrich et al., 2009, 2011). Bei der Fetalen bzw. Neonatalen Alloimmunthrombozytopenie (FAIT/NAIT) des Menschen opsonieren alloreaktive maternale Antikörper gegen das HPA-1a-Antigen die Thrombozyten des Fetus bzw. Neugeborenen, sodass diese nachfolgend von Makrophagen in Leber und Milz phagozytiert und abgebaut werden (Wiener et al, 2003). Aus der Beobachtung, dass sich auch im Knochenmark BNP-kranker Kälber aktivierte Makrophagen und Zeichen der Phago-

zytose von Erythrozyten und anderen, nicht näher spezifizierten Zellen fanden (Bauer et al. 2009, Pardon et al., 2011), ergab sich die Frage, ob die Allo-AK-vermittelte Zytophagozytose ähnlich wie bei der FAIT/NAIT auch bei der BNP von Bedeutung ist. Bastian et al. (2011) entdeckten, dass BNP-assoziierten Allo-AK *in vitro* die Zytophagozytose von bovinen Lymphoblasten durch bovine Makrophagen beschleunigen, verwendeten dazu aber nur drei sog. BNP-Sera. Außerdem untersuchten wir, ob die ausgeprägte Zelldepletion bei BNP die Folge einer direkten zytotoxischen Aktivität der aufgenommenen Allo-AK sein kann. Ein derartiger Mechanismus liegt manchen Abstoßungsreaktionen bei humanen Transplantationspatienten zugrunde, wobei gegen HLA-Antigen gerichtete, alloreaktive Antikörper des Rezipienten komplementvermittelt den Untergang von Donorzellen herbeiführen können (Roelen et al., 2012).

2. Material und Methoden

2.1 Rinderserum- und Rinderkolostrumproben

Zur Etablierung und Validierung der Methoden wurden Serumproben aus zwei PregSure® BVD-Impfbetrieben (118 bzw. 48 beprobte Rinder) und je 50 Serumproben von einem Bovilis®- und einem Bovidec®-Impfbetrieb verwendet (Betriebe A bis D). Als Kontrolle dienten je 25 Serumproben aus zwei gemäß BVD-Verordnung BVD-unverdächtigen Nicht-Impfbetrieben (Betriebe E und F).

Zusätzlich dazu wurden von Oktober 2009 bis März 2011 16 Kolostrumproben gewonnen, darunter 13 Proben aus einem PregSure® BVD-Impfbetrieb (Betrieb A) und 3 Proben aus einem BVD-unverdächtigen Betrieb (Betrieb G).

2.2 EDTA-Blutproben

Blutzellen zur Verwendung als Testantigen in den DFZM-Allo-AK-Tests wurden aus Frischblutproben von insgesamt drei männlichen Spenderkälbern im Alter zwischen 3 und 78 Lebenstagen im BVD-unverdächtigen Milchviehbetrieb E gewonnen. Zur Vorbereitung der Hyperimmunisierungsversuche und der Serumübertragungsstudie wurden EDTA-Blutproben von 60 BVDV-seronegativen Kühen in 3 hessischen Milchviehbetrieben (Betriebe H bis J) bzw. 75 neugeborenen männlichen Kälbern in 4 Betrieben in Hessen und Rheinland-Pfalz (Betriebe W bis Z; Stand 04.02.2013) untersucht.

2.3 Zelllinien

Als Testantigene in den DFZM-Allo-AK-Tests wurden Zellen der Zelllinien BL-3 (bovine Lymphomzelllinie) und MDBK (*Madin-Darby bovine kidney cells*) verwendet. Beide Linien waren dankenswerter Weise von Herrn Prof. Dr. Thiel vom Institut für Virologie der JLU Gießen zur Verfügung gestellt und dort zuvor negativ auf BVDV getestet worden.

2.4 Antikörper

Zur durchflusszytometrischen Analyse wurden die folgenden Antikörper eingesetzt: **Maus-anti-Schaf-CD41/CD61** (Clone CO.35E4; Isotyp IgG₁), **Schaf-anti-Rind-IgG** (FITC²-konjugiert), **Schaf-anti-Rind-IgG₁** (FITC-konjugiert), **Schaf-anti-Rind-IgG₂** (FITC-konjugiert), **Schaf-anti-Rind-IgM** (FITC-konjugiert), alle von Fa. AbD Serotech; **Maus-anti-Rind-CD14** (Clone CAM36A, Isotyp IgG₁) von Fa. VMRD; **Ziege-anti-Maus-IgG₁**, (APC³-konjugiert), **Ziege-anti-Maus-IgG_{2a}** (APC-konjugiert), beide Fa. Jackson Immuno Resarch; **mAK IL-A88** (Hybridoma-Überstand, anti-Rind-MHC-I) vom Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, JLU Giessen, **mAK W6/32** (Hybridoma-Überstand, anti-Mensch-HLA) vom Institut für Virologie, JLU Giessen.

2.5 Gewinnung von Blutleukozyten und Thrombozyten

Zur Isolierung der **Blutleukozyten** aus EDTA-Vollblutproben wurden die Erythrozyten mit Ammoniumchlorid-Puffer lysiert und die Leukozyten mittels wiederholter Zentrifugation und Resuspension in PBS-EDTA-Puffer aufgereinigt. **Thrombozyten** wurden aus den EDTA-Vollblutproben mittels Zentrifugation bei 150 x g gewonnen. Der thrombozytenreiche Überstand wurde mit PBS (inkl. 0,01 % NaN₃) versetzt und unmittelbar als Testantigen im DFZM-Allo_{THROMBO}-AK-Test eingesetzt.

2.6 DFZM-basierte Tests

Der Nachweis von Allo-Ak bzw. Allo-Ak-beladenen Zellen erfolgte in Tests, die technologisch auf der Durchflusszytometrie beruhen. Alle Analysen erfolgten in einem Durchflusszytometer Modell FACSCalibur™ (Fa. Becton Dickinson). Zum Nachweis der an Zellen anhaftenden Allo-AK wurden Sekundärantikörper mit FITC- oder APC-Markierung eingesetzt (siehe Abschnitt 2.4). Bei der Datenauswertung wurden zunächst Auswertefenster für die einzelnen Zellpopulationen im Vorwärts-/Seitwärtslichtstreuung-Diagramm festgelegt. Maßgebliche Messgröße für die Menge an gebundenen Allo-Ak war die mittlere relative Fluoreszenzintensität (MFI), die aus der geometrischen Mittelung der Fluoreszenzintensitäten aller im jeweiligen Auswertefenster erfassten Ereignisse („Zellen“) errechnet wurde.

DFZM-Allo-AK-Tests. Zur Bestimmung von Allo-AK-Gehalten in Serum- und Kolostrumproben wurden Leukozyten und Thrombozyten aus EDTA-Blutproben sowie BL-3- und MDBK-Zellen als Testantigene eingesetzt (DFZM-Allo_{LEUKO}⁻, DFZM-Allo_{THROMBO}⁻, DFZM-Allo_{BL-3}⁻ bzw. DFZM-Allo_{MDBK}-AK-Test). Proben und Testzellen wurden in standardisierter Weise zusammen inkubiert, nach Waschen der Zellen die anhaftenden Immunglobuline mit Sekundärantikörpern dekoriert, und die Zellen nach erneutem Waschen im Durchflusszytometer vermessen. Als Grenzwerte ("Cutoffs") zur Klassifizierung von Serumproben als Allo-AK-positiv, -fraglich und -negativ wurden das 99 %- bzw. . das 95 %-Quantil derjenigen

² Fluoresceinisothiocyanat

³ Allopyocyanin

Messwerte definiert, welche die 50 Serumproben aus den o.g. Kontrollbetrieben im DFZM-Allo_{MDBK}-AK-Test erzielt hatten.

DFZM-Allo-AK-Empfänglichkeitstest. Zur Bestimmung der Allo-AK-bindenden Aktivität („Allo-AK-Affinität“) eines Rinds wurden seine Leukozyten aus peripherem Blut isoliert und in Parallelansätzen probeweise mit definierten Allo-AK-positiven und -negativen Rinderseren koinkubiert. Die Anhaftung von IgG wurde anschließend unter Verwendung von markierten Sekundärantikörpern wie oben beschrieben mit der Durchflusszytometrie geprüft.

DFZM-Allo-AK-Bindungstest. In der Serumübertragungsstudie wurde untersucht, in welchem Ausmaß Lymphozyten im peripheren Blut der Versuchskälber mit Allo-AK beladen waren. Hierzu wurden die aus EDTA-Blutproben isolierten Leukozyten unmittelbar mit markierten Anti-IgG-Sekundärantikörpern koinkubiert und anschließend im Durchflusszytometer vermessen.

DFZM-Allo-AK-Hemmungstest. MDBK-Zellen wurden in Parallelansätzen mit Allo-AK-positiven oder -negativen Rinderseren oder mit PBS präinkubiert. Anschließend wurde die verbliebene Bindungskapazität dieser Zellen für monoklonale Antikörper (mAKs) gegen bovines MHC-I (mAK IL-A88) oder menschliches HLA (mAK W6/32) bestimmt. Zum quantitativen Nachweis der gebundenen mAKs wurden APC-konjugierte Sekundärantikörper gegen Maus-IgG_{2a} verwendet. Die Vorgehensweise entsprach ansonsten derjenigen beim DFZM-Allo_{MDBK}-AK-Test (siehe oben).

2.7 Zytotoxizitätstest

Nach 48-stündiger Einwirkung von Serumproben (mit und ohne Meerschweinchen-Komplement; Fa. Siemens Healthcare) wurde die Vitalität von Testzellen mit dem modifizierten MTT-Test nach Tada et al. (1986) gemessen. Zur genaueren Bestimmung der zytotoxischen Aktivität von Serumproben wurde deren zu 50 % zytotoxische Dosis (CD₅₀/ml) mit der Endpunkt-titrationsmethode von Fröhlich et al. (2009) ermittelt.

2.8 Apoptose-/Nekrosetest

Zum Nachweis apoptotischer und nekrotischer Zellen mittels Durchflusszytometrie wurde das Annexin V-FITC Assay Kit (Fa. AbD Serotec) verwendet. Annexin V-FITC diente der Markierung apoptotischer, und Propidiumiodid (PI) der Markierung nekrotischer Zellen.

2.9 Zytophagozytostest

Als Testzellen wurden Monozyten aus Blutproben von gesunden Spenderkühen in einem hessischen Milchviehbetrieb verwendet. Die Isolierung und Herstellung von Makrophagen, erfolgten in Anlehnung an das Protokoll von Adler et al. (1994). Als Zielzellen wurden den Makrophagen BL-3-Zellen angeboten, die zuvor mit CFSE⁴ (Fa. Enzo[®] Life Sciences) angefärbt und dann mit Rinderserumproben oder mit PBS präinkubiert worden waren. In der durchflusszytometrischen Analyse der Reaktionsansätze wurden der Anteil CFSE-positiver

⁴ Carboxyfluorescein-Succinimidylester

Zellen im Makrophagen-Auswertefenster sowie die Anzahl CFSE-positiver Zellen im BL-3-Auswertefenster als Parameter von Zytophagozytose verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse

3.1.1 Probenbank mit bovinen Serum- und Kolostrumproben

Im Rahmen des Projektes wurde über die Jahre 2008 bis 2012 von der AG Doll eine Sammlung aus Serum- und Kolostrumproben von Rindern mit hinreichend gesicherter BVDV-Impf- und BNP-Historie angelegt (Probenbank). Wir verwendeten aus dieser Sammlung 316 Serum- sowie 16 Kolostrumproben von weiblichen Rindern im Alter von mindestens 2 Jahren, um die verschiedenen Allo-AK-assoziierten Diagnostika, auf die in diesem Bericht Bezug genommen wird, zu etablieren und zu validieren.

3.1.2 Arbeitsvorschriften zum Nachweis von Allo-AK bei Rindern

Mit der Zielsetzung, seine Robustheit zu steigern, wurde zunächst der **DFZM-Allo_{Leuko}-Ak-Test** verbessert, mit dem man Allo-AK in Serumproben quantifizieren kann. Die Justierung bezog sich insbesondere auf die folgenden Parameter: Präparation der Testantigen-Zellen, Reduktion unspezifischer Bindungen durch die Verwendung eines Blocking-Reagenz, Normalisierung der Messwerte auf Referenzseren, Verrechnung der Messwerte zu Allo-AK-Titern. Die Methodik wurde außerdem dahingehend weiter entwickelt, dass sich mit ihr auch die Bindungsaktivität der Allo-AK gegenüber bovinen Thrombozyten sowie MDBK- und BL-3-Zellen bestimmen ließ. Schlussendlich standen vier Varianten des Tests zur Verfügung: der **DFZM-Allo_{LEUKO}-Ak-Test** (mit getrennter Auswertung der Titer gegen Blutlymphozyten, –monozyten und –granulozyten), der **DFZM-Allo_{THROMBO}-Ak-Test**, der **DFZM-Allo_{MDBK}-Ak-Test**, und der **DFZM-Allo_{BL-3}-Ak-Test**. Ferner wurde eine Methode zur Aufarbeitung von Kolostrumproben etabliert, sodass sich auch diese Proben für die Untersuchung zugänglich wurden. Zum Nachweis von Allo-AK-beladenen Zellen wurden außerdem der sog. **DFZM-Allo-AK-Empfänglichkeitstest**, der **DFZM-Allo-AK-Bindungstest** und der **DFZM-Allo-AK-Hemmungstest** entwickelt.

Auf Anfrage sind detaillierte Arbeitsvorschriften für diese Tests beim Teilprojektleiter erhältlich.

3.1.3 Assoziation zwischen BVD-Impfstatus und Allo-AK-Gehalt in Serumproben

Mit den von uns etablierten Allo-AK-Tests wurden Serumproben von insgesamt 316 mindestens zweijährigen weiblichen Rindern in sechs hessischen Milchviehbetrieben auf Allo-AK untersucht. Bei den Betrieben handelte sich um zwei PregSure[®] BVD-Impfbetriebe, einen Bovilis[®] BVD-MD- und einen Bovidec[®]-Impfbetrieb sowie zwei BVD-unverdächtige Betriebe, in denen nicht gegen die BVD geimpft wurde (Kontrollbetriebe). Die BNP war nur in den beiden PregSure[®] BVD-Impfbetrieben aufgetreten. Unabhängig von den betrachteten Testzellen

(Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten und Thrombozyten von Spenderkalb Nr. 3, MDBK-, BL-3-Zellen), waren die Allo-AK-Titer in den beiden PregSure® BVD-Impfbetrieben im Mittel signifikant höher als in dem Bovilis® BVD-MD-Impfbetrieb und den beiden Kontrollbetrieben ($p \leq 0,001$). Mit einer Ausnahme (BL-3-Zellen, $p \leq 0,01$) traf dies auch auf den Vergleich der PregSure® BVD-Impfbetriebe mit dem Bovidec®-Impfbetrieb zu. Die höchsten Allo-AK-Titer wurden registriert, wenn Lymphozyten als Testzellen dienten. Mit Lymphozyten, Monozyten oder MDBK-Testzellen waren auch die Titer im Bovidec®-Impfbetrieb durchschnittlich signifikant höher als im Bovilis® BVD-MD-Impfbetrieb ($p \leq 0,001$).

In den beiden PregSure® BVD-Impfbetrieben waren die Allo-AK-Titer bei denjenigen Kühen, deren Kalb bzw. Kälber an BNP erkrankt war(en)(BNP-Mütter), signifikant höher als bei Kühen, deren Kälber nicht an BNP erkrankt waren (Nicht-BNP-Mütter)($p \leq 0,001$; DFZM-Allo-_{LEUKO}-Ak-Test).

Zur Evaluierung der hier vollständig neu etablierten Testvarianten mit Thrombozyten, MDBK- und BL-3-Zellen wurden die mit den verschiedenen Testzellen ermittelten Allo-AK-Titer eines Serums paarweise auf ihre Korrelation untersucht. In die Analyse gingen nur die 166 Serumproben aus den beiden PregSure® BVD-Impfbetrieben ein, da nur hier einige Proben höhere Titer erzielt hatten. Vor allem zwischen den mit Lymphozyten und Monozyten ermittelten Allo-AK-Titern bestand eine hohe Korrelation ($r = 0,95$). Die mit Thrombozyten ermittelten Allo-AK-Titer korrelierten ebenfalls gut mit denjenigen aus der Analyse von Lymphozyten oder Monozyten ($r = 0,88$ bzw. $0,82$). Nur geringfügig kleiner waren die Koeffizienten, wenn man die Ergebnisse aus dem DFZM-Allo_{BL-3}- bzw. dem DFZM-Allo_{MDBK}-Ak-Test mit denen aus dem DFZM-Allo_{LYMPHO}-Ak-Test verglich ($r = 0,82$ bzw. $0,83$).

Wegen der guten Diskriminierung zwischen den Betrieben und wegen arbeitstechnischer Vorteile bei der Präparation der Testzellen wurde in den weiteren Untersuchungen bevorzugt der DFZM-Allo_{MDBK}-Ak-Test eingesetzt.

3.1.4 Assoziation zwischen den Allo-AK-Gehalten in Serum- und Kolostrumproben

Von 13 Kühen in einem PregSure® BVD-Impfbetrieb sowie von 3 Kühen in einem Kontrollbetrieb standen neben den Serumproben auch zeitnah entnommene Kolostrumproben zur Verfügung. Die Kühe der erstgenannten Gruppe wiesen sowohl in ihren Serum- als auch in ihren Kolostrumproben im Mittel signifikant höhere Allo-AK-Titer auf als die Kontrolltiere ($p < 0,01$; DFZM-Allo_{MDBK}-Test). Mit Ausnahme einer einzigen Probe waren die Allo-AK-Titer in der Kolostrumprobe höher als in der korrespondierenden Serumprobe (im Mittel ca. 35 %).

3.1.5 Labordiagnostische Untersuchungen zur Vorbereitung der Hyperimmunsierungsversuche

Ursprünglich war in diesem Arbeitspaket vorgesehen, BVDV-seronegative, Allo-AK-negative Kühe aus drei Herden randomisiert jeweils einer von drei Kohorten zuzuordnen, in denen dann wiederholt entweder mit PregSure® BVD (Gruppe 1), Bovidec® (Gruppe 2) oder mit einem Placebo (Gruppe 2) geimpft werden sollte. Die durchgeführten serologischen Untersuchungen zeigten jedoch, dass Allo-AK bei Rindern aus Herden ohne BVDV-Impfung niemals nachweisbar waren, weshalb auf die o.g. Placebo-Gruppe aus Kostengründen verzichtet wurde. Dagegen schien es notwendig, den Einfluss der unterschiedlichen Allo-AK-Affinität der Probanden auf die möglicherweise impfinduzierte Allo-AK-Bildung näher zu untersuchen. Deswegen sollten die Rinder den Gruppen 1 und 2 nicht randomisiert, sondern gezielt zugeteilt und in beiden Gruppen jeweils zwei gleichgroße Untergruppen aus je 8 affinen und nicht-/wenig-affinen Rindern gebildet werden. Grundlage dieser Zuordnung sollte die Allo-AK-Affinität ihrer Blutlymphozyten (AG Bauerfeind) sowie die Allo-AK-Affinität der MHC-1-Moleküle ihrer Blutleukozyten (AG Rümenapf / Thiel) sein, die vorher labordiagnostisch zu bestimmen war.

Nachdem die Genehmigungsbehörde den entsprechenden Tierversuchsantrag unter Verweis auf das Erlöschen der Zulassung von PregSure® BVD negativ beschied, wurden die Arbeiten in diesem Teilprojekt eingestellt. Bis dahin waren von unserer Arbeitsgruppe die Blutleukozyten von 60 Rindern in drei hessischen Milchviehbetrieben (keine BVDV-Impfung, BVDV-unverdächtig im Sinne der BVD-Verordnung) mit dem DFZM-Allo-AK-Bindungstest auf ihre Allo-AK-bindende Aktivität getestet worden. Für 50 Rinder lagen auch schon Messergebnisse der AG Rümenapf/Thiel vor: 20 Rinder (40 %) hatten demnach in wenigstens einem Test stark und in dem anderen Test wenigstens mittelgradig positiv reagiert, 22 weitere Rinder (44 %) zeigten sich in wenigstens einem Test negativ oder nur schwach positiv und in dem anderen Test höchstens mittelgradig positiv.

3.1.6 Labordiagnostische Untersuchungen zur Vorbereitung und Begleitung der Serumübertragungsstudie

An neugeborenen männlichen Holstein-Kälbern sollte geprüft werden, ob sich die BNP durch die Verabreichung eines Serumgemischs („BNP-Serumpool“) auslösen lässt, das aus von BNP-Müttern entnommenen Blutproben hergestellt worden war. Kälber der Kontrollgruppe sollten ein Gemisch aus Seren von Nicht-BNP-Müttern („Kontroll-Serumpool“) erhalten. Der Versuchsaufbau ist im Schlussbericht der AG Doll, die in dieser Studie federführend war, näher beschrieben. Der AG Bauerfeind fielen Aufgaben bei der Herstellung der beiden Serumgemische, der Auswahl und Zuordnung der Probanden sowie beim *ex vivo*-Nachweis der verabreichten Allo-Ak zu.

Herstellung der Serumgemische. Zur Herstellung dieser Gemische wurden geeignete Rinderserumproben anhand ihrer Herkunft (BNP-Mütter bzw. Nicht-BNP-Mütter) sowie ihrer Allo-AK-Gehalte ausgewählt, unter sterilen Bedingungen gemischt und aliquotiert gelagert. Der Allo-AK-Titer des hergestellten BNP-Poolserums (ca. 15 Liter) betrug 41,6 (DFZM-

Allo_{Lympho}-AK-Test) bzw. 13,3 (DFZM-Allo_{MDBK}-AK-Test), während das Kontroll-Poolserum (ca. 6 Liter) in beiden Tests nur einen Titer von 1,0 aufwies.

Auswahl geeigneter Probanden. In Analogie zu den Vorbereitungen der Hyperimmunisierungsstudie (siehe 3.1.5) sollten die Kälber nach ihrer Allo-AK-Reaktivität in drei Gruppen mit je 12 Tieren eingeteilt werden, in denen dann je 6 Tiere Aliquots des BNP-Poolserums oder des Kontroll-Poolserums erhielten. Grundlage dieser Zuordnung sollten wieder die Ergebnisse der Voruntersuchung durch die AG Bauerfeind (DFZM-Allo-AK-Bindungstest) und die AG Rümenapf/Thiel (Allo-AK-Affinität leukozytärer MHC-I-Moleküle) sein. Bisher wurden 75 Kälber von uns geprüft, und davon 28 Kälber in die Studie aufgenommen und ausgewertet (Stand am 04.02.2013). Da Kälber mit mittel- bis hochgradiger Affinität zahlenmäßig dominierten, verteilten sich die 28 ausgewählten Probanden wie folgt: Gruppe 1 (positiv in beiden Vortests) 14 Kälber, Gruppe 2 (divergierende Befunde in beiden Vortests) 11 Kälber, Gruppe 3 (negativ in beiden Vortests) 3 Kälber. In Gruppe 2 reagierten alle 11 Kälber im DFZM-Allo-AK-Empfänglichkeitstest positiv aber negativ (7 Kälber) oder fraglich (4 Kälber) im MHC-1-Test.

