

Aus dem Zentrum für klinische Tiermedizin
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. Rüdiger Wanke

Angefertigt am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
(Prof. Dr. Mathias Büttner)

Bovine neonatale Panzytopenie: Laborexperimentelle Untersuchungen im Rahmen der Ursachenforschung

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Daniela Schumann
aus Nürnberg

München 2011

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Wanke

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Pfister

Tag der Promotion: 30. Juli 2011

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I.	Einleitung	1
II.	Literaturübersicht	3
1	Überblick zur bovinen neonatalen Panzytopenie	3
1.1	Epidemiologie	3
1.2	Klinische Symptome	5
1.3	Hämatologische Befunde	6
1.4	Pathologie	6
1.5	Histopathologische Untersuchungen	7
1.6	Fütterungsversuche zur Rolle von Kolostrum in der Auslösung von BNP	8
2	Krankheiten mit Panzytopenie und Pathologie im Knochenmark	11
2.1	Bei Wiederkäuern	11
2.1.1	Nicht-infektiöse Ursachen.....	11
2.1.2	Beschreibung idiopathischer Einzelfälle aus der Literatur	16
2.1.3	Infektiöse Ursachen.....	17
2.2	Infektiöse Ursachen bei anderen Tierarten	18
2.3	Beispiele von Panzytopenie mit Pathologie im Knochenmark beim Menschen.....	21
3	Mechanismen zur Entstehung von Autoimmunreaktionen.....	23
3.1	Grundlegende Mechanismen	23
3.2	Langlebige Plasmazellen	25
4	Zusammenfassung bisheriger Forschungsergebnisse zur Aufklärung von BNP	26
5	Zielsetzung	27
III.	Material und Methoden	28
1	Probenmaterial	28

1.1	Kolostrumproben.....	28
1.2	Blutproben.....	30
1.3	Organproben aus der Pathologie	31
2	Labormaterial.....	32
2.1	Zellen	32
2.2	Viren.....	32
2.3	Chemikalien, Reagenzien, Nährmedien.....	33
2.4	Antikörper.....	36
2.5	Puffer und Lösungen.....	38
2.6	Kits.....	39
2.7	Primer und Fragmentgrößen.....	40
2.8	Geräte und Laborhilfsmittel	40
2.9	Software.....	43
2.10	Verbrauchsmaterial.....	43
3	Methoden.....	45
3.1	Virologische Methoden.....	45
3.1.1	Virologische Diagnostik	45
3.1.2	Nachweis von Circovirus-Genom mit einer PCR nach HALAMI et al. (2008)	49
3.2	Bearbeitung von venösem peripheren Blut	54
3.3	Auftrennung und Nachweis kolostraler Proteine	55
3.3.1	Vorbereitung von Kolostrum	55
3.3.2	Gelfiltrationschromatographie.....	56
3.3.3	ELISA zum Nachweis von Immunglobulinen.....	57
3.3.4	Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	58
3.4	Durchflusszytometrie	60

3.4.1	Darstellung von bovinen Leukozytensubpopulationen durch Oberflächenmarkierungen	60
3.4.2	Bindungstests mit kolostralem IgG	64
3.4.3	Toxizitätstests von BNP-Proben auf Leukozyten.....	67
3.4.4	Versuche zum Nachweis einer Bindungsreduktion von kolostralem IgG	71
IV.	Ergebnisse.....	74
1	Virologische Untersuchungen.....	74
1.1	BTV-Antikörper Nachweis	74
1.2	Nachweis von Circovirus-Genom.....	75
1.3	BVDV-Genom Nachweis.....	77
1.4	Chiphybridisierung	77
2	Leukozytopenie bei BNP-Kälbern.....	78
3	Fraktionierung von Kolostrum.....	82
3.1	Separation von kolostralen Proteinen aus Kolostrals Serum.....	82
3.2	Nachweis von Immunglobulinen, Proteinen und BVDV-Antikörpern	83
3.2.1	Identifizierung von Immunglobulinen	83
3.2.2	Bestimmung der IgG-Konzentration in Peakfraktion 2.....	85
3.2.3	Proteinnachweis in den Peakfraktionen 1 bis 4	87
3.2.4	Nachweis von BVDV-Antikörpern.....	89
4	Bindung von IgG aus BNP-Kolostrum an bovine Zellen	89
4.1	IgG-Bindung an Leukozyten.....	89
4.2	IgG Bindung an BK-KL3A- und MDBK-Zellen	96
5	Toxizitätsprüfung von BNP-Proben.....	101
5.1	Einfluss von Serumproben auf die Zellvitalität	101
5.2	Einfluss von kolostralen Proteinen auf die Zellvitalität	102
5.3	Toxizitätsprüfung mit Komplementzusatz.....	106

6	IgG-Bindungsreduktion	108
6.1	MHC-Klasse I-reaktive monoklonale Antikörper.....	108
6.2	Bindungsreduktion nach Vorinkubation mit Viruszellkulturextrakt von Pestiviren	109
V.	Diskussion.....	114
1	Virologische Untersuchungen.....	114
2	Vergleich der peripheren Leukozytensubpopulationen von BNP-Kälbern und gesunden Kälbern.....	115
3	Identifikation von kolostralen Immunglobulinen und Proteinen.....	117
4	Reaktivität von IgG aus BNP-Kolostrum mit bovinen Zellen	119
5	Zellzerstörende Wirkung von Immunglobulin aus BNP-Proben	121
6	IgG-Bindungsreduktion	124
6.1	MHC-Klasse I als möglicher zellulärer Ligand für IgG _{BNP}	125
6.2	Bindungsreduktion durch Vorinkubation von IgG _{BNP} mit Pestivirus Zellkulturextrakt	126
7	Bildung autoreaktiver IgG-Antikörper.....	128
7.1	Zelluläre Liganden für IgG _{BNP}	128
7.2	Möglicher Einfluss einer genetischen Prädisposition	131
7.3	Mögliche Rolle des Impfstoffes	132
7.4	Entstehung von Autoimmunität	135
7.5	Problematik langlebiger Plasmazellen	136
VI.	Zusammenfassung	137
VII.	Summary	139
VIII.	Literaturverzeichnis.....	141
IX.	Anhang	155
1	Tabellenverzeichnis	155
2	Abbildungsverzeichnis	157

3	Detaillierte Daten zur Bindung der IgG _{BNP} -Proben an die Leukozyten gesunder Kälber	161
4	Detaillierte Daten zur Bindung von IgG _{BNP} an bovine Zelllinien	164
4.1	Bindung an BK-KL3A Zellen	164
4.2	Bindung an MDBK-Zellen.....	167
X.	Danksagung	170

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

7-AAD	7-Aminoactinomycin D
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
Aqua dest.	Aqua destillata
BK-KL3A	<i>Bovine kidney cells</i>
BNP	Bovine neonatale Panzytopenie
BNP-Kälber	Kälber, die an BNP erkrankt sind
BNP-Kolostrum	Kolostrum einer Kuh, die ein Kalb mit BNP geboren hat
BNP-Mutter	Kuh, die ein Kalb mit BNP geboren hat
bp	Basenpaar
BPV	Bovines Parvovirus
BTV	<i>Bluetongue Virus</i> (Blauzungenvirus)
BVD	Bovine Virusdiarrhö
BVDV	Bovines Virusdiarrhö Virus
bzw.	beziehungsweise
CAV	<i>Chicken anemia virus</i> (Virus der Kükenanämie)
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
ConA	Concanavalin A
cp	zytopathogen
CPV	Kanines Parvovirus
CV	Circovirus
d	Tage
DCVC	S-(1,2-dichlorvinyl)-L-Cystein
DEFRA	<i>Department for Environment, Food and Rural Affairs</i>
DENV	Denguevirus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECF	<i>East Coast Fever</i> (Ostküstenfieber der Rinder)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EHDV	<i>Epizootic haemorrhagic disease virus</i> (Virus der epizootischen Hämorrhagie der Hirsche)
EK	Extraktionskontrolle
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
ESP	Europäische Schweinepest
ESPV	Virus der europäischen Schweinepest
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FBS	Fötales bovines Serum
FITC	Fluorescein
FNAIT	Fötale/neonatale alloimmune Thrombozytopenie
for	<i>forward</i>
FPV	Felines Parvovirus
FSC	<i>Forward Scatter</i> (Vorwärtsstreulicht)
HCl	Chlorwasserstoff

HEF	Hühnerembryo-Fibroblasten
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HLH	Hämophagozytische Lymphohistiozytose
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IgG ⁺	Zellen, an die IgG gebunden hat
IgG _{BNP}	IgG aus dem Kolostrum einer BNP-Mutter
IgG _{Kontr}	IgG aus dem Kolostrum einer Kontroll-Mutter
IgM	Immunglobulin M
IL	Interleukin
IZ	Inkubationszeit
kB	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KHCO ₃	Kaliumhydrogenkarbonat
KID ₅₀	Kulturinfektiöse Dosis 50
Kontr	Kontrolle
Kontrollkälber	gesunde Kälber
Kontrollkolostrum	Kolostrum einer Kuh, die ein gesundes Kalb geboren hat
Kontrollmutter	Kuh, die ein gesundes Kalb geboren hat
KVN	Kein Virusgenomnachweis
LGL	Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
LVG	Lehr- und Versuchsgut der LMU München
LZS	Leukozytensuspension
MCP	<i>Membrane cofactor protein</i> (Membrankofaktorprotein)
MDBK	<i>Madin Darby bovine kidney cells</i>
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> (Haupthistokompatibilitätskomplex)
min	Minute
n	Probenanzahl
n.v.	nicht verfügbar
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
ncp	nicht zytopathogen
neg	Zellen, an die kein IgG gebunden hat
NEG	Negativ
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
NK	Negativkontrolle
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
O.D.	<i>Optical density</i> (Optische Dichte)

p	Irrtumswahrscheinlichkeit
p.a.	pro analysi
pAK	Primärer Antikörper
PBFDV	<i>Beak and feather disease virus</i> (Virus der Schnabel- und Federkrankheit der Papageien)
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i> (Periphere mononukleäre Blutzellen)
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (mit Phosphat gepufferte Salzlösung)
PBS _o	<i>Phosphate buffered saline</i> , ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PCV	Porzines Circovirus
PE	Phycoerythrin
PF	Peakfraktion
PK15	<i>Porcine kidney 15 cells</i>
PK	Positivkontrolle
POS	Positiv
QSA	Qualitätssichernde Anweisung
RVC	<i>Royal Veterinary College</i>
RE	Relative Einheiten
rev	<i>reverse</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	reverse Transkription
RaT	Raumtemperatur
s	Sekunde
sAK	Sekundärer Antikörper
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> (Polyacrylamidgelelektrophorese mit Natriumdodecylsulfat)
SSC	<i>Side Scatter</i> (Seitwärtsstreulicht)
TLR	<i>Toll-like</i> Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
Tr1-Zellen	T-regulatorische Zellen vom Phänotyp 1
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vgl.	vergleiche
\bar{x}	arithmetischer Mittelwert

I. Einleitung

Seit 2006 wurden in Deutschland und anderen europäischen Ländern vermehrt Kälber mit einer ungewöhnlichen Blutungsneigung beobachtet (FRIEDRICH et al., 2009; PARDON et al., 2010). Das Syndrom wird als bovine neonatale Panzytopenie (BNP) bezeichnet.

Charakteristisch für die Krankheit sind innere und äußere Hämorrhagien, sowie eine Zellreduktion bis hin zur vollkommenen Abwesenheit der blutbildenden Zellen im Knochenmark. Im Blutbild findet sich eine Leukozytopenie, welche den schweren Verlauf von Begleiterkrankungen erklärt, sowie eine hochgradige Thrombozytopenie, die für die gesteigerte Blutungsneigung verantwortlich zu sein scheint (FRIEDRICH et al., 2009; PARDON et al., 2010). Oftmals ist ein hämorrhagischer Darminhalt zu finden und in der histopathologischen Untersuchung zeigt sich, dass die roten Blutzellen aus den Gefäßen austreten, obwohl die Gewebearchitektur intakt ist. Zudem zeigt sich eine massive Zelldepletion in allen lymphoiden Geweben (PARDON et al., 2010). Die Krankheit tritt oft im Alter von zwei bis drei Wochen auf und die Kälber versterben in den meisten Fällen innerhalb weniger Tage (FRIEDRICH et al., 2009). Neben den klinischen Fällen wird noch eine größere Zahl an subklinischen Fällen vermutet (PARDON et al., 2010).

Schnell wurden bekannte virale, bakterielle und toxische Ursachen durch Routinediagnostik ausgeschlossen und noch immer war keine Ätiologie bekannt (PARDON et al., 2010).

Epidemiologische Erhebungen ergaben als einzige Gemeinsamkeit, dass nahezu alle BNP-Mütter mit einem im Jahr 2004 neu auf den Markt (TEICH, 2006) gekommenen, inaktivierten Impfstoff gegen das bovine Virusdiarrhö Virus (BVDV) (PregSure-BVD®, Pfizer) geimpft wurden (FRIEDRICH et al., 2009). Dieser wurde mittlerweile in ganz Europa vom Markt genommen (FRIEDRICH et al., 2011).

Da es Hinweise auf einen Zusammenhang von BNP mit der Kolostrumaufnahme gab, führte die Klinik für Wiederkäuer der LMU München in Zusammenarbeit mit dem Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit einen Kolostrumfütterungsversuch mit sechs Kälbern durch. Dabei wurden die Tiere direkt nach der Geburt von ihren Müttern getrennt und bekamen statt deren

Kolostrum Kolostren von Müttern, die bereits mindestens ein BNP-Kalb geboren hatten. Letztendlich entwickelten drei der Kälber Symptome von BNP (FRIEDRICH et al., 2011). BRIDGER et al. (2010) wiesen vor kurzem die Bindung von IgG-Antikörpern aus dem Serum von BNP-Müttern an die Leukozyten von gesunden, neugeborenen Kälbern nach. Außerdem konnte eine Bindung der gleichen Antikörper an die Leukozyten von Kälbern nach der Verfütterung von BNP-Kolostrum ihrer Mütter nachgewiesen werden. Diese Versuche lassen eine Verbindung zwischen der Kolostrumaufnahme und der Entwicklung von BNP sehr wahrscheinlich erscheinen.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag in der Analyse von Kolostrumproben von BNP-Müttern. Ziel war die Identifizierung eines Agens, das im Vergleich zu Kolostrum von gesunden Mutterkühen signifikante Unterschiede aufweist. Durch die Auftrennung der kolostralen Proteine mithilfe der Gelchromatographie gelang die Separation und Identifizierung von IgG. Diese IgG-Antikörper wurden für weitere Versuche verwendet. Nachdem eine Bindung von IgG aus BNP-Kolostrum (IgG_{BNP}) an bovine Zellen nachgewiesen werden konnte, wurden weitere Versuche zur Induktion einer Zelltoxizität und zur Klärung der Reaktivität von IgG_{BNP} mit den verschiedenen Leukozytensubpopulationen durchgeführt. Um eine eventuelle Verbindung mit der Impfung gegen BVDV zu evaluieren, wurde eine mögliche Kreuzreaktivität zwischen IgG_{BNP} und BVDV getestet.

II. Literaturübersicht

1 Überblick zur bovinen neonatalen Panzytopenie

1.1 Epidemiologie

Seit 2006 wurden in Deutschland vermehrt Kälber mit einer hämorrhagischen Diathese beobachtet (FRIEDRICH et al., 2011). Dabei stellte sich zuerst die Frage, ob es sich um eine tatsächliche Häufung handelte, oder ob es derartige Fälle schon früher gab und sie nur nicht bemerkt wurden. FRIEDRICH et al. (2009) schlossen letzteres aber aus, da das Krankheitsbild sehr schwere und auffällige Symptome aufweist und bei einzelnen Betrieben zu großen Verlusten führte. Schon bald kamen auch Berichte über dieses Syndrom aus anderen europäischen Ländern hinzu. In Belgien traten derartige Fälle das erste Mal im Jahr 2006 (zwei Fälle) auf und erreichten 2008 (39 Fälle) und 2009 (38 Fälle) einen Höhepunkt (PARDON et al., 2010). In Schottland wurde 2008 zum ersten Mal über Kälber berichtet, die mit Panzytopenie und Hämorrhagien aufgrund einer Knochenmarkshypoplasie ähnliche Symptome wie die Kälber in Belgien und Deutschland zeigten (SAC, 2008). Im Jahr 2009 folgten ähnliche Berichte und die Verbindung zu dem Syndrom in anderen europäischen Ländern wurde hergestellt (PENNY et al., 2009; VLA, 2009). WILLOUGHBY et al. (2010) berichten von über 100 Verdachtsfällen in Großbritannien im Jahr 2009.

Deshalb wurde im Dezember 2009 im Rahmen des 1st European Buiatrics Forum in Marseille ein Satellitensymposium zu diesem Thema veranstaltet. Hier wurden unter anderem weitere Berichte über Fälle von hämorrhagischer Diathese in Großbritannien, den Niederlanden, Frankreich (48 Verdachtsfälle) und Italien vorgetragen (CORBIÈRE et al., 2009; ELLIS-IVERSEN & COLLOFF, 2009; GENTILE et al., 2009; SMOLENAARS & MARS, 2009). Weiterhin einigte sich dieses Expertengremium darauf, das Syndrom fortan als bovine neonatale Panzytopenie (BNP) zu bezeichnen. Unter Tierärzten und Landwirten ist BNP auch weiterhin unter Bezeichnungen wie z.B. „Blutschwitzen“ oder „Bleeding Calf Syndrome“, bekannt (PARDON et al., 2010).

Zur Definition der Diagnose BNP wurde Einigkeit darüber erzielt, dass neben den vielfältigen klinischen Symptomen der pathologische Befund der Knochenmarksdepletion (Panmyelophthase) ausschlaggebend sein soll, da diese bei allen Kälbern mit BNP nachweisbar ist (FRIEDRICH et al., 2009).