Ex vivo-Nachweis der verabreichten Allo-AK. Vor, während und über 21 Tage nach der Serumübertragung wurden Blutlymphozyten der Probanden *ex vivo* wiederholt mit dem DFZM-Allo-AK-Bindungstest auf oberflächlich gebundenes IgG untersucht. Sowohl in Gruppe 1 als auch in Gruppe 2 stieg die MFI der Lymphozyten bei denjenigen Kälbern, die das BNP-Poolserum erhielten, während ersten Stunden der Serumübertragung (10. LT⁵, 8:00 Uhr bis 11. LT, 8:00 Uhr) transient an. Gegen Ende der Serumübertragung sanken die MFI-Werte wieder. Spätestens ab 48 h nach Beginn der Serumübertragung hatten sie wieder das Ausgangsniveau erreicht und differierten im Mittel nicht mehr von den Werten der Kontrollkälber ($p > 0,05$). Während der Serumübertragung waren die Werte der mit BNP-Serumpool behandelten Kälber der Gruppe 1 an den drei Messzeitpunkten 6, 12 und 24 h nach Beginn der Serumübertragung im Mittel signifikant größer als bei den mit Kontroll-Serumpool behandelten Kälbern ($p < 0,01$). In der Gruppe 2 traf dies nur auf den Messzeitpunkt nach 12 h zu.

In Gruppe 3 konnten bisher erst drei Kälber beprobt werden, weshalb sich deren Messergebnisse der statistischen Analyse derzeit noch entziehen.

⁵ Lebenstag

3.1.7 Charakterisierung der PregSure® BVD-assoziierten Allo-AK in Rinderserum-Proben

Immunglobulin-Klassen und -Subtypen

Um die Allo-AK hinsichtlich der Immunglobulinklasse bzw. des IgG-Subtyps zu klassifizieren, wurden 28 Allo-AK-positive und 32 Allo-AK-negative Serumproben ausgewählt. Unter Verwendung von Sekundärantikörpern gegen IgG, IgG₁, IgG₂ und IgM wurden diese Proben im DFZM-Allo_{MDBK}-Test auf ihren Allo-AK-Gehalt vergleichend untersucht. Dabei waren die Allo-AK-Titer der positiven Serumproben stets hochsignifikant größer als diejenigen der negativen Proben ($p < 0,001$), und zwar unabhängig davon, welcher Sekundärantikörper eingesetzt wurde. Dieser Unterschied war bei der Analyse von alloreaktivem IgG₁ am größten. Nach diesen Ergebnissen tragen auch IgG₂- und IgM-Antikörper zur Allo-AK-Aktivität eines positiven Serums bzw. Kolostrums bei. Allerdings dürften IgG₁-Allo-AK in der Pathogenese der BNP die Hauptrolle spielen, da IgG₁ der mengenmäßig vorherrschende Immunglobulinsubtyp in bovinem Kolostrum ist (Butler, 1983).

MHC-I-Bindung

Die Frage, ob die PregSure® BVD-assoziierten Allo-AK gegen MHC-I-Epitope der MDBK-Zellen gerichtet sind, wurde mit dem DFZM-Allo-AK-Hemmungstest näher untersucht. Kennzeichen der MHC-I-Bindung sollte die kompetitive Bindungsblockade von nachträglich hinzugefügten monoklonalen Antikörpern mit MHC-I-Spezifität (mAKs IL-A88 und W6/32) sein. Anders als bei Foucras et al. (2011) war bei uns allerdings kein blockierender Effekt der Allo-AK erkennbar. Die getesteten hochtitrigen Allo-AK-positiven Serumproben ($n = 6$) unterschieden sich in ihrer Wirkung im Mittel nicht von den Allo-AK-negativen Serumproben ($n = 6$; $p > 0,05$).

Zytotoxische Wirkung der Allo-AK

Allo-AK-positive und -negative Serumproben von PregSure® BVD-geimpften Kühen ($n = 51$) bzw. nicht gegen BVD geimpften Müttern aus BNP-freien Herden ($n = 30$) wurden mittels MTT-Test vergleichend auf zytotoxische Effekte gegenüber MDBK-Zellen untersucht. Im Vergleich zu den Allo-AK-negativen Proben setzten die positiven Serumproben die Vitalität der Testzellen signifikant herab ($p < 0,001$). Dieser zytotoxische Effekt trat aber nur dann ein, wenn den Reaktionsansätzen neben der Serumprobe auch Meerschweinchen-Komplement zugesetzt worden war. Unter den Allo-AK-positiven Serumproben bestand kein Unterschied, ob sie von BNP-Müttern ($n = 27$) oder Nicht-BNP-Müttern stammten ($p > 0,05$). Die Allo-AK-Titer der Serumproben waren positiv mit ihrer zytotoxischen Aktivität (gemessen in CD_{50}/ml) korreliert ($r = 0,61$ bzw. $r = 0,70$).

Induktion von Apoptose und Nekrose durch Allo-AK

Allo-AK-positive und -negative Serumproben von PregSure® BVD-geimpften Kühen ($n = 44$) bzw. nicht gegen BVD geimpften Müttern aus BNP-freien Herden ($n = 36$) wurden mit dem Apoptose-/Nekrosetest an MDBK-Zellen untersucht. Mit unserem Versuchsansatz waren

apoptoseinduzierende Effekte der Serumproben nicht nachweisbar. Unter der 72-stündigen Einwirkung der Proben stieg allerdings der Prozentsatz an nekrotischen MDBK-Zellen signifikant an ($p < 0,01$). Der Anteil nekrotischer Zellen war unter der Einwirkung der Allo-AK-positiven Serumproben signifikant größer als derjenige bei –negativen Proben ($p < 0,01$).

Zytophagozytosesteigernde Wirkung der Allo-AK

Allo-AK-positive und -negative Serumproben von PregSure® BVD-geimpften Kühen bzw. einer nicht gegen BVD geimpften Kuh aus einer BNP-freien Herde wurden mit dem Zytophagozytostest dahingehend geprüft, ob sie die Phagozytose von CSE-gefärbten BL-3-Zellen durch bovine Makrophagen *in vitro* zu steigern. Mit dem von uns entwickelten Versuchsansatz war ein solcher Effekt für die Allo-AK-positiven Serumproben auch nachweisbar, allerdings nur mit den Makrophagen einer einzigen Spenderkuh aus einer Gruppe von insgesamt drei Tieren. Nach 4-stündiger Inkubation war der zytophagozytosesteigernde Effekt der Serumproben an der gestiegenen Zahl CFSE-positiver Makrophagen ablesbar, nach 18-stündiger Inkubation an der Abnahme von CFSE-gefärbten BL-3-Zellen.

3.2 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Unsere Ergebnisse tragen zur Aufklärung der Ätiologie und Pathogenese der BNP bei. So untermauert die hier aufgezeigte Assoziation zwischen der BVD-Impfung, der Alloreaktivität von Serum- und Kolostrumproben und dem Auftreten von BNP die Hypothese, dass es sich bei dieser Erkrankung um eine neuartige Immunerkrankung handelt, die von alloreaktiven Immunglobulinen gegen exponierte Zellwandantigene boviner Zellen bei Kälbern mit entsprechender Disposition ausgelöst wird. Ursache für die Bildung derartiger Allo-AK scheint die Impfung mit PregSure® BVD zu sein. Das Spektrum der Allo-AK-Zielzellen schließt neben Lympho-, Mono- und Granulozyten auch Thrombozyten des peripheren Blutes ein.

Da PregSure® BVD-assoziierte Allo-AK auch mit Zellen der bovinen Zelllinien MDBK und BL-3 reagieren, war es möglich, standardisierte Nachweismethoden zu entwickeln, für deren Testantigene auf Frischblutproben von empfänglichen Kälber verzichtet werden konnte. Die hier entwickelten, auf der Durchflusszytometrie beruhenden Diagnostika, besitzen Modellcharakter, um auch andere Impfstoffe auf alloimmunologische Nebenwirkungen in der Zielspezies zu prüfen.

Die immunpathologischen Mechanismen, die der für die BNP charakteristischen Panzytopenie und Panmyeloptose zurunde liegen, sind noch nicht aufgeklärt. Unsere Untersuchungsergebnisse deuten sowohl auf eine direkte, komplementvermittelte Zytotoxizität alloreaktiver Immunglobuline hin als auch auf eine opsonierende Wirkung mit nachfolgender Zytophagozytose. Die widersprüchlichen Ergebnisse zur MHC-I-Affinität von alloreaktiven Rinderseren machen deutlich dass es zur zweifelsfreien Identifizierung der verantwortlichen Allo-Antigene noch weiterer Forschung bedarf.

4. Zusammenfassung

Zum Nachweis von alloreaktiven Antikörpern (Allo-AK) in Rinderblutserum und Rinderkolostrum wurden vier auf der Durchflusszytometrie basierende Tests etabliert (DFZM-Allo_{LEUKO}⁻, DFZM-Allo_{THROMBO}⁻, DFZM-Allo_{MDBK}⁻ und DFZM-Allo_{BL-3}-AK-Test). Untersuchungen an Serumproben aus PregSure[®]-BVD-Impfbetrieben ergaben die höchsten Werte, wenn Blutlymphozyten als Testantigen verwendet wurden. Die Allo-AK reagierten auch mit bovinen Thrombozyten. Die mit Lymphozyten ermittelten Allo-AK-Titer korrelierten sehr gut bzw. gut mit den an Monozyten, Thrombozyten sowie MDBK- und BL-3-Zellen gemessenen Titern ($r = 0,95$ bzw. $0,88$ bzw. $0,83$ bzw. $0,82$).

Mit jedem der genannten Tests konnten signifikant erhöhte Allo-AK-Titer in den Blutseren von Rindern in zwei PregSure[®] BVD-Impfbetrieben nachgewiesen werden, nicht aber in einem Bovilis[®] BVD-MD- und in einem Bovidec[®]-Impfbetrieb ($p \leq 0,001$). In den PregSure[®] BVD-Impfbetrieben waren die Allo-AK-Titer der BNP-Mütter signifikant höher als die Titer anderer Kühe ($p \leq 0,001$). Allo-AK waren auch in den Kolostrumproben von PregSure[®]-BVD-geimpften Kühen nachweisbar. Die Allo-AK in den Blutseren PregSure[®]-BVD-geimpfter Kühe gehörten den IgG-Subtypen IgG₁ und IgG₂ sowie der Klasse IgM an.

Für die geplante Hyperimmunisierungsversuche mit PregSure[®] BVD und mit Bovidec[®] (Leitung: AG Doll) wurden 42 geeignete Kühe anhand der Allo-AK-Affinität ihrer Blutleukozyten identifiziert und den beiden Gruppen „affin“ und „nicht/wenig affin“ zugeordnet. Da die zuständige Behörde die zur Impfung und Beprobung der Probanden erforderliche Tierversuchsgenehmigung verweigerte, mussten die Arbeiten an diesem Teilprojekt eingestellt werden.

Für die Serumübertragungsstudie (Leitung: AG Doll) wurden bisher 28 geeignete Kälber identifiziert und den drei Gruppen 1 („affin“), 3 („nicht/wenig affin“) und 2 („Kälber mit divergierenden Befunden“) zugeteilt. Vor, während und nach der Übertragung von Poolseren (von BNP-Müttern oder von Kontrollkühen) wurden die Blutlymphozyten der Probanden *ex vivo* im DFZM-Allo-AK-Bindungstest untersucht. Bei Kälbern, die BNP-Poolserum erhielten, stieg die IgG-Beladung der Blutlymphozyten kurzfristig an und war gegenüber Kälbern, die Kontroll-Poolserum bekamen, für 24 h (Gruppe 1) bzw. 12 h (Gruppe 2) signifikant erhöht ($p < 0,01$). Die erforderliche Anzahl an Probanden ($n = 12$) wurde in den Gruppen 2 und 3 noch nicht erreicht (Stand am 04.02.2013).

Untersuchungen zur Antigenspezifität der PregSure[®] BVD-assoziierten Allo-AK ergaben, dass diese nicht mit zwei monoklonalen Antikörpern (IL-A88, W6/32) um deren MHC-I-Epitope auf MDBK-Zellen konkurrierten. Nach den Ergebnissen der durchflusszytometrischen Analyse mit Annexin V-FITC und Propidiumiodid lösten die Allo-AK in den MDBK-Zellen innerhalb von 72 h Nekrose, aber nicht Apoptose aus. Im MTT-Test zeigten sich die Allo-AK bereits innerhalb von 48 h zytotoxisch, aber nur wenn den Reaktionsansätzen Meer-schweinchen-Komplement zugesetzt wurde. Diese komplementabhängige, zytotoxische Aktivität der Seren war positiv ihren Allo-AK-Titern korreliert ($r = 61$ bzw. $0,70$). Darüber hinaus förderten Allo-Ak-positive Seren *in vitro* die Zytophagozytose von BL-3-Zellen durch bovine Makrophagen aus dem peripheren Blut einer Spenderkuh.

5. Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächliche erreichten Zielen; ggf. mit Hinweisen auf weiterführende Fragestellungen

Reproduktion der Krankheit, Serumübertragungsstudie

(Arbeitspaket 2 im Forschungsschwerpunkt 2 des Antrags):

Die für unsere AG formulierten Ziele, nämlich Arbeitsprotokolle zum Nachweis von Allo-AK im Serum zu etablieren (Abschnitt A) und definierte Poolseren für die Inokulation der Versuchskälber herzustellen (Abschnitt C) wurden vollständig erreicht. Ferner sind die Auswahl geeigneter Versuchstiere (Abschnitt D) und die begleitenden labordiagnostischen Untersuchungen unserer AG (Abschnitt F) für die Gruppe 1 abgeschlossen. Da Kälber mit geringer Affinität für die BNP-assoziierten Allo-AK in der uns zugänglichen Rinderpopulation offenbar seltener vorkommen als vorausgesetzt, bereitete es Schwierigkeiten, termingerecht geeignete Probanden für die Gruppen 2 und 3 zu finden. Zur Erfüllung des Versuchsplans müssen noch Messdaten an einem Kalb in Gruppe 2 sowie 9 Kälbern in Gruppe 3 erhoben werden (Stand am 04.02.2013). Erst nach Abschluss der tierexperimentellen Untersuchungen können die klinischen und verschiedenen labordiagnostischen Befunde einer multivariaten statistischen Analyse unterzogen werden, in der auch die unterschiedliche Affinität der Kälber gegenüber Allo-AK-positiven Serumproben, wie sie in den Vortest ermittelt wurde, Berücksichtigung findet.

Nachweis von Alloantikörpern in Serum und Kolostrum, Hyperimmunisierungsversuche an BVDV-negativen Rindern (Forschungsschwerpunkt 3 des Antrags):

Gemeinsam gelang es der AG Doll, der AG Rümenapf/Thiel und uns, 42 geeignete Kühe anhand von labordiagnostischen Befunden und Betriebsdaten für die Versuche zu rekrutieren (Abschnitt A des Arbeitsplans). Leider mussten die Arbeiten danach eingestellt werden, da die zuständige Behörde die beantragte Tierversuchsgenehmigung nicht erteilte (siehe auch Abschlussbericht der AG Doll). Das Ziel, die Bildung von Allo-AK durch Verimpfung des verdächtigen PregSure® BVD-Impfstoffes unter kontrollierten Bedingungen zu modellieren, wurde deshalb nicht erreicht.

Wirkmechanismen der PregSure® BVD-assoziierten Allo-AK (Positionen 2 und 3 im Aufstockungsantrag vom 12.01.2012):

In unseren Untersuchungen offenbarten die Allo-AK-positiven Serumproben *in vitro* sowohl zytotoxische als auch opsonierende bzw. phagozytosesteigernde Eigenschaften gegenüber immortalisierten bovinen Zellen. Die Ergebnisse deuten zwar auf bestimmte pathophysiologische Prozesse in der Pathogenese der BNP hin, warfen gleichzeitig aber viele neue Fragen auf. Sie dürfen deshalb noch nicht als hinreichende Belege verstanden werden, die Panzytopenie nur als Folge einer breitgefächerten, komplementvermittelten Zytolyse und/oder der von Allo-AK initiierten Zytophagozytose zu verstehen. Zukünftige Untersuchungen müssten zunächst auf die Frage fokussieren, ob auch native Rinderzellen (insbesondere Thrombozyten) BNP-empfindlicher Kälber von den beobachtenden Wirkungen betroffen sind und ob die physiologischen Komplementkonzentrationen im Kalb dazu ausreichen, um

derartige Reaktionen *in vivo* ablaufen zu lassen. Aus Zeit- und Budgetgründen konnten diese Aspekte nicht mehr adressiert werden.

Unser Versuch, die MHC-I-Hypothese mit Hilfe des DFZM-Allo-AK-Hemmungstest zu unterstützen, gelang im Gegensatz zu Foucras et al. (2011), die mit dem mAK W6/32 ähnliche Versuche unternahmen wie wir, nicht. Leider konnte nicht mehr beleuchtet werden, ob diese Diskrepanzen methodische oder prinzipielle Ursachen hatten. Um die Bedeutung von MHC-I-Antigenen in der Pathogenese der BNP abzuklären, sind weitere Forschungsarbeiten erforderlich.

6. Literaturverzeichnis

- Adler, H., et al. (1994). Generation and functional characterization of bovine bone marrow-derived macrophages. *Vet Immunol Immunopathol* 41(3-4): 211-27.
- Barth, S., et al. (2009). *Escherichia coli* Nissle 1917 for probiotic use in piglets: evidence for intestinal colonization. *J Appl Microbiol* 107(5): 1697-710.
- Bastian, M. et al. (2011). Bovine Neonatal Pancytopenia: is this alloimmune syndrome caused by vaccine-induced alloreactive antibodies? *Vaccine* 29(32): 5267-75.
- Bauer, N., et al. (2009). Entwicklung der Blutbild- und Knochenmarksbefunde bei Kälbern mit hämorrhagischer Diathese. 2. Tagung der Deutschen Buiatrischen Gesellschaft – DVG; 13.11.2009, Berlin: Proceedings: 23-29.
- Bridger, P. S., et al. (2011). Detection of colostrum-derived alloantibodies in calves with bovine neonatal pancytopenia. *Vet Immunol Immunopathol* 141(1-2): 1-10.
- Butler, J. E. (1983). Bovine immunoglobulins: an augmented review. *Vet Immunol Immunopathol* 4: 43-152.
- Deutskens, F., et al. (2011). Vaccine-induced antibodies linked to Bovine Neonatal Pancytopenia (BNP) recognize cattle Major Histocompatibility Complex I (MHC I). *Vet Res* 42(1): 97.
- Foucras, G., et al. (2011). Alloantibodies against MHC class I: a novel mechanism of neonatal pancytopenia linked to vaccination. *J Immunol* 187(12): 6564-70.
- Friedrich, A., et al. (2009). Gehäuftes Auftreten von hämorrhagischer Diathese infolge Knochenmarkschädigung bei jungen Kälbern. *Tierärztl Umschau* 6: 423–431.
- Friedrich, A., et al. (2011). Ingestion of colostrum from specific cows induces Bovine Neonatal Pancytopenia (BNP) in some calves. *BMC Vet Res* 2011: 7-10.
- Fröhlich, J., et al. (2009). Maternally and naturally acquired antibodies to Shiga toxins in a cohort of calves shedding Shiga-toxigenic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 75(11): 3695-3704.
- Pardon, B., et al. (2011). Sera from dams of calves with bovine neonatal pancytopenia contain alloimmune antibodies directed against calf leukocytes. *Vet Immunol Immunopathol*. 141(3-4): 293-300.
- Roelen, D.L., et al. (2012). Detection and clinical relevance of donor specific HLA antibodies: a matter of debate. *Transplant International* 25: 604–610.
- Wiener, E., et al. (2003). Anti-HPA-1a-mediated platelet phagocytosis by monocytes in vitro and its inhibition by Fc gamma receptor (FcgammaR) reactive reagents. *Eur J Haematol*. 70(2): 67-74.

Forschungsvorhaben zur Bereitstellung wissenschaftlicher Entscheidungshilfe für das
Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV)

Ursachenermittlung bei der Bovinen Neonatalen Pancytopenie

Projektträger: Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE)
Förderkennzeichen: 2809HS025
Laufzeit: 01.09.2010 – 28.02.2013
Berichtszeitraum: 01.09.2010 – 28.02.2013

SCHLUSSBERICHT der Arbeitsgruppe Doll

Klinik für Wiederkäuer
Justus-Liebig-Universität Gießen
Prof. Dr. Klaus Doll
Frankfurter Str. 110, 35392 Gießen
Tel. 0641-9938670, Fax 0641-9938679
E-Mail: Klaus.Doll@vermed.uni-giessen.de

1. Ziele und Aufgabenstellung des Vorhabens

Im Rahmen dieses Forschungsvorhabens war die Arbeitsgruppe an der Bearbeitung der folgenden beiden Schwerpunkte beteiligt:

A) Reproduktion der Bovinen Neonatalen Pancytopenie durch Transfusion des Serums von „Bluter-Müttern“ (Forschungsschwerpunkt 2, Arbeitspaket 2).

Dabei sollten folgende Fragestellungen beantwortet werden:

- Welche interindividuellen Unterschiede bestehen bezüglich der Reaktion auf die Transfusion einer definierten Serummenge unter standardisierten Bedingungen im Hinblick auf die Entwicklung der hämatologischen und der Knochenmarkbefunde?
- In welchem Umfang binden die transfundierten Alloantikörper bei den jeweiligen Kälbern insgesamt an Leukozyten und Thrombozyten und speziell an deren MHC-I-Oberflächenantigene?
- Besteht eine Beziehung zwischen der vorstehend genannten Antikörperbindung und den auftretenden hämatologischen Veränderungen?

B) Hyper-Immunisierungsversuche an BVDV-seronegativen Kühen (Forschungsschwerpunkt 3)

Dabei ging es um die Beantwortung der folgenden Fragenstellungen:

- Induziert die Impfung mit der inaktivierten BVDV-Vakzine PregSure® BVD (Fa. Pfizer GmbH) die Bildung maternaler Antikörper gegen zelluläre Blut- und Knochenmarksbestandteile von Kälbern?
- Wie verhält es sich diesbezüglich mit der BVDV-Inaktivatvakzine eines anderen Herstellers (Bovidec®, Fa. Virbac Tierarzneimittel GmbH), welche als Adjuvans-Bestandteil ebenfalls Quil A enthält?