Das Paul-Ehrlich-Institut bestätigte die Meldung von über 2300 Fällen von BNP in der Europäischen Union, davon waren es alleine in Deutschland 1800 Fälle (Stand 30.04.2010; http://www.pei.de/nn_1686480/DE/infos/tieraerzte/pharm-vet/uaw-vet/bnp/bnp-cvmp.html). PIONTKOWSKI (2010) vom Bundesverband der beamteten Tierärzte beschreibt in seiner Zusammenfassung zur bovinen neonatalen Panzytopenie das gehäufte Auftreten von BNP-Fällen in Bayern und Nordrhein-Westfalen. Seltener trat das Syndrom in Baden-Württemberg und Schleswig-Holstein auf, während zum Beispiel Thüringen und Sachsen-Anhalt kaum oder gar nicht betroffen waren. Auffällig dabei ist, dass die Bundesländer verschiedene Impfstrategien bezüglich des Einsatzes von Impfstoffen gegen die bovine Virusdiarrhö (BVD) haben.

Seit 2010 sind die Fallzahlen, die an die Klinik für Wiederkäuer der LMU München gemeldet werden, deutlich rückläufig. Das kann zum einen daran liegen, dass die Landwirte die Fälle nicht mehr an die Kliniken melden, da nur die wenigsten Kälber, unabhängig von der Behandlung, überleben und die Diagnose BNP bisher keinen weiteren Informationsgewinn für die Landwirte bedeutet. Möglich ist aber auch, dass viele Bauern kein Kolostrum mehr von Mutterkühen, die bereits ein Bluterkalb hatten, verfüttern, sondern Fremdkolostrum von gesunden Tieren verwenden (Annette Friedrich, persönliche Kommunikation).

BNP betrifft Kälber aller Rassen. Beispielsweise wurden Fälle bei deutschem Fleckvieh, Schwarzbunten, weiß-blauen Belgiern und verschiedenen Rassenkreuzungen beschrieben. In Frankreich sind die dort gehaltenen Rinderrassen, wie Charolaise- oder Limousine-Rinder, betroffen. Dabei sind männliche und weibliche Kälber in etwa dem gleichen Ausmaß betroffen (CORBIÈRE et al., 2009; FRIEDRICH et al., 2009; KAPPE et al., 2010; PARDON et al., 2010).

1.2 Klinische Symptome

Je nach Literaturquelle lag das Alter der erkrankten Kälber zwischen einem und 32 Tagen. Das mittlere Alter lag bei 17 Tagen (KAPPE et al., 2010), 16 Tagen (PARDON et al., 2010) oder 12,7 Tagen (FRIEDRICH et al., 2009). Die meisten Tiere zeigen demzufolge in der zweiten bis dritten Lebenswoche die ersten Symptome.

Für diese Krankheit typische Symptome umfassen eine allgemeine Blutungsneigung (hämorrhagische Diathese), die sich durch Hämorrhagien (Petechien, Ekchymosen oder Hämorrhagien) der Haut und der inneren und äußeren Schleimhäute bemerkbar macht. Hautblutungen wurden bei 60 % der betroffenen Kälber in der Klinik für Wiederkäuer im Jahr 2008 festgestellt. Dabei fiel auf, dass diese bei Kälbern, die von Mai bis November eingeliefert wurden, signifikant häufiger auftraten (FRIEDRICH et al., 2009). Eine Erklärung dafür ist, dass Mücken in diesen Monaten vermehrt vorkommen und somit auch die Anzahl der Insektenstiche steigt. Diese bluten dann durch die hämorrhagische Diathese nach (FRIEDRICH et al., 2009).

Aber nicht alle betroffenen Kälber fallen primär durch Hautblutungen auf. Zum Teil werden sie auch wegen klassischer Neugeborenenenerkrankungen (z.B. Durchfall, Nabelentzündung), Störungen des Allgemeinbefindens oder idiopathischem Fieber vorgestellt (11 von 25 Fällen in der Klinik für Wiederkäuer der LMU München, 2008). Diese Patienten zeigten erst während dem Klinikaufenthalt Symptome der BNP, wie zum Beispiel Nachbluten nach Injektionen, starke Blutbeimengungen im Kot oder spontane Hautblutungen (FRIEDRICH et al., 2009).

Petechiale Blutungen der Schleimhäute, zum Beispiel an der Zungenunterseite, dem Naseneingang oder der Vaginalschleimhaut, sind ein sehr häufiger Befund (FRIEDRICH et al., 2009) und können meist schon im Initialstadium der Krankheit beobachtet werden (PARDON et al., 2010). Ein weiterer regelmäßiger Befund ist der blutige Kot, der bei fast allen erkrankten Kälbern mit unterschiedlich starkem Ausmaß der Blutbeimengungen auftritt (24 von 25 Kälber in der Klinik für Wiederkäuer der LMU München, 2008) (FRIEDRICH et al., 2009). Auch PARDON et al. (2010) beschreiben Mälena als ein bei allen Kälbern im fortgeschrittenen Krankheitsstadium vorhandenes Symptom.

Therapieresistentes hohes Fieber (bis zu 41,8 °C) wurde früher oder später bei den meisten Kälbern festgestellt (FRIEDRICH et al., 2009; PARDON et al., 2010). Das Allgemeinbefinden und die Futteraufnahme der Tiere sind im Anfangsstadium oft ungestört, erst mit Fortschreiten der Krankheit verschlechtert sich der mentale Status und der Zustand der Tiere immer weiter (FRIEDRICH et al., 2009; PARDON et al., 2010). Erklärbar ist das unter anderem durch den schweren Verlauf der auftretenden Begleiterkrankungen, wie Lungenentzündung, Durchfall oder sogar Sepsis (FRIEDRICH et al., 2009). Obwohl die Tiere meist Bluttransfusionen und andere Medikamente erhalten, überleben nur wenige Tiere, die klinische Symptome zeigen. PARDON et al. (2010) berichten beispielsweise, dass 91 % der in der Klinik vorgestellten Fälle innerhalb von einem bis 15 Tage nach dem Auftreten erster Symptome verendeten oder euthanasiert werden mussten.

1.3 Hämatologische Befunde

Der typische Befund betroffener Tiere ist die immer auftretende hochgradige Thrombozyto- und Leukopenie. Zum Teil findet sich auch eine Anämie, die zu Beginn auf den Blutverlust zurückzuführen ist, später aber in eine aplastische Anämie übergeht (FRIEDRICH et al., 2009). Die zytologische Untersuchung des peripheren Blutes zeigte in den meisten Fällen aktivierte Lymphozyten sowie eine Neutro- und Thrombozytopenie. Die Prothrombinzeit scheint bei allen Fällen leicht verlängert, Fibrinogen kann erhöht oder normal sein und in der biochemischen Untersuchung kann eine Hypoproteinämie auffallen, die wahrscheinlich durch den Blutverlust verursacht wird (PARDON et al., 2010).

1.4 Pathologie

Eine Gemeinsamkeit aller untersuchten Fälle sind die generalisierten Hämorrhagien (Petechien, Ekchymosen, Hämorrhagien). Diese sind sowohl in der Haut, subkutan oder in den äußeren Schleimhäuten zu sehen, finden sich aber auch in unterschiedlich starkem Ausmaß in den Serosen der inneren Organe (zum Beispiel im Gastrointestinaltrakt, dem Herz, oder den Meningen) und der Skelettmuskulatur. Ein weiterer, relativ häufiger Befund ist eine Lymphadenopathie. Viele Tiere haben einen hämorrhagischen Mageninhalt, dabei

sind nur in wenigen Fällen Bakterien, wie zum Beispiel *Clostridium perfringens*, isolierbar. Neben Erosionen oder sogar Ulzerationen im Abomasum sind hämorrhagische Pleural-, bzw. Abdominalergüsse, ein weniger häufigerer Befund. Zum Teil hatten die Kälber Pneumonien unterschiedlicher Art. Das Knochenmark der Röhrenknochen, wie Femur oder Humerus, und des Sternums erscheint oft blassrot (KAPPE et al., 2010; PARDON et al., 2010).

1.5 Histopathologische Untersuchungen

Die Blutungen in der Haut, den Mukosen, der Skelettmuskulatur und den inneren Organen sind auf den Austritt von Erythrozyten aus den Blutgefäßen zurückzuführen. Dabei bleiben die Gewebestruktur sowie das Endothel der Gefäße intakt. Im Darm finden sich bis auf den blutigen Inhalt und einige unspezifische Befunde (zum Beispiel milde eosinophile oder lymphoplasmazytäre Infiltration in der Lamina propria) keine Auffälligkeiten. Andere, seltenere Befunde sind beispielsweise eine kapsuläre Fibrose der Milz oder der Lunge und der Leber.

Bezeichnend hingegen sind die Ergebnisse der zytologischen und histopathologischen Untersuchungen der hämatopoetischen und lymphoiden Gewebe. In den untersuchten Lymphknoten ist immer eine hochgradig diffuse lymphoide Depletion im Kortex sowie im Parakortex (sowohl im T-, als auch im B-Zellkompartiment der Lymphfollikel) zu sehen. Auch in der Milz sind mit den Milzfollikeln und den periarteriellen lymphatischen Scheiden die B- und die T-Zellregion von der Lymphozytendepletion betroffen. Ausstriche von Milzgewebe wurden bei einigen Kälbern durchgeführt. Dabei waren immer aktivierte Lymphozyten (Immunoblasten) und Plasmazellen zu sehen. Wenn der Thymus untersucht wurde, war auch hier eine lymphoide Depletion zu finden (PARDON et al., 2010).

Untersuchungen des Knochenmarks betroffener Kälber enthüllen in allen Fällen eine Depletion des hämatopoetischen Gewebes. Dabei waren alle Zellen der Hämatopoese in reduzierter Zahl oder auch gar nicht mehr vorhanden (totale Aplasie) (BELL et al., 2010; PARDON et al., 2010). Häufig waren im Knochenmark multifokal aktivierte Makrophagen (ovaler bis runder exzentrischer Kern, üppiges, zum Teil vakuoliertes Zytoplasma) zu sehen. In manchen Fällen waren diese in

engem Kontakt mit Lymphozyten und selten war sogar eine Hämophagozytose feststellbar (PARDON et al., 2010).

Nur wenige Fälle, bei denen Knochenmarksaspirationen im Verlauf der Krankheit wiederholt durchgeführt wurden, sind bisher beschrieben. Die Ergebnisse lassen aber vermuten, dass zu Beginn durchaus noch einige Vorläuferzellen und Megakaryozyten vorhanden sind, die Zahl aber mit dem Fortschreiten der Krankheit bis zur totalen Aplasie abnimmt (PARDON et al., 2010).

1.6 Fütterungsversuche zur Rolle von Kolostrum in der Auslösung von BNP

Schon zu Beginn dieser Untersuchungen gab es Vermutungen, dass BNP mit der Kolostrumaufnahme der Kälber zusammenhängen könnte. Grund dafür waren zum Beispiel Berichte von Landwirten, die Kolostrum vom Nachbarhof (wo bereits Fälle von BNP aufgetreten waren) an ihre Kälber verfüttert hatten. Diese entwickelten daraufhin Symptome, obwohl das Syndrom auf dem eigenen Betrieb bisher noch nicht vorgekommen war. Bis auf einen unbestätigten Fall in Schottland gab es bisher keine Berichte über Symptome von BNP vor der Kolostrumaufnahme (FRIEDRICH et al., 2011).

Fütterungsversuche der Klinik für Wiederkäuer der Universität München

Im Juli 2009 wurde ein Fütterungsversuch in der Klinik für Wiederkäuer (LMU München) auf Anregung und in Zusammenarbeit mit dem Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) durchgeführt (FRIEDRICH et al., 2011). Dabei wurden sechs Kälber (Nr. 1 bis 6) von zwei Betrieben, in denen noch keine Fälle von BNP aufgetreten waren und die nicht gegen BVDV impften, direkt nach der Geburt von ihren Müttern getrennt. Diese Tiere konnten somit kein Kolostrum aufnehmen. Stattdessen wurde ihnen zwischen zwei und drei Liter Kolostrum (zum Teil auch Mischkolostrum) von Müttern, die jeweils mindestens schon ein BNP-Kalb geboren hatten, gefüttert.

Die Tiere wurden für die Zeit des Versuches getrennt von anderen Tieren gehalten. Es wurden täglich Blutproben genommen und die Kälber wurden klinisch untersucht.

Vor der Kolostrumaufnahme waren bei keinem der sechs Versuchskälber Antikörper gegen BVDV oder Pestivirusgenom nachweisbar. Nach der Kolostrumaufnahme waren im Serum von allen Kälbern Antikörper gegen BVDV nachweisbar (FRIEDRICH et al., 2011).

Die Kälber mit den Nummern 2, 3 und 4 wurden euthanasiert, nachdem sie eindeutige Symptome der BNP entwickelt hatten und ihr Zustand sich zunehmend verschlechterte. Die übrigen Kälber entwickelten andere Krankheiten, die eine Euthanasie erforderlich machten. Alle Tiere wurden in der Pathologie des LGL untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die Kälber mit den Nummern 2, 3 und 4 mit multiplen Hämorrhagien und einer Panmyelophthise die für BNP typischen Befunde aufwiesen. Kalb Nr. 1 und Nr. 6 zeigten zwar einige wenige Petechien bzw. Hämorrhagien, die Zahl der Vorläuferzellen und Megakaryozyten im Knochenmark erschien aber nur bei Kalb Nr. 6 etwas vermindert. Kalb Nr. 5 hatte eine Nabelentzündung und Arthritis. Der Befund aus der Untersuchung des Knochenmarks war nicht auffällig.

Als Kontrollen wurden sechs Kälber unterschiedlicher Rassen, die in der Klinik für Wiederkäuer geboren wurden und von Betrieben stammten, die keine BVD-Impfung durchführten und auch noch keine Fälle von BNP hatten, herangezogen. Sie bekamen das Kolostrum ihrer jeweiligen Mütter gefüttert. Auch diese Tiere wurden überwacht. Keines der Kälber entwickelte Symptome von BNP oder zeigte eine Thrombozyto- oder Leukopenie (FRIEDRICH et al., 2011).

Weiterhin führten FRIEDRICH et al. (2011) einen „Kreuzversuch“ durch. Dabei wurde das Kolostrum einer bezüglich BNP unauffälligen Mutterkuh an das Kalb einer Kuh verfüttert, die bereits drei Bluterkälber in Folge geboren hatte. Das Kolostrum dieser Mutter wurde an das Kalb der unverdächtigen Mutter verfüttert. Das Ergebnis des Versuchs war, dass letztendlich das Kalb der unverdächtigen Mutter im Alter von 12 Tagen aufgrund seines schlechten Zustands euthanasiert werden musste. Neben blutigem Kot wies das Tier auch Petechien auf. Die pathologische Untersuchung zeigte moderate Hämorrhagien und eine Panmyelophthise (FRIEDRICH et al., 2011).

Versuche zum Nachweis leukozytenreaktiver Antikörper bei BNP-Müttern

BRIDGER et al. (2010) wies kürzlich die Bindung von IgG Antikörpern aus dem Serum von BNP-Müttern an die Leukozyten neugeborener gesunder Kälber nach. Dabei wurde Serum von BNP-Müttern und Serum von Müttern gesunder Kälber verdünnt und mit Leukozyten gesunder Kälber inkubiert. Zum Nachweis von gebundenem IgG wurden die Zellen danach mit einem sekundären, Fluorochrom-konjugiertem Antikörper gegen bovines IgG inkubiert und mit einem Durchflusszytometer analysiert. Weiterhin wurde ein Kolostrumfütterungsversuch durchgeführt, bei dem vier Kälber mit dem Kolostrum ihrer jeweiligen Mütter, die vorher schon ein Kalb mit BNP geboren hatten, gefüttert wurden. Den Kälbern wurden vor und nach der Kolostrumaufnahme Blutproben entnommen und mithilfe des bereits genannten, sekundären Antikörpers konnte der Anteil an Leukozyten, die IgG gebunden hatten, nachgewiesen werden. Dieser stieg nach der Kolostrumaufnahme stark an. Im Verlauf des Versuches stellte sich heraus, dass der Anteil der IgG bindenden Zellen (IgG+ Zellen) mit der Schwere der BNP-Symptome bei den Kälbern korrespondiert.

Schlussfolgerungen

Diese Versuche bestätigen die Vermutung, dass die Kolostrumaufnahme wahrscheinlich eine entscheidende Rolle bei der Auslösung von BNP bei Kälbern spielt. Durch die Versuche von BRIDGER et. al (2010) wird die Hypothese eines nicht-infektiösem Agens im Kolostrum von BNP-Müttern (FRIEDRICH et al., 2011), welches mit peripheren Blutzellen reagiert, bestätigt. Die Reaktivität dieser Antikörper mit Zellen des Knochenmarks sowie der Mechanismus, der zur Zerstörung dieser Vorläuferzellen führt, bleiben jedoch weiterhin ungeklärt.

2 Krankheiten mit Panzytopenie und Pathologie im Knochenmark

Nachdem die ersten Fälle bei Kälbern mit Symptomen einer hämorrhagischen Diathese, Panzytopenie und Hypoplasie des Knochenmarks auftraten, wurden vermehrt Anstrengungen zum Nachweis bekannter Ursachen für die geschilderte Symptomatik unternommen. Mögliche Differentialdiagnosen wurden in Betracht gezogen und Untersuchungen in diese Richtungen angestellt. Die in Frage kommenden Möglichkeiten mit Auslösung einer zu BNP ähnlichen Symptomatik werden hier kurz zusammen gefasst.

2.1 Bei Wiederkäuern

2.1.1 Nicht-infektiöse Ursachen

In der Literatur wurden einige Fälle von Panzytopenie aufgrund einer Zelldepletion im Knochenmark in Zusammenhang mit verschiedenen medikamentösen und toxischen Ursachen beschrieben.