1.1 Planung und Ablauf des Vorhabens

Bereits bei Konzeption dieser Studie war bekannt, dass manche Kälber nach Aufnahme des Kolostrums bestimmter Kühe („Bluter-Mütter“) die für BNP charakteristischen Blut- und Knochenmarkveränderungen entwickeln (Bauer et al., 2009; Doll et al., 2009 u. 2010; Friedrich et al., 2009 u. 2010). Die enterale Absorption kolostraler (Allo-)Antikörper ist aber bekanntlich auf die ersten 24 Lebensstunden beschränkt. Sie ist weiterhin abhängig von der Tränkeaufnahme des Kalbes (bzw. nach zwangsweiser Verabreichung mittels Sonde vom Übertritt des Kolostrums aus dem Pansen in Labmagen und Dünndarm), und insbesondere von der Ab-

sorption der aufgenommenen Immunglobuline über den Darm. Denn bezüglich der Expression des hierfür verantwortlichen Fc-Rezeptors bestehen erhebliche interindividuelle Unterschiede (Laegreid et al., 2003).

Im Rahmen dieses Forschungsvorhabens sollte deshalb zum einen geprüft werden, ob sich dieses Krankheitsbild bei jungen Kälbern durch Serumübertragung induzieren lässt. Ein darauf basierendes standardisiertes Modell hätte gegenüber der Kolostrumverabreichung den Vorteil, unabhängig vom Alter der Probanden pro Zeiteinheit jeweils eine genau definierte Menge an Alloantikörper zuführen zu können, um die hieraus resultierenden Auswirkungen auf verschiedene Zellpopulationen zu erfassen.

Zur Überprüfung der sich aus epidemiologischen Beobachtungen ergebenden Hypothese, dass eine Beziehung bestehen könnte zwischen dem Auftreten der BNP und der vorausgegangenen Impfung der Muttertiere mit einer inaktivierten BVD-Vakzine (PregSure® BVD, Fa. Pfizer; Bell et al., 2009a; Friedrich et al., 2009b), sollten des Weiteren entsprechende Hyperimmunisierungsversuche mit dieser Vakzine im Vergleich gegen einen anderen inaktivierten BVD-Impfstoff sowie gegen Plazebo durchgeführt werden.

1.2 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Ausgangshypothese war, dass dieser Krankheit ein immunpathologisches Geschehen zugrundeliegen könnte (Doll et al., 2009, 2010; Friedrich et al., 2009, 2010), doch war zu Projektbeginn noch nicht bekannt, weshalb manche Kühe offensichtlich solche, gegen bestimmte Blut- und Knochenmarkszellen des Kalbes gerichtete Antikörper bilden. Epidemiologische Hinweise deuteten für einen möglichen Zusammenhang mit der vorherigen Impfung der „Bluter-Mütter“ mit einer BVDV-Inaktivatvakzine (PregSure® BVD, Fa. Pfizer). Diese These war allerdings nicht unumstritten, zumal eine andere Forschergruppe Porzines Circovirus Typ 2 (PCV-2) in erkrankten Kälber – aber auch bei einigen Kontrollkälbern - nachgewiesen hatte (Kappe et al., 2010).

2. Material und Methoden

A) Serum-Transfusionsstudien

Zunächst wurde im Rahmen einer Pilotstudie eine geeignete Methode der Serum-Transfusion entwickelt. Dabei konnten Transfusionszwischenfälle durch Verdünnung des Serums mit 0,9%iger NaCl (50 ml Serum auf 1000 ml Infusionslösung) und gleichmäßige Zufuhr mittels Infusionspumpe über 24 Stunden weitgehend verhindert werden. Diese ersten Versuche wurden mit dem Serum einer Bluter-Mutter durchgeführt, deren Zwillingssäbber nach Kolostrumaufnahme bereits innerhalb der ersten 24 Lebensstunden eine dramatische Thrombozytopenie und Leukopenie entwickelt hatten. Beide Kälber waren nach drei bzw. fünf Tagen an BNP verendet. Nachdem sich durch Transfusion dieses Serums in einer Dosis von 60 ml / 100 kg) bei einem acht Wochen alten Versuchskalb eine massive, innerhalb von drei Tagen

jedoch wieder reversible Thrombozytopenie induzieren ließ (Minimum 38 G/l, bei einem Leukozytenwert von 3,5 G/l), wurde die Serumdosis für die Hauptversuche auf 100 ml / 50 kg KM festgelegt.

In Vorbereitung dieser Studie wurde Serum von 22 Bluter-Müttern bei – 80°C tiefgefroren asserviert. Das Serum der acht Kühe mit dem höchsten Alloantikörper-Gehalt (bestimmt durch die AG Bauerfeind) wurde schließlich gepoolt und in Aliquots von ca. 60 ml in verschlossenen Glasflaschen eingefroren. Für die Kontrollkälber stand das gepoolte Serum von fünf nicht gegen BVDV geimpften Kühen zur Verfügung, deren Kälber sich in den ersten drei Lebenswochen bei regelmäßigen Kontrollen als hämatologisch unauffällig erwiesen hatten.

Übersicht 1: über die Zusammensetzung der Serumpools

Zusammensetzung	BNP-Serum	Kontrollserum	Differenz
IgG-Gehalt (mg/ml)	28,5	25,6	+ 2,9
BVDV-AK (logND ₅₀)**	4,3	≤ 0,2	
Allo-AK-Gehalt***	41,6	1	+40,6

* ELISA, Lehrstuhl für Tierschutz, Verhaltenskunde, Tierhygiene u. Tierhaltung der LMU München (Prof. Dr. M. Erhard)

** Serumneutralisationstest, AG Rümenapf u. Thiel

*** Durchflusszytometrie unter Verwendung der Lymphozyten eines Spenderkalbes, AG Bauerfeind

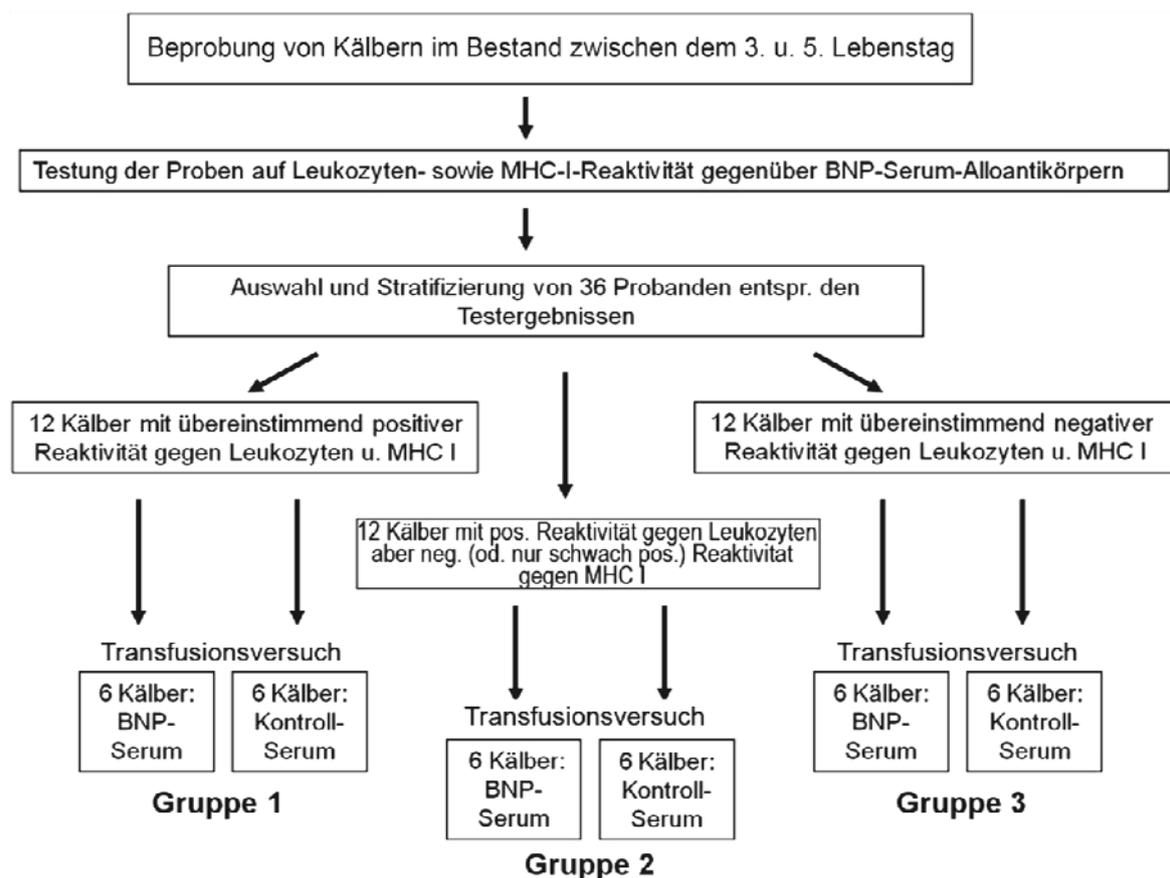
In nachfolgenden Untersuchungen zeigte es sich jedoch, dass durch Transfusion des gepoolten BNP-Serums in der vorgesehenen Dosis von 100 ml / 50 kg KM nur eine geringgradige Leukopenie induziert wurde, und dies auch nur bei zwei von fünf Kälbern. Ähnliches galt auch bei Verdopplung dieser Dosis auf 200 ml / 50 kg KM BNP-Serum. Aus diesem Grunde wurde die eigentliche Studie mit einer nochmals erhöhten Dosis von 300 ml Serum / 50 kg KM durchgeführt.

Für den Versuch wurden in vier Milchviehbeständen insgesamt 88 männliche Holstein-Kälber (Stand 28.02.2013) zwischen dem 3. und 5. Lebenstag beprobt und ihre Blutzellen im DFZM-Allo-AK-Bindungstest auf ihre Alloantikörper-Reaktivität getestet (AG Bauerfeind). Ein Teil der Proben wurde darüber hinaus von der AG Rümenapf / Thiel auf Allo-AK-Affinität leukozytärer MHC-I-Moleküle untersucht.

Von den 88 derart vorgetesteten Kälbern reagierten 73 (entspr. 83 %) im DFZM-Allo-AK-Bindungstest positiv und 15 (17 %) negativ. Von den 34 auf Allo-AK-Affinität leukozytärer MHC-I-Moleküle getesteten Kälbern erwiesen sich 24 (71 %) als positiv und 10 (29 %) als negativ, darunter 7 Kälber mit positiver Allo-AK-Reaktivität.

Die in die Studie einbezogenen Kälber wurden am 7. Lebenstag in die Klinik verbracht und gemäß ihrer Alloantikörper- bzw. MHC-I-Reaktivität den einzelnen Gruppen zugeordnet (Übersicht 2). Allerdings konnten aus personaltechnischen Gründen nicht ausreichend viele Kälber bezüglich ihrer MHC-I-Reaktivität getestet werden, so dass von dieser Kategorie nur 9 Probanden in Gruppe 2 einbezogen werden konnten. Nachdem es sich aber gezeigt hatte, dass diese bezüglich MHC-I-Reaktivität negativ getesteten Kälber nach Transfusion von BNP-Serum die gleichen hämatologischen Veränderungen entwickelten wie die im DFZM-Allo-AK-Bindungstest positiven Tiere, wurde diese Gruppe 2 nachfolgend mit Letzteren aufgefüllt. Da Kälber mit negativer Reaktivität Allo-AK-Reaktivität in der Population relativ selten vorkommen, konnten darüber hinaus von diesen der Gruppe zuzuordnenden Probanden bis Studienende nur neun Tiere aufgenommen werden (davon 6 für die Versuchsgruppe, 3 für die Kontrollgruppe).

Übersicht 2: Ablauf des Versuchsvorhabens und die Gruppenzuordnung



Die in diese Studie einbezogenen Kälber wurden vor, während und nach der Serumtransfusion zunächst in kurzen Abständen (1 - 4stündig), ab dem 2. Tag nach Serumtransfusion in Tagesabständen bzw. Zweitagesabständen beprobt. Vor sowie 48 Stunden nach Serumtransfusion und abschließend am 30. Lebenstag (hier Euthanasie und Sektion) wurde zusätzlich eine Knochenmarksbiopsie durchgeführt (an Femur od. Humerus). Die entnomme-

nen Proben wurden zur weiteren Untersuchung an andere Arbeitsgruppen weitergeleitet (AG Bauerfeind: Allo-AK-Bindung; AG Moritz / Bauer: Knochenmarkszytologie, Hämatologie u. klinische Chemie; AG Reinacher: pathologische Untersuchung, Immunhistologie). Dieses Tierversuchsvorhaben wurde vom Regierungspräsidium Gießen genehmigt (Geschäftszeichen GI 18/15-Nr.35/2012).

B) Hyperimmunisierungsversuche

Zum Vorbereitung dieser Studie wurden zunächst umfangreiche Untersuchungen in drei Milchviehbeständen durchgeführt, in denen zuvor nicht gegen BVDV geimpft worden war. Insgesamt wurden 60 Kühe beprobt und anhand definierter Kriterien kategorisiert (BNP-Alloantikörper-Reaktivität von Zelloberflächen-Antigenen; siehe hierzu Ausführungen der AG Bauerfeind). Davon wurden dann 32 Kühe ausgewählt und auf die Versuchs- (PregSure[®] BVD-Impfung) und Kontrollgruppen (Bovidec[®]-Impfung) randomisiert. Auf die zusätzliche Einbeziehung einer Placebo-Gruppe wurde verzichtet, da es sich anhand der Ergebnisse von Bestandsbeprobungen gezeigt hat, dass Rinder in nicht mit PregSure[®] BVD geimpften Herden keine oder nur marginale Alloantikörper-Titer aufweisen (siehe hierzu die Ausführungen der AG Bauerfeind).

Im Laufe der vorbereitenden Arbeiten hatte allerdings die Fa. Pfizer auf die Zulassung von PregSure[®] BVD verzichtet. Daraufhin hat die zuständige Landesbehörde im Benehmen mit dem Paul-Ehrlich-Institut die zur Durchführung solcher Feldversuche erforderliche Genehmigung nach §17 c Tierseuchengesetz versagt, so dass diese Untersuchungen nicht wie geplant durchgeführt werden konnten.

3. Ergebnisse

3.1 Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse

Nachdem nach intravenöser Transfusion von gepooltem BNP- respektive Kontrollserum zwischen Gruppe 1 (übereinstimmend positive Reaktivität gegen Leukozyten und MHC I) und Gruppe 2 (positive Reaktivität gegen Leukozyten, keine MHC I-Reaktivität) keine Unterschiede hinsichtlich der hämatologischen Befunde erkennbar waren, werden nachfolgend diese beiden Gruppen zusammen abgehandelt (Tab. 1). Die im Vergleich zu den Beiträgen der Arbeitsgruppen Bauerfeind sowie Moritz / Bauer teilweise divergierenden Fallzahlen erklären sich durch unterschiedliche Auswertungszeitpunkte im Rahmen der noch bis Ende Februar 2013 laufenden Untersuchungen.

Tabelle 1: Hämatologische Werte in den Versuchs- und Kontrollgruppen am Ende der 24-stündigen Serumtransfusion

Gruppe		n	Leukozyten (G / l)		Lymphozyten (G / l)		Thrombozyten (G / l)	
1 + 2	Versuchsgruppe	12	7,5 ± 3,5	p = 0,07	1,5 ± 0,6	p < 0,001	261 ± 193	p < 0,001
	Kontrollgruppe	12	10,6 ± 4,0		3,9 ± 1,1		579 ± 148	
3	Versuchsgruppe	6	8,3 ± 1,0	p = 0,9	2,6 ± 2,8	p = 0,7	285 ± 245	p < 0,05
	Kontrollgruppe	3	8,8 ± 3,9		2,8 ± 2,9		741 ± 220	

Zwischengruppenvergleiche, zweiseitig, Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test

Ergebnisse in Gruppen 1 + 2

Schon während der Serumtransfusion kam es in diesen Versuchsgruppen zu einem deutlichen Abfall der Thrombozytenzahlen, in 10/12 Fällen auf unter 300 G/l, davon in 7 Fällen auf unter 200 G/l (Min. 27 G/l). Diese transiente Thrombozytopenie hatte sich allerdings bei allen Probanden innerhalb 48 Stunden nach Transfusion wieder weitgehend normalisiert. Im Vergleich zur Kontrollgruppe war in der mit BNP-Serum transfundierten Gruppe im selben Zeitraum auch ein deutlicher Rückgang der Leukozytenzahlen zu beobachten – was insbesondere auf eine Abnahme der Lymphozyten zurückzuführen war, doch lagen nur bei 3/12 Kälbern die Werte vorübergehend unter 4,0 G/l (Min. 2,4 G/l). Auffallend war jedoch die beträchtliche interindividuelle Variation der hämatologischen Befunde trotz der standardisierten Bedingungen.

Ergebnisse in Gruppe 3

Die Kälber dieser Gruppe zeichneten sich dadurch aus, dass ihre Leukozyten in der Vortestung (AG Bauerfeind, AG Rümenapf / Thiel) keinerlei Alloantikörper-Reaktivität erkennen ließen.

Trotzdem entwickelten 4 / 6 der mit BNP-Serum transfundierten Probanden eine deutliche Thrombozytopenie (< 300 G/l); bei drei Tieren sank die Thrombozytenzahl im Laufe der Transfusion unter 200 G/l (Minimum 38 G/l). Nach Transfusion von Kontrollserum war dieser Effekt nicht zu beobachten. Innerhalb von 48 bis 72 Stunden nach Ende der Transfusion hatten sich die erniedrigten Werte aber weitgehend normalisiert. Spontanblutungen waren in dieser Versuchsgruppe nicht zu beobachten.

Im Gegensatz dazu – und auch konträr zu den Befunden in den Gruppen 1 und 2, hatte in dieser Gruppe 3 die Transfusion von BNP-Serum keine Auswirkungen auf den Leukozyten- und Lymphozytengehalt des Blutes (Tag. 1). Eine mögliche hierfür Erklärung wäre, dass die im BNP-Serum verschiedene Alloantikörper vorhanden sind, von denen die einen an Leukozyten / Lymphozyten binden, die anderen an Thrombozyten – wobei in dem Vortest die Bindung an Thrombozyten nicht geprüft wurde.

In allen Gruppen hatte die Serumtransfusion keine signifikanten Auswirkungen auf die Zahl der neutrophilen Granulozyten im Blut. Und nur bei einem Kalb (aus Gruppe 2) waren vorübergehend Blutbeimengungen im Kot festzustellen. Knochenmarksveränderungen konnten bei keinem dieser Kälber festgestellt werden (s. Ausführungen der AG Reinacher).

Am Ende dieser eigentlichen Studie wurden drei weiteren Kälber mit positiv getesteter Alloreaktivität ihrer Leukozyten eine nochmals erhöhte Dosis BNP-Serum aus dem selben Serumpool verabreicht (900 ml / 50 kg KM). Das Resultat war ein noch wesentlich deutlicherer und etwas länger anhaltender (über 4-5 Tage) Rückgang der Thrombozytenzahlen, mit der Folge einer verlängerten Blutungszeit (> 6 Minuten) und leichtgradigen Spontanblutungen. Bei einem dieser drei Kälber war auch die Leukozytenzahl vorübergehend deutlich erniedrigt (Minimum 2,6 G/l).

3.2 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Mittels des hier entwickelten Serum-Transfusionsmodells ist es möglich, unter standardisierten Bedingungen und unabhängig vom Alter der Probanden die Auswirkungen solcher Serum-Alloantikörper auf unterschiedliche Zellpopulationen zu untersuchen. Dabei können zukünftig auch gezielt bestimmte Antikörper aus dem Serum entfernt werden (etwa durch Adsorption) oder zugesetzt werden. Dies ist notwendig bei der Erforschung der in Frage kommenden Zielantigene, aber auch zur Überprüfung der funktionellen Relevanz der mittlerweile entwickelten und noch weiter zu entwickelnden In-vitro-Tests. Solchen Tests kommt insbesondere im Zusammenhang mit der Impfstoff-Entwicklung und –Zulassung erhebliche Bedeutung zu. Die Ergebnisse dieser Transfusionsstudien könnten darauf hindeuten, dass zum einen nicht allen der mittels durchflusszytometrischer oder ELISA-Methoden erfassten Alloantikörper auch eine solche zellzerstörende Wirkung zukommt. Daraus können falsche Schlüsse abgeleitet werden, etwa wenn nach Vakzinierung mit einem bestimmten Impfstoff festgestellt wird, dass alle Impflinge Alloantikörper gebildet hätten (Kasonta et al, 2013).

4. Zusammenfassung

Mittels des entwickelten Serum-Transfusionsmodells lassen sich die Wirkungen der nach Impfung mit PregSure® BVD von bestimmten Kühen gebildeten Alloantikörpern auf hämatologische Zellen und auf deren Vorläuferzellen im Knochenmark untersuchen. Den Ergebnissen zufolge besteht hierbei eine gewisse Dosis-Wirkungsbeziehung, wobei sich dieses Geschehen erst bei relativ hohen Dosen klinisch in Form erhöhter Blutungsneigung manifestiert. Die im Vergleich zu Leukozyten erhöhte Empfindlichkeit der Thrombozyten könnte darauf hindeuten, dass das Zielantigen auf unterschiedlichen Zelllinien different exprimiert wird, oder dass hierbei verschiedene zellspezifische Oberflächenantigene eine Rolle spielen. Der weiteren Aufklärung dieses Geschehens kommt insbesondere bei der zukünftigen Entwicklung und Zulassung von Impfstoffen erhebliche Bedeutung zu.

5. Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen; ggf. Hinweise zu weiterführenden Fragestellungen

Die erste Teilaufgabe – Entwicklung eines Serum-Transfusionsmodells – konnte erfolgreich realisiert werden, wobei es sich gezeigt hat, dass die aufgrund der Ergebnisse einer Pilotstudie gewählte Serumdosis nicht ausreicht, eine deutliche Knochenmarkschädigung und klinische Wirkungen zu induzieren. Versuchsweise wurde deshalb begonnen, höhere Dosen zu applizieren, doch konnten diese Studien im Rahmen dieses bisherigen Projekts nicht abgeschlossen werden. Des Weiteren sollten in nachfolgenden Studien gezielt bestimmte Alloantikörper – bzw. davon depletiertes Serum – transfundiert werden, um die funktionelle Relevanz der in Frage kommenden Zielantigenen validieren zu können.

Die als zweite Aufgabe vorgesehene Hyperimmunisierungsstudie konnte trotz der umfangreichen, zeit- und kostenaufwändigen Vorbereitungen aufgrund fehlender tierseuchenrechtlicher Genehmigung nicht durchgeführt werden. Solche Impfversuche sind aber unabdingbar, um die genaue Ursache möglicher Nebenwirkungen erforschen zu können. Dies betrifft insbesondere die Rolle von Fremdproteinen in Impfstoffen und die Auswirkungen bestimmter Adjuvantien.

6. Literaturverzeichnis

Bauer, N., L. Wenzel, A. Moritz, K. Doll (2009b): Entwicklung der Blutbild- und Knochenmarksbefunde bei Kälbern hämorrhagischer Diathese. Vortragszusammenfassungen 2. Tagung der Deutschen Buiatrischen Gesellschaft - DVG, Berlin, 23-29.

Bell CR, Scott PR, Penny CD (2009): Ten cases of „Bleeding Calf Syndrome“ in a Scottish beef herd: Epidemiology. Proceeding of the Satellite Symposium “Haemorrhagic Diathesis in Calves”. European Buiatrics Forum, Marseille, 5.

Doll, K., L. Wenzel, M. König, H.-J. Thiel, M. Reinacher, E. Prenger-Bernighoff, R. Weiß, A. Moritz, N. Bauer (2009): Krankheitsverlauf bei Kälbern mit hämorrhagischer Diathese. Vortragszusammenfassungen 2. Tagung der Deutschen Buiatrischen Gesellschaft - DVG, Berlin, 20-22.

Doll, K., L. Wenzel, M. König, H.-J. Thiel, M. Reinacher, E. Prenger-Bernighoff, R. Weiß, A. Moritz, N. Bauer (2010): Clinical, haematological and bone marrow findings in calves with haemorrhagic diathesis („Bleeding Calf Syndrome“). Proc. XIth Middle European Buiatrics Congress, Brno, 14-15.

Friedrich, A., A. Carlin, A. Assad, M. Büttner, G. Rademacher, C. Sauter-Louis, W. Klee (2009a): Experimental production of the syndrome. Proc. Satellite Symp. „Haemorrhagic Diathesis in Calves“. Europ. Buiatrics Forum, Marseille, 27.

Friedrich A, Rademacher G, Weber BK, Kappe E, Carlin A, Assad A, Sauter-Louis C, Hafner-Marx A, Büttner M, Böttcher J, Klee W (2009b): Gehäuftes Auftreten von hämorrhagischer Diathese infolge Knochenmarkschädigung bei jungen Kälbern. Tierärztl Umschau 64: 423-431.

Friedrich, A., M. Büttner, B.K. Weber, M. Müller, A. Carlin, A. Assad, D. Schumann, G. Rademacher, C. Sauter-Louis, A. hafner-Marx, W. Klee (2010): Clinical signs of Bovine Neonatal Pancytopenia (Bleeding calf syndrome) and experimental production of the disease. Proc. XIth Middle European Buiatrics Congress, Brno, 15.

Kappe, E.C., M.Y. Halami, B. Schade, M. Alex, D. Hoffmann, A. Gangl, K. Meyer, W. Dekant, B.A. Schwarz, R. Johne, J. Buitkamp, J. Böttcher, H. Müller (2010): Bone marrow depletion with haemorrhagic diathesis in calves in Germany: Characterization of the disease and preliminary investigations on its aetiology. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 123, 31-41.

Kasonta R, Sauter-Louis C, Holsteg M, Duchow K, Cussler K, Bastian M (2013): Effect of the vaccination scheme on PregSure® BVD induced alloreactivity and the incidence of Bovine Neonatal Pancytopenia. Vaccine 30, 6649-55.

Laegreid WW, Heaton MP, Keen JE, Grosse WM, Chitko-McKown CG, Smith TP, Keele JW, Bennett GL, Besser TE (2002): Association of bovine neonatal Fc receptor α -chain gene (FCGRT) haplotypes with serum IgG concentration in newborn calves. Mamm. Genome 13: 704-10.

7. Auf diesem Forschungsprojekt basierende eigene Publikationen

Deutskens F, Lamp B, Riedel CM, Wentz E, Lochnit G, Doll K, Thiel HJ, Rügenapf T. (2011): Vaccine-induced antibodies linked to Bovine Neonatal Pancytopenia (BNP) recognize cattle Major Histocompatibility Complex class I (MHC I). *Veterinary Research* 42, 97.

Doll K, Bridger PS, Schillinger S, Beyer M, Wenzel L, Francke J, Thiel HJ, Reinacher M, Bauer N, Bauerfeind R (2011): Investigations on the etiopathogenesis of Bovine Neonatal Pancytopenia (BNP). *Veterinarska Stanica*; 42, Suppl 1, 8-9.

Doll K, Wenzel L, Francke J, Reiner G, Willems H, Bauer N, Rügenapf T, Deutskens F, Thiel HJ, Reinacher M, Beyer M, Schillinger S, Bridger PS, Bauerfeind R. (2012): Bovine Neonatale Pancytopenie. *LBH: 6. Leipziger Tierärztekongress – Tagungsband 3*, 101-104.

Doll K, Wenzel L, Francke J, Reiner G, Willems H, Bauer N, Rügenapf T, Deutskens F, Thiel HJ, Reinacher M, Beyer M, Schillinger S, Bridger PS, Bauerfeind R (2013a): Bovine Neonatale Pancytopenie – Geschichte einer außergewöhnlichen Krankheit. Teil 1: Klinik, Labordiagnostik und Sektionsbefunde. *Prakt. Tierarzt* 94, 236-245.

Doll K, Wenzel L, Francke J, Reiner G, Willems H, Bauer N, Rügenapf T, Deutskens F, Thiel HJ, Reinacher M, Beyer M, Schillinger S, Bridger PS, Bauerfeind R (2013b): Bovine Neonatale Pancytopenie – Geschichte einer außergewöhnlichen Krankheit. Teil 2: Epidemiologie, Ätiopathogenese, Therapie und Prophylaxe. *Prakt. Tierarzt* 94, 436-443.

Ursachenermittlung bei der Bovinen Neonatalen Pancytopenie

Projektträger: Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE)
Förderkennzeichen: 2809HS025
Laufzeit: 01.09.2010 – 28.02.2013
Berichtszeitraum: 01.09.2010 – 28.02.2013

SCHLUSSBERICHT der Arbeitsgruppe Reinacher

Justus-Liebig-Universität Gießen, Fachbereich Veterinärmedizin

Institut für Veterinär-Pathologie

Prof. Dr. med. vet. Manfred Reinacher

Frankfurter Str. 96, 35392 Gießen,

Tel: 0641/99-38200, Fax: 0641/99-38209

E-Mail: Manfred.Reinacher@vetmed.uni-giessen.de

1. Ziele und Aufgabenstellung des Vorhabens

Im Rahmen des Projektes entnommene Knochenmarksbiopsien und Knochenmarksgewebe sowohl von BNP-Sektionstieren als auch Studienkälbern sollten histologisch und immunhistologisch untersucht werden. Des Weiteren wurden die Studienkälber selbst ebenfalls im Institut für Veterinär-Pathologie der JLU Gießen sezirt und gegebenenfalls Proben für weiterführende diagnostische Untersuchungen genommen. Das Hauptziel stellte der immunhistologische Nachweis der Bindung von Alloantikörpern von BNP-Müttern an Zellen dar (Forschungsschwerpunkt 5, Arbeitspaket 3). Der Weg dorthin erforderte die Gewinnung und Markierung von Alloantikörpern, die Entnahme von Probenmaterial zur Anfertigung immunhistologischer Schnitte und schließlich die Etablierung einer geeigneten Methode zur Darstellung der Antikörperbindungen an Zellen im Gewebe mittels eines immunhistologischen Verfahrens.

1.1. Planung und Ablauf des Vorhabens

Die Entnahme von Knochenmarksbiopsien und das Durchführen von Sektionen der Versuchstiere sind zeitlich abhängig von den jeweiligen Versuchsplanungen gewesen. Am Anfang stand die Gewinnung von Alloantikörpern sowohl aus Kolostrum als auch aus Serum im Vordergrund. Nach einer Kopplung an die immunhistologischen Marker Biotin oder Meerrettichperoxidase wurde mittels einer Inkubation mit MDBK-Zellen auf deren Bindung und Signalstärke selektiert. Eine zeitliche Verzögerung trat dadurch ein, dass sich routinemäßig Formalin-fixiertes Gewebe als unbrauchbar für den immunhistologischen Bindungsnachweis herausstellte. Ebenfalls gab es im Rahmen der immunhistologischen Untersuchungen Probleme bei der Gewinnung eines negativen Kontrollserums, so dass eine erfolgreiche, reproduzierbare immunhistologische Methodik erst relativ spät im Frühjahr 2012 etabliert werden konnte. Trotzdem wurden sämtliche geplante Arbeitsziele im Laufe der zur Verfügung stehenden Zeit bearbeitet und erreicht.

1.2. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Schon in den ersten Beschreibungen der plötzlich vermehrt auftretenden Fälle von hämorrhagischer Diathese bei wenige Tage alten Kälbern wurde auf eine lichtmikroskopisch diagnostizierte Panmyelophthise, einem Schwund sämtlicher Reihen der Knochenmarkszellen, hingewiesen (Friedrich et al., 2009b). Unterschiedliche Ätiologien, sowohl viraler, toxischer und auch hereditärer Natur, für diese pathologischen Veränderungen im Knochenmark wurden diskutiert und durch geeignete Nachweisverfahren widerlegt. So konnte zum Beispiel weder porcines Circovirus-Genom (Willoughby et al., 2010) noch BVD-Virus-Genom (Kappe et al., 2010) mittels molekularbiologischer Tests in betroffenen Tieren nachgewiesen werden. Toxine wie Furazolidon und Dichlorovinylcystein (DCVC), welche in Zusammenhang mit Knochenmarksschädigungen stehen können, wurden bei keinem erkrankten Tier gefunden (Friedrich et al., 2009b). Des Weiteren verliefen Untersuchungen auf vererbte Gendefekte, z.B. in Hinsicht auf den Gerinnungsfaktor XI (Krappmann et al., 2011), mit einem negativen

Ergebnis. Schließlich wurde ein Zusammenhang zur eingesetzten BVD-Vakzine Pregsure® von Pfizer erkannt, so dass eine immunvermittelte Pathogenese der Erkrankung als Ursache in den Vordergrund rückte. In darauffolgenden Studien konnte eine klinische Erkrankung von Kälbern mittels einer Kolostrumgabe von geimpften, bereits als Blutmütter aufgefallenen Kühen reproduziert werden (Friedrich et al., 2011). Eine Bindung von Alloantikörpern, gewonnen aus Serum oder Kolostrum von Blutmüttern, sowohl an MDBK-Zellen als auch an bovine Leukozyten aus dem Blut konnte durch verschiedene Arbeitsgruppen nachgewiesen werden (Bastian et al., 2011; Bridger et al., 2011; Pardon et al., 2011). Im Speziellen waren jedoch bisher keine immunhistologischen Untersuchungen zum Nachweis solcher Antikörperbindungen an Zellen erfolgt, so dass diesbezüglich auf keinerlei Erkenntnissen aus vorherigen Studien aufgebaut werden konnte. Des Weiteren konnten aufgrund des unbekanntes Antigens zum immunhistologischen Nachweis von Zielepitopen auf Zellen in bovinem Gewebe keine kommerziellen Antikörper eingesetzt werden. Es galt daher, genügend Alloantikörper des Typs IgG für einen Einsatz in immunhistologischen Untersuchungen aus Probenmaterial zu gewinnen. Protein G ist dafür bekannt, eine hohe Affinität für die Fc-Region von Immunglobulinen des Isotyps IgG zu besitzen und so konnte eine ausreichende Anzahl dieser Moleküle mittels einer Protein G-Säule gewonnen werden. Biotin und Meerrettichperoxidase sind die gängigsten immunhistologischen Marker und lassen sich mittels moderner Kopplungs-Kits in wenigen Schritten an Proteine, in unserem Fall die isolierten IgG-Antikörper, konjugieren. Ein direktes immunhistologisches Verfahren am Gewebeschnitt und auch an MDBK-Zellen sollte es dann ermöglichen, eine Bindung solcher markierter Antikörper an Zellen darzustellen.

2. Material und Methoden

2.1. Ausgangsmaterial

Gewebe

Es wurden Knochenmarksproben von Kälbern bis zu einem Alter von einem Monat aus dem Femur gewonnen und untersucht. Die Proben stammen von Tieren, welche entweder im Institut für Veterinär-Pathologie der Justus Liebig Universität Gießen seziert, der Tierkörperbeseitigung zugeführt oder im Rahmen der Serumübertragungsstudie beprobt wurden. Dabei wurden etwa erbsengroße Gewebestücke umgehend ins Fixiermedium überführt. Bei einigen Tieren wurden neben der Knochenmarksprobe auch gleichartige Proben aus parenchymatösen Organen gewonnen.

Zellen

Eine Population von MDBK-Zellen wurde in 25 cm²- Kulturflaschen im Brutschrank bei 37 °C und 0,5 % CO₂-Begasung kultiviert. Das Nährmedium bestand aus 5 ml RPMI 1640 pro Kulturflasche, dem 10 % fetales Kälberserum und 1 % Penicillin/Streptomycin zugesetzt wurde.

Isolierte Leukozyten aus dem Blut von Studienkälbern wurden vom Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere der JLU Gießen zur Verfügung gestellt.

Seren und Kolostrum

BNP-Mischkolostrum von nachgewiesenen Blutmutterkühen wurde vom Institut für Tierzucht und Genetik der TiHo Hannover zur Verfügung gestellt.

BNP-Mischserum von nachgewiesenen Blutmutterkühen wurde von der Klinik für Wiederkäuer und Schweine der JLU Gießen zur Verfügung gestellt. Ebenfalls wurde sowohl das Negativ-Kolostrum als auch das Negativ-Serum aus der Sammlung der Klinik für Wiederkäuer und Schweine erhalten. Beide Kontrollen stammen von einem nicht gegen BVD-geimpften Tier und wurden sowohl vom Institut für Virologie als auch vom Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere mit negativem Ergebnis auf BNP-Alloantikörper getestet.

Blut zur Herstellung des Organpulvers

Das Blut zur Adsorption des Negativ-Serums stammt von einer nachgewiesenen Blutmutterkuh, welche in der Rinderklinik der JLU Gießen aufgestallt war („Berta“, VT215, DE 0579977134).

2.2. Methoden

Fixierungen

Zum einen erfolgte eine Fixierung von Gewebeproben in 10%igem Formalin für mindestens 24 Stunden. Nach einer routinemäßigen, automatisierten Prozessierung im Einbettautomaten und darauffolgender Ausbettung in Paraffin dienten die Proben der Herstellung von Gewebeschnitten für eine lichtmikroskopische Untersuchung. Zum anderen wurden Gewebestücke nach dem Protokoll des Herstellers in HOPE-Lösung[®] (Hepes-glutamic acid buffer mediated Organic solvent Protection Effect, DCS Innovative Diagnostik-Systeme, Hamburg) fixiert und in niedrig schmelzendes Paraffin eingebettet, wobei hier Gewebeschnitte sowohl lichtmikroskopischen als auch immunhistologischen Untersuchungen dienten.

Gewinnung der IgG-Antikörper aus Kolostrum und Serum

Zur Gewinnung der IgG-Fraktion wurde eine Affinitätschromatografie mittels einer Protein-G Säule (GE Healthcare) nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Zur Fällung des Caseins und zur Entfernung der oben schwimmenden Fettschicht wurde das Kolostrum zunächst mit 1 M HCl angesäuert, für 15 Minuten bei 4 °C stehen gelassen und schließlich bei gleicher Temperatur zentrifugiert. Nach Neutralisation der mittleren Phase wurde diese Kolostrum-Lösung, parallel zur Serum-Aufbereitung, verdünnt, sterilfiltriert und anschließend nach Anleitung über eine äquilibrierte Protein G-Säule gegeben. Das gewonnene Immunglobulin G wurde zum Schluss mittels einer PD-10 Entsalzungssäule (GE-Healthcare) in eine phosphatgepufferte Salzlösung (PBS, pH = 7,4) umgepuffert. Photometrische Daten ergaben

Werte von etwa 10 mg IgG in einem Milliliter PBS, deren Korrektheit durch eine Proteinbestimmung nach Lowry überprüft wurde.

Kopplung des IgGs an immunhistologische Marker (Biotin, Meerrettichperoxidase)

Um eine grundsätzliche Bindung von Alloantikörpern an MDBK-Zellen nachzuweisen, wurden Zellen zunächst mit ungekoppeltem IgG (Verdünnung: 1: 50 in PBS) vital für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Zuvor waren die MDBK-Zellen in gekammerten Objektträgern (Lab Tek II Chamber Slides®, Fisher Scientific) ausgesät und über Nacht zur Anheftung im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ belassen worden. Im nächsten Schritt erfolgte eine Inkubation mit einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (Kaninchen anti-Rind, Firma Cappel, Verdünnung: 1: 100 in PBS), ebenfalls für 30 Minuten bei 4 °C. Mittels des Chromogens DAB (3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid) konnte eine Bindung von Alloantikörpern an MDBK-Zellen schließlich farblich nachgewiesen werden. Die IgG-Antikörper unterschiedlicher Ausgangsseren (gewonnen aus BNP-Serum, BNP-Kolostrum, Negativ-Serum, Negativ-Kolostrum) wurden jeweils mit Hilfe eines Protein Labeling Kits (Roche) entsprechend der Anleitung des Herstellers an den immunhistologischen Marker Biotin gekoppelt. Außerdem erfolgte eine Kopplung an Meerrettichperoxidase (HRP) mittels des Lightning Link HRP Conjugation Kits nach Anleitung der Firma Novus. Sowohl die Biotin-konjugierten als auch die HRP-konjugierten Antikörper wurden zur Überprüfung der erfolgreichen Kopplung vital mit MDBK-Zellen inkubiert und die Bindung der markierten Antikörper mittels DAB nachgewiesen, wobei für den Nachweis der gebundenen, Biotin-gekoppelten Antikörper ein Avidin-Biotin-Komplex (Vector Laboratories, Burlingame) als Sekundärantikörper eingesetzt wurde. In den folgenden Versuchen wurden aufgrund deutlicherer Signalwiedergabe die HRP-konjugierten Antikörper für einen direkten immunhistologischen Nachweis verwendet.

Immunhistologischer Nachweis der Bindung von Alloantikörpern am Gewebeschnitt

Die HRP-gekoppelten Antikörper wurden zuerst auf Gewebeschnitten aus formalinfixiertem Material inkubiert. Trotz zahlreicher Versuche mittels unterschiedlicher Antigen-Retrieval-Techniken konnte keinerlei Bindung von Antikörpern im Gewebe dargestellt werden. Die Vermutung, dass das Formalin zu einer irreversiblen Konformationsänderung der relevanten Epitope führt, konnte mittels der Anfertigung von Gefrierschnitten aus unfixiertem Material untermauert werden. Hierzu wurde im nächsten Schritt frisches Kälberknochenmark aus dem Femur in OCT (Tissue-Tek®) eingebettet. Im Anschluss daran wurden am Kryotom Gewebeschnitte hergestellt und auf Objektträger aufgezogen. Eine Inkubation mit den HRP-markierten Antikörpern erbrachte eine deutliche Braunfärbung eines Großteils der Zellen im Knochenmark, wobei jedoch auch die Inkubation mit den Negativseren eine ähnlich starke Anfärbung erzeugte. Zur leichteren Handhabung und Verbesserung der Zellmorphologie erfolgten die nächsten immunhistologischen Versuche mit HOPE-fixiertem Material, welches nach befolgen des Herstellerprotokolls eine ebenso deutliche Signalwiedergabe der gebundenen Antikörper zeigte. Trotz verschiedener Veränderungen des Versuchsprotokolls, wie zum Beispiel das Wechseln von Blocking-Seren, wiesen die Negativkontrollen zunächst weiterhin ebenfalls eine starke Braunfärbung eines Großteiles der Zellen im Knochenmark auf.

Adsorption von Antikörpern an Blutpulver

Eine Adsorption von Antikörpern an Blutpulver einer Blutmutterkuh sollte dazu führen, dass unerwünschte Antikörper, welche neben den spezifischen BNP-Alloantikörpern auch noch im Gewebe binden, weggefangen würden. Danach sollte Gewebe nach einer Inkubation mit adsorbiertem Negativserum weitestgehend negativ sein, da sich im verbleibenden Überstand nur noch wenige nicht-adsorbierte Alloantikörper befinden dürften. Für die Adsorption wurde 500 ml geronnenes Blut einer nachgewiesenen Blutmutterkuh bis zur breiigen Konsistenz zerkleinert und mit dem 4-fachen Volumen an Aceton aufgegossen. Nach einer Stunde wurden die festen Bestandteile abzentrifugiert und das Sediment 3-mal in Leitungswasser gewaschen. Danach erfolgte abermals eine Entwässerung des Sediments mit Aceton (3x) und eine Ausbreitung desselben in Petrischalen. Anschließend wurden diese zum Trocknen bei 37 °C über Nacht in den Brutschrank gestellt. Am darauffolgenden Tag wurden die getrockneten Blutbrocken zu Pulver gemahlen und feuchtigkeitsgeschützt gelagert. In ein 2,2 ml großes Eppendorfgefäß wurden 150 mg des Pulvers zunächst mit Tris-gepuffertem Kochsalz (TBS) für 5 Minuten rehydriert und im Anschluss daran noch einmal mit TBS gewaschen. Dann wurden sowohl das BNP-Serum als auch das Negativserum in einer Verdünnung von 1:400 in TBS jeweils in solche vorbereiteten Eppendorfgefäße pipettiert und nach ausführlichem Mischen für mindestens 2 Stunden im Kühlschrank inkubiert. Nach dieser Zeit wurde das Sediment abzentrifugiert und der Überstand als adsorbierte Antikörperlösung in der Immunhistologie auf HOPE-fixiertem Gewebe (Knochenmark, Milz, Thymus, Leber, Niere, Zellpellet aus Blutleukozyten) eingesetzt.