Sulfonamide

So wurde der Fall eines 14 Tage alten Holsteinkalbes nach der Behandlung mit einem Sulfadoxin-Trimethoprim-Gemisch abgehandelt. Das Tier hatte neben dem gestörten Allgemeinbefinden blasse Schleimhäute, blutigen Durchfall und blutete aus Injektionsstellen nach. Das Blutbild ließ neben einer Anämie auch eine Thrombozyto- und Leukopenie (Neutropenie) erkennen. Nach der Euthanasie wurden zahlreiche Hämorrhagien, unter anderem in Serosen und Skelettmuskulatur, sowie eine Hypoplasie des Knochenmarks festgestellt (AMMANN et al., 1996). Beim Menschen wurden ebenfalls Fälle von Knochenmarksdepression, verbunden mit einer Thrombozyto- und Leukopenie, in Zusammenhang mit der Behandlung mit Sulfonamiden beschrieben (MACAULAY, 1954). Auch beim Hund gab es Berichte über die Entwicklung einer aplastischen Anämie mit Hypoplasie des Knochenmarks nach Gabe von Trimethoprim-Sulfadiazin (in Verbindung mit Fenbendazol) (WEISS & ADAMS, 1987).

Es ergaben sich keine Hinweise darauf, dass alle betroffenen Kälber mit Sulfonamiden vorbehandelt wurden. Der Nachweis einer

Sulfamethazin/Trimethoprim-Kombination bei einem Kalb wird durch therapeutische Bemühungen erklärt (FRIEDRICH et al., 2009). In der Humanmedizin, aber auch bei Hunden, wird eine idiosynkratische Reaktion nach Gabe von Sulfonamiden beschrieben. Neben Symptomen wie Fieber, Hautausschlag oder Lymphadenopathie findet man häufig eine Thrombozytopenie, Neutropenie oder sogar eine hämolytische Anämie. Die Ursache hierfür liegt seltener im Knochenmark als in der Peripherie (TREPANIER, 2004). Es ist aber unwahrscheinlich, dass derartige Dispositionen plötzlich gehäuft auftreten und für die Entwicklung von BNP verantwortlich sind (FRIEDRICH et al., 2009).

Furazolidon

Furazolidon ist ein Antibiotikum aus der Gruppe der Nitrofurane. In verschiedenen Versuchen wurde gezeigt, dass Furazolidon auch in früher therapeutisch eingesetzten Dosen über einen längeren Zeitraum hinweg verabreicht zu Symptomen wie Petechien, Mälena und Hämorrhagien führen kann. Unstillbare Nachblutungen aus Injektionsstellen wurden im Finalstadium ebenfalls beschrieben. Alle Tiere verendeten früher oder später (HOFMANN, 1972; HOFMANN et al., 1974). Es kommt zu einer Schädigung des Knochenmarks, was sich im Blutbild in einer Thrombozyto- und Neutropenie, sowie später auch in einer Anämie äußert. Je höher dabei die Menge an verabreichten Furazolidon ist, desto schneller zeigen die Tiere Symptome. In der pathologischen Untersuchung sind neben den äußerlich sichtbaren Petechien auch Blutungen in allen Organen und der Muskulatur zu sehen. Nekrosen im Intestinaltrakt werden auf eine verminderte Abwehrbereitschaft in Folge der Granulozytopenie zurück geführt (HOFMANN et al., 1974). Im Knochenmark ist eine Abnahme der Megakaryozyten bereits eine Woche nach der ersten Furazolidongabe festzustellen. Myeloblasten nehmen nach drei bis fünf Wochen ein erstes Mal ab (HOFFMANN-FEZER et al., 1974).

Furazolidon wurde früher bei Kälbern zur Darmprophylaxe eingesetzt (HOFMANN et al., 1974). Die in der Literatur beschriebenen Symptome entsprechen zwar denen von BNP, jedoch ist eine wochenlange tägliche Verabreichung des Medikaments nötig. Zudem verbietet mittlerweile die Verordnung (EG) Nr. 470/2009 den Einsatz von Nitrofuranen (einschließlich Furazolidon) bei lebensmittelliefernden Tieren (Anhang IV der Verordnung).

Trichothezene

Trichothezene sind Mykotoxine, die als sekundäre Stoffwechselprodukte unterschiedlicher Pilzarten (z.B. *Fusarium*, *Trichothecium*) entstehen (STÖBER, 2007). Eine Anzahl an negativen Auswirkungen auf das Knochenmark verschiedener Spezies, die sich neben anderen Symptomen wie Erbrechen, in einer hämorrhagischer Diathese verbunden mit einer Thrombozyto- und Leukopenie manifestieren, wurden beschrieben (PARENT-MASSIN, 2004). Obwohl das Rind weniger empfänglich zu sein scheint als das Schwein (STÖBER, 2007), ist die hochgradig nekrotisierende Wirkung von intravenös verabreichtem Diazetoxyszirpenol, einem *Fusarium*-Toxin, auf das Knochenmark von Kälbern nachgewiesen (COPPOCK et al., 1989).

Es konnten aber keine Trichothezene bei der Untersuchung von Futterproben betroffener Betriebe nachgewiesen werden (FRIEDRICH et al., 2009)

Trichloräthylen

Eine Krankheit mit hämorrhagischem Syndrom, verbunden mit einer Aplasie des Knochenmarks und einer Nierenschädigung, wurde nach Fütterung mit, durch Trichloräthylen extrahiertem, Sojaschrot beschrieben (STOCKMANN, 1916). Der auslösende toxische Faktor wurde später als S-(1,2-dichlorvinyl)-L-Cystein (DCVC) bezeichnet. Kälber, die DCVC oral oder intravenös erhielten, zeigten Mälena, petechiale Blutungen der Schleimhäute, subseröse Hämorrhagien im Verdauungstrakt und im Blutbild eine hochgradige Thrombozyto- und Leukopenie (MCKINNEY LL. et al., 1957).

Mittlerweile wird Trichloräthylen aber nicht mehr zur Extraktion von Sojaschrot verwendet (STÖBER, 2007). In Urin- und Blutproben von betroffenen Kälbern konnte weder DCVC, noch dessen Metabolit N-Acetyl-DCVC nachgewiesen werden (KAPPE et al., 2010).

Akute Adlerfarnvergiftung

Eine akute Vergiftung mit Adlerfarn (*Pteridium aquilinum*) kann beim Rind aufgrund seiner toxischen Wirkung auf das Knochenmark zu einer hämorrhagischen Diathese führen. Das auslösende Agens ist dabei das Norsequiterpen Ptaquilosid. Vergiftungen kündigen sich durch einen Abfall der Thrombozyten und der Leukozyten an. Die Ausscheidung von Ptaquilosid mit der Milch wird zwar beschrieben (ALONSO-AMELOT et al., 1996), allerdings treten akute Symptome erst nach monatelanger intensiver Fütterung (Anteil > 30%) mit Adlerfarn auf (STÖBER, 2007).

Anämie bei Schaf- und Ziegenlämmern nach Fütterung von Kolostrum bestimmter Kühe

WINTER (2011) beschreibt die Ähnlichkeit von BNP bei Kälbern mit der Anämie von Schaf- und Ziegenlämmern nach Fütterung von Kolostrum bestimmter Mutterkühe, die sie in den späten 1980er Jahren untersucht hat (WINTER & CLARKSON, 1992).

Kolostrum von Kühen kann als Ersatz an Schaf- und Ziegenlämmer verfüttert werden. Die Immunglobuline, und auch andere enthaltene Bestandteile, sind nicht speziesspezifisch und werden in die Zirkulation absorbiert. Gerade bei über das Kolostrum übertragenen Krankheiten, wie Maedi/Visna oder der caprinen Arthritis-Enzephalitis, ist ein Einsatz von speziessfremden Kolostrum sinnvoll (WINTER & CLARKSON, 1992).

Dass Lämmer nach der Fütterung von bovinem Kolostrum eine Anämie entwickeln können, wurde bereits 1983 in England (Schafe) (STUBBINGS, 1983) und 1988 in Frankreich (Ziegen) beschrieben (PERRIN & POLACK, 1988).

Die Lämmer zeigen die ersten klinischen Symptome im Alter von fünf bis zwölf Tagen. Der Hämatokrit fällt bei betroffenen Tieren stark ab. Die Lämmer werden apathisch und zeigen keinen Antrieb mehr, von selbst Milch zu trinken. Die Schleimhäute sind blass und die Herz- und Atemfrequenz steigt deutlich. In der pathologischen Untersuchung erscheinen die Tierkörper ebenfalls sehr blass. Wie bei von BNP betroffenen Kälbern wird auch hier das cremeweiß oder grau erscheinende Knochenmark als auffälligstes Merkmal beschrieben (WINTER & CLARKSON, 1992). WINTER (2011) beschreibt, dass bei der Anämie der Lämmer

aber vor allem die Erythrozyten und ihre Vorläuferzellen betroffen sind. Bei der Messung des Hämatokrits ist für gewöhnlich aber, im Gegensatz zu Blutproben von BNP-Kälbern, eine Thrombozytenschicht erkennbar. Die meisten betroffenen Tiere versterben und es gab auch hier subklinische Fälle.

Als Ursache wird kolostrales, bovines IgG beschrieben, das sich an die Oberfläche der Erythrozyten und ihrer Vorläuferzellen anheftet. Dadurch werden diese dann vom retikuloendothelialen System als „fremd“ erkannt und werden zerstört (WINTER & CLARKSON, 1992).

Schon eine Menge von 50 ml bovinen Kolostrum von bestimmten Kühen soll ausreichen, um eine derartige Anämie bei Lämmern auszulösen (WINTER & CLARKSON, 1992). FRIEDRICH et al. (2011) beschreiben die relativ geringe Inzidenz von Kühen, die Antikörper, die zur Entstehung von BNP beitragen, in ihrem Kolostrum haben. Auch bei der Anämie der Lämmer wird beschrieben, dass nur Kolostrum von wenigen Kühen diese Symptome auslösen kann (WINTER & CLARKSON, 1992).

PERRIN & POLLACK (1988) zeigten, dass von 20 Ziegenlämmern nach der Fütterung von Kolostrum einer Kuh, sieben Tiere Symptome einer Anämie entwickelten. Es konnte nachgewiesen werden, dass asserviertes Kolostrum oder Serum dieser Kuh die Fähigkeit hatte, Erythrozyten erkrankter Lämmer zu agglutinieren, nicht aber die von gesunden Lämmern.

Verschiedene Methoden wurden beschrieben, um bovines Kolostrum auf seine potentiellen hämolytischen Eigenschaften zu untersuchen (BERNADINA & FRANKEN, 1985; WINTER, 1990). Zumeist sind diese Tests aber in der tierärztlichen Praxis nicht durchführbar oder zu aufwendig (WINTER & CLARKSON, 1992).

2.1.2 Beschreibung idiopathischer Einzelfälle aus der Literatur

Bei Rindern werden Thrombozytopenien oftmals aufgrund unzureichender individueller Diagnostik als idiopathisch bezeichnet (BRAUN et al., 2008). Tatsächlich gibt es nur wenige Berichte über wirklich idiopathische Thrombozytopenien und diese sind mit keiner Schädigung des Knochenmarks verbunden (LUNN & BUTLER, 1991; JANZEN & CLARK, 1995). Einige Einzelfälle, bei denen keine Ätiologie festzustellen war, sollen jedoch trotzdem kurz erwähnt werden. Ein Bericht über eine Kuh mit Thrombozytopenie und aplastischer Anämie nach Impfung mit einem polyvalenten Botulismus-Impfstoff liegt vor. Über das Knochenmark wurde keine Aussage getroffen, da wiederholte Biopsien nur Fettmark enthielten (YERUHAM et al., 2003). Ein weiterer Fall wäre der einer drei Jahre alten Holsteinkuh mit Panzytopenie aufgrund einer Knochenmarksnekrose. Auch bei diesem Tier wurde letztendlich keine Ursache für die Symptome festgestellt (WEISS & MILLER, 1985).

Bisher ist in der Literatur nur eine Fallbeschreibung verfügbar, in der ähnliche Symptome wie bei BNP geschildert werden. Das elf Tage alte Holsteinkalb hatte Mälena, blasse Schleimhäute, Fieber und ein blutverkrustetes Fell aufgrund einer mangelnden Koagulation nach Injektionen. Das Blutbild zeigte neben einer Anämie eine Thrombozyto- und Leukopenie. Nach dem Tod des Tieres wurde das Knochenmark untersucht und eine hochgradige Hypoplasie mit einer Reduktion aller Vorläuferzelllinien festgestellt. Es konnte keine Ursache für diesen speziellen Fall gefunden werden (SHIMADA et al., 2007).

Zusammengenommen sind es jedoch sehr seltene Einzelfälle, die vom klinischen und pathologischen Bild meist nicht vollständig auf das Krankheitsbild BNP zutreffen und keine Erklärung für das Syndrom liefern.

2.1.3 Infektiöse Ursachen

Ostküstenfieber der Rinder

Ostküstenfieber der Rinder (East Coast Fever) wird durch das Protozoon *Theileria parva* verursacht, das durch Zecken der Gattung *Rhipicephalus appendiculatus* übertragen wird. Es gehört zu den verlustreichsten Rinderkrankheiten Afrikas. Symptome wie Fieber, Anämie, Panzytopenie, Thrombozytopenie und eine Hypoplasie des Knochenmarks wurden beschrieben (MBASSA et al., 1994). Geographisch ist die Erkrankung aber bisher auf Ost-, Zentral- und Südafrika beschränkt, streng verbunden mit der Ausbreitung des Vektors (SIEPELMAYER & RESCH, 2009).

Epizootische Hämorrhagie der Hirsche

Das Virus der epizootischen Hämorrhagie der Hirsche (Epizootic haemorrhagic disease virus, EHDV) wurde erstmals in New Jersey, USA, nach einem Massensterben von Weißwedelhirschen (*Odocoileus virginianus*) (SHOPE et al., 1960) isoliert. Es wird durch Mücken der Gattung *Culicoides* übertragen (JONES et al., 1977). Aber auch andere Wiederkäuerarten wie zum Beispiel Maultierhirsche (*Odocoileus hemionus*), Bisons (*Bison bison*) und Dickhornschafe (*Ovis canadensis*) können infiziert werden. (DUBAY et al., 2004; NOL et al., 2010). Symptome sind unter anderem Anorexie, zahlreiche innere und äußere Hämorrhagien, blutiger Nasen- und Maulausfluss, Ödeme der Nasen-, Maul-, und Konjunktivenschleimhaut, Dyspnoe und hämorrhagische Enteritis (FISCHER et al., 1995; YADIN et al., 2008). EHDV wurde mittlerweile auch bei Rindern nachgewiesen. Im Allgemeinen ähneln die Symptome hier zwar eher denen der Blauzungkrankheit (YADIN et al., 2008) und in der Literatur wurde bislang kein Einfluss auf das Knochenmark beschrieben. Trotzdem wurde EHDV neben dem Blauzungenvirus (Bluetongue Virus, BTV) als Auslöser für BNP in Betracht gezogen (PARDON et al., 2010).

Bovine Virusdiarrhö

Das bovine Virusdiarrhö Virus (BVDV) ist ein behülltes Virus mit Einzelstrang RNA Genom positiver Polarität, das dem Genus Pestivirus in der Familie der Flaviviridae zuzuordnen ist. BVDV lässt sich hinsichtlich seiner Wirkung auf Zellen in zytopathogene (cp) und nicht zytopathogene (ncp) Biotypen unterscheiden (GILLESPIE et al., 1960). Außerdem wird es durch markante, genetische Unterschiede in die Genotypen 1 und 2 unterschieden (PELLERIN et al., 1994). Die bovine Virusdiarrhö (BVD) wurde 1946 zum ersten Mal beschrieben (OLAFSON et al., 1946) und in den darauffolgenden Jahren mit milden oder subklinisch verlaufenden Infektionen verbunden. In den späten 1980er Jahren wurde in Nordamerika eine neue, seuchenartig verlaufende Form von BVD beschrieben, die mit Symptomen wie eine in Hämorrhagien resultierende Thrombozytopenie, Leukopenie, teils blutigem Durchfall, Fieber und einer Mortalitätsrate von über 30 % einherging (REBHUN et al., 1989; PELLERIN et al., 1994). Derartig schwere Verlaufsformen sind oft mit hochvirulenten, nicht zytopathogenen BVD Typ 2 Virusinfektionen (ncpBVDV-2) verbunden. Ein hemmender Effekt von ncpBVDV-2 auf die Proliferation von Vorläuferzellen des Knochenmarks wurde beschrieben (KELLER et al., 2006). Subtypen von BVDV Typ 1 wurden weltweit nachgewiesen, während der Typ 2 zumeist in Nordamerika isoliert wird (RIDPATH et al., 2000).

2.2 Infektiöse Ursachen bei anderen Tierarten

Familie Circoviridae

Die Kükenanämie wird durch ein aviäres Circovirus (Chicken Anemia Virus, CAV) verursacht. Typische Symptome sind, neben der hochgradigen Anämie, subkutane und intramuskuläre Blutungen, eine Atrophie von Thymus und Bursa fabricius, sowie eine Depletion des Knochenmarks (ROLLE & MAYR, 2007; KUSCU & GÜREL, 2008) CAV infiziert nur Hühner und ist der einzige Vertreter des Genus Gyroviridae.

Allerdings gibt es noch das Genus Circovirus mit Vertretern, die auch Säugetiere und andere Vogelarten infizieren. Neben den porcinen Circoviren (PCV) gehört unter anderem der Verursacher der Schnabel- und Federkrankheit der Papageien (Psittacine beak and feather disease virus, PBFDV) dazu. Außer PCV-1 sind alle

bekanntem Circoviren pathogen, zerstören das Lymphgewebe und können eine hochgradige Immunsuppression verursachen (PRINGLE, 1999; TODD, 2000; SEGAL & MATEU, 2006). Bei jungen afrikanischen Graupapageien (*Psittacus erithacus erithacus*), die mit PBFDV infiziert waren, wurde eine Panzytopenie beobachtet (SCHOEMAKER et al., 2000). Auch bei experimentell mit PCV-2 infizierten Ferkeln konnte zumindest eine Leukopenie nachgewiesen werden (NIELSEN et al., 2003).

Bislang gibt es nur wenige Erkenntnisse über die Existenz von Circoviren bei Rindern (KAPPE et al., 2010). Der Nachweis eines, dem PCV-2 sehr ähnlichen, Circovirus (99% Homologie in der Sequenz) in Organproben von Rindern und Aborten wurde beschrieben. Das Virus wurde vorläufig als bovines Circovirus bezeichnet (NAYAR et al., 1999). In einer Studie wurden im Serum von Rindern PCV-reaktive Antikörper nachgewiesen (TISCHER et al., 1995), in einer anderen Studie wurden dagegen keine Antikörper gegen PCV-2 nachgewiesen (ALLAN et al., 2000). Diese Daten regten in Zusammenhang mit der Ursachenforschung zur BNP weitere Untersuchungen an.

Europäische Schweinepest

Die Europäische Schweinepest (ESP) wird durch ein Virus der Familie Flaviviridae verursacht, das, wie BVDV, dem Genus Pestivirus zuzuordnen ist (Europäisches Schweinepestvirus, ESPV) und kommt nur beim Schwein vor (ROLLE & MAYR, 2007). Zu den Symptomen gehören unter anderem Fieber, Anorexie, Störungen der primären lymphoiden Organe und Hämorrhagien der Haut sowie der inneren Organe (SUMMERFIELD et al., 2000; MOENNIG et al., 2003). Das Blutbild zeigt eine hochgradige Thrombozyto- und Leukopenie. Es wurde nachgewiesen, dass ESPV eine Depletion der hämatopoetischen Vorläuferzelllinien des Knochenmarks verursachen kann (SUMMERFIELD et al., 2000; SUMMERFIELD et al., 2001). Dies lässt sich aus der Affinität des Virus für myeloide und endotheliale Zellen erklären (SUMMERFIELD et al., 2000).

Durch den eventuellen Zusammenhang von BNP mit einer Impfung gegen BVD (FRIEDRICH et al., 2009) und durch die Verwandtschaft von BVDV, Border Disease Virus (BDV) und ESPV (gruppiert im Genus Pestivirus) wurden diese Virusspezies als Kandidaten für weitergehende Untersuchungen in dieser Arbeit ausgewählt.

Parvoviren

Die Familie der Parvoviridae hat nur ein für Säugetiere bedeutendes Genus, das Genus Parvovirus. Hier wird zum Beispiel das feline Parvovirus (FPV) als Verursacher der Panleukopenie der Katzen eingeordnet. Typische pathologisch-anatomische Veränderungen umfassen eine Thymusatrophie, petechiale Blutungen in Serosa- und Mukosaepithelien und degenerative Veränderungen im Darm sowie im Knochenmark. Diese resultieren in der Zerstörung der myeloiden Zellen. Das Virus vermehrt sich nur in mitotisch aktiven Geweben, was die Tatsache erklärt, warum Infektionen vor allem in den Zellen von Thymus, Knochenmark, Lymphgewebe und Dünndarmepithel stattfinden. Im Blutbild zeigt sich naturgemäß eine hochgradige Panleukopenie und durch die Immunsuppression kommt es häufig zu Sekundärinfektionen (TRUYEN et al., 2009).

Auch beim Hund gibt es verschiedene Parvoviren (kanine Parvoviren, CPV). Die Pathogenese ist ähnlich der der Panleukopenie der Katzen. Betroffene Hunde entwickeln eine Enteritis, verbunden mit Neutropenie, Lymphopenie und zum Teil Panleukopenie (POTGIETER et al., 1981). Auch eine milde Thrombozytopenie kann auftreten (WEISS et al., 1999). Im Knochenmark ist eine bezeichnende Depletion der neutrophilen Vorläuferzellen zu beobachten. Erythroide Vorläuferzellen sind leicht reduziert, wohingegen andere Vorläuferzellen in normalem Umfang vorhanden sind. In der Phase der Rekonvaleszenz ist schließlich eine Hyperplasie der granulozytären und erythroiden Vorläuferzellen festzustellen (POTGIETER et al., 1981).

Bovine Parvoviren (BPV) sind dagegen unterschiedlich pathogen (PARDON et al., 2010). Kälber, die kein Kolostrum erhalten hatten, entwickelten Durchfall nach einer oralen Infektion mit BPV. Die orale Infektion mit BPV von drei Monate alten Kälbern führte, neben Durchfall, zur Entwicklung einer Lymphopenie. Auch auf reproduktive Vorgänge kann eine Infektion mit BPV wohl Einfluss nehmen (SANDALS et al., 1995).

Beim Menschen kann das Parvovirus B19 eine Panzytopenie verursachen (KONDO et al., 2002; YETGIN et al., 2004) und bei Patienten mit einer Immunschwäche im Knochenmark persistieren, wobei es eine hohe Affinität für unreife erythroide Zellen zeigt (ROSENFELD & YOUNG, 1991).

2.3 Beispiele von Panzytopenie mit Pathologie im Knochenmark beim Menschen

Auch beim Menschen wurden verschiedenste Krankheiten mit Panzytopenie und Pathologie im Knochenmark beschrieben. Hier sollen nur einige Beispiele genannt werden.

Hämophagozytische Lymphohistiozytose (HLH)

Die Hämophagozytische Lymphohistiozytose (HLH) beschreibt ein klinisches Syndrom, das eine heterogene Gruppe von Krankheiten zusammenfasst. Zum Einen gibt es genetische Formen (primäre Formen), die autosomal rezessiv oder x-chromosomal vererbt werden. Bei der familiären HLH treten in 70–80 % der Fälle erste Symptome schon im Säuglingsalter (< 1 Jahr) auf. Beispiele für vererbte Immundefekte wären weiterhin das Chédiak-Higashi-Syndrom oder das Griscelli-Syndrom. Zum Anderen werden auch unterschiedlich bedingte erworbene Formen (sekundäre HLH) beschrieben. Den ersten Bericht zu HLH gab es bei Erwachsenen, die eine Organtransplantation erhalten hatten, und anschließend eine Virusinfektion entwickelten. Bald wurde aber klar, dass auch andere Infektionen, wie Bakterien, Pilze oder Protozoen, das Syndrom auslösen können. Dabei stellte sich heraus, dass die Gruppe der Herpesviren, und hier vor allem das Epstein-Barr-Virus und das Cytomegalie-Virus, HLH auslösen können. Die meisten Patienten hatten zuvor keinen bekannten Immundefekt. Eine andere Form wäre das Lymphom-assoziierte hämophagozytische Syndrom. Auch hier scheint das Epstein-Barr-Virus eine entscheidende Rolle zu spielen. Die klinische Diagnose HLH wird gestellt, wenn fünf der folgenden acht Kriterien zutreffen:

- Fieber
- Splenomegalie
- Zytopenie von mindestens zwei Zelllinien
- Hypertriglyceridämie und/oder Hyperfibrinogenämie
- erhöhtes Ferritin
- erhöhter Spiegel von löslichem IL-2-Rezeptor (sCD25)
- verminderte oder nicht vorhandenen natürliche Killer (NK)-Zellaktivität und
- Hämophagozytose im Knochenmark, in der Zerebrospinalflüssigkeit oder in den Lymphknoten

Alle Symptome können durch eine erhöhte Konzentration von inflammatorischen Zytokinen (z.B. IL-1, IL-6, TNF α), sowie durch Organinfiltration durch aktivierte Lymphozyten und Histozyten erklärt werden (JANKA, 2007).

PARDON et al. (2010) diskutieren die HLH im Zusammenhang mit BNP: Zwar wurden viele für die HLH typischen Parameter aufgrund der mangelnden Verfügbarkeit verlässlicher Tests nicht durchgeführt, wie zum Beispiel Ferritin- und sCD25-Spiegelmessungen, oder die Bestimmung der NK-Zellaktivität. Trotzdem wurden durch die zytologische Untersuchung im Knochenmark zweier betroffener Kälber aktivierte Makrophagen und Hämophagozytose nachgewiesen. Auch in Proben von anderen Kälbern waren Gruppen von Makrophagen in engem Kontakt mit Lymphozyten die einzigen Überbleibsel in einem sonst aplastischen Knochenmark. Folglich wurden Vermutungen über eine mögliche Rolle dieser Zellen in der Pathogenese angestellt, obwohl die Symptome von BNP nicht vollständig dem Krankheitsbild der HLH des Menschen entsprechen.

Denguefieber

Auch beim Menschen gibt es mit dem Denguevirus (DENV) einen Vertreter aus der Familie der Flaviviren, das in seiner hämorrhagischen Verlaufsform (Hämorrhagisches Denguefieber) unter anderem eine Depression des Knochenmarks verursacht. Durch Neutralisationstests können mittlerweile vier Serotypen des DENV unterschieden werden. Die Mechanismen, die zu einer schweren Verlaufsform der Infektion führen, sind noch nicht vollständig geklärt. Das DENV wird durch Aedes-Mücken übertragen und gelangt durch deren Stich in die Haut. Das Virus verbreitet sich zuerst über das Blut (primäre Virämie) und infiziert dann vor allem Makrophagen, Hepatozyten und Endothelzellen. Infizierte Zellen sterben zum Großteil durch Apoptose, zum Teil aber auch durch Nekrose. Abhängig vom Ausmaß der Infektion von Stromazellen im Knochenmark und dem Spiegel von löslichen Faktoren wie IL-6, IL-8 oder IL-10 wird die Hämatopoese gehemmt. Die Infektion mit DENV stimuliert gleichzeitig die Entwicklung spezifischer Antikörper und eine zelluläre Immunantwort. IgM kreuzreagiert mit Endothelzellen und Thrombozyten, was zu einer Produktion von Plasmin führt. Dadurch werden die vaskuläre Permeabilität und die Koagulopathie verstärkt. Hinzu kommt eine Erhöhung von IgG, welches heterologe Virusserotypen während einer zweiten Infektion bindet, aber nicht neutralisiert. Dies wiederum

führt zu einer verstärkten Infektion von Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) und lässt die Viruslast weiter ansteigen. Hohe Viruslasten stimulieren wahrscheinlich auch kreuzreaktive T-Zellen. Die Fähigkeit aktivierter T-Zellen, virusinfizierte Zellen zu zerstören ist abhängig von der Avidität des T-Zellrezeptors zum humanen Leukozytenantigen (HLA)-Peptidkomplex. Vermutlich bieten kreuzreaktive T-Zellen niedriger Avidität keinen Schutz, da sie zwar hohe Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine produzieren, aber ihre zytolytische Aktivität verlieren. Eine verzögerte Beseitigung der Viruslast würde die Aktivierung solcher kreuzreaktiven T-Zellen verlängern. Dies würde wiederum zur Produktion von hohen Konzentrationen an Zytokinen (z.B. TNF α , IL-6) oder von anderen löslichen Faktoren führen. Es sind diese löslichen Faktoren, von denen viele noch nicht bekannt sind, die zu Veränderungen der Endothelzellen und damit zur Koagulopathie und zum Entweichen von Plasma aus den Gefäßen führen. Dies kann letztendlich zum lebensbedrohlichen, hypovolämischen Schock führen (ROSENFELD & YOUNG, 1991; MARTINA et al., 2009).

3 Mechanismen zur Entstehung von Autoimmunreaktionen

3.1 Grundlegende Mechanismen

Autoimmunkrankheiten sind die Konsequenz einer Immunantwort gegen körpereigene Antigene (Autoantigene, Selbstantigene), die in der Schädigung von Geweben und Organen resultieren kann (ALBERT & INMAN, 1999). Es gibt viele Mechanismen, die zur Entstehung von Autoimmunreaktionen führen können. Grundsätzlich lassen sich einige generelle Situationen vereinfacht darstellen (SAINT-REMY, 2010).

Molekulare Mimikry

Diese Hypothese beruht auf der Theorie, dass ein empfänglicher Wirt eine Infektion mit einem Agens erfährt, welches Antigene aufweist, die immunologische Ähnlichkeiten mit Antigenen des Wirtes zeigen. Der Unterschied ist aber, dass die Antigene des Agens in der Lage sind, eine Immunreaktion im Wirt hervor zu rufen, wenn sie den T-Zellen präsentiert werden. Die entstandene pathogen-spezifische Immunantwort kann mit den ähnlichen körpereigenen Strukturen kreuzreagieren (ALBERT & INMAN, 1999) und das feine Gleichgewicht, welches im Thymus und

in der Peripherie zur Toleranz von Autoantigenen führt, zerstören. Die T-Zellen, die mit körpereigenen Antigenen reagieren, helfen wiederum B-Zellen, Autoantikörper zu produzieren und infiltrieren das Gewebe. Die molekulare Mimikry wirkt so als Auslösemechanismus und kann dazu führen, dass zusätzliche Zellen in den Prozess mit einbezogen werden. Dies kann in Form der Erkennung neuer T-Zellepitope desselben Autoantigens oder der Ausweitung der Reaktivität auf zusätzliche Autoantigene (Epitope spreading) geschehen (SAINT-REMY, 2010).

Überstimulation von Antigen-präsentierenden Zellen

Im Kontext einer Entzündung und/oder einer Infektion kommt es zur Gewebeerstörung und zur Expression von Rezeptoren der natürlichen Immunität, wie zum Beispiel den Toll-like Rezeptoren (TLR). Das kann dazu führen, dass antigenpräsentierende Zellen überstimuliert werden und die Oberflächenpräsentation von Haupthistokompatibilitätskomplex (Major Histocompatibility Complex, MHC)- Klasse II-Molekülen ansteigt (SAINT-REMY, 2010). Das T-Zell-Repertoire beinhaltet für gewöhnlich eine Anzahl an autoreaktiven Zellen, die der Negativselektion im Thymus entkommen sind (FLETCHER et al., 2011). Diese autoantigen-spezifische T-Zellen finden unter diesen Umständen viel bessere Konditionen für ihre Aktivierung vor. Außerdem beinhalten Proteine, die aus zerstörtem Gewebe freigesetzt werden, einen Pool von Antigenen, die dem Immunsystem neu präsentiert werden (SAINT-REMY, 2010). TSUMIYAMA et al. (2009) beschreiben beispielsweise, dass die Überstimulation des Immunsystems von Mäusen durch wiederholte Applikation eines Antigens unvermeidlich zu systemischen Autoimmunitätsreaktionen führt.

Neuerdings wurde aber auch festgestellt, dass die Toleranzinduktion von T-Zellen lebenslang in der Peripherie im Stroma der Lymphknoten abläuft. Der Entwicklung einer Autoimmunreaktion kann vorgebeugt werden, wenn der autoreaktive T-Zelle ihr verwandtes Antigen durch eine Stromazelle im Lymphknoten präsentiert wird (FLETCHER et al., 2011).

Weitere Beispiele für periphere Mechanismen zur Entstehung von Autoimmunerkrankungen

Peptide von Autoantigenen werden durch MHC-Klasse II und MHC-Klasse I Moleküle präsentiert. T- und B-Zellen werden in der Peripherie in einem nicht-funktionellen Zustand (Anergie) gehalten, solange sie einer gegebenen Konzentration eines Selbstantigens ausgesetzt sind. Die Reduktion dieser Konzentration kann dazu führen, dass die Inhibition der T- und B-Zellen unterdrückt wird und eine autoimmune Reaktion ausgelöst wird (SAINT-REMY, 2010).

Foxp3⁺ CD25⁺CD4⁺ T_{reg}-Zellen sind natürlicherweise im gesunden Immunsystem als eine phänotypisch und funktionell eigene T-Zellsubpopulation zu finden. Sie werden im Thymus gebildet und verbinden zentrale und periphere Mechanismen der Toleranz von Selbstantigenen. Die Foxp3⁺ CD25⁺CD4⁺ T_{reg}-Zellen kontrollieren in der Peripherie autoreaktive T-Zellen, die der Negativselektion im Thymus entkommen sind. Studien haben gezeigt, dass eine Depletion oder Dysfunktion dieser Zellen in sonst gesunden Tieren zur Entstehung einer Autoimmunerkrankung führen kann, unabhängig davon, ob andere Typen von T_{reg}-Zellen vorhanden sind (SAKAGUCHI, 2005).

3.2 Langlebige Plasmazellen

Da Serumantikörper bekanntlich eine kurze Überlebenshalbwertszeit haben (Tage bis Wochen), ist es offensichtlich, dass es einen Pool an stetig antikörperproduzierenden Plasmazellen geben muss, um ein hohes Maß an zirkulierenden Antikörpern auch in der Abwesenheit vom entsprechenden Antigen aufrechterhalten zu können (SLIFKA et al., 1995). Mittlerweile erfolgte der Nachweis von antigenspezifischen, langlebigen Plasmazellen im Knochenmark, die nicht der Zellteilung unterliegen (MANZ & RADBRUCH, 2002). Diese Zellen werden im Kontext einer Immunreaktion generiert und migrieren ins Knochenmark, wo sie, durch Signale von dort ansässigen Zellen, in ihrer so gebildeten Überlebensnische persistieren und über lange Zeiträume hinweg Antikörper sekretieren. Diese Plasmazellen können aber auch in entzündetem Gewebe überleben.

Bei Autoimmunerkrankungen stellen langlebige Plasmazellen, die Autoantikörper produzieren, eine bisher ungelöste Herausforderung dar, da sie resistent gegenüber herkömmlichen Behandlungsmethoden (Immunsuppression, anti-inflammatorische Medikamente) sind (HOYER et al., 2008).

4 Zusammenfassung bisheriger Forschungsergebnisse zur Aufklärung von BNP

Unterschiedliche Arbeitsgruppen haben bisher bekannte, infektiöse oder toxische Ursachen durch Routinediagnostikverfahren und durch die Untersuchung verschiedener Proben von betroffenen Kälbern ausgeschlossen. Dazu gehören beispielsweise DCVC, organische Verbindungen (Lösungsmittel), Cumarinderivate, Chemotherapeutika (Sulfonamide) und Arzneimittelrückstände (Furazolidon). Aber auch Futterproben betroffener Betriebe wurden, besonders im Hinblick auf das Vorhandensein von Mykotoxinen, untersucht (FRIEDRICH et al., 2009; KAPPE et al., 2010).