3. Ergebnisse

3.1. Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse

Es wurden sowohl aus Kolostrum als auch aus Serum Immunglobulin G-Antikörper gewonnen und erfolgreich an immunhistologische Marker gekoppelt. Im nächsten Schritt konnte eine Bindung von solchen markierten Antikörpern mittels einer Vitalinkubation an MDBK-Zellen nachgewiesen werden. Ein direkter immunhistologischer Nachweis mit der gebrauchsfertigen Antikörperlösung gelang jedoch nicht auf standardmäßig Formalin-fixiertem Material, erst die Anfertigung von Gefrierschnitten aus unfixiertem Gewebe und die Fixierung in HOPE-Lösung machten einen Nachweis von Antigen-Antikörperbindungen im Gewebeschnitt möglich. Auf das lebende Tier übertragen heißt das, dass eine BNP-Kuh Antikörper des Typs IgG gegen mindestens ein Antigen, welches auch auf MDBK-Zellen exprimiert wird, bildet. Im weiteren Verlauf des Projektes konnte eine immunhistologische Methode zur Darstellung der Bindung von gewonnenen Antikörpern in Gewebeschnitten, im Speziellen Knochenmark, etabliert werden. Dabei zeigten Knochenmarkszellen verschiedener Kälber quantitative Unterschiede in der Bindung markierter Alloantikörper, was für eine individuell unterschiedliche Empfänglichkeit der Kälber gegen die BNP-Antikörper ihrer Mütter spricht. Auch exprimierten verschiedene Zelltypen des Knochenmarks das Antigen in unterschiedlichem Ausmaß, wobei über eine diesbezügliche Abhängigkeit vom Reifestadium der Zellen

bisher nur gemutmaßt werden kann. Es traten jedoch auch Fälle auf, bei denen im gleichen Gewebeschnitt nicht bei allen Megakaryozyten eine Antikörperbindung nachgewiesen werden konnte, so dass von Antigenexpressionsunterschieden auch innerhalb derselben Zellpopulation ausgegangen werden muss. Allein der Nachweis einer Bindung von Alloantikörpern an Megakaryozyten widerlegt jedoch auch die Beobachtung von Pardon et al. (2011), dass keinerlei Zellen dieses Typs Alloantikörper binden. Des Weiteren wies die Mehrheit der Zellpellets aus isolierten Leukozyten von Studienkälbern eine Braunfärbung nach der Inkubation mit der Antikörperlösung auf, so dass davon ausgegangen werden kann, dass in einem empfänglichen Kalb auch die Zellen im strömenden Blut zu einem Großteil Alloantikörper binden. Somit muss das Antigen, zumindest in einer gewissen Menge, auch innerhalb des Gefäßsystems von einigen Zellen weiterhin exprimiert werden. Im Gegensatz dazu wiesen in peripheren immunologischen Organen, wie Milz und Thymus, nur wenige Einzelzellen bzw. kleine Zellinseln eine positive Braunfärbung auf. Dies deutet auf keine bis lediglich eine geringe Expression des vermuteten Antigens hin. Mit einem komplett negativen Ergebnis verliefen die immunhistologischen Untersuchungen von anderen Organen wie Leber und Niere, welche im physiologischen Zustand konstitutiv keine Wanderzellen des Immunsystems aufweisen. Hier konnte in keinem Gewebeschnitt eine Antikörperbindung an Zellen nachgewiesen werden. Auch kam es vor, dass in Einzelfällen an Knochenmarkszellen keine Antikörperbindung nach Inkubation mit den gekoppelten Alloantikörpern nachweisbar war. Diese Tiere scheinen das Antigen überhaupt nicht zu exprimieren und sind somit als prospektive BNP-Mutterkühe anzusehen.

Bezüglich der untersuchten Biopsien im Rahmen der Serumübertragungsstudie war festzustellen, dass sowohl 3 Tage nach erfolgter Transfusion von 300 ml BNP-Serum/50 kg Körpergewicht als auch nahezu 3 Wochen später das Knochenmark keine sichtbaren pathologischen Veränderungen in Form einer Panmyelophthise aufwies. Sämtliche Zelllinien waren in normaler Anzahl vorhanden.

3.2. Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Das direkte immunhistologische Verfahren am Gewebeschnitt ermöglichte es, eine Bindung von markierten Alloantikörpern an Zellen darzustellen und somit postulierte Theorien über das vermeintliche Antigen bzw. die vermuteten Zielzellen zu unterstützen oder aber auch abzuschwächen. So konnte eine Bindung der Antikörper an sowohl MDBK-Zellen, bovinen Knochenmarkszellen als auch Bluteukozyten gezeigt und damit bestätigt werden. Des Weiteren spricht das negative Ergebnis der Inkubation mit Gewebeschnitten von Leber und Niere dafür, dass sich die Bindung solcher Alloantikörper auf Knochenmarks- und Blutzellen beschränkt. Bei MHC I als Antigen wäre prinzipiell eine Reaktivität der Alloantikörper mit sämtlichen kernhaltigen Zellen zu erwarten. Die Untersuchungen deuten demnach darauf hin, dass noch Folgestudien zum genaueren Verständnis der pathogenetischen Vorgänge durchgeführt werden müssen. Ebenfalls weisen die sehr individuellen immunhistologischen Ergebnisse der Kälber auf die Komplexität der möglichen Reaktionen nach Aufnahme von Alloantikörper-enthaltendem Kolostrum hin, was sowohl eine Voraussage bei Einzeltieren als

auch eine grundsätzliche Theorie in Hinsicht auf stattfindende pathogenetische Vorgänge der Erkrankung erschwert. Das/ die BNP-Epitope können derzeit allerdings nur auf nativem oder spezialfixiertem Gewebe dargestellt werden, was eine routinemäßige Durchführung einer immunhistologischen Untersuchung impraktikabel macht.

4. Zusammenfassung

Zusammenfassend wurden die Ziele in dem vorgegebenen Zeitraum detailliert bearbeitet und erreicht. Die immunhistologischen Untersuchungen tragen zu einer näheren Charakterisierung von Zielzellen der BNP-Alloantikörper bei und erweitern das Verständnis für die Pathogenese dieser immunpathologischen Erkrankung. Die Ergebnisse verdeutlichen die komplexe Genese derselben und unterstreichen die Notwendigkeit weitergehender Studien, welche helfen können, zukünftige, mit Impfstoffen assoziierte Zwischenfälle zu verstehen und zu vermeiden.

5. Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen; ggf. mit Hinweisen auf weiterführende Fragestellungen

Die unter dem Punkt eins genannten Ziele wurden umfangreich mit den zu Verfügung gestellten Mitteln bearbeitet, so dass ein immunhistologischer Nachweis der Bindung von Alloantikörpern mittels einer etablierten Methode erfolgen konnte. Zielzellen im Knochenmark und im Blut wurden dargestellt. Zur genauen Charakterisierung der Zielzellen im Knochenmark bedarf es weiterer Untersuchungen, welche Leukozyten und Vorläuferzellen deutlich voneinander differenzieren können und zum Beispiel ebenfalls eine Aussage über den Reifegrad einer Zelle zulassen. In Anbetracht der komplexen Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchungen wäre es sinnvoll, sowohl den genetischen Hintergrund als auch das Alter der Tiere in die Untersuchungen mit einzubeziehen.

6. Literaturverzeichnis

Bastian, M., Holsteg, M., Hanke-Robinson, H., Duchow, K., Cussler, K. (2011): Bovine Neonatal Pancytopenia: is this alloimmune syndrome caused by vaccine-induced alloreactive antibodies? *Vaccine* 29(32), 5267-5275.

Bridger, P. S., Bauerfeind, R., Wenzel, L., Bauer, N., Menge, C., Thiel, H.-J., Reinacher, M., Doll, K. (2011): Detection of colostrum-derived alloantibodies in calves with bovine neonatal pancytopenia. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 141(1-2), 1-10.

Friedrich, A., Rademacher, G., Weber, B. K., Kappe, E., Carlin, A., Assad, A., Sauter-Louis, C., Hafner-Marx, A., Büttner, M., Böttcher, J., Klee, W. (2009b): Gehäuftes Auftreten von hämorrhagischer Diathese infolge Knochenmarkschädigung bei jungen Kälbern. *Tierärztl. Umschau* 64, 423-431.

Friedrich, A., Büttner, M., Rademacher, G., Klee, W., Weber, B. K., Müller, M., Carlin, A., Assad, A., Hafner-Marx, A., Sauter-Louis, C. M (2011): Ingestion of colostrum from specific cows induces Bovine Neonatal Pancytopenia (BNP) in some calves. *BMC Vet. Res.* 7:10.

Kappe, E. C., Halami, M. Y., Schade, B., Hoffmann, D., Gangl, A., Meyer, K., Dekant, W., Schwarz, B. A., Johne, R., Buitkamp, J., Boettcher, J., Müller, H. (2010): Bone marrow depletion with haemorrhagic diathesis in calves in Germany: Characterization of the disease and preliminary investigations on its aetiology. *Berl. Münch. Tierarztl. Wschr.* 123, 31–41.

Krappmann, K., Weikard, R., Gerst, S., Wolf, C., Kühn, C. (2011): A genetic predisposition for bovine neonatal pancytopenia is not due to mutations in coagulation factor XI. *Vet. J* (London, England : 1997) 190(2), 225–229.

Pardon, B., Stuyven, E., Stuyvaert, S., Hostens, M., Dewulf, J., Goddeeris, B. M., Cox, E., Deprez, P. (2011). Sera from dams of calves with bovine neonatal pancytopenia contain alloimmune antibodies directed against calf leukocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 141(3-4), 293-300.

Willoughby, K., Gilray, J., Maley, M., Dastjerdi, A., Steinbach, F., Banks, M., Scholes, S., Howie, F., Holliman, A., Baird, P., McKillen, J. (2010): Lack of evidence for circovirus involvement in bovine neonatal pancytopenia. *Vet. Rec.* 166(14), 436–437.

Ursachenermittlung bei der Bovinen Neonatalen Pancytopenie

Projektträger: Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE)
Förderkennzeichen: 2809HS025
Laufzeit: 01.09.2010 – 28.02.2013
Berichtszeitraum: 01.09.2010 – 28.02.2013

SCHLUSSBERICHT der Arbeitsgruppe Rümenapf und Thiel

Justus-Liebig-Universität Gießen, Fachbereich Veterinärmedizin

Institut für Virologie

Prof. Dr. med. vet. Heinz-Jürgen Thiel,
Institut für Virologie, Fachbereich Veterinärmedizin,
BFS Schubertstraße 81, 35392 Giessen
Tel. 0641/9938350, Fax: 0641/99-38359
Heinz-Juergen.Thiel@vetmed.uni-giessen.de

Prof. Dr. med. vet. Till Rümenapf,
Neue Anschrift: Institut für Virologie, Veterinärmedizinische Universität Wien
Veterinärplatz 1, A-1210 Wien

1. Laut Arbeitsplan geplante Arbeitsschritte während des abgelaufenen Berichtszeitraums

Ausgangspunkt unserer Untersuchungen war die Arbeitshypothese, dass es sich bei der BNP um ein durch Allo-antikörper (Allo-AK) vermitteltes, immunpathologisches Geschehen handelt, welches in direktem Zusammenhang mit dem Einsatz der Vakzine PregSure® BVD steht. Wesentliches Ziel war die Identifizierung des Zielantigens der Allo-AK im Impfstoff PregSure® BVD und in Zielzellen.

2. Durchgeführte Arbeitsschritte und erreichte Ziele.

- Sowohl BNP-Muttertiere als auch ein Großteil der mit PregSure® BVD geimpften Muttertiere ohne Bluterkalb haben Allo-AK im Serum, die sich im indirekten Immunfluoreszenz-Test gegen Oberflächenproteine von bovinen Kulturzelllinien (MDBK- und BL-3-Zellen) richten.
- Mit den Allo-AK PregSure® BVD immunisierter Tiere wurden aus einem Lysat von oberflächenbiotinylierten MDBK-Zellen zwei Proteinspezies mit einer apparenten molekularen Masse von 12 und 44 kDa präzipitiert. Serum BVDV-freier, nicht gegen BVD geimpfter Tiere zeigte keine Reaktivität gegen diese beiden Antigene. Eine schwache Bindung an das 44 kDa Protein wurde bei einigen Tieren nachgewiesen, bei denen andere BVD-Impfstoffe eingesetzt worden waren. Die Allo-AK gegen die 12 und 44 kDa Proteine waren auch im Kolostrum PregSure geimpfter Tiere nachweisbar. Durch Massenspektrometrie und Immunoblotanalysen wurde das 44 kDa Protein als Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex Klasse I (MHC I), das 12 kDa Protein als β_2 -Mikroglobulin (β_2 M) identifiziert.
- BNP-Muttertierserum zeigte eine Reaktivität gegen MHC I und β_2 M von PBMCs von empfänglichen Kälbern und von anderen adulten Tieren. Keine Bindung von Allo-AK aus BNP-Muttertierseren erfolgt an die eigenen Leukozyten des Muttertieres. Eine Reaktivität von Allo-AK gegen β_2 M kann ausgeschlossen werden, da es sich um ein hochkonserviertes Protein handelt, von dem beim Rind nur eine Variante bekannt ist. Es handelt sich bei β_2 M um ein Kopräzipitat von MHC I, das durch die Probenaufbereitung als eigenständige Bande im WB erscheint.
- In PregSure® BVD ist bovines MHC I eindeutig nachweisbar; dabei handelt es sich um MHC-1 Varianten, die von BNP Allo-AK erkannt werden. MHC I spezifische Allo-AK sind daher auf die Immunisierung mit PregSure® BVD zurückzuführen. Nach einer Auffrischungsimpfung mit diesem Impfstoff konnte ferner gezeigt werden, dass Allo-AK-Titer deutlich ansteigen.

- Für das Auftreten von BNP beim Kalb ist vermutlich auch der Allo-AK-Titer des Muttertieres entscheidend. Hierzu wurde ein ELISA entwickelt, der die Quantifizierung der Allo-AK-ermöglicht. Alle BNP-Muttertiere wiesen höhere Allo-AK-Titer auf als PregSure® BVD geimpfte Tiere, bei deren Kälbern BNP nicht aufgetreten ist.

3. Vergleich des Vorhabensstandes mit dem verbindlichen Arbeits- und Zeitplan

Die wesentlichen Ziele des Arbeitsplans für das Jahr 2011 wurden im Zeitrahmen erreicht und mit dem Titel „Vaccine-induced antibodies linked to Bovine Neonatal Panzytopenie (BNP) recognize cattle Major Histocompatibility Complex class I (MHC I),“ am 31.07.2011 publiziert (Deuskens F., Lamp B., Riedel C., Wentz E., Lochnit G., Doll K., Thiel H.-J., Rümmerapf T. (2011). *Veterinary Research*. 42:97). Darüber hinaus wurden Ergebnisse der bisherigen Arbeit als Dissertationsschrift von Herrn Fabian Deuskens mit dem Titel „Untersuchungen zur Ätiologie der Bovinen Neonatalen Panzytopenie (BNP)“ veröffentlicht (Fachbereich Veterinärmedizin der JLU Gießen, 2013).

Die im Erweiterungsantrag für das Jahr 2012 vorgesehenen Arbeiten zu Klonierung und Expression von bovinen MHC-1 Varianten, die von BNP spezifischen Allo-AK erkannt werden, konnten teilweise erfüllt werden. Zur Analyse der BNP-spezifischen Reaktivitäten von Antikörpern aus den BNP-Mutterkuhsereen und zur Bestimmung der reaktiven Epitope auf bovinen MHCI-Molekülen (BoLa) sollten die MHCI-Varianten der Ursprungszelllinie (MDBK) kloniert und exprimiert werden. Es gelang die Klonierung der Gene von insgesamt 5 MHCI-Varianten (N1101, N1201, N2101, N2301 und N5001) und des passenden bovinen β 2-Mikroglobulins. In Zusammenarbeit mit Frau PD Dr. Kühn wurden ferner MDBK Zellen hinsichtlich ihres MHC-1 Repertoires durch „Deep sequencing“ analysiert; die Ergebnisse stehen aber noch aus. Die Expression der verschiedenen MHC-I Allele in heterologen Zelllinien (z.B. BHK) wurde untersucht. Dazu wurden die Proteine mit einem sog. FLAG-Tag markiert und exprimierende Zellen in der Immunfluoreszenz und im Western-Blot mit FLAG-Tag spezifischen Antikörpern und einem kreuzreaktiven Antikörper gegen bovine MHC-I Moleküle getestet. Das Ergebnis der Experimente zeigte, dass eine heterologe Expression der bovinen MHC-I Moleküle möglich ist, aber die erzielbaren Proteinmengen für die geplante Depletion von Rinderseren und Affinitätsreinigungen von Antikörpern zu gering sind.

Expression von MHC I in Prokaryonten

Als weiterer Ansatz mit dem Ziel der Aufreinigung reaktiver Antikörper wurde die Expression der Ektodomäne der BoLa in Bakterien (*E. coli*) durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde ein Expressionsplasmid konstruiert, das die Sequenz des bovinen β 2-Mikroglobulins, eines GSGSGS-Linkers und der betreffenden MHCI-Variante enthielt. Die Expression des single-chain β 2M-MHC I in Bakterien konnte mittels eines C-terminalen Polyhistidin-Tags detektiert werden. Das Expressionskonstrukt konnte allerdings nicht unter nativen Bedingungen gereinigt werden, da es nicht in der löslichen Fraktion des Bakterienlysates aufgefunden wurde. Die Behandlung mit chaotropen Substanzen (8M Harnstoff) erlaubte jedoch die Reinigung des single-chain β 2M-MHC I. Da die Bindung der BNP-spezifischen Antikörper aus Mutter-

kuhsere an nicht-linearen Epitopen erfolgt, mussten die single-chain β 2M-MHCI-Konstrukte durch Entzug des Harnstoffs in einen nativen Zustand zurückgefaltet werden. Die Rückfaltung der single-chain β 2M-MHC I-Variante pFD39 wurde untersucht. Dabei konnten nach optimierter Expression, Reinigung und Rückfaltung ca. 250 μ g des löslichen MHC I Proteins gewonnen werden. Es wurde kovalent an eine NHS-Säule gebunden und zur Reinigung von Antikörpern aus 0,5 ml BNP-Mutterkuhsere genutzt. Nach Elution wurden 50 μ g gebundener Antikörper erhalten. Diese hatten die gewünschte Spezifität, denn in der anschließenden Immunpräzipitation konnte bovines MHC I dargestellt werden. Die angestrebte Fraktionierung von Rinderseren ist mit dieser Methode möglich, allerdings ist die Effizienz noch zu gering, um die entscheidenden Tierversuche mit definierten anti MHC-I IgG bzw MHC-I IgG depletierten Rinderseren durchzuführen. Die dazu benötigten Mengen liegen bei ca. 500mg IgG, also der 10.000-fachen Menge. Dies verdeutlicht, dass noch erhebliche Optimierungsarbeiten notwendig sind.

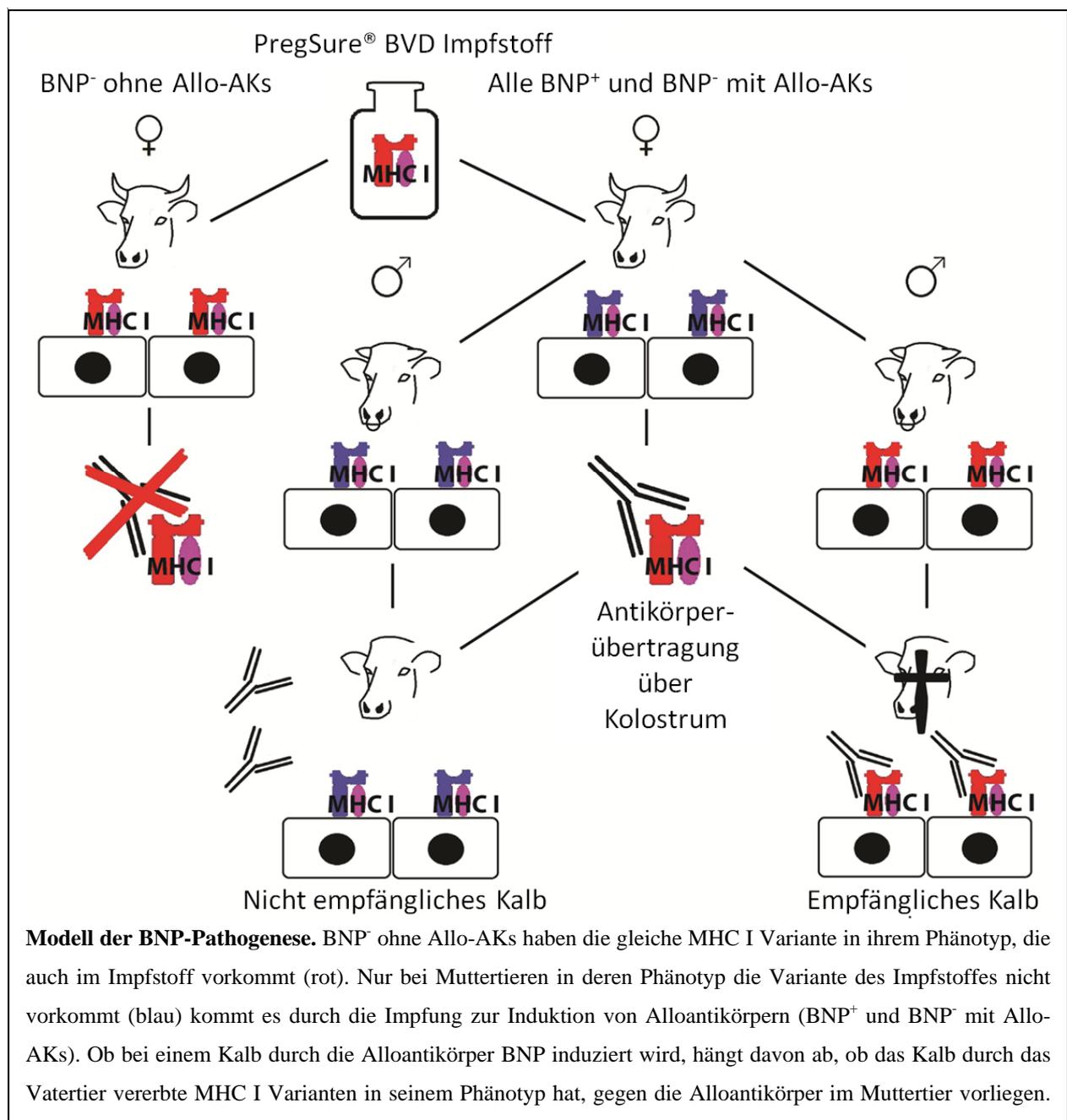
Immortalisierte bovine B Zellen mit anti MHC I Spezifität

Zur Prüfung der Hypothese, dass die MHC I Antikörper in Seren von BNP Muttertieren direkt für die Krankheitsentstehung verantwortlich sind, wurde versucht, monoklonale Rinderantikörper gegen MHC I zu erzeugen. Monoklonale Antikörper haben den Vorteil, unbegrenzt zur Verfügung zu stehen und dadurch große Mengen an IgG erzeugen zu können. Zu diesem Zweck wurden bei der Schlachtung eines hyperimmunisierten BNP-Muttertieres (AG Doll) Milzzellen gewonnen, die mit murinen Myelomzellen fusioniert wurden. Ausgehend von dieser Zellfusion konnten vorübergehend zwei spezifisch reagierende Hybridome isoliert werden. Leider waren die Hybridome nicht stabil und gingen nach wenigen Passagen verloren. Dieser Ansatz wird wiederholt und weiter verfolgt, da es grundsätzlich möglich ist, chimäre Hybridomzellen zu erzeugen.

4. Wichtige Ergebnisse

Das wichtigste Ergebnis war die Identifizierung von bovinem MHC-1 als dem dominanten Antigen, das von Allo - AK der BNP Muttertiere erkannt wird (Deutskens F., Lamp B., Riedel C., Wentz E., Lochnit G., Doll K., Thiel H.-J., Rümenapf T. (2011) Vaccine-induced antibodies linked to Bovine Neonatal Pancytopenie (BNP) recognize cattle Major Histocompatibility Complex class I (MHC I). *Veterinary Research*. 42:97). Der Ursprung der Allo-Ak ist zweifelsfrei auf die Vakzine PregSure[®] BVD zurückzuführen. Die Daten wurden im Wesentlichen durch eine Publikation einer anderen, von der Fa. Pfizer unterstützten Arbeitsgruppe bestätigt (Foucras, G., F. Corbiere, C. Tasca, C. Pichereaux, C. Caubet, C. Trumel, C. Lacroux, C. Franchi, O. Bulet-Schiltz, und F. Schelcher (2011) Alloantibodies against MHC class I: a novel mechanism of neonatal pancytopenia linked to vaccination. *J Immunol* 187, 6564-70). Aus diesen Befunden lässt sich ein grundsätzliches Problem bei der Herstellung von inaktivierten Impfstoffen erkennen, die im Produktionsprozess Zellkultursysteme der gleichen Tierart verwenden, die auch Empfänger des Impfstoffs ist. Zusätzlich gibt es Hinweise, wonach das bei PregSure[®] BVD verwendete Adjuvans eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Allo- Ak spielt.

Die im Erweiterungsantrag geplanten Experimente sollten vor allem der Bestätigung / Widerlegung der oben beschriebenen Arbeitshypothese dienen. Da es eindeutig fest steht, dass Immunglobuline an der Entstehung von BNP beteiligt sind, gilt es die Spezifität der betreffenden Antikörper zu bestimmen. Ob tatsächlich allelspezifische MHC -I Antikörper für die Panzytopenie verantwortlich sind, ließe sich in einem Tierversuch bestimmen, in dem empfängliche Kälber mit solchen Antikörpern belastet werden. Wir haben Methoden entwickelt, die - wenn auch mit großem Aufwand - die präparative Darstellung von MHC-I spezifischem IgG mit Hilfe bakteriell exprimierter MHC I Proteine aus Rinderseren erlauben. Außerdem sehen wir die Möglichkeit, stabile monoklonale Rinderantikörper zu erzeugen, die von BNP Müttern gegen die "fremden" MHC-I Antigene gebildet.



Ursachenermittlung bei der Bovinen Neonatalen Pancytopenie

Projektträger: Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE)
Förderkennzeichen: 2809HS025
Laufzeit: 01.09.2010 – 28.02.2013
Berichtszeitraum: 01.09.2010 – 28.02.2013

SCHLUSSBERICHT der Arbeitsgruppe Distl

Institut für Tierzucht und Vererbungsforschung der Stiftung Tier- ärztliche Hochschule Hannover

Prof. Dr. med. vet. Ottmar Distl, Institut für Tierzucht und Vererbungsforschung
Bünteweg 17p, 30559 Hannover
Tel: 0511/953-8875, Fax: 0511/953-8582, E-Mail: ottmar.distl@tiho-hannover.de

Weitere Projektbeteiligte: Prof. Dr. M. Kaske (Klinik für Rinder), Prof. Dr. M. Ganter (Klinik für kleine Klautiere), Prof. Dr. L. Haas und Prof. Dr. Beatrice Grummer (Zentrum für Infektionsmedizin, Institut für Virologie), Prof. Dr. W. Baumgärtner (Institut für Pathologie)

Forschungsschwerpunkt 2: Reproduktion der Krankheit

1. Geplante Arbeitsschritte

Etablierung des Kälbermodells:

Auswahl der Betriebe, Charakterisierung der Kolostren einschließlich deren Spender

Negative Kontrolle für das Kälbermodell

2. Tatsächlich durchgeführte Arbeitsschritte und erreichte Ziele

2.1. Auswahl der Betriebe

Insgesamt wurden im Umkreis von Hannover 20 Milchviehbetriebe eruiert, die nachweislich BVD und IBR frei sind und bei denen in den letzten Jahren weder BVD-Impfungen noch BVD-Fälle nachweislich waren.

2.2. Charakterisierung von Kolostren und deren Spenderinnen

Bisher wurden ca. 120 l Kolostrum von 30 Kühen gesammelt, die nachweislich ein mit BNP-betroffenes Kalb hatten. Das Kolostrum stammt jeweils von der nachfolgenden Abkalbung, in der das BNP-Kalb festgestellt wurde. Die BNP wurde mittels klinischer Symptomatik, Thrombo- und Leukozytopenie sowie Depletion des Knochenmarks (Biopsie und histopathologische Untersuchungen) festgestellt.

Für die Charakterisierung der Kolostren wurden von den Kolostrenspendern EDTA-Blutproben genommen, die DNA extrahiert und auf eine Konzentration von 50ng/µl eingestellt. Alle DNA-Proben wurden auf Qualität überprüft. Von allen bisherigen Kolostrumspenderkühen konnte DNA in ausreichender Menge und Qualität isoliert werden. An diesen DNA-Proben wurden ca. 770.000 SNPs (single nucleotide polymorphisms) mittels des bovinen Illumina HD Beadchips genotypisiert. Die Ergebnisse der Genotypisierungen von 636 Tieren liegen inzwischen vor.

2.3 Kälbermodell

Bisher wurden im Kälbermodell 79 Kälber für das Auftreten klinischer BNP-Symptome, Blutbild- und Knochenmarkveränderungen getestet (Tabelle 1). Die Ergebnisse zeigten, dass BNP anhand von Kolostrum von Kühen mit BNP-Vorgeschichte auslösbar ist und BNP mit klinischen oder subklinischen Symptomen auftreten kann. Der Verlauf kann unabhängig von der klinischen Symptomatik letal sein. Insgesamt wurden zwölf experimentelle Kälbergruppen unterschieden. Acht Gruppen erhielten BNP-Kolostrum, zwei Gruppen subklinisches BNP-Kolostrum und zwei Gruppen Kolostrum aus BNP-Risikobeständen, jedoch BNP-freien Kühen. Bei den Kälbergruppen mit BNP-Kolostrum erfolgte die Zuteilung des Kolostrums in der Weise, dass vier Gruppen jeweils das Kolostrum einer Kuh, zwei Gruppen ein Mischko-

lostrum von je zwei Kühen und eine Gruppe das Mischkolostrum von zehn Kühen erhielten. Bei den Kälbergruppen mit subklinischem Kolostrum wurde jeweils nur das Kolostrum je einer Kuh verwendet. Bei den Kälbergruppen mit BNP-freiem Kolostrum wurde für eine Gruppe ein Mischkolostrum von zwei Kühen und einmal ein Mischkolostrum von 16 Kühen verwendet. Letale BNP konnte nur mittels BNP-Kolostrum ausgelöst werden. Klinische BNP trat bis auf eine Ausnahme (Versuchsgruppe 12) nur dann auf, wenn BNP-Kolostrum verwendet wurde. Subklinische BNP kann sowohl mit BNP-Kolostrum, subklinischem BNP-Kolostrum wie auch BNP-freiem Kolostrum aus Risikobeständen ausgelöst werden. Die Erklärung dafür ist darin zusehen, dass nicht alle Kühe mit BNP-Kolostrum als solche erkannt werden und dadurch die Rate der Kühe mit BNP-Kolostrum durch falsch negative Diagnosen nach unten verzerrt ist.

Die Mortalitätsrate wird durch das Kolostrum der Kuh bestimmt. Wenn ein Mischkolostrum das Kolostrum einer Kuh enthält, das mit einer sehr hohen Mortalität assoziiert ist, dann bewirkt das Mischkolostrum ebenfalls eine hohe Mortalität. Die geringe Anzahl an BNP-freien Kälbern bei den BNP-Kolostrumkälbergruppen zeigt, dass das BNP auslösende Antigen sehr selten ist und deshalb der Großteil der Kälber auf BNP-Kolostrum mit BNP reagiert. Dagegen ist die Variabilität in der Schwere und Dauer der BNP-Verläufe von vielen Faktoren abhängig. Diese Faktoren können sowohl in dem alloreaktiven Antikörperspektrum der Mütter, kalbspezifischen Faktoren und der Behandlung des Kolostrums liegen. Es ist also davon auszugehen, dass das Reaktionsspektrum der Kälber auf BNP-Kolostrum von kalbspezifischen Faktoren und weniger von immungenetischen Faktoren abhängt und andererseits die Kühe ein weites Reaktionsspektrum in der Produktion alloreaktiver Antikörper zeigen. Die letztgenannte These wird durch die hohe Bandbreite subklinischer BNP-Fälle gestützt.

2.4 Negative Kontrolle für das Kälbermodell

In einem Feldversuch auf einem Milchviehbetrieb mit nachgewiesenen BNP-Fällen über mehrere Jahre sollte gezeigt werden, ob ein Austausch des Kolostrums der Mutter des Kalbes gegen ein Kolostrumersatzpräparat der Firma Milkivit das Auftreten von BNP verhindert. In dem Versuch wurden insgesamt 60 weibliche Kälber miteinbezogen sowie alle weiteren gleichzeitig im Betrieb geborenen Kälber ($n=113$) auf BNP-Anzeichen kontrolliert. Die Versuchsgruppe von 30 weiblichen Kälbern erhielt das Kolostrumersatzpräparat (5 l) im Anschluss an die Geburt und kein Kolostrum oder Vollmilch der Mutter oder einer anderen Kuh aus dem Betrieb. Danach erfolgte die Tränke mit Milchaustauscher. Die Kontrollgruppe erhielt 5 l Kolostrum von der eigenen Mutter und danach Milchaustauscher. In der Versuchsgruppe konnte kein Fall von BNP ermittelt werden, während in der Kontrollgruppe 8 Kälber Anzeichen von BNP zeigten, jedoch daran nicht verstarben. Von diesen acht Kälbern hatten sieben Tiere keine klinischen Anzeichen für BNP und wurden deshalb als subklinische BNP

Fälle klassifiziert. Nur ein Kalb zeigte zusätzlich klinische BNP-Symptome. Von den übrigen 113 gleichaltrigen Kälbern hatten elf Tiere klinische Anzeichen von BNP begleitet von erniedrigten Thrombozyten- und Leukozytenzahlen und vier dieser Kälber starben aufgrund von BNP.

2.5 Molekulargenetische Analysen

Die Kälber aus dem Kälbermodell sowie ein Teil der Kälber und Kühe aus dem Feldversuch werden auf dem bovinen Illumina HD Beadchip genotypisiert. Die Genotypisierungsergebnisse liegen insgesamt vor und die Auswertungen sind abgeschlossen. Die Ergebnisse konnten Genom-weit signifikante Assoziationen für die Tiere aus dem Kälbermodell sowie für die BNP-Kühe nachweisen. Die Ergebnisse werden an weiteren Proben validiert. Dafür werden auch Proben der anderen Arbeitsgruppen erbeten.

3. Vergleich des Vorhabenstandes mit dem verbindlichen Arbeits- und Zeitplan

Der Vorhabenstand ist im geplanten Zeitrahmen der Planungen.

4. Wichtige Ergebnisse

Das Kälbermodell kann BNP zuverlässig reproduzieren. Die Versuche lassen die Beteiligung einer komplexen Anzahl von kolostralen Alloantikörpern erwarten. Ein immungenetisches Geschehen infolge einer geringen Anzahl genetischer Varianten ist für die klinische und/oder letale BNP wahrscheinlich, während für die subklinischen Fälle eine größere Anzahl von genetischen Varianten eher wahrscheinlich ist. Ein Aussetzen von Kolostrum von allen Kühen aus Herden mit BNP-Vorgeschichte eliminiert das Auftreten von BNP. Die BNP persistiert in den Herden weiter, solange Kolostrum von BNP-Kühen an neugeborene Kälber weiterverfüttert wird. Ungeklärt ist, welche Auswirkungen BNP auf die Mast- und Milchleistung sowie Lebensleistung der Tiere hat.

5. Zusammenfassung

Das Kälbermodell liefert brauchbare Ergebnisse zur immungenetischen Aufklärung der BNP. BNP kann zuverlässig reproduziert werden und es erscheint möglich, die einzelnen immungenetischen Faktoren mittels molekulargenetischen Methoden charakterisieren und quantifizieren zu können.

6. Publikationen

Buck BC, Ulrich R, Kuiper H, Reinacher M, Peters M, Heimberg P, Holsteg M, Puff C, Haas L, Ganter M, Distl O. (2011) Bovine neonatale Panzytopenie (BNP) bei Deutschen Holstein Kälbern. Berl Münch Tierärztl Wochenschr 124: 329-36.

Schröter P, Kuiper H, Holsteg M, Puff C, Haas L, Baumgärtner W, Ganter M, Distl O. (2011) Reproduzierbarkeit der bovinen neonatalen Panzytopenie (BNP) über die Verabreichung von Kolostrum. Berl Münch Tierärztl Wochenschr 124: 390-400.

Schröter P, Lupp B, Ganter M, Distl O. (2012) A colostrum substitute prevents bovine neonatal pancytopenia (BNP) in a herd with previously BNP-affected calves. Berl Münch Tierärztl Wochenschr 125: 390-400.

Schröter P, Kuiper H, Holsteg M, Distl O. (2012) Reproducibility of Bovine Neonatal Pancytopenia (BNP) in calves from colostrum of cows from dairy herds at risk to BNP. In review.

Henninger T, Patzak P, Holsteg M, Puff C, Haas L, Ganter M, Distl O. (2012) Outcome from a calf model for bovine neonatal pancytopenia. In review.

Henninger T, Patzak P, Puff C, Haas L, Ganter M, Distl O. (2012) Investigation of the factors causing lethality in calves affected by bovine neonatal pancytopenia. In review.

Tabelle 1. Ergebnisse des Kälbermodells nach BNP-Symptomen und der Mortalität für jede Versuchsgruppe und insgesamt

Versuchsgruppe	Kolostrumklassifikation BNP-n-Kühe	n	BNP-Anzeichen			BNP-Mortalität	
			frei	subklinisch	klinisch	Tödliche Fälle	Überlebende
1	BNP-1	6	0	3	3	1	5
2	BNP-1	6	2	0	4	4	2
3	BNP-1	5	0	0	5	3	2
4	BNP-1	6	0	5	1	5	1
5	BNP-1	10	1	0	9	9	1
6	BNP-2	6	2	3	1	2	4
7	BNP-2	6	0	1	5	6	0
8	BNP-10	10	0	0	10	8	2
9	Sub BNP-1	5	1	4	0	0	5
10	Sub BNP-1	5	5	0	0	0	5
11	BNP-frei-2	5	5	0	0	0	5
12	BNP-frei-16	9	6	2	1	0	9
1 - 12		79	22	18	39	38	41

Ursachenermittlung bei der Bovinen Neonatalen Pancytopenie

Projektträger: Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE)
Förderkennzeichen: 2809HS025
Laufzeit: 01.09.2010 – 28.02.2013
Berichtszeitraum: 01.09.2010 – 28.02.2013

SCHLUSSBERICHT der Arbeitsgruppe Deeg

Lehrstuhl für Physiologie, Veterinärwissenschaftliches Department
Ludwig-Maximilians-Universität München

Prof. Dr. Cornelia Deeg
Veterinärstr. 13, 80539 München
Telefon: 089/2180-1630, -5889, -2524
Telefax: 089/2180-2554
e-mail: deeg@tiph.vetmed.uni-muenchen.de

1. Ziele und Aufgabenstellung des Vorhabens

Die Ziele und Aufgabenstellung unseres Vorhabens war die Identifikation des Zielantigens der BNP-übertragenden Antikörper. Dies wollten wir mit Western Blots und einer Kandidaten-Identifikation über Massenspektrometrie erreichen. Ein weiteres Ziel war die nähere immunologische Charakterisierung der BNP-übertragenden Antikörper.

1.1 Planung und Ablauf des Vorhabens

Geplant war eine Erstellung von Proteinlandkarten von Rinder-Leukozyten, Knochenmarkszellen und Thrombozyten mit zweidimensionaler Gelelektrophorese. Diese Landkarten sollten auf Blots transferiert werden, um dann die Bindung von Kolostren und Seren von BNP-übertragenden Rindern im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren zu testen. 2D-Gele haben den Vorteil, auch targetierte Proteinmodifikationen anzuzeigen und ermöglichen durch die zusätzliche Information über die Ladung des Proteins eine bessere Zuordnung des tatsächlich gebundenen Proteins, als es bei standardmäßig mit SDS-Page getrennten Proteingemischen der Fall ist. Ein methodischer Nachteil ist aber die mangelhafte Auftrennung von Membranproteinen, die in 2D-Gele häufig gar nicht einwandern (Rabilloud, 2002). Aus diesem Grund hatten wir als zusätzliche Methode eine Anreicherung von Zellmembranproteinen und anschließende eindimensionale Western Blots vorgeschlagen (Hauck et al., 2010; Swadzba et al., 2012). Von BNP-Überträgern selektiv gebundene Kandidaten sollten dann per Massenspektrometrie (LC-MS/MS) identifiziert werden. Anschließend sollte die Immunreaktion gegen das Kandidatenprotein mit einer weiteren Methode bestätigt werden (Western Blot und/oder Enzyme linked immunosorbent Assay) mit gereinigtem Protein. Für die nähere Charakterisierung der Pathophysiologie wollten wir außerdem den Isotyp des BNP-Antikörpers bestimmen. Die Experimente wurden wie geplant durchgeführt, wobei mit der Validierung begonnen wurde, diese aber aufgrund der Fülle der identifizierten Antigene und deren Besonderheiten in diesem Zeitraum nicht fertiggestellt werden konnte. Dies hatten wir aber bei der Antragstellung für diese Aufgabe (3.3) schon entsprechend prognostiziert, sollte es sich um nicht kommerziell erhältliche Kandidatenproteine handeln.

Aufgabe	Monat
3.1 Identifikation der Spezifität der Autoantikörper von BNP-Überträgern	
Herstellung der Proteinlandkarten von Rinder-PBL, Knochenmarkszellen und Thrombozyten, Mastergele für die Massenspektrometrie	0 – 9
2D Blots zum Screening	0- 18
Erstellung der Membranproteinpräparation, 1D Western Blots	9- 15
3.2 Identifikation der Kandidatenantigene mittels Massenspektrometrie	6- 24
3.3 Validierung der identifizierten Autoantigene mit gereinigten Kandidatenproteinen, funktionelle Assays	6 - 24

1.2 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Der wissenschaftliche Stand zu Beginn des Projektes war, dass Antikörper aus dem Kolostrom bestimmter Pregsure-geimpfter Tiere die BNP auf gesunde Empfängerkalber transferieren können (Friedrich et al., 2011). Unsere Vorarbeiten zeigten, dass die Antikörper von BNP-Überträgern an mehrere Zellarten binden. Mit der Identifikation unbekannter Zielantigene mittels 2D Western Blots und spezieller Membranproteinaufbereitungen hatten wir Erfahrung aus anderen Tier- und Erkrankungsmodellen (Deeg et al., 2006).

2. Material und Methoden

Proteinlandkarten wurden von gesunden Kälbern im BNP-Erkrankungsalter und adulten Rindern angefertigt. Für die 2D Gele haben wir breite pH Gradienten (pH 3-11) gewählt, da die Proteome viele Spots im pH-Bereich außerhalb von 4-7 aufwiesen, so dass eine Fokussierung auf einen pH-Bereich von 4-7 zu einer schlechten Separation dieser Kandidaten geführt hätte. Im Proteommuster haben wir nach der Proteomanalyse von Kälbern verschiedener Rassen, Altersstufen und Geschlechts keine bedeutenden inter-individuellen Unterschiede festgestellt. Die Methode der Thrombozytenpräparation von (Garcia, 2007) ließ sich erfolgreich auf Rinderblut adaptieren und führte zu einer sehr reinen Thrombozytenpräparation. Bei der Präparation von Kälber-PBL mussten wir einige Modifikationen an der Dichtezentrifugationsmethode vornehmen, die wir ansonsten für die Separation von Pferde-PBL verwenden, um eine zufriedenstellende Ausbeute der gewünschten Zellen zu erzielen. Die Membranproteinanreicherung konnte dagegen direkt erfolgreich für die Rinderzellen verwendet werden, wie die massenspektrometrische Analyse zeigte.

Die Identifikation der Kandidatenproteine stellte kein Problem dar, alle submittierten Spots oder Banden konnten klar identifiziert werden und wurden auch als Rinderproteine und nicht als Orthologe identifiziert. Die Blots wurden mit enhanced Chemilumineszenz auf Röntgenfilmen entwickelt und sind digitalisiert. Die Mastergele wurden mit kolloidalem Coomassie und Silber gefärbt. Der Isotyp des BNP-Antikörpers wurde mit Rinder-Ig spezifischen sekundären Antikörpern gegen die schweren Ketten von IgA, IgM, IgG1 und IgG2 ermittelt. Dabei erwiesen sich die kommerziell vertriebenen monoklonalen Antikörper gegen IgG1 und IgG2 des Rindes als untaugliche Reagenzien und mussten durch polyklonale Antikörper ersetzt werden (weitere Alternativen waren nicht auf dem Markt).

3. Ergebnisse

3.1 Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse

Die 2D-Blots, bei denen wir die Antikörperspezifität von Kolostren und Seren gesunder Rinder und BNP-Überträgerkühe verglichen haben, wurden zunächst so titriert und modifiziert, dass erste Unterschiede im Bindungsmuster beider Gruppen deutlich wurden. Insgesamt konnten wir 10 Kandidatenspots mit den 2D Blots identifizieren, gegen die BNP-Überträger-tiere IgG Antikörper aufweisen (Abb 1, links).