Für kurze Zeit wurde die Beteiligung eines Circovirus an der Pathogenese von BNP diskutiert. KAPPE et al. (2010) wiesen in verschiedenen Organproben bei fünf von 25 BNP-Kälbern und bei einem von acht Kontrolltieren Circovirusgenom nach, das zu 99 % der Sequenz von PCV-2 entspricht. WILLOUGHBY et al. (2010) präsentierten jedoch Untersuchungsergebnisse, in denen trotz umfangreicher virologischer Diagnostik kein Circovirusgenom nachweisbar war.

KRAPPMANN et al. (2010) untersuchten einen möglichen Zusammenhang von BNP mit einer Mutation im für den Koagulationsfaktor XI codierenden Gen. Ein Zusammenhang mit BNP war nicht nachweisbar. Trotzdem wiesen sie ausdrücklich auf ein mögliches Zusammenspiel einer genetischen Prädisposition mit anderen Faktoren in Hinblick auf die Pathogenese von BNP hin. BALLINGAL et al. (2011) fanden keinen Zusammenhang für eine Prädisposition von BNP und dem Genort für MHC-Klasse II *DRB3* bei Holsteinrindern.

Die einzige bisher festgestellte epidemiologische Gemeinsamkeit bezüglich BNP ist die Vakzinierung der BNP-Mütter mit einem, Mitte 2004 auf den Markt gekommenen (TEICH, 2006), inaktivierten BVDV-Impfstoff (PregSure®-BVD, Pfizer) (FRIEDRICH et al., 2009; BRIDGER et al., 2010). Als Folge gab der Ausschuss für Tierarzneimittel der Europäischen Arzneimittelagentur dem Antrag

Deutschlands (gestellt durch das Paul-Ehrlich-Institut) statt und nahm die Vermarktungsrechte für die Vakzine im Juli 2010 zurück (Pressemitteilung des Ausschusses für Tierarzneimittel der Europäischen Arzneimittelagentur, Treffen vom 13.-15. Juli 2010). Schon zuvor hatte der Hersteller das Produkt freiwillig in Deutschland (April 2010) und schließlich in ganz Europa (Juni 2010) vom Markt genommen. In Ländern, die frei von BVD sind oder keine Impfung durchführen (z.B. Dänemark, Österreich, Schweiz) wurden keine Fälle von BNP bekannt (FRIEDRICH et al., 2011).

5 Zielsetzung

Aufgrund der mündlichen Berichte vieler Landwirte über eine mögliche Auslösung von BNP durch die Fütterung von Kolostrum bestimmter Mütter, sowie der Ergebnisse des im Sommer 2009 durchgeführten Fütterungsversuchs von FRIEDRICH et al. (2011) lag der Schwerpunkt dieser Arbeit in der Analyse von Kolostrumproben von BNP-Müttern. Dabei sollte ein Agens identifiziert werden, das im Vergleich zu Kolostrum von Mutterkühen mit gesunden Kälbern signifikante Unterschiede aufweist. Ein erstes Ziel war die Auftrennung kolostraler Immunglobuline und anderer Proteine und deren Identifikation, um eine Probenbank gereinigter Proteine für weitere Versuche anlegen zu können. Diese Proteine sollten dann in einem zweiten Schritt in verschiedenen Bindungs- und Toxizitätstests auf ihre Reaktion mit bovinen Zellen hin getestet werden. Aus den Bindungsstudien mit bovinen Zellen resultierten Untersuchungen mit Pestiviren, um einen möglichen Zusammenhang mit dem Einsatz des neuen, inaktivierten BVDV-Impfstoffes zu eruieren.

Die hier dargestellten Laboruntersuchungen bezüglich der Pathogenese von BNP, die im Zeitraum von Mai 2009 bis Dezember 2010 durchgeführt wurden, hat das Bayerischen Staatsministerium für Umwelt, Gesundheit und Verbraucherschutz in Auftrag gegeben und finanziert. Die Laboruntersuchungen wurden im Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit in Oberschleißheim durchgeführt.

III. Material und Methoden

1 Probenmaterial

1.1 Kolostrumproben

Kolostrumproben von Kühen, die ein Kalb mit BNP geboren haben

Kolostrumproben dieser Gruppe (BNP-Kolostren) stammten von Kühen, die bereits mindestens ein Kalb mit BNP geboren haben. Diese Proben wurden von den Landwirten abgefüllt, bei -20 °C gelagert und an die Klinik für Wiederkäuer der LMU München weitergegeben. Aliquote dieser Proben wurden in den hier durchgeführten Versuchen verarbeitet.

Eine Probe wurde von einem Tierarzt direkt an das LGL gesendet.

Die Tiere stammen von acht verschiedenen Betrieben (Tabelle III.1) aus verschiedenen Bundesländern. Alle Kühe wurden mindestens einmal mit dem in Verbindung zu BNP diskutierten BVDV-Impfstoff PregSure-BVD® aus inaktiviertem Virus geimpft (Dr. Annette Friedrich, persönliche Kommunikation).

Tabelle III.1 Überblick über die Herkunft und die Verteilung der BNP-Kolostren

Probe Nr.	Betrieb	Regierungsbezirk, Bundesland
BNP-1	A	Nordwürttemberg, Baden-Württemberg
BNP-2	B	Münster, Nordrhein-Westfalen
BNP-3	C	Mittelfranken, Bayern
BNP-4	C	Mittelfranken, Bayern
BNP-5	D	Oberpfalz, Bayern
BNP-6	E	Oberbayern, Bayern
BNP-7	B	Münster, Nordrhein-Westfalen
BNP-8	F	Mittelfranken, Bayern
BNP-9	F	Mittelfranken, Bayern
BNP-10	F	Mittelfranken, Bayern
BNP-11	D	Oberpfalz, Bayern
BNP-12	G	Schwaben, Bayern
BNP-13	G	Schwaben, Bayern
BNP-14	H	Arnsberg, Nordrhein-Westfalen

Kolostrumproben von Kühen mit gesunden Kälbern

Alle 14 Kolostrumproben von Kontrolltieren stammten vom Lehr- und Versuchsgut (LVG) der LMU München, wo BNP bisher nicht aufgetreten ist. Eine Impfung gegen BVDV wird derzeit nicht durchgeführt (Dr. Stefan Nüske, persönliche Kommunikation) (Tabelle III.2). Je 100 ml Kolostrum wurden nach der Geburt des Kalbes in zwei 50 ml Gefäße abgefüllt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Tabelle III.2 Überblick über die asservierten Kontrollkolostrumproben aus dem Lehr- und Versuchsgut der LMU München

Probe Nr.	Herkunft
LVG 397	Lehr- und Versuchsgut der Tierärztlichen Fakultät der LMU München
LVG 404	
LVG 420	
LVG 439	
LVG 454	
LVG 456	
LVG 476	
LVG 483	
LVG 753	
LVG 795	
LVG 827	
LVG 862	
LVG 865	
LVG 903	

1.2 Blutproben

Kälber mit Symptomen von BNP

Die Blutproben von Kälbern mit BNP-Symptomen stammten von Patienten der Klinik für Wiederkäuer der Universität München. Jedem Tier wurden mindestens 50 ml EDTA-Blut entnommen.

Jedem Kalb wurden zusätzlich 10 ml nicht gerinnungsgehemmtes Blut zur Gewinnung von Serum entnommen.

Gesunde Kälber

Blutproben von gesunden Kälbern wurden von Tieren des LVG entnommen. Alle Tiere waren zwischen einem und 28 Tagen alt, um möglichst genau der Altersgruppe der BNP-Kälber zu entsprechen. Es wurden 10-30 ml EDTA-Blut und 10 ml nicht gerinnungsgehemmtes Blut zur Serumgewinnung entnommen.

Serumproben von Mutterkühen

Mutterkühen, die bereits mindestens ein BNP-Kalb geboren hatten, wurden 10 ml nicht gerinnungsgehemmtes Blut zur Serumgewinnung entnommen. Die Tiere stammten von zwei Betrieben in denen viele Fälle von BNP auftraten.

Als Kontrollen wurde die gleiche Menge an Blut zwei Müttern (eine Kuh stammte aus dem LVG, die andere aus der Klinik für Wiederkäuer der LMU München) mit gesunden Kälbern entnommen.

1.3 Organproben aus der Pathologie

In der Pathologie des LGL wurden Knochenmark- und Thymusproben von Kälbern entnommen (Tabelle III.3). Ein Stück des Femurknochen wurde ausgesägt, zur Desinfektion in Ethanol (70 %) getaucht und in einer sauberen Plastikschaale bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C eingefroren. Vom Thymus der Kälber wurde ein walnussgroßes Stück entnommen, ebenfalls mit Ethanol desinfiziert und in einer sauberen Schale bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Als Kontrollen dienten Proben von Kälbern, die aus einem anderen Grund in die Pathologie zur Untersuchung eingeliefert wurden und keine sichtbaren Veränderungen des Knochenmarks, sowie keine inneren oder äußeren Blutungen aufwiesen.

Tabelle III.3 Anzahl der in der Pathologie des LGL entnommenen Knochenmark- und Thymusproben von BNP- und Kontrollkälbern

	Knochenmark	Thymus
BNP-Kälber	8	3
Kontrollkälber	15	2

2 Labormaterial

2.1 Zellen

Bovine Leukozyten und periphere mononukleäre Blutzellen (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) aus dem Blut von Kälbern (1-28 d)

Diese Zellen wurden aus dem Blut von Kälbern gewonnen und direkt für verschiedene Versuche verwendet.

Madin Darby Bovine Kidney (MDBK) Zellen (ATTC Katalog Nr. CCL-22™)

Diese Zellen wurden für Bindungs- und Reduktionstests mit kolostralem IgG verwendet.

Bovine Kidney Zellen (BK-KL3A, Fa. Bayer AG)

Diese Zellen wurden für Bindungstests mit kolostralem IgG verwendet.

Porcine Kidney 15 (PK15) Zellen (ATTC Katalog Nr. CCL-33™)

Diese Kontrollzelllinie einer nicht zu den Wiederkäuern gehörenden Spezies wurde für Bindungstests mit kolostralem IgG verwendet.

2.2 Viren

Die verwendeten, Viruszellkulturen der nicht zytopathogenen (ncp) Pestiviren wurden ursprünglich dankenswerterweise von Dr. Georg Meyers (Institut für Immunologie, Friedrich Löffler Institute, Tübingen) zur Verfügung gestellt.

Bezeichnung	Stamm	KID ₅₀ /ml
Bovines Virusdiarrhö Virus (BVDV)	New York	6,5
Border Disease Virus (BDV)	X818	6,5
Europäisches Schweinepestvirus (ESPV)	Glentorf	6,5

2.3 Chemikalien, Reagenzien, Nährmedien

Chemikalien und Reagenzien

1,4-Dithiothreitol	Roth, Karlsruhe
2-Mercaptoethanol	Bio-Rad, München
7-Aminoactinomycin D (7-AAD)	Beckton Dickinson, Heidelberg
Agarose (Gibco)	Invitrogen, Darmstadt
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	AppliChem, Darmstadt
Aqua destillata (Water purification system)	Sartorius Stedim biotech, Aubagne, Frankreich
Chlorwasserstoff (HCl), 1M	Merck, Darmstadt
Concanavalin A	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
DEPC treated H ₂ O	Ambion, Darmstadt
Dikalium-Ethylendiamintetraacetat	Roth, Karlsruhe
Dulbecco's PBS (10 x) without Ca ²⁺ & Mg ²⁺	PAA, Linz, Österreich
Essigsäure 100 % p.a. (Eisessig)	Roth, Karlsruhe
Ethanol absolut, zur Analyse	Merck, Darmstadt
Ethanol 70 % (vergällt)	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromidlösung	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	AppliChem, Darmstadt
Fetal bovine serum (FBS)	Biochrom AG, Berlin
Fetal bovine serum (FBS)	PAA, Linz, Österreich

Gentamicin (50 mg/ml)	PAA, Linz, Österreich
Glycerin	Roth, Karlsruhe
HEPES 1M	PAA, Linz, Österreich
ITS+3 Liquid Media Supplement (100x)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Kaliumhydrogencarbonat	AppliChem, Darmstadt
Lämmli-Puffer (2x)	Bio-Rad, München
Low-Tox Guinea Pig Complement, Lyophilized	Cedarlane, Burlington, Kanada
Lymphocyte Separation Medium LSM 1077	PAA, Linz, Österreich
MEM Earle's Salts Medium	PAA, Linz, Österreich
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumbikarbonat 7,5 % (w/v)	PAA, Linz, Österreich
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumpyruvat 100 mM	PAA, Linz, Österreich
Natronlauge (NaOH)	Merck, Darmstadt
Nicht-essentielle Aminosäuren	PAA, Linz, Österreich
Normal goat serum (Ziegen Serum)	Promo Cell, Heidelberg
Precision Plus Protein Standard unstained	Bio-Rad, München
RPMI 1640	PAA, Linz, Österreich
SyproRuby Protein gel stain	Bio-Rad, München

TAE-Puffer (Gibco)	Invitrogen, Darmstadt
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Roth, Karlsruhe
Tris/Glycin/SDS (10 x) Laufpuffer	Bio-Rad, München
TRIS-HCl	Roth, Karlsruhe
Trypan blue 0,5% (w/v)	Biochrom AG, Berlin

Nährmedien

<i>Serumfreies Medium</i>	1 % Natriumpyruvat; 1 % NEAS; 1 % ITS-3; 1 % 1M HEPES; 0,2 % Gentamycin; RPMI 1680 (PILLING et al., 2009)
<i>Medium für BK-KL3A Zellen</i>	5 % FBS; MEM Earle's Salts
<i>Medium für MDBK-Zellen</i>	5-10 % FBS; 1 % NEAS; 1 % Natriumbikarbonat; MEM Earle's Salts
<i>Medium für PK15-Zellen</i>	Anzucht 10 % FBS; 1 % NEAS; 0,8 % Natriumbikarbonat; MEM Earle's Salts Erhaltung 2 % FBS; 1 % NEAS; 1 % Natriumbikarbonat; MEM Earle's Salts

2.4 Antikörper

Primäre, unkonjugierte Antikörper

Alle verwendeten Antikörper stammen aus der Maus und reagieren mit ihren entsprechenden bovinen Antigenen.

Klon	Antigen	Isotyp	Konzentration	verwendete Verdünnung	Herkunft
CC30	CD4	IgG1	unbekannt	1:10	D. Werling
CC63	CD8	IgG2a	unbekannt	1:10	D. Werling
CC21	CD21	IgG1	unbekannt	1:10	D. Werling
CC149	CD172a	IgG2b	unbekannt	1:10	D. Werling
IL-A88	MHC1	IgG2a	unbekannt	1:10	D. Werling
IL-A42	CD2	IgG2a	unbekannt	1:10	D. Werling
AKS1	CD335 NKp46	IgG1	1 mg/ml	1:1000	AbD Serotec
MM1A	CD3	IgG1	1 mg/ml	1:1000	VMRD
CC15	WC1	IgG2a	1 mg/ml	1:1000	AbD Serotec

Sekundäre, fluorochromkonjugierte Antikörper

Alle hier verwendeten Antikörper stammen aus der Ziege und reagieren mit dem entsprechenden Immunglobulinisotypen aus der Maus.

Bezeichnung	Konzentration	verwendete Verdünnung	Herkunft
P21129 IgG1 PE	1 mg/ml	1:1000	Molecular Probes
A-21126 IgG1 Alexa Fluor 633	2 mg/ml	1:2000	Molecular Probes
A21131 IgG2a Alexa Fluor 488	2 mg/ml	1:2000	Molecular Probes
A-21136 IgG2a Alexa Fluor 633	2 mg/ml	1:2000	Molecular Probes
M32404 IgG2b PE	unbekannt	1:5	Molecular Probes
IgG FITC	1 mg/ml	1:200	AbD Serotec

Isotypkontrollen

Bezeichnung	Isotyp	Konzentration	verwendete Verdünnung	Herkunft
MCA928	IgG1	0,1 mg/ml	1:100	AbD Serotec
MCA929	IgG2a	0,1 mg/ml	1:100	AbD Serotec
MCA691	IgG2b	0,1 mg/ml	1:100	AbD Serotec

2.5 Puffer und Lösungen

Gelfiltrationschromatographie

Alle Puffer wurden mit destilliertem Wasser (Aqua dest.) angesetzt und anschließend durch 0,22 µm-Filter in Glasflaschen vakuumfiltriert.

Bezeichnung	Bestandteile	Durchflussrate
Laufpuffer pH8	0,1M TRIS-HCl 0,5M NaCl NaOH zum Einstellen des pH-Werts	Äquilibrieren 2,6 ml/min Probenauftrennung 1 ml/min
Waschpuffer	0,2M NaOH	1,3 ml/min
Aqua dest.	destilliertes Wasser	1,3 ml/min
20 % Ethanol	Ethanol absolut zur Analyse	1,3 ml/min

Durchflusszytometrie

FACS Flow Sheath Fluid	BD Biosciences, Heidelberg
7-AAD-Puffer	Gebrauchsverdünnung 1:50 in PBS _o

SDS-PAGE

1x Tris/Glycin/SDS Laufpuffer	100 ml 10x Tris/Glycin/SDS Laufpuffer + 900 ml Aqua dest.
10 % Glycerinlösung	50 ml Glycerin + 450 ml Aqua dest.
2x Probenpuffer reduzierend	10 µl 2-ME + 190 µl 2x Lämmli-Puffer
Fixierlösung (10 % Methanol, 7 % Essigsäure)	100 ml Methanol + 70 ml Essigsäure + 830 ml Aqua dest..

Andere Puffer und Lösungen

Erythrozytenlysepuffer	8,29 g/l NH ₄ Cl, 1,0 g/l KHCO ₃ , 1 mM EDTA in Aqua dest.
PBS (1x) ohne Kalzium und Magnesium	50 ml PBS ₀ (10x) ad 500 ml Aqua dest.
Physiologische Kochsalzlösung (0,9 %)	8,0 g NaCl ad 1000 ml Aqua dest.
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS), 2M	121,14 g TRIS ad 500 ml Aqua dest.