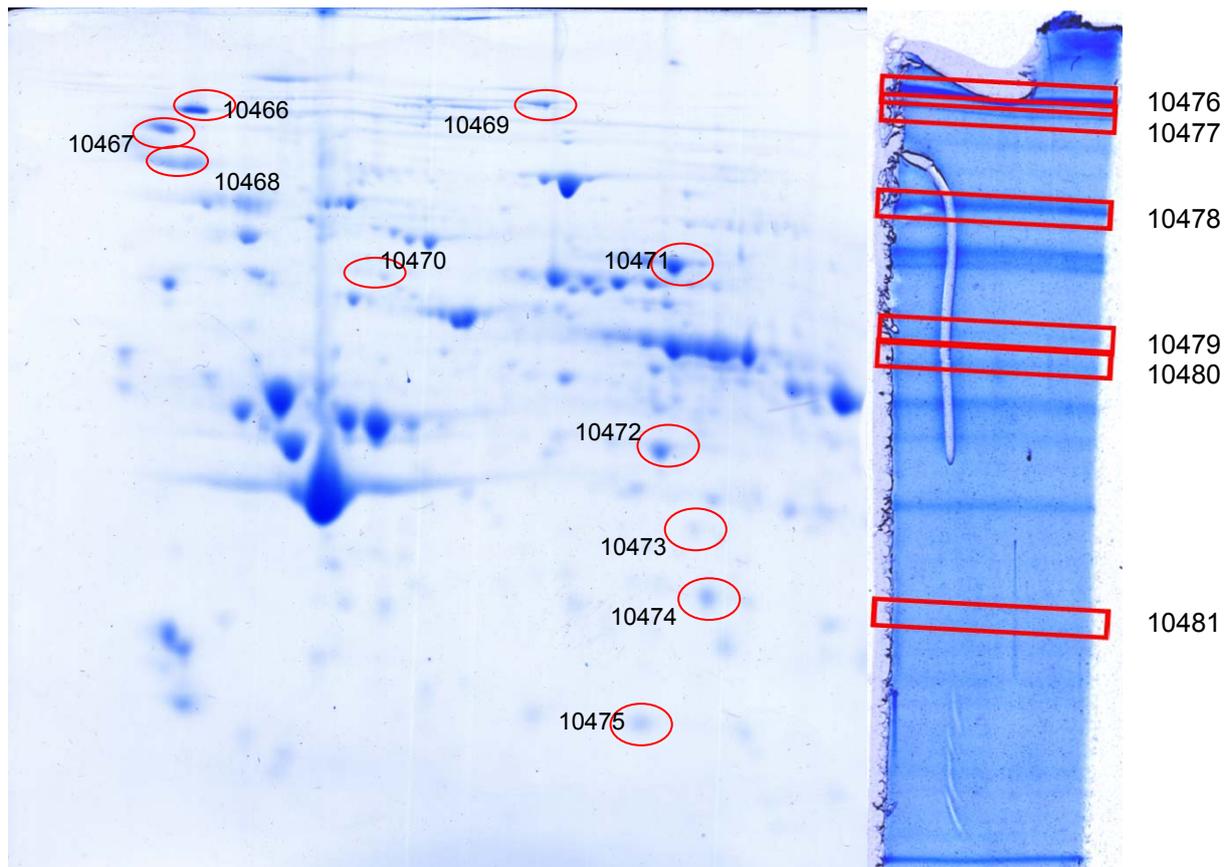


Abb. 1, links: 2D Master-Gel, aufgetrennt sind die Proteine einer Thrombozyten-Präparation eines gesunden Fleckvieh-Kalbes. Horizontale Trennung der Proteine nach ihrer Ladung, verwendet wurde ein größtmöglicher pH-Gradient (3-11, Immobiline Dry Strips von GE Healthcare). Die vertikale Auftrennung erfolgte über Standard SDS-Page, oben Proteine mit hohem Molekulargewicht, Trennung bis ca. 10 kD; rechts: Membranproteinpräparation von Thrombozyten. Die Gele wurde mit kolloidalem Coomassie gefärbt. Kandidatenproteine, die im Blot nur von BNP-Überträgern gebunden wurden sind rot markiert und nummeriert.

Sechs BNP-Antigene wurden aus den Membranproteinblots identifiziert (Abb. 1 rechts). Die Identifikation dieser Kandidaten mittels Massenspektrometrie erfolgte aus entsprechenden Mastergelen und der Anfärbung der Blots mit kolloidalem Gold nach einer speziellen, Protein-freien Blockade. Die Spots und Banden wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten, tryptisch verdaut und mit LC-MS/MS identifiziert (Tabelle 1 und 2).

10466	Thrombospondin-1 n=1 Tax=Bos taurus RepID=TSP1_BOVIN
10467	Integrin alpha 2b n=1 Tax=Bos taurus RepID=Q58DK0_BOVIN
10468	Integrin alpha 2b n=1 Tax=Bos taurus RepID=Q58DK0_BOVIN
10469	Zyxin n=1 Tax=Bos taurus RepID=Q08DQ6_BOVIN
10470	Fructose-bisphosphate aldolase n=2 Tax=Bos taurus RepID=Q3ZBY4_BOVIN
10471	Serum albumin n=1 Tax=Bos taurus RepID=ALBU_BOVIN
10472	Alpha-enolase (EC 4.2.1.11) (2-phospho-D-glycerate hydro-lyase) (Non- neural enolase) (NNE) (Enolase 1) (Phosphopyruvate hydratase) (HAP47). N=1 Tax=Bos taurus RepID=UPI0000614F27
10473	Kandidat 1; Tax=Bos taurus
10474	PDZ and LIM domain 1 n=1 Tax=Bos taurus RepID=A6H7E3_BOVIN
10475	Peroxiredoxin-6 n=1 Tax=Bos taurus RepID=PRDX6_BOVIN

Tabelle 1: Massenspektrometrische Identifikation der Kandidatenproteine aus 2D Blots.

10476	Kandidat 2; Tax=Bos taurus
10477	Kandidat 3; Tax=Bos taurus
10478	Integrin alpha 2b n=1 Tax=Bos taurus RepID=Q58DK0_BOVIN
10479	Fibrinogen alpha chain n=1 Tax=Bos taurus RepID=A5PJE3_BOVIN
10480	NADH-cytochrome b5 reductase 3 soluble form n=2 Tax=Bos taurus RepID=NB5R3_BOVIN
10481	Integrin alpha 2b n=1 Tax=Bos taurus RepID=Q58DK0_BOVIN

Tabelle 2: Massenspektrometrische Identifikation der Kandidatenproteine aus Membran-Blots.

Bei den Validierungsexperimenten konnten die Kandidaten Thrombospondin 1 und Integrin alpha 2b (=CD41) nicht bestätigt werden. Thrombospondin 1 ist nicht auf allen Zellpopulationen exprimiert, an die die BNP-Antikörper binden und das zelluläre Expressionsmuster deckt sich in der Immunzytologie nicht mit dem der BNP-Seren (das Bindungsmuster überlagert nicht; die Seren zeigen eine deutlich membranständige, aber auch eine intrazytoplasmatische Färbung (s. Abb. 2 links, Immunfluoreszenz auf MDBK-Zelllinie; BNP-Antikörper grün, Zelloberfläche rot gefärbt). Um die Liste einengen zu können, charakterisierten wir parallel dazu die Eigenschaften des BNP-Alloantigens mit immunzytologischen Methoden außerdem ohne Doppelfärbung mit potenziellen Kandidatenproteinen (Abb. 2, Bindungsmuster eines BNP-Kolostrums auf MDBK-Zellen).

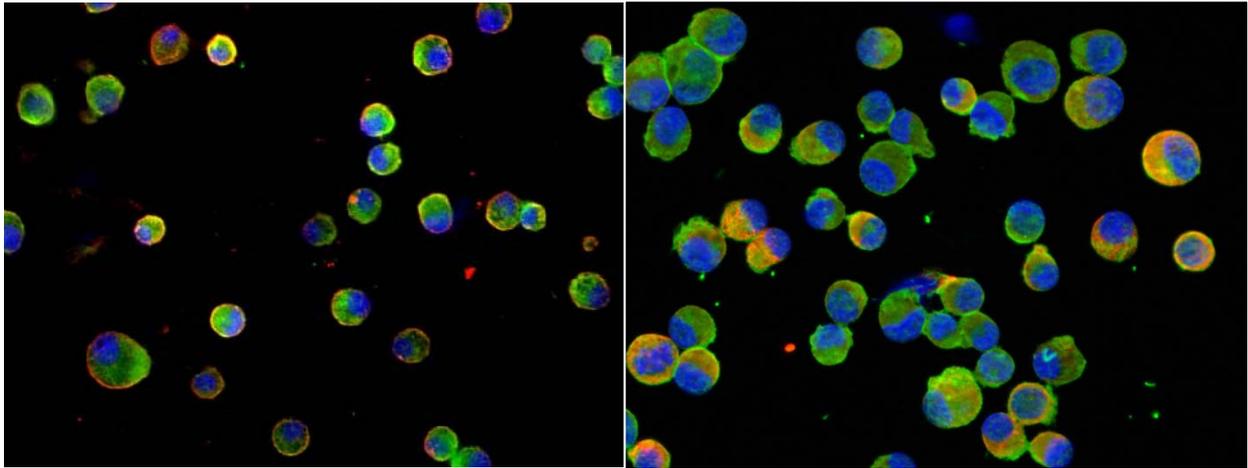


Abb. 2, links: Immunzytologie auf MDBK Zellen (Bovine Nierenzelllinie, mit der der BNP-assoziierte Impfstoff hergestellt wurde). Inkubation mit BNP-Überträgerkolostrum (angefärbt mit anti Rinder IgG1-FITC Antikörper, grün) und WGA-Lektin (rot angefärbt) zur Markierung der Zelloberfläche. Überlagernde Färbung an der Zellmembran (gelb), weitere positive Reaktionen im Zytoplasma (grün), Abb 2, rechts: Inkubation mit BNP-Überträgerkolostrum (angefärbt mit anti Rinder IgG1-FITC Antikörper, grün) und CD41 (rot angefärbt). Keine vollständig überlagernde Färbung zwischen BNP-Antikörper und Kandidat.

Die Bindung an CD41 konnte auf gereinigtem Protein (CD41 des Menschen) nicht bestätigt werden, da BNP-Überträgertiere bei diesem Screening nicht signifikant häufiger an CD41 banden als Negativkontrollen. Außerdem konnten wir CD41 zwar auf den MDBK-Zellen nachweisen (Abb. 2 rechts, CD41: rot), aber nicht in Pregsure detektieren. Das Expressionsmuster von CD41 überlagerte zudem nicht vollständig mit dem Bindungsmuster der BNP-Alloantikörper (Abb. 2 rechts; CD41 rot; BNP-Antikörper grün, Überlagerung gelb).

Die weitere Charakterisierung und Phänotypisierung der Alloantikörper mit Durchflusszytometrie bestätigte unsere immunzytologischen Daten (Assad et al., 2012), wonach die Alloantikörper unterschiedlich stark an verschiedene Lymphozytenpopulationen binden. Am häufigsten werden B-Zellen gebunden, am seltensten CD4⁺ T-Zellen bei den PBL, sowie alle Thrombozyten.

Der Isotyp des Alloantikörpers ist IgG1 (Assad et al., 2012), (das nach einer Th2-Antwort bei Rindern gebildet wird, s. Abb. 3) und der Antikörper wird nicht erst in der Milchdrüse gebildet, sondern findet sich auch im peripheren Blut der BNP-Rinder (Pardon et al., 2011). Das Zielantigen wird gleichbleibend exprimiert, weil die Bindung an Zellen junger Kälber (Abb. 3C) und adulter Rinder (Abb. 3D) gleich häufig und mit gleicher Intensität erfolgt. In unseren Assays kam es im Durchschnitt zu einer Bindung an 70 % der PBL und 100 % der Thrombozyten.

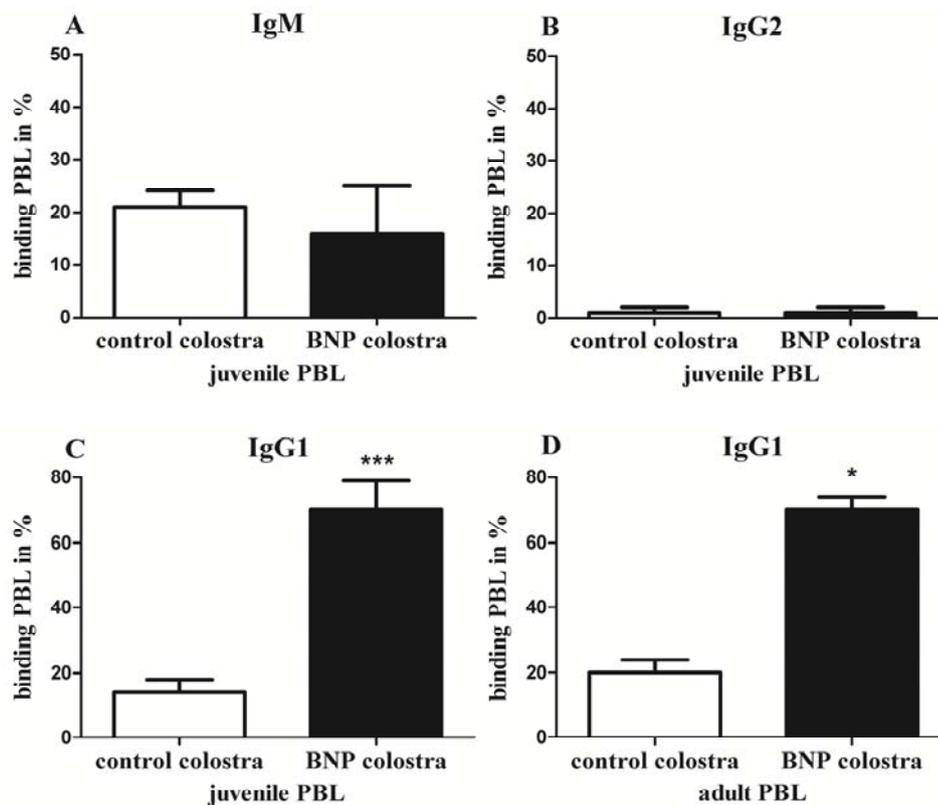


Abb. 3. Der Isotyp des BNP-Alloantikörpers ist IgG1. Das BNP-Alloantigen ist auf Zellen von Kälbern und erwachsenen Rindern gleich exprimiert (Assad et al., 2012).

Die drei Kandidaten 10473, 10476 und 10477 (Abb. 1) können momentan noch nicht verifiziert werden, weil keine entsprechenden Antigene zur Verfügung stehen, diese müssen also zunächst kloniert werden. Um zu entscheiden, welche kloniert werden, werden wir Genomdaten heranziehen, die vorher eine entsprechend vorhandene Isoform bei den BNP-Überträgern anzeigen können und das Vorhandensein der kanonischen Sequenz bei nicht betroffenen Rindern und der MDBK-Zelllinie.

Nach Absprache im Konsortium haben wir zusätzlich zu den geplanten Western Blots noch eine IP durchgeführt, nach der von der AG Rümenapf beschriebenen Methode. Aus diesem Ansatz erhielten wir eine große Zahl weiterer Kandidaten, die wir jetzt nach ihrer Funktion, dem Expressionsmuster und dem Abgleich mit den im Impfstoff von uns identifizierten Proteinen auf drei interessante Kandidaten einengen konnten.

3.2 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Mit unseren Untersuchungen konnten wir klar zeigen, dass die Immunisierung von Rindern mit einem mit einer autologen Zelllinie kontaminierten Impfstoff bei einigen prädisponierten Rindern eine langlebige und aggressive Immunantwort gegen mehrere Alloantigene ausgelöst hat. Der Auslöser für diese Alloantikörperbildung ist die Zusammensetzung des verursachenden BVD-Impfstoffes. Zum einen wurde für die Produktion eine autologe Zelllinie verwendet und der Impfstoff bei der Herstellung hochgradig mit dieser Rindernierenzelllinie kontaminiert (Euler et al., 2013), zum anderen enthielt der Impfstoff ein neues, vorher noch nicht eingesetztes Adjuvans. Die Impfstoffentwicklung ist häufig eine Gratwanderung zwischen einer erwünschten Aktivierung des Immunsystems, verbunden mit der Verabreichung eines Adjuvans, das dem Immunsystem „Gefahr“ signalisieren soll und der Vermeidung unerwünschter, gefährlich überschießender Immunreaktionen. Die hier aufgetretene Pathogenese ist ein warnendes Beispiel für die Impfstoffentwicklung in der Tiermedizin, hat aber als translationales Modell unserer Meinung nach auch eine große Bedeutung für die Humanmedizin. Eine dort auftretende, ähnliche Pathophysiologie hätte noch fatalere Auswirkungen für die geimpften Menschen. Wir haben mit unseren Studien nachgewiesen, dass die Alloantikörper IgG1 Isotypen sind und im peripheren Blut der Mutterkuh zirkulieren (und nicht lokal im Euter gebildet und von dort ins Kolostrum abgegeben werden). Das Kalb ist im Uterus vor diesen Antikörpern geschützt, weil es ohne IgG geboren wird und diese erst in den ersten beiden Lebenstagen über das Kolostrum supplementiert werden. Beim Menschen passieren IgGs problemlos die Plazentaschranke und würden das hämatopoetische System des Kindes in einer Phase im Mutterleib angreifen, in der kaum eine Chance bestünde therapeutisch einzugreifen. Da Menschen sehr langfristige immunologische Gedächtnisantworten produzieren, könnten solche Allo-Antikörper über Jahrzehnte bestehen und noch lange nach einer Schutzimpfung im Kindesalter schwerwiegende Komplikationen bei Schwangerschaften oder Bluttransfusionen verursachen. Für die Sicherheit bei der weiteren Impfstoffentwicklung und -herstellung ist es deshalb jetzt essenziell wichtig festzustellen, welche Faktoren (Impfstoffkomponente, Genetik und Immunreaktion empfänglicher Tiere) diese tödliche Alloantikörperbildung ausgelöst haben und welches targetierte Antigen letztlich zur BNP-Pathogenese führt, nicht zuletzt um das Vertrauen in den Nutzen von Impfungen zu erhalten.

4. Zusammenfassung

Die BNP wird durch Alloantikörper aus dem Kolostrum verursacht, die manche Rinder nach einer Impfung mit dem Pregsure BVD-Impfstoff bildeten. Diese Alloantikörper binden an Proteine, die auf Thrombozyten und Leukozyten vieler Kälber vorhanden sind (kanonische Sequenz) und bei den Überträgern nicht oder als Isoform. Die Antikörper sind sehr langlebig, auch im Plasma dieser Muttertiere vorhanden und vom Isotyp IgG1. Zum jetzigen Zeitpunkt ist noch unklar, ob die Kontamination des Impfstoffes mit der verwendeten autologen Nierenzelllinie MDBK oder die Verwendung des zum ersten Mal eingesetzten Adjuvans zur fehlgeleiteten Immunreaktion mancher Rinder führte. Die exakte Aufklärung der Pathogenese der Erkrankung ist nötig, um die BNP zu verstehen und solche Impf-assoziierte Erkrankungen bei Rindern, anderen Tieren und auch beim Menschen in Zukunft verhindern zu können. Dabei steht auch die Akzeptanz von Schutzimpfungen auf dem Spiel. Ein Schlüssel zum Verständnis der BNP ist die Identifikation des pathogenetisch relevanten Zielantigens. Mit Untersuchungen zur Spezifität der gebildeten Antikörper bei BNP-übertragenden Rindern konnten wir jetzt sechs potenzielle BNP-Antigen-Kandidaten identifizieren. Außerdem haben wir die entstehende Immunreaktion näher charakterisiert und damit weitere Hinweise zu den Eigenschaften des targetierten Proteins erhalten (Membranständige und intrazytoplasmatische Expression, prozentuale Verteilung auf PBL und Thrombozyten, Expression in der Hämatopoese).

5. Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen; ggf. mit Hinweisen zu weiterführenden Fragestellungen

Die Identifikation potenzieller Alloantigene ist mit den vorgeschlagenen Methoden und in der geplanten Zeit erreicht worden, erste Kandidaten (Thrombospondin-1 und CD41) hielten aber einer kritischen Überprüfung nicht stand. Die geplante immunologische Charakterisierung der Antikörperantwort ist gelungen. Jetzt müssen die weiteren Proteine getestet werden, diese müssen jedoch für die Etablierung der entsprechenden Tests erst hergestellt werden. Eine enger Abgleich mit den jetzt vorliegenden genetischen Daten hilft jetzt bei der Selektion der vielversprechendsten Kandidaten und dem möglichen Sequenzunterschied, denn die Lösung liegt ja in der Abweichung der Proteinsequenz bei den BNP-Überträgern und nicht in der kanonischen Sequenz. Wesentliche Fragen zur Pathophysiologie sind noch ungeklärt, zum Beispiel wie die Antikörper die Zielzellen schädigen oder eliminieren. Es gibt drei Möglichkeiten, zum einen eine erhöhte Eliminierung der Zielzellen aus der Zirkulation; eine Störung der Thrombozytenfunktion durch die Antikörperbindung oder ein negativer Einfluss auf die Thrombozytenbildung. Aus den bisher im Konsortium in verschiedenen Arbeits-

gruppen gewonnenen Daten ist die erhöhte Elimination unwahrscheinlich und es bleibt zu klären, ob die Thrombozytenfunktion oder die Produktion durch die Antikörperbindung gestört werden. Die Etablierung eines Zellkulturmodells wäre wünschenswert, denn es würde auch schnelle funktionelle Tests bezüglich des Zielantigens ermöglichen. Dabei würde man das Zielantigen in Kultur targetieren (mit einem Protein-spezifischen Antikörper) und die Auswirkungen auf die Thrombozyten, Leukozyten oder Knochenmarkszellfunktion zeigen, oder die Proteinexpression des Kandidaten reduzieren (z.B. mit siRNA) und die Rettung der Zellen zeigen.

6. Literaturverzeichnis

Assad, A., Amann, B., Friedrich, A., and Deeg, C.A. (2012). Immunophenotyping and characterization of BNP colostrum revealed pathogenic alloantibodies of IgG1 subclass with specificity to platelets, granulocytes and monocytes of all maturation stages. *Vet Immunol Immunopathol* 147, 25-34.

Bridger, P.S., Bauerfeind, R., Wenzel, L., Bauer, N., Menge, C., Thiel, H.J., Reinacher, M., and Doll, K. (2011). Detection of colostrum-derived alloantibodies in calves with bovine neonatal pancytopenia. *Vet Immunol Immunopathol* 141, 1-10.

Deeg, C.A., Pompetzki, D., Raith, A.J., Hauck, S.M., Amann, B., Suppmann, S., Goebel, T.W., Olazabal, U., Gerhards, H., Reese, S., *et al.* (2006). Identification and functional validation of novel autoantigens in equine uveitis. *Mol Cell Proteomics* 5, 1462-1470.

Euler, K.N., Hauck, S.M., Ueffing, M., and Deeg, C.A. (2013). Bovine neonatal pancytopenia-comparative proteomic characterization of two BVD vaccines and the producer cell surface proteome (MDBK). *BMC veterinary research* 9, 18.