2.6 Kits

Bovine IgA ELISA Kit	Bethyl Laboratories, Montgomery, USA
Bovine IgG ELISA Kit	Bethyl Laboratories, Montgomery, USA
Bovine IgM ELISA Kit	Bethyl Laboratories, Montgomery, USA
DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Svanovir Bovine Viral Diarrhoea Virus antibody ELISA	Svanova, Uppsala, Schweden

Die hier verwendeten Kits wurden mit den vom Hersteller mitgelieferten Reagenzien nach Anleitung durchgeführt.

Geldokumentation SDS-PAGE

Gel iX Imager Intas

Gelelektrophoreseapparatur

Mini-Protean 3 Cell Bio-Rad

Heizblock/Thermomixer

Thermomixer Comfort Eppendorf

Magnetrührer

Combimag REO Janke & Kunkel GmbH

Mikroskope

Laborlux 12 Leitz

CKX 41 Olympus

Mikrotiterplattenschüttler

Schüttler MTS 4 IKA

Pipetten

Reference 10-100/50-200/1-1000 µl Eppendorf

Research 1-10 µl Eppendorf

Research (8-Kanal) 30-300 µl Eppendorf

Multipette plus Eppendorf

Pipettierhilfe

Easypet Eppendorf

Power Supply (für SDS-PAGE)

PowerPac HC Bio-Rad

Schüttelmaschine (für SDS-PAGE Gelfärbung)

SM 25 Laborgerätebau Glastechnik
Umwelttechnik

Sicherheitswerkbank

Hera Safe Heraeus

Thermocycler

T3000 Thermocycler Biometra

Ultrazentrifugenrotor

Type 45 Ti Fixed Angle Rotor Beckman Coulter

Vortex

Vortex Genie 2 Scientific Industries

Waage

CP622–OCE Sartorius

Zählkammer

Fuchs-Rosenthal Brand GmbH

Zentrifugen

Heraeus Megafuge 1.0 Thermo Fisher Scientific

Optimal L-90 K Ultrazentrifuge Beckman Coulter

2.9 Software

Verwendungszweck

Programm

Auswertung FACS-Daten	Flow Jo 7.6.3, Tree Star
Durchflusszytometer Software	FACS Diva, BD Biosciences
Chromatographiesystem Software	Prime View 5.0 Edition AB, GE Healthcare
ELISA-Reader Software	Magellan
Textverarbeitung	MS Word
Diagramme und Tabellen	MS Excel
Literaturverwaltung	Endnote X4
Statistikprogramm	SPSS Statistics 18.0.0
Geldokumentation Aufnahmesoftware SDS-PAGE	PCI Gel Imager, Intas
Auswertesoftware SDS-PAGE	LabImage, Kapelan

2.10 Verbrauchsmaterial

Blutröhrchen zur Serumgewinnung, 10 ml	KABE Labortechnik, Nümbrecht
Cell Star Gewebekulturflasche	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Combitips plus 1 ml, 2,5 ml, 20 ml	Eppendorf, Hamburg
EDTA-Blutröhrchen, 10 ml	KABE Labortechnik, Nümbrecht
Falcon Tubes, 12x75 mm	Beckton & Dickinson, Heidelberg
Filteraufsatz 500 ml zur Vakuumfiltration	Biochrom AG, Berlin
Mikrotestrundbodenplatten aus PS, 96 Vertiefungen, steril und unsteril	Sarstedt, Nümbrecht

Stahlnetz für die FACS-Proben, Maschenweite 0,042 mm	W&E Drahtgewebefabriken, Ludwigsstadt
pH-Indikatorstäbchen (pH 0-14)	Macherey-Nagel, Düren
PP-Röhrchen, steril, 15 ml und 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Ready Gel Tris-HCl 4-20 %	Bio-Rad, München
Safe-Lock Tubes 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Spritzenfilter, 0,45 µm	Sartorius Stedim biotech, Aubagne, Frankreich
Ultrazentrifugenröhrchen aus Polykarbonat, 70 ml	Beckman Coulter, Brea, USA
Zellschaber 24 cm	TPP, Trasadingen, Schweiz

3 Methoden

3.1 Virologische Methoden

3.1.1 Virologische Diagnostik

Internationales Referenzlabor für BTV und EHDV in Pirbright, England

Serum-, Leukozyten- und EDTA-Blutproben betroffener Kälber wurden an das internationale Referenzlabor des Instituts für Tiergesundheit in Pirbright, England, geschickt. Dort wurden die Proben auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen BTV und EHDV und zum Nachweis von Virusgenom von BTV und EHDV getestet (Tabelle III.4). Die Proben wurden dabei entsprechend ihres Ursprungs zusammengefasst, so dass letztendlich vier Probengruppen entstanden.

Tabelle III.4 Übersicht über die nach Pirbright versendeten Proben zur virologischen Diagnostik

Gruppe Nr.	Probe	Probenart	Kommentar
1	891/09	Serum	BNP-Kalb
	2. BK-KL3A Zellpassage mit Serum von Kalb 891/09		Zytopathogener Effekt nach 1. Passage
2	892/09	Serum	BNP-Kalb
	2. BK-KL3A Zellpassage mit Serum von Kalb 892/09		Zytopathogener Effekt nach 1. Passage
3	1006/09	Leukozyten	BNP-Kalb
		EDTA-Blut	
		Serum	
4	1007/09	Leukozyten	BNP-Kalb
		EDTA-Blut	
		Serum	

Die Untersuchungen erfolgten auf Grundlage der Vorgaben für das internationale Referenzlabor für BTV und EHDV in Pirbright mittels Antikörper-ELISA und Virusgenom-Nachweis durch spezifische reverse Transkriptions-PCR (RT-PCR).

Chip-Hybridisierungsexperiment

Der Versuch wurde mit einem Biochip (Biosecurity Chip SD0443, Entwicklung gefördert vom „Department for Environment, Food and Rural Affairs“ DEFRA, England), der eine Probenhybridisierung mit über 600 konservierten Nukleotidsequenzen aus bekannten Virusfamilien von Vertebraten, Invertebraten und Pflanzen erlaubt, durchgeführt. Es wurden Serumproben von BNP-Kälbern (n= 2) und gesunden Kälbern (n= 2) getestet. Dies war möglich durch die freundliche Unterstützung von Dirk Werling (Royal Veterinary College (RVC), London, England), Victoria Offord (RVC), Abu-Bakr Abu Median (Institut für Tiergesundheit, Pirbright, England) und Paul Britton (Institut für Tiergesundheit).

Virologische Untersuchungen am Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit

BVDV-Antikörper Nachweis durch ELISA

Kolostralseum-Proben von Kontrollmüttern (n= 7) und BNP-Müttern (n= 6) wurden als Vortest in einer 1 zu 10 Verdünnung mit einem standardmäßig nach QSA-Vorschriften des LGL verwendeten indirektem ELISA zum Nachweis von BVDV-spezifischen IgG₁ Antikörpern (SVANOVIR® BVDV-Ab ELISA, Svanova) nach Herstellerangaben getestet. Im Anschluss daran wurden alle verwendeten Proben der Peakfraktion 2 (kolostrales IgG) von BNP-Müttern (n= 14) und Kontrollmüttern (n= 11) in einer Konzentration von 200 µg/ml mit diesem ELISA getestet.

Jede Probe wurde in zwei Plattenvertiefungen über Nacht getestet und die Absorption (optische Dichte, O.D.-Wert) wurde gemessen. Eine Vertiefung war dabei mit BVDV-Antigen beschichtet, die andere war mit einem Kontrollantigen zum Ausschluss unspezifischer Bindungen beschichtet. Vor der Auswertung müssen die gemessenen O.D.-Werte der Proben ($OD_{\text{BVDV-Ag}}$) korrigiert werden, indem die korrespondierenden Werte aus den Vertiefungen mit Kontrollantigen ($OD_{\text{Kontroll-Ag}}$) abgezogen werden.

$$OD_{\text{BVDV-Ag}} - OD_{\text{Kontroll-Ag}} = OD_{\text{korrigiert}}$$

In jedem Test laufen eine Positiv- und eine Negativkontrolle zur Validierung des Tests mit. Die Extinktionswerte der Proben (PP) werden in % des Extinktionswertes der positiven Kontrollen ausgedrückt und mit folgender Formel berechnet:

$$PP = \frac{OD_{\text{korrigiert}} \text{ der Probe}}{\bar{x} \cdot OD_{\text{korrigiert}} \text{ der Positivkontrolle}} \times 100$$

Die Höhe des PP-Wertes korreliert mit der Höhe des Antikörpertiters und die Grenzwerte sind für Einzelmilchproben vom Hersteller wie folgt festgelegt:

PP-Wert	Bewertung
< 9	Negativ
≥ 9	Positiv

Nachweis von BVDV-, BTV- und PCV-2-Genom durch RT-PCR

Die Untersuchungen zum Nachweis von BVDV-Genom wurden nach der QSA des LGL durchgeführt, die auf der amtlichen Methodensammlung des nationalen Referenzlabors (Friedrich-Löffler-Institut, <http://www.fli.bund.de>; in der Fassung vom Januar 2011) beruhen. Die Untersuchungen zum PCV-Genomnachweis wurden ebenfalls nach der QSA des LGL durchgeführt. Einen Überblick über die untersuchten Proben gibt Tabelle III.5.

Tabelle III.5 Untersuchungen zum Genomnachweis von Circovirus (CV) und bovinem Virusdiarrhö Virus (BVDV) in verschiedenen Proben von BNP- und Kontrolltieren nach QSA-Vorschriften am Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit

	Untersuchungen zum Genomnachweis von
Knochenmark von BNP-Kälbern	CV (n= 3) BVDV (n= 8)
Knochenmark von Kontrollkälbern	CV (n= 3) BVDV (n= 14)
Kolostrum von BNP-Müttern	CV (n= 2)
Kolostrum von Kontrollmüttern	CV (n= 2)
Inaktivierter BVD-Impfstoff (PregSure-BVD®, Pfizer)	CV (n= 1)
Zellkulturüberstand BK-KL3A Zellen	CV (n= 1)
1. Passage BK-KL3A Zellen nach Beimpfung mit BNP-Serum	CV (n= 1)

3.1.2 Nachweis von Circovirus-Genom mit einer PCR nach HALAMI et al. (2008)

Extraktion von DNA aus Zell- und Gewebeproben

Die DNA wurde bei allen verwendeten Proben nach Herstellerangaben mithilfe des DNEasy Blood&Tissue Kits (QIAGEN) extrahiert. Als Extraktionskontrolle (EK) diente Überstand aus einer Hühnerembryo-Fibroblasten-Zellkultur (HEF). Als Positivkontrolle wurde DNA aus einem Stück Schweinelunge, die positiv für PCV-2 getestet worden war, extrahiert. Neben Femurmark von BNP-Kälbern wurden Thymusproben und Leukozytensuspensionen der Kälber aus dem Fütterungsversuch getestet.

Von Organproben (Knochenmark, Thymus, Lunge) wurden vor der Extraktion jeweils ein erbsengroßes Stück in einem 2 ml Reaktionsgefäß mit einem Stahlkügelchen (Ø 5 mm, QIAGEN) und 180 µl ATL-Puffer versetzt und in einem Tissue Lyser bei 25 Hz 3 min zerkleinert. Anschließend wurden 20 µl Proteinase K zugegeben und die Reaktionsgefäße wurden kurz geschüttelt. Die Proben wurden über Nacht bei 56 °C inkubiert, um eine möglichst gute Lyse des Gewebeproteins zu erreichen. Am nächsten Tag wurden die Proben erneut für 15 s kräftig geschüttelt und anschließend wurden 200 µl AL-Puffer hinzu gegeben und gut vermischt. Jetzt wurden 200 µl Ethanol (100 %) zugegeben und sofort gut gemischt. Nachfolgend wurden die Proben auf DNA-Fängersäulen aufgetragen. Es folgte ein einminütiger Zentrifugationsschritt bei 8000 U/min. Die DNA-Fängersäulen wurden im Anschluss an jeden Zentrifugationsschritt jeweils in ein neues Auffanggefäß übertragen. Daraufhin wurden die Proben zuerst mit 500 µl AW1-Waschpuffer versetzt und bei 8000 U/min für 1 min zentrifugiert. Ein zweiter Waschschrift mit 500 µl AW2-Waschpuffer und anschließender Zentrifugation bei 14 000 U/min für 3 min folgte. Die Fängersäule wurde noch einmal in ein neues Auffanggefäß gesetzt und für 1 min bei 14 000 U/min trocken zentrifugiert, um auch die letzten Reste an Ethanol zu entfernen. Jetzt wurden die Säulen in 1,5 ml Reaktionsgefäße gesteckt und nach Zugabe von 100 µl AE-Puffer (Elution der DNA) für 1 min bei Raumtemperatur (RaT) inkubiert. Die Proben wurden für 1 min bei 8000 U/min zentrifugiert. Um die DNA-Ausbeute zu maximieren, wurden nochmals 100 µl AE-Puffer zugegeben und der Zentrifugationsschritt wiederholt. Die Proben wurden bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Die Extraktion von DNA aus Leukozytenzellsuspension verlief ähnlich. Die zuvor bei -80 °C gelagerten Proben wurden aufgetaut. 100 μl Zellsuspension wurden mit 20 μl Proteinase K und anschließend mit 200 μl AL-Puffer versetzt. Die Proben wurden bei 56 °C für 10 min inkubiert. Die restliche Extraktion wurde, wie bereits beschrieben, durchgeführt.

Pan Circovirus-PCR nach HALAMI et al. (2008)

Der Nachweis von Circovirus-Genom erfolgte nach einem Protokoll für eine konventionelle PCR (1. Runde) kombiniert mit einer nested PCR (2. Runde) nach HALAMI et al. (2008). Zur Kontrolle der DNA-Extraktion und zum Ausschluss einer Inhibition der PCR wurde eine DNA-Extraktionskontrolle (EK; Überstand einer HEF-Zellkultur) und eine Positivkontrolle (PK; DNA aus PCV-2 positiver Schweinelunge, 1:100 verdünnt) mitgeführt. Nach Herstellung des Mastermixes, der für beide Runden gleich war (Tabelle III.6), wurden 42,6 μl von Mastermix 1 vorgelegt und anschließend 1 μl DNA hinzugefügt. Nach einer initialen Denaturierung wurden 6,4 μl des Mastermix 2 zugefügt. Die PCR erfolgte nach dem in Tabelle III.7 dargestellten Thermalprofil.

Tabelle III.6 Reaktionsvolumina und -konzentrationen der Mastermix-Komponenten für beide Runden der PCR nach HALAMI et al. (2008)

Mastermix-Komponente	Volumen	Konzentration
MgCl ₂	2,5 µl	15 µM
DEPC H ₂ O	38,1 µl	
Primer rev	1 µl	25 µM
Primer for	1 µl	25 µM
Mastermix 1 (konventionelle PCR)	42,6 µl	
dNTPs	1 µl	2,5 mM
Taq	0,4 µl	2 Units/µl
10x Puffer	5 µl	
Mastermix 2 (nested PCR)	6,4 µl	
Gesamtvolumen Mastermix	49 µl	
Zugabe DNA	1 µl	
Gesamtvolumen Reaktionsansatz	50 µl	

Tabelle III.7 Thermalprofil für die beiden Runden der PCR nach HALAMI et al. (2008)

Initiale Denaturierung	95 °C	5 min	
Pause	85 °C	∞ Zugabe Mastermix 2	
Denaturierung	94 °C	30 s	45 Zyklen
Annealing	46 °C (nested PCR: 56 °C)	1 min	
Elongation	72 °C	1 min	
Finale Elongation	72 °C	5 min	

Agarosegelelektrophorese

Die gelelektrophoretische Auftrennung der in den beiden PCRs generierten Nukleinsäurefragmente erfolgte über 1,5 %iges Agarosegel (1,5 g Agarose pro 100 ml 1x TAE-Puffer). Zur späteren Visualisierung der DNA-Banden wurden 3 µl (0,01 µg/µl) Ethidiumbromidlösung pro 100 ml Gel zugesetzt. Nach der Polymerisation des Gels wurden die DNA-Proben mit Gel-Ladepuffer vermischt und in die Geltaschen pipettiert. Um die Produktgrößen bestimmen zu können, wurde eine 100 bp DNA-Leiter als Größenmarker aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 90 V für 45 min in TAE-Puffer. Der Nachweis der DNA-Banden erfolgte mit Hilfe eines digitalen Geldokumentationssystems (Biometra). Eventuell generierte Doppelstrang-DNA wurde bei UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$) nachgewiesen.

Untersuchte Proben

Tabelle III.8 Mit der PCR nach HALAMI et al. (2008) untersuchte Proben zum Nachweis von Circovirusgenom

Probe	BNP-Kälber	Kontrollkälber
Knochenmark	6	13
Thymus	2	2

Sonstige Proben

Ultrazentrifugat von BK-KL3A Zellen

Ultrazentrifugat inaktivierter BVD Impfstoff (PregSure-BVD®, Pfizer)

Nukleotidsequenzanalysen

Bei drei Proben (BNP-Knochenmark, Ultrazentrifugat von BK-KL3A Zellen, Kontroll-Knochenmark), die eine Bande auf der zu erwartenden Höhe zeigten, sowie der Positivkontrolle wurden die DNA-Fragmente auf einer Leuchtplatte mit UV-Licht (360 nm) dargestellt und aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Im Anschluss wurden sie mithilfe des QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) nach Angaben des Herstellers extrahiert.

Die Sequenzierung der DNA-Fragmente wurde bei der Firma Eurofins MWG (Martinsried) in Auftrag gegeben. Zur Sequenzierung wurden die gleichen Primer wie für die PCR verwendet.

Untersuchungen zur Übereinstimmung der Sequenzen wurden mithilfe der Anwendung BLASTn 2.2.25 (ZHANG et al., 2000) durchgeführt.

3.2 Bearbeitung von venösem peripheren Blut

Blutentnahme

Das Blut wurde durch Punktion der Vena jugularis externa mit einer sterilen Kanüle (18G) möglichst zeitnah zu den Versuchen gewonnen. Das venöse Blut wurde in mit EDTA beschickten 10 ml Plastikröhrchen oder in 10 ml Gefäße zur Serumgewinnung oder in, mit 5 ml EDTA-Lösung (75 mg EDTA in 5 ml PBS₀) gefüllten, 50 ml PP-Röhrchen aufgenommen und so schnell wie möglich weiter verarbeitet. Lagerung und Transport erfolgten bei Raumtemperatur.

Gewinnung von Serum

10 ml nicht gerinnungsgehemmtes Blut wurden für mindestens vier Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. Dann wurde es für 20 min bei 2700 U/min (Megafuge 1.0, Heraeus) zentrifugiert. Der Überstand (Serum) wurde mit einer Pipette abgenommen und in Safe-Lock Tubes (2 ml) bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Isolierung von Leukozyten

10 bis 15 ml EDTA-Vollblut wurden in ein 50 ml Reaktionsgefäß gefüllt und mit Erythrozytenlysepuffer aufgefüllt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei Raumtemperatur wurde das lysierte Blut für 10 min bei 1500 U/min zentrifugiert (Megafuge 1.0, Heraeus). Nach Abgießen des Überstandes wurde das Leukozytenzellpellet mit PBS ohne Kalzium und Magnesium (PBS₀) resuspendiert. Zellen vom selben Tier wurden zusammen geführt. Das Röhrchen mit der Leukozytenzellsuspension wurde mit PBS₀ aufgefüllt und erneut für 10 min bei 1500 U/min zentrifugiert (waschen). Abhängig von der Größe des Leukozytenzellpellet wurde dieses in 1 bis 3 ml PBS₀ aufgenommen und gut resuspendiert.

10 µl der Leukozytenzellsuspension wurden mit 990 µl Trypanblau (0,5%) gemischt und die Zellen mithilfe einer Fuchs-Rosenthal-Kammer unter dem Mikroskop ausgezählt. Die Konzentration wurde für alle Experimente auf 2×10^7 Zellen/ml eingestellt.

Auftrennung von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) und Granulozyten durch Dichtegradientenzentrifugation

Zur Auftrennung von PBMC und Granulozyten wurde das Leukozytenzellpellet in ca. 4 ml PBS_o aufgenommen. 9 ml Separationsmedium zur Dichtegradientenzentrifugation (Ficoll) wurden in einem 15 ml-Röhrchen vorgelegt und vorsichtig mit der Leukozytenzellsuspension überschichtet. Das Röhrchen wurde für 35 min bei 1600 U/min (Megafuge 1.0, Heraeus) ohne Bremse zentrifugiert.

Das Zellpellet enthielt die Granulozyten, die PBMC befanden sich in einem grauweißen Ring zwischen Plasma und Ficoll. Der Ring wurde vorsichtig abgenommen, in ein 50 ml-Röhrchen transferiert und mit PBS_o aufgefüllt. Das restliche Ficoll wurde dekantiert und das Granulozytenpellet in 5 ml PBS_o resuspendiert. Beide Subpopulationen wurden noch einmal mit PBS_o, wie bereits beschrieben, gewaschen und auf eine Konzentration von 2×10^7 Zellen/ml eingestellt (siehe oben).

3.3 Auftrennung und Nachweis kolostraler Proteine

3.3.1 Vorbereitung von Kolostrum

Die Kolostrumproben wurden nach einer von AZWAI et al. (1996) beschriebenen Methode vorbereitet. Dazu wurden 100 ml Kolostrum mit 50 ml 0,9%iger NaCl-Lösung gemischt. Je 62 ml der Mischung wurden in zwei Ultrazentrifugenröhrchen gefüllt und bei 37 000 U/min (Optimal L-90 K Ultrazentrifuge, Beckman Coulter) eine Stunde bei 4 °C zentrifugiert und dadurch entfettet. Der klare, wässrige Überstand (Laktoserum) zwischen der oberen Fettschicht und dem Zellpellet wurde abgenommen, auf einem Magnetrührer gemischt und durch Zugabe von 1M HCl mithilfe von pH-Indikatorstäbchen auf einen pH-Wert von 4 eingestellt. Das Laktoserum wurde erneut zentrifugiert (25 000 U/min, 30 min, 4 °C). Nach Abnahme des Überstandes wurde dieser auf dem Magnetrührer gerührt, durch Zugabe von 2M TRIS neutralisiert (pH 7) und ein letztes Mal zentrifugiert (25 000 U/min, 30 min, 4 °C). Der Überstand wurde durch einen 0,45 µm Spritzenfilter in 15 ml Reaktionsgefäßen steril filtriert. Das Filtrat (Kolostralserum) wurde bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.3.2 Gelfiltrationschromatographie

Die Gelfiltration ist eine Methode, um Moleküle nach ihrer Größe aufzutrennen. Die Probe wird auf eine Säule aufgetragen und die enthaltenen Moleküle wandern mit einem Laufpuffer durch die poröse Matrix (hier Sephacryl S-300) im Inneren der Säule. Da große Moleküle nicht in die Säulenmatrix eindringen können, werden sie zuerst eluiert. Kleinere Partikel können in unterschiedlichem Ausmaß in die Matrix eindringen und benötigen dadurch länger, um das Säulenbett zu durchwandern.

Gerät und Säule

Das hier verwendete Gerät war das ÄKTaprime Plus Chromatographiesystem (GE Healthcare). Die Absorption der aufgetrennten Proteine wurde bei Licht der Wellenlänge 280 nm gemessen. Zusätzlich wurde außerdem die Leitfähigkeit, der Druck und die Temperatur erfasst. Der geräteeigene Durchflussbegrenzer wurde ausgebaut, um einen zu hohen Druck im System zu vermeiden.

Es wurde eine vorgepackte Säule (HiPrep XK26/60 Sephacryl S-300 HR, GE Healthcare) mit einem Säulenvolumen von 320 ml verwendet

Software und PC

Die vom Gerät gemessenen Parameter wurden durch einen angeschlossenen Laptop aufgezeichnet und gespeichert. Dazu wurde die geräteeigene Software Prime View 5.0 Edition AB (GE Healthcare) verwendet, die auch zur Auswertung der Daten diente.

Waschen, Äquilibrieren und Lagerung der Säule

Vor jeder Auftrennung wurde die Säule mit $\frac{1}{2}$ Säulenvolumen Aqua dest. und zwei Säulenvolumen Laufpuffer äquilibriert. Als Kontrolle für eine erfolgreiche Äquilibrierung wurde die UV-Grundlinie herangezogen. Nach jedem Lauf wurde die Säule mit $\frac{1}{2}$ Säulenvolumen Waschpuffer gewaschen und anschließend äquilibriert. Wurde die Säule länger als einen Tag nicht genutzt, wurde sie nach dem letzten Lauf mit $\frac{1}{2}$ Säulenvolumen Waschpuffer und drei Säulenvolumen Aqua dest. gewaschen und schließlich mit drei Säulenvolumen 20 % Ethanol gespült und, mit diesem gefüllt, gelagert.

Auftrennung von kolostralen Proteinen

Die Auftrennung erfolgte im Kühlraum bei 4 °C. Der an das Gerät angebrachte 2 ml-Sample Loop wurde mit 10 ml Laufpuffer gespült. 6 ml Kolostralerum wurden in einer Einmalspritze aufgezogen. Diese wurde auf das Injektionsventil des Gerätes aufgesetzt und die Probe wurde in den Sample Loop gedrückt (Probenvolumen 2 ml), wobei die überschüssige Probenmenge zum Wegspülen von eventuellen Laufpufferresten diente. Ein Säulenvolumen Laufpuffer lief mit einer Durchflussrate von 1 ml/min durch die Säule und eluierte die in der Probe enthaltenen Moleküle. Mit dem Fraktionskollektor wurden Fraktionen mit einem Volumen von 4 ml in Plastikröhrchen gesammelt. Fraktionen, die Proteine oder andere Moleküle enthielten, konnten mithilfe der UV-Absorption bei 280 nm identifiziert werden. Fraktionen eines jeden Peaks wurden gepoolt, durch einen 0,45 µm Spritzenfilter steril filtriert und in Aliquoten bei -20 °C bis zum weiteren Gebrauch gelagert.

3.3.3 ELISA zum Nachweis von Immunglobulinen

Der Nachweis von Immunglobulinen in aufgetrennten Kolostralerum-Proben wurde mit ELISA Kits (Bethyl Laboratories) zur Detektion von bovinem IgA, IgG und IgM den Herstellerangaben folgend durchgeführt. Dabei wurden folgende Probenverdünnungen getestet: 1:100, 1:1000, 1:10 000, 1:100 000. Als Negativkontrolle wurde der Laufpuffer aus der Gelchromatographie verwendet, als Positivkontrolle diente der jeweils vom Hersteller mitgelieferte Immunglobulin-Standard. Der Ablauf des Tests war für alle Immunglobulin-Subklassen gleich und wurde bei Raumtemperatur durchgeführt.

Zuerst wurde die benötigte Anzahl an Teststreifen in den Plattenrahmen eingesetzt. Anschließend wurden 100 µl Probe bzw. Kontrolle pro Well aufgetragen, die Platte mit einer adhäsiven Klebefolie abgedeckt und für eine Stunde inkubiert. Danach wurde die Platte viermal wie folgt gewaschen: Der Platteninhalt wurde entleert und Restflüssigkeit durch Ausklopfen der Platte auf Papierhandtüchern entfernt. Jedes Well wurde mit 200 µl ELISA-Waschpuffer gefüllt, die Platte anschließend wieder entleert und auf Papierhandtüchern ausgeklopft. Dann wurden 100 µl der Detektionsantikörperlösung pro Vertiefung hinzugefügt, gut gemischt und nach Abdecken der Platte für eine Stunde inkubiert. Nach viermaligem Waschen wurden 100 µl Meerrettichperoxidase-Lösung C in

jede Vertiefung pipettiert, die Platte bedeckt und für 30 min inkubiert. Im Anschluss wurde die Platte viermal gewaschen und 100 µl TMB Substrat-Lösung pro Well zugegeben. Diesmal fand die dreißigminütige Inkubation ohne Abdeckung im Dunkeln statt. Nach dieser enzymatischen Reaktion sollte sich eine blaue Färbung der Proben, die die entsprechenden Immunglobuline enthalten, entwickelt haben. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µl Stop-Lösung pro Vertiefung beendet, was daran zu erkennen war, dass ein sofortiger Farbumschlag von blau nach gelb stattgefunden hat. Die Absorption der einzelnen Probenlösungen wurde sofort im ELISA Plattenleser (Sunrise Basic, Tecan) bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt.

Nachdem bekannt war, dass bovines IgG in Peakfraktion 2 zu finden ist und dass sich eine Probenverdünnung von 1: 100 000 am besten eignen würde, wurden die Peakfraktionen 2 aller BNP- sowie Kontrollproben verdünnt und im Doppelansatz getestet. Im gleichen Test wurde eine im Kit enthaltene Standard-IgG-Probe (500 ng/ml) in verschiedenen Verdünnungsstufen ebenfalls im Doppelansatz getestet, so dass eine Standardkurve und daraus schließlich die IgG-Konzentration von jeder Probe berechnet werden konnte.

3.3.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Auftrennung von Proteinen

Die diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrer unterschiedlichen Molekulargewichte wurde nach der qualitätssichernden Arbeitsanweisung (QSA) des Landesamtes für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit durchgeführt. Nach der Auftrennung der kolostralen Proteine durch Gelchromatographie wurden alle Peakfraktionen (1-5) von zwei BNP- und einer Kontrollprobe auf ihren Proteingehalt unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen getestet.

Je 10 µl der unverdünnten Peakfraktionen wurden mit 10 µl 2x Lämmli Puffer (nicht reduzierend) oder 10 µl 2x Probenpuffer (reduzierend) 1:2 verdünnt und gevortext. Als Negativkontrolle wurde Laufpuffer aus der Gelchromatographie in gleicher Weise behandelt. Zur Spaltung der Disulfidbrücken (reduzierende Bedingungen) wurden alle Proben und Kontrollen für 5 min auf 95°C erhitzt und wieder auf Raumtemperatur abgekühlt.

Zwei Gradientengele (Ready Gel Tris-HCl 4- 20 %, Bio-Rad) wurden in die Gelelektrophoreseapparatur eingesetzt. Die mittlere Gelkammer wurde mit 1x Tris/Glycin/SDS-Laufpuffer aufgefüllt und auf ihre Dichtigkeit überprüft. Die Kämme der Gele wurden vorsichtig entfernt und eventuell vorhandene Luftblasen vorsichtig aus den Geltaschen entfernt. Jede Geltasche wurde mit 10 µl der entsprechenden Probenlösung gefüllt. Pro Gel wurden eine Negativkontrolle und zweimal ein Proteinstandard zum späteren Ablesen des Molekulargewichts der Banden in je eine Geltasche pipettiert. Im Anschluss wurden die äußeren Gelkammern mit 1x Tris/Glycin/SDS-Laufpuffer aufgefüllt. Die an die Kammer angelegte Spannung wurde auf 110 V eingestellt und die Elektrophorese lief, bis die Bromphenolblau-Front den unteren Gelrand erreicht hatte. Am Ende wurden die Gele aus der Kammer entnommen und gefärbt.

Färbung von Polyacrylamidgelen zum Nachweis von Proteinen

100 ml Fixierlösung (10 % Methanol, 7 % Essigsäure) wurden in eine Plastikschale gefüllt und das Gel wurde hineingelegt. Nachdem es 30 min vorsichtig geschüttelt (Schüttler SM25, Laborgerätebau Glastechnik Umwelttechnik) wurde, wurde die Fixierlösung abgegossen und 100 ml SyproRuby Färbelösung in die Schale gefüllt. Das Gel wurde über Nacht durchgehend vorsichtig geschüttelt. Am Tag darauf wurde die Färbelösung entfernt und durch 100 ml Fixierlösung ersetzt. Nach weiteren 60 min auf dem Schüttler wurde dieses wieder abgegossen. Das Gel wurde mit Aqua dest. gewaschen, auf die UV-Platte der Geldokumentationskammer überführt und fotografiert. Die Auswertung der Banden erfolgte mit der Software LabImage.

3.4 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Messung und Analyse von Signalen, die von Zellen oder anderen Partikeln erhalten werden, die in einem Flüssigkeitsstrom im Idealfall einzeln durch einen Laserstrahl treten. Dabei können verschiedene Parameter gleichzeitig erfasst werden. Grundsätzliche Informationen liefern das Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter, FSC), das etwas über die Größe der Zelle aussagt, sowie das Seitwärtsstreulicht (Side Scatter, SSC), das Aufschluss über die Granularität und Oberflächenbeschaffenheit der Zelle gibt. Durch fluoreszenzkonjugierte Antikörper können zudem noch andere Zelleigenschaften, wie zum Beispiel das Vorhandensein bestimmter Antigene auf der Zelloberfläche, erfasst werden.

Gerät, Software und PC

Der in dieser Arbeit verwendete FACS Canto II (Beckton Dickinson) ist mit einem blauen, luftgekühlten Festkörper-Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm und einem roten Helium-Neon-Laser mit einer Wellenlänge von 633 nm ausgestattet. Damit können neben dem FSC und dem SSC sechs Fluoreszenzparameter erfasst werden.

Die vom FACS Canto II gemessenen Daten wurden auf einen angeschlossenen Computer übertragen und dort mit der Software FACS DIVA (Version 6.2.1, Beckton Dickinson) erfasst und gespeichert. Die Auswertung erfolgte über die Software Flow Jo (Version 7.6.3, Tree Star Inc.)

3.4.1 Darstellung von bovinen Leukozytensubpopulationen durch Oberflächenmarkierungen

Aufgrund der geringeren Auswahl an käuflich erwerbbaaren primär konjugierten Antikörpern für die Arbeit mit Rinderzellen wurde mit einer indirekten Färbemethode gearbeitet. Dabei ist der primäre Antikörper (pAK) unkonjugiert und erst ein sekundärer Antikörper (sAK), der sich gegen den pAK richtet, ist an ein Fluorochrom gekoppelt.

Alle Färbeschritte wurden in einer 96-Loch-Rundbodenplatte (Sarstedt) bei Raumtemperatur durchgeführt.

Für die Darstellung von Oberflächenantigenen der bovinen Leukozyten wurden 25 µl Leukozytensuspension (entspricht 10^5 Zellen) in jedes benötigte Plattenloch pipettiert. Die Platte wurde für 2 min bei 1200 U/min zentrifugiert (Megafuge 1.0, Hereaus) und der Überstand durch abruptes Abkippen entfernt. Auf das so gewonnene Zellpellet wurden 25 µl des jeweiligen Maus-anti-Rind pAK (bei Doppelfärbungen beider pAK) gegeben und auf dem Schüttler (MTS 4, IKA) gut gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min wurden die Zellen drei Mal durch Zugabe von 100 µl PBS_o, Zentrifugieren bei 1200 U/min für 2 min und Abkippen des Überstandes, gewaschen. Nun wurden 25 µl des passenden, fluorochromkonjugierten Ziege-anti-Maus sAK zu den Proben gegeben. Nach der Inkubation (10 min) im Dunkeln wurden die Zellen zwei weitere Male gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen in 7-Aminoactinomycin-Puffer (7-AAD-Puffer, Gebrauchsverdünnung 1:50 in PBS_o) resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wurden die Zellen durch ein Stahlnetz (Maschenweite 0,042mm) in mit 250 µl FACS FLOW gefüllte Röhrchen (12x75 mm Falcon Röhrchen) filtriert und sofort mit dem FACS Canto II analysiert.