Friedrich, A., Buttner, M., Rademacher, G., Klee, W., Weber, B.K., Muller, M., Carlin, A., Assad, A., Hafner-Marx, A., and Sauter-Louis, C.M. (2011). Ingestion of colostrum from specific cows induces Bovine Neonatal Pancytopenia (BNP) in some calves. *BMC veterinary research* 7, 10.

Garcia, A. (2007). Two-dimensional gel electrophoresis in platelet proteomics research. *Methods Mol Med* 139, 339-353.

Hauck, S.M., Dietter, J., Kramer, R.L., Hofmaier, F., Zipplies, J.K., Amann, B., Feuchtinger, A., Deeg, C.A., and Ueffing, M. (2010). Deciphering membrane-associated molecular processes in target tissue of autoimmune uveitis by label-free quantitative mass spectrometry. *Molecular & Cellular Proteomics* 9, 2292-2305.

Pardon, B., Stuyven, E., Stuyvaert, S., Hostens, M., Dewulf, J., Goddeeris, B.M., Cox, E., and Deprez, P. (2011). Sera from dams of calves with bovine neonatal pancytopenia contain alloimmune antibodies directed against calf leukocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 141, 293-300.

Rabilloud, T. (2002). Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but it still climbs up the mountains. *Proteomics* 2, 3-10.

Swadzba, M.E., Hirmer, S., Amann, B., Hauck, S.M., and Deeg, C.A. (2012). Vitreal IgM Autoantibodies Target Neurofilament Medium in a Spontaneous Model of Autoimmune Uveitis. *Investigative ophthalmology & visual science* 53, 294-300.

Ursachenermittlung bei der Bovinen Neonatalen Pancytopenie

Projektträger: Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE)
Förderkennzeichen: 2809HS025
Laufzeit: 01.09.2010 – 28.02.2013
Berichtszeitraum: 01.09.2010 – 28.02.2013

SCHLUSSBERICHT der Arbeitsgruppe Klee

Klinik für Wiederkäuer mit Ambulanz und Bestandsbetreuung

Ludwig-Maximilians-Universität München

Dr. med. vet. Carola Sauter-Louis, PhD, Prof. Dr. med. vet. Wolfgang Klee

Sonnenstr. 16, 85764 Oberschleißheim,

Tel.: 089/2180-78850, Fax: 089/2180-7885 E-Mail: c.s@lmu.de, klee@lmu.de

Ziele

Planung und Ablauf des Vorhabens

Eine detaillierte Umfrage unter Fallbetrieben sollte dazu beitragen, die möglichen Gründe für die Unterschiede in der BNP-Inzidenz zwischen betroffenen Betrieben aufzudecken. Des Weiteren sollte geklärt werden, ob sich Änderungen im Management auf die Inzidenz von BNP auswirken. Dazu sollten 100 Fall-Betriebe ausführlich befragt werden. In einem ersten Schritt wurden dazu alle Betriebe aus der Datenbank (n = 246) telefonisch nach dem Verlauf der Krankheit, der Gesamtanzahl der BNP-(Verdachts)fälle und dem Impfschema der letzten Jahre im Betrieb befragt. Auf der

Basis dieser Informationen wurden die Betriebe in solche mit hoher Inzidenz (geplant: die 50 Betriebe mit der höchsten Inzidenz) und solche mit niedriger Inzidenz eingeteilt (n=50; wozu auch Betriebe gezählt wurden, die nur Einzelfälle von BNP beobachteten). In einem zweiten Schritt wurden die Betriebe sehr detailliert mit einem Fragebogen zu Impfungen, Impfschemata, Versorgung der Kälber mit Kolostrum, und anderen Managementfaktoren befragt (geplant: persönliche Interviews mit den Landwirten; da jedoch viele Details bezüglich des Impfschemas und der verwendeten Impfstoffe nur dem Tierarzt bekannt waren, wurde der Fragebogen postalisch an die Landwirte geschickt und telefonisch mit dem Hof-tierarzt und wenn nötig mit dem Landwirt noch offene Fragen beantwortet). Die Landwirte erteilten Zugang zur HI-Tier-Datenbank, wodurch objektive Zahlen zur Mortalität im Betrieb erhalten werden konnten.

Gemäß einer Fall-Kontroll-Studie sollten die zwei Inzidenz-Gruppen miteinander verglichen werden.

Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Vorausgegangene epidemiologische Erhebungen zeigten erhebliche Unterschiede in der Inzidenz der BNP zwischen betroffenen Betrieben. Während in der Mehrzahl der Betriebe nur einzelne Fälle registriert wurden, waren in anderen bis zu 70 Kälber betroffen. Es war jedoch zum damaligen Zeitpunkt nicht klar, wodurch diese Unterschiede bedingt sein könnten.

Material und Methoden

Die erste telefonische Befragung von insgesamt 253 Betrieben, deren Daten in der Datenbank der Klinik für Wiederkäuer gespeichert waren, fand von 1.12.2010 bis 30.3.2011 statt. Die meisten Betriebe hatten nur einen Fall (n=81) oder zwei Fälle (n=52) in den vorangegangenen Jahren. Es gab jedoch auch Betriebe, die mehr als 15 betroffene Kälber hatten. Nach Berechnung der Inzidenz aller befragten Betriebe ergab sich eine Einteilung in 54 Betriebe mit hoher Inzidenz (> 6,5 %) und 197 Bestände mit niedriger Inzidenz (≤ 6,5 % oder Einzelfälle). Für die Studie wurden die 50 Betriebe mit der höchsten Inzidenz und 50 zufällig ausgewählte Betriebe mit niedriger Inzidenz ausgewählt. Da der Fragebogen sehr ausführlich

war, bedeutete dies für die Landwirte einen hohen zeitlichen Aufwand (bis zu 4 Stunden pro Betrieb), weshalb den Landwirten eine Aufwandsentschädigung zugesagt wurde. Nur dadurch war eine einigermaßen akzeptable Beteiligung der Landwirte zu gewährleisten. Letztlich waren nur 35 Betriebe mit hoher Inzidenz bereit, den ausführlichen Fragebogen auszufüllen. Somit wurden 35 Betriebe mit hoher BNP-Inzidenz und 49 Bestände, die eine niedrige BNP-Inzidenz aufwiesen, hinsichtlich der BVD-Impfung, des Kolostrummanagements und der Kälbergesundheit vergleichend untersucht.

In den näher untersuchten 84 BNP-Betrieben wurden zwischen 2005 und 31.08.2011 insgesamt 521 BNP-/BNP-Verdachtsfälle dokumentiert. Bei 298 wurde BNP durch eine Blutuntersuchung und/oder Sektion bestätigt. Die restlichen Verdachtsfälle waren nicht untersucht.

Ergebnisse

Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse

Nachdem eine Publikation über die Ergebnisse in dieser Studie in Vorbereitung ist, möchten wir Sie bitten, die folgenden Ergebnisse nicht auf Ihrer Homepage zu veröffentlichen.

Insgesamt ist von einem hohen ‚Underreporting‘ auszugehen, da die Anzahl der ‚BNP‘-Fälle, die von den Landwirten in der telefonischen Befragung genannt wurde, wesentlich höher war, als die tatsächlich bis dahin an die Klinik oder ans Paul-Ehrlich-Institut gemeldeten Fälle.

Kälber verschiedener Rassen und beider Geschlechter waren betroffen.

Insgesamt 8,6 % der von den Landwirten beobachteten ‚BNP‘-Kälber überlebten die Erkrankung. Der Anteil der BNP-Mütter betrug in Betrieben mit niedriger Inzidenz zwischen 1 und 16 %, in Beständen mit hoher Inzidenz zwischen 7 und 40 %. In beiden Inzidenzgruppen hatte der Großteil der BNP-Mütter lediglich ein Kalb, das an BNP erkrankte. Dies könnte daran liegen, dass auf Grund der Altersstruktur der Herden die Kühe oft nur noch 1-3 Kälber in der Herde produzieren. Die meisten BNP-Kälber wurden zwischen der ersten und vierten Kalbung geboren. Aufgrund des Auftretens von BNP wurden bis zu 15 Kühe pro Bestand geschlachtet.

Landwirte aus Betrieben mit hoher Inzidenz setzten das Erstkolostrum häufiger und über eine größere Anzahl von Mahlzeiten ein als Landwirte der Gruppe mit niedriger Inzidenz. Ein erhöhtes Risiko für eine hohe BNP-Inzidenz entstand auch durch die Verfütterung von Mischkolostrum. Das Volumen pro Mahlzeit und die Dauer der Biestmilchversorgung (Erstkolostrum und nachfolgende Gemelke) unterschieden sich zwischen den beiden Inzidenzgruppen nicht voneinander.

In 30 der 35 Betriebe mit hoher Inzidenz wurde das Kolostrummanagement dahingehend umgestellt, dass BNP-Kolostrum entsorgt und Nachkommen der BNP-Mütter mit Biestmilch anderer Kühe aus dem eigenen Bestand oder in Einzelfällen aus einem Nachbarbetrieb versorgt wurden. In acht dieser Betriebe wurden seitdem keine neuen BNP-Fälle beobachtet, 22 Betriebsleiter registrierten erneut Fälle von BNP. Drei Landwirte hatten alle BNP-Mütter

verkauft und zwei, die weiterhin BNP-Kolostrum einsetzten, registrierten keine neuen Fälle mehr. 16 Betriebsleiter der Gruppe mit niedriger Inzidenz hatten alle BNP-Mütter aus dem Bestand entfernt. Von 19 Betriebsleitern, die eine Veränderung der Kolostrumversorgung eingeführt hatten, beobachteten elf keine weiteren BNP-Kälber mehr. 14 verfütterten weiterhin BNP-Kolostrum an Kälber, woraufhin in vier Betrieben erneut BNP-Fälle von bereits bekannten BNP-Müttern auftraten.

Das Schema der BVD-Impfung unterschied sich zwischen den Inzidenzgruppen dahingehend, dass in Betrieben mit niedriger Inzidenz häufiger keine Grundimmunisierung durchgeführt wurde, der Abstand der beiden Impfungen der Grundimmunisierung häufig größer war als in Betrieben mit hoher Inzidenz und dass ein höherer Anteil der Landwirte aus der Gruppe mit niedriger Inzidenz Rinder bereits ab einem Alter von drei Monaten grundimmunisieren ließ. In Beständen mit hoher Inzidenz wurde PregSure® BVD tendenziell länger eingesetzt und BNP-Mütter aus diesen Betrieben waren häufiger mit der Vakzine geimpft als solche aus Betrieben mit niedriger Inzidenz. Es wurden BNP-Mütter registriert, die vier Jahre nach der letzten Impfung mit PregSure® BVD das erste BNP-Kalb geboren hatten.

Es ergaben sich Hinweise, dass nicht nur aufgrund des Totalverlustes verendeter BNP-Kälber, sondern auch infolge der Zunahme der Inzidenz von Kälberkrankheiten und deren notwendige Behandlungen, den Landwirten aus BNP-Betrieben ein nicht unerheblicher Schaden entstehen kann.

Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Das Ergebnis, dass es ein erhebliches Underreporting der Fälle gab, lässt darauf schließen, dass die offiziellen Zahlen über das Auftreten von nicht-meldepflichtigen Krankheiten wie BNP keine zuverlässigen Angaben sind, und demzufolge auch keine Rückschlüsse auf die tatsächliche wirtschaftliche Bedeutung für die Landwirtschaft zulassen.

Betriebe mit hoher Inzidenz verzeichneten seit dem Auftreten von BNP eine höhere Anzahl von Behandlungen bei Kälbern bis zu einem Alter von vier Wochen. Dies lässt darauf schließen, dass wirtschaftliche Einbußen in betroffenen Betrieben nicht nur durch den Verlust von an BNP verendeten Kälbern entstehen, sondern auch durch eine erhöhte Erkrankungsinzidenz aufgrund der subklinischen Form der BNP, sowie den daraus folgenden Behandlungskosten und durch die vorzeitige Ausmerzungen der betroffenen Kühe.

Die gefundenen Unterschiede in den verwendeten Impfschemata zwischen der Betriebsgruppe mit hoher im Vergleich zur Betriebsgruppe mit niedriger BNP-Inzidenz deuten darauf hin, dass die wiederholte Impfung mit PregSure® BVD einen erheblichen Einfluss auf die Entstehung von BNP hat.

Abgrenzung zu anderen Publikationen zum Thema BNP

Anfang 2012 wurde eine Publikation aus der Klinik für Wiederkäuer mit dem Titel „Case control study to investigate risk factors for bovine neonatale pancytopenia in young calves in southern Germany“ (Sauter-Louis et al., 2012) veröffentlicht. Dabei handelt es sich um die schon im Antrag beschriebene Studie, die von der Firma Pfizer Animal Health finanziert wurde. Im Antrag unter 4.4. auf Seite 16/17 steht: „In unserer Datenbank sind derzeit 396 als gesichert angesehene Fälle aus 246 Betrieben gespeichert. Zur Ermittlung weiterer potenzieller Risikofaktoren wurde eine von der Pfizer GmbH unterstützte Fall-Kontrollstudie durchgeführt, in deren Rahmen die Leiter von 56 betroffenen Betrieben und von 100 Kontrollbetrieben interviewt wurden (Auswertung läuft).“ Die Daten aus der Datenbank waren die Grundvoraussetzung für die Durchführbarkeit der beantragten Studie. Ohne die Adressen und die Informationen zum Vorliegen von BNP in den einzelnen Betrieben hätte man keine Fall-Kontroll-Studie dieser Art durchführen können.

Eine Mitbeteiligung an der Publikation von Kasonta et al. (2012) ergab sich durch die räumlichen Auswertungen der BNP-Fälle, die auch von der Klinik für Wiederkäuer, aber auch von den Tierärzten und Landwirten an das Paul-Ehrlich-Institut gemeldet wurden.

Darstellung und Anwendung der Ergebnisse für Zwecke des BMELV

Aus den Ergebnissen der Studie können folgende Punkte als Empfehlungen für betroffene Landwirte abgeleitet werden:

Kolostrum von Kühen, die schon einmal ein BNP-Kalb hatten, sollte nicht mehr verfüttert werden, sondern verworfen werden. Nachfolgende Kälber von BNP-Kühen sollten mit Kolostrum von Kühen, die nicht mit PregSure® BVD geimpft wurden, versorgt werden.

Mischkolostrum sollte bei der Versorgung von Kälbern vermieden werden, da sich dadurch das Risiko für das Auftreten von BNP erhöht.

Zusammenfassung

Eine Fall-Kontroll Studie wurde mit 35 Betrieben mit hoher BNP-Inzidenz (>6,5 % der Kälber betroffen) und 49 Betrieben mit niedriger BNP-Inzidenz (\leq 6,5 % der Kälber betroffen; letztere wurden zufällig ausgewählt) durchgeführt. Die Betriebe wurden zwischen dem 01.02. und dem 31.08.2011 mittels eines detaillierten Fragebogens zu den auftretenden BNP-Fällen, zu Impfungen gegen BVD, den Impfschemata und zu allgemeinen Managementfaktoren befragt. Der Fragebogen wurde den Landwirten zugesandt und offene Fragen nach Erhalt des Fragebogens noch telefonisch abgeklärt. Daten zu Impfungen und Impfschemata wurden ebenfalls beim Hoftierarzt telefonisch erfragt.

Landwirte aus Betrieben mit hoher Inzidenz setzten das Erstkolostrum häufiger und über eine größere Anzahl von Mahlzeiten ein als Landwirte aus Betrieben mit niedriger Inzidenz. Auch wurde in den Betrieben mit hoher Inzidenz häufiger Mischkolostrum eingesetzt als in

Betrieben mit niedriger Inzidenz. Betriebsleiter aus Betrieben mit hoher Inzidenz ließen häufiger eine Grundimmunisierung gegen BVDV bei ihren Tieren durchführen als Betriebsleiter von Betrieben mit niedriger Inzidenz, wobei der zeitliche Abstand zwischen den zwei Impfungen der Grundimmunisierung bei Betrieben mit niedriger Inzidenz häufiger größer war als in Betrieben mit hoher Inzidenz. In Betrieben mit hoher Inzidenz wurde PregSure® BVD tendenziell länger eingesetzt.

Aus diesen Ergebnissen ergibt sich ein weiterer Hinweis auf die Beteiligung von PregSure® BVD an der Entstehung von BNP, und es lassen sich Empfehlungen für die Versorgung von Kälbern von bereits betroffenen BNP-Kühen ableiten: diese Kälber sollten mit Kolostrum von nicht-PregSure® BVD-geimpften Kühen versorgt werden, und der Einsatz von Mischkolostrum sollte vermieden werden.

Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen, ggf. mit Hinweisen auf weiterführende Fragestellungen

Die vorgegebenen Ziele wurden erreicht – aus der Studie ergeben sich direkt keine zusätzlichen Fragestellungen.

<i>Geplante Ziele</i>	<i>Erreichte Ziele</i>
Vergleich von Betrieben mit hoher BNP-Inzidenz mit solchen mit niedriger BNP-Inzidenz bezüglich Impfschemata, Impfungen, Versorgung der Kälber mit Kolostrum und allgemeiner Managementfaktoren	Alle Punkte wurden ausgewertet, sowohl bei den Impfungen, als auch beim Kolostrum-Management ergaben sich Unterschiede zwischen den zwei Betriebsgruppen.

Literaturverzeichnis

Kasonta, R., Sauter-Louis, C., Holsteg, M., Duchow, K., Cussler, K., Bastian, M. (2012) Effect of the vaccination scheme on PregSure® BVD induced alloreactivity and the incidence of Bovine Neonatale Pancytopenia. *Vaccine* 30: 6649-55.

Sauter-Louis, C., Carlin, A., Friedrich, A., Assad, A., Reichmann, F., Rademacher, G., Heuer, C., Klee, W. (2012) Case control study to investigate risk factors for bovine neonatale pancytopenia in young calves in southern Germany. *Preventive Veterinary Medicine* 105: 49-58.

Adressenverzeichnis

FU Berlin

Prof. Dr. med. vet. Kerstin E. Müller, Dr. med. vet. Corinna N. Weber
Klinik für Klautiere, Königsweg 65, 14163 Berlin
Tel.: 030/83862261, -83862282, Fax: 030/83862512
E-mail: mueller.kerstin@vetmed.fu-berlin.de, ceweb@zedat.fu-berlin.de

FBN Dummerstorf

Priv.-Doz. Dr. Christa Kühn, Leibniz-Institut für Nutztierbiologie (FBN)
FB Molekularbiologie,
Wilhelm-Stahl-Allee 2, D-18196 Dummerstorf
Tel.: 038208-68709, Fax 038208-68702, E-mail: kuehn@fbn-dummerstorf.de

JLU Gießen

Priv.Do. Dr. med. vet. Natali Bauer, Prof. Dr. med. vet. Andreas Moritz
Klinik für Kleintiere (Innere Medizin, Zentrallabor),
Frankfurter Str. 126, 35392 Gießen
Tel: 0641/99-38663, Fax: 0641/99-38609
E-Mail: natalie.bauer@vetmed.uni-giessen.de, Andreas.Moritz@vetmed.uni-giessen.de

Prof. Dr. med. vet. Rolf Bauerfeind
Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere
Frankfurter Str. 85-89, 35392 Gießen
Tel: 0641/99-38300, Fax: 0641/99-38309, E-Mail: Rolf.Bauerfeind@vetmed.uni-giessen.de

Prof. Dr. med. vet. Klaus Doll
Klinik für Wiederkäuer und Schweine
Frankfurter Str. 110, 35392 Gießen,
Tel: 0641/99-38670, Fax: 0641/99-38679, E-Mail: Klaus.Doll@vetmed.uni-giessen.de

Prof. Dr. med. vet. Manfred Reinacher
Institut für Veterinär-Pathologie
Frankfurter Str. 96, 35392 Gießen,
Tel: 0641/99-38200, Fax: 0641/99-38209
E-Mail: Manfred.Reinacher@vetmed.uni-giessen.de

Prof. Dr. med. vet. Heinz-Jürgen Thiel,
Institut für Virologie, Fachbereich Veterinärmedizin,
BFS Schubertstraße 81, 35392 Giessen
Tel. 0641/9938350, Fax: 0641/99-38359
Heinz-Juergen.Thiel@vetmed.uni-giessen.de

Prof. Dr. med. vet. Till Rümenapf,
Institut für Virologie, Veterinärmedizinische Universität Wien
Veterinärplatz 1, A-1210 Wien
Tel. 0043 (1) 25077-2311
E-mail: Till.H.Ruemenapf@vetmeduni.ac.at

TiHo Hannover

Prof. Dr. med. vet. Ottmar Distl, Institut für Tierzucht und Vererbungsforschung
Bünteweg 17p, 30559 Hannover
Tel: 0511/953-8875, Fax: 0511/953-8582, E-Mail: ottmar.distl@tiho-hannover.de

Prof. Dr. med. vet. Martin Kaske, Klinik für Rinder
Bischofsholer Damm 15, 30173 Hannover
Tel. 0511-856-7309, Fax: 0511-856-7693, E-Mail: martin.kaske@tiho-hannover.de

Prof. Dr. med. vet. Martin Ganter, Klinik für kleine Klautiere
Bischofsholer Damm 15, 30173 Hannover
Tel.: 0511-856-7620 Fax: 0511-856-7684, E-Mail: martin.ganter@tiho-hannover.de

Prof. Dr. med. vet. Ludwig Haas u. Prof. Dr. med. vet. Beatrice Grummer, Zentrum für Infektionsmedizin, Institut für Virologie, Bünteweg 17, 30559 Hannover
Tel.: 0511-953-8860 + 0511-953-8845, Fax: 0511-953-8898
E-Mail: ludwig.haas@tiho-hannover.de, E-Mail: beatrice.grummer@tiho-hannover.de

Prof. Dr. med. vet. Wolfgang Baumgärtner, PhD, Institut für Pathologie
Bünteweg 17, 30559 Hannover, Tel.: 0511-953-8620, Fax: 0511-953-8675
E-Mail: wolfgang.baumgaertner@tiho-hannover.de

LMU München

Prof. Dr. med. vet. Cornelia Deeg, Lehrstuhl für Physiologie,
Veterinärwissenschaftliches Department, Ludwig-Maximilians-Universität München
Veterinärstr. 13, 80539 München
Tel: 089/2180-1630, -5889, -2524, Fax: 089/2180-2554
E-mail: deeg@tiph.vetmed.uni-muenchen.de

Dr. med vet. Carola Sauter-Louis, PhD, Prof. Dr. med. vet. Wolfgang Klee
Klinik für Wiederkäuer mit Ambulanz und Bestandsbetreuung
Sonnenstr. 16, 85764 Oberschleißheim,
Tel.: 089/2180-78850, Fax: 089/2180-7885 E-Mail: c.s@lmu.de, klee@lmu.de