Darstellung der Leukozytensubpopulationen von BNP- und Kontrollkälbern

50 ml EDTA-Blut von BNP-Kälbern (n= 9) und 10 ml EDTA-Blut von gesunden Kontrollkälbern (n= 8) wurden den Tieren entnommen. Die Leukozyten wurden, wie bereits beschrieben, vorbereitet und mit den in Tabelle III.9 aufgeführten Antikörperkombinationen behandelt. Die passenden Isotypkontrollen (IgG1, IgG2a, IgG2b) wurden in den jeweiligen Versuchen mit getestet.

Tabelle III.9 Verwendete Antikörperkombinationen zur Darstellung und Analyse von bovinen Leukozytensubpopulationen in der Durchflusszytometrie

Primärantikörper (Maus gegen Rind)	Sekundärantikörper (Ziege gegen Maus)	Identifikationsantigen für
CD4 IgG1 CD8 IgG2a	Alexa Fluor 633 IgG1 Alexa Fluor 488 IgG2a	T-Zellen
CD21 IgG1	Alexa Fluor 633 IgG1	B-Zellen
CD3 IgG1 CD172a IgG2b	Alexa Fluor 633 IgG1 PE IgG2b	Granulozyten Monozyten T-Zellen
CD335 IgG1 CD2 IgG2a	Alexa Fluor 633 IgG1 Alexa Fluor 488 IgG2a	NK-Zellen
CD3 IgG1 WC1 IgG2a	Alexa Fluor 633 IgG1 Alexa Fluor 488 IgG2a	$\gamma\delta$ -T-Zellen

Datenauswertung

Die Zellsuspensionen wurden mit dem FACS Canto II eingelesen. Von jeder Probe wurden 10 000 Ereignisse aufgenommen. Zuerst wurden die toten Zellen aus der Analyse ausgeschlossen. Dazu wurden die Zellen nach einer von SCHMID et al. (1994) beschriebenen Vorgehensweise in einer Punktwolke (ein Punkt pro Ereignis, Dot Plot) (7-AAD gegen FSC) aufgezeigt (Abbildung III.1). Ein elektronischer Grenzwert (Fenster) wurde auf die 7-AAD-negativen Zellen gesetzt (lebende Zellen).

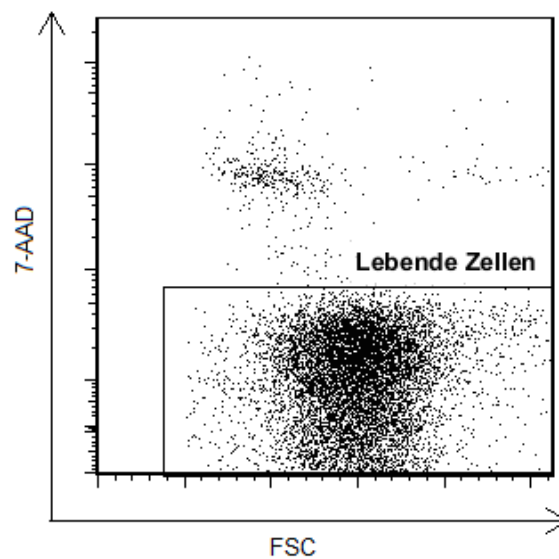


Abbildung III.1 Definition der lebenden Zellen eines Versuchs durch Setzen eines Fensters auf die 7-AAD-negativen Zellen im Dot Plot (7-AAD vs. FSC).

Nur diese Zellen wurden zur weiteren Auswertung herangezogen. Durch Setzen einer Markierung (Marker) im Histogramm (Abbildung III.2) oder von Fenstern im Dot Plot in der jeweils mit dem korrespondierenden Isotyp-Antikörper gefärbten Kontrolle wurde in jeder Probe der Anteil an Zellen bestimmt, die im Vergleich zur Kontrolle jenseits dieser Markierung bzw. des Fensters liegen und somit den Fluorochrom-markierten Sekundärantikörper gebunden hatten.

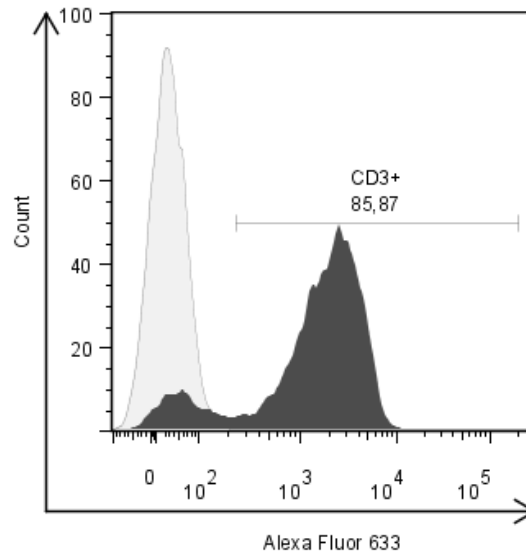


Abbildung III.2 Auswertung der Oberflächenantigenfärbung am Beispiel von mit CD3-reaktiven Antikörpern behandelten Zellen. Die Berechnung CD3-positiver Zellen erfolgte durch das Setzen eines Markers in der Histogrammdarstellung der Fluoreszenz (Alexa Fluor 633) und Vergleich der Isotypkontrolle (hellgrau) mit der CD3-gefärbten Probe (dunkelgrau).

Die einzelnen Leukozytensubpopulationen aus Proben der BNP-Kälber zu einem gegebenen Zeitpunkt konnten so mit denen der Kontrollkälber verglichen werden.

3.4.2 Bindungstests mit kolostralem IgG

Bovine Leukozyten

Alle Färbeschritte wurden bei Raumtemperatur ausgeführt. Leukozyten von gesunden Kälbern (1-28 d, n= 19) wurden wie bereits beschrieben vorbereitet. Alle IgG-Proben wurden mit PBS₀ auf eine ungefähre IgG-Konzentration von 200 µg/ml eingestellt. Da das aus Kolostrum gewonnene IgG (Peakfraktion 2) keiner Isotypcharakterisierung unterzogen wurde, wurde ein Schritt zur Blockierung unspezifischer Bindungen eingefügt. Dazu wurde vor der Zugabe von kolostralem IgG von BNP-Müttern (IgG_{BNP}, n= 14) und Kontrollmüttern (IgG_{Kontr.}, n= 11), das dem primären Antikörper entspricht, 10 µl Ziegenserum (Promo Cell) pro Vertiefung zugegeben (Blocken). Nach einer Inkubationszeit von 10 min wurden die Zellen einmal gewaschen. Danach wurden 25 µl der IgG-Verdünnungen zugegeben. Die Zellen wurden für 10 min inkubiert und dreimal wie bereits beschrieben gewaschen. Als sekundärer Antikörper diente ein polyklonaler, FITC-konjugierter Antikörper gegen bovines IgG (AbD Serotec, Verdünnung 1:200 in PBS₀), von dem 25 µl in jede Vertiefung zugegeben wurden.

Nach der Inkubation (10 min) im Dunkeln erfolgten zwei Waschschriffe. Zuletzt wurden, wie bereits beschrieben, 100 μ l 7-AAD-Puffer zugegeben, die Probe in mit 250 μ l FACS FLOW gefüllte Röhrrhen durch ein Netz filtriert und mit dem FACS Canto II analysiert.

Zelllinien

Bovine Nierenzellen (BK-KL3A), Madin Darby Bovine Kidney Zellen (MDBK) und Porcine Kidney 15 Zellen (PK15) wurden geerntet, sobald der Zellrasen dicht war. Die Zellen wurden in der Zellschale einmal mit 5 ml PBS₀ gewaschen, mit einem Zellschaber vorsichtig von Boden abgeschabt, mit 5 ml PBS₀ resuspendiert und in ein 50 ml Röhrrhen übertragen. Dieses wurde mit PBS₀ aufgefüllt und bei 1000 U/min (Megafuge 1.0, Heraeus) 10 min zentrifugiert (Waschschritt). Das Zellpellet wurde mit 2 ml PBS₀ resuspendiert und erneut gewaschen. Zuletzt wurde das Zellpellet je nach Zellmenge in 1-3 ml PBS₀ aufgenommen, resuspendiert und durch ein Stahlnetz (0,042 μ m Maschenweite) filtriert. Die Konzentration wurde auf 2×10^7 Zellen/ml eingestellt. Die Behandlung der Zellen mit kolostralem IgG_{BNP} (n= 14) und IgG_{Kontr} (n= 11) erfolgte wie bereits bei den Leukozyten beschrieben.

Datenauswertung

Die lebenden Zellen jeder Probe wurden, wie bereits beschrieben, bestimmt und zur weiteren Analyse verwendet. Dann wurden die Zellen der Kontrollen, die nur mit den Sekundärantikörpern inkubiert wurden, analysiert. Dazu wurden die Zellen im Histogramm gegen FITC dargestellt. Ein Marker wurde auf die FITC-negativen (neg) und ein zweiter auf die FITC-positiven Zellen (IgG+) gesetzt (Abbildung III.3).

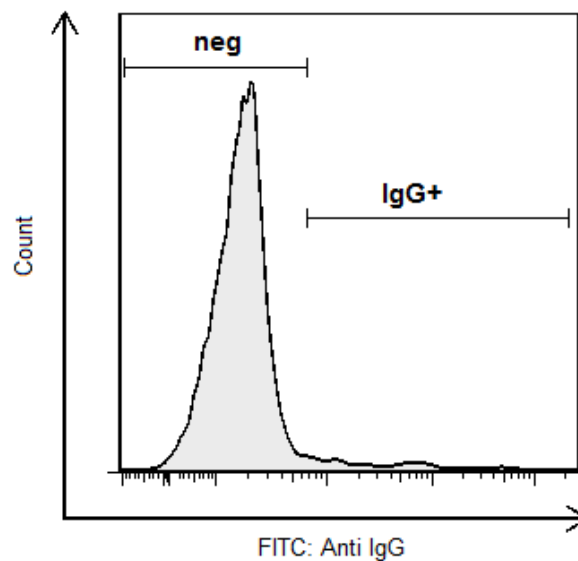


Abbildung III.3 Beispiel für das Setzen der Marker in einer Kontrolle, die nur mit den Sekundärantikörpern inkubiert wurde. Diese Grenzen werden auf die zugehörigen Proben zur Bestimmung der IgG+ Zellen übertragen.

Dadurch konnte bestimmt werden, ob tatsächlich kolostrales IgG spezifisch an die Zelloberfläche gebunden hatte. Die beiden Marker „neg“ und „IgG+“ wurden auf alle zugehörigen Proben eines Versuchs übertragen, um diese miteinander vergleichen zu können.

Um zu überprüfen, ob IgG_{BNP} an alle Leukozytensubpopulationen gleichermaßen bindet, wurde im FSC gegen SSC Dot Plot je ein Fenster auf die Population der Granulozyten und der PBMC (Lymphozyten und Monozyten) gesetzt. Diese wurden mit den durch Dichtegradientenzentrifugation getrennten Subpopulationen (Granulozyten und PBMC) verglichen. Der Anteil der IgG+ Zellen wurde für beide Subpopulationen, wie bereits bei den Leukozyten beschrieben, bestimmt.

Darstellung der Ergebnisse aus den Bindungstests

Beim Vergleich der Bindung an die verschiedenen Zellen wurde die statistische Darstellung der Ergebnisse im sogenannten Boxplot gewählt. Dabei entspricht die Box dem Bereich, in dem 50 % der Daten liegen. Die obere Grenze der Box wird als das obere Quartil, die untere als das untere Quartil bezeichnet. Die Länge der Box wird Interquartilsabstand genannt. Der Median wird durch einen Strich in der Box wiedergegeben (50 % der Werte liegen oberhalb und 50 % unterhalb der Linie). Der jeweils kleinste und größte Wert, der nicht als Ausreißer eingestuft wird, wird durch die Whisker dargestellt (maximale Länge der Whisker beträgt 1,5 Interquartilsabstände). Ausreißer sind Werte, die zwischen 1,5 und 3 Interquartilsabständen vom unteren oder oberen Quartil entfernt liegen und werden durch einen Kreis (°) gekennzeichnet. Extreme Werte liegen mehr als drei Boxlängen vom unteren oder oberen Quartil entfernt und werden durch ein Sternchen (*) gekennzeichnet (Abbildung III.4) (TOUTENBURG & HEUMANN, 2008).

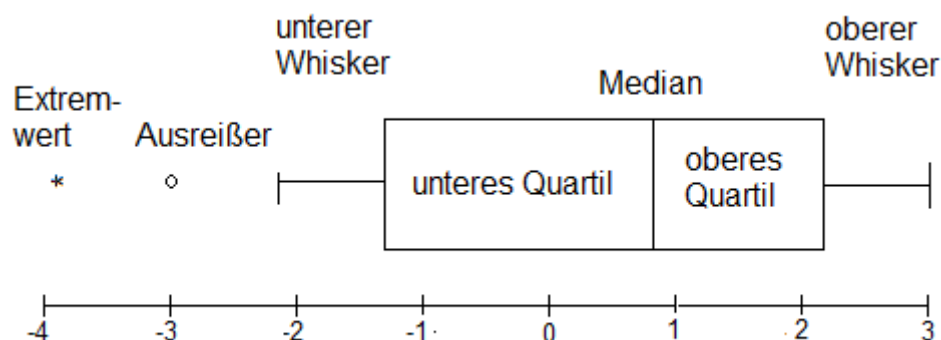


Abbildung III.4 Exemplarische Darstellung eines vertikalen Boxplots über einem Zahlenstrahl.

3.4.3 Toxizitätstests von BNP-Proben auf Leukozyten

Mit Serum von BNP-Kälbern und Mutterkühen

Serumproben von BNP- und gesunden Kontrolltieren (Kälber und Mutterkühe) wurden wie bereits beschrieben gewonnen. Es wurden 26 verschiedene BNP- und 11 verschiedene Kontrollserumproben getestet. Bovine Leukozyten wurden aus je 30 ml EDTA Blut von gesunden Kälbern (1-28 d, n= 16) wie bereits beschrieben gewonnen. Das Leukozytenzellpellet wurde anstatt in PBS_o in RPMI 1640 Medium aufgenommen und die Leukozytenzellsuspension (LZS) auf eine Konzentration

von 2×10^7 Zellen/ml eingestellt. Alle Ansätze wurden in einer sterilen 96-Loch-Rundbodenplatte (Sarstedt) vorbereitet. Pro Ansatz wurden vier Vertiefungen mit je 150 μ l endgültigem Volumen für die spätere Behandlung der Zellen gerechnet. Ansätze mit 20 % Serumanteil (120 μ l LZS + 30 μ l Serum) und 40 % Serumanteil (90 μ l LZS + 60 μ l Serum) wurden für jede BNP- und Kontrollserum-Probe vorbereitet. Bei den Kontrollseren wurde auf Heterogenität zu den verwendeten Leukozyten geachtet. Als weitere Kontrolle wurde fötales bovines Serum (FBS) verwendet, das in gleicher Weise den Zellen zugesetzt wurde. Nach Zugabe der Seren bzw. des FBS zu den Zellen wurde der Platteninhalt durch Antippen vorsichtig gemischt und bei 37 °C inkubiert. Nach 24 und 48 Stunden wurden für jede Probe 50 μ l der Suspension in eine 96-Loch-Platte pipettiert und bei 1200 U/min für 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt und 100 μ l 7-AAD-Puffer wurden zugegeben. Nach fünfminütiger Inkubation wurden die Proben wie bereits beschrieben mit dem Durchflusszytometer analysiert.

Ziel der Auswertung war es zu testen, ob BNP-Serumproben eine Reduktion der lebenden Leukozyten im Vergleich zu Kontroll-Serumproben bewirken würden. Dazu wurden die Proben nach 24 und 48 Stunden getestet. Von jeder Probe wurden die lebenden Zellen, wie bereits beschrieben, bestimmt. Wenn für eine Probe mehr als eine Lebend-Tot-Färbung zur Auswertung zur Verfügung stand, wurde das arithmetische Mittel der lebenden Zellen berechnet. Die Reduktion der lebenden Zellen der jeweiligen Probe im Vergleich zum Vortag wurde berechnet. Zur endgültigen Auswertung wurden die Daten bezüglich der verwendeten Serumkonzentration und dem Tag der Auswertung (24 und 48 Stunden) in Gruppen zusammengefasst:

- Zellen mit 20 % (n= 6) und 40 % FBS (n= 6)
- Zellen mit 20 % (n= 27) und 40 % BNP-Serum (n= 27)
- Zellen mit 20 % (n= 11) und 40 % Kontrollserum (n= 11)

Von jeder Gruppe wurde der Mittelwert mit der zugehörigen Standardabweichung der lebenden Zellen berechnet. Diese Werte wurden miteinander verglichen.

Mit kolostralen Proteinen

Bovine Leukozyten wurden aus je 30 ml EDTA Blut von gesunden Kälbern (1-28 d, n= 8) wie bereits beschrieben gewonnen. Anstatt mit PBS₀ wurde hier das Leukozytenzellpellet zuletzt in serumfreien Medium aufgenommen und auf eine Konzentration von 2×10^7 Zellen/ml eingestellt. Alle Ansätze wurden in einer sterilen 96-Loch-Rundbodenplatte durchgeführt. Für diesen Versuch wurden nur Proben ausgewählt, die in der Gelchromatographie in fünf Peakfraktionen getrennt werden konnten, um vergleichbare Daten zu erhalten. Für jede zu testende Peakfraktion wurde pro Ansatz eine Vertiefung mit einem endgültigen Volumen von 150 µl verwendet. Da dieser Versuch als Pilotversuch durchgeführt wurde, wurden den Zellen verschiedene Anteile (5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %) der Peakfraktionen 1-5 zugesetzt (Tabelle III.10).

Tabelle III.10 Überblick zu den verwendeten Anteilen der Peakfraktionen (PF) 1-5 aus der Gelchromatographie, jeweils von BNP-Müttern (BNP) und Kontrollmüttern (Kontr) mit der Leukozytenzellsuspension (LZS) in den einzelnen Versuchen

	5 %	10 %	15 %	20 %	25 %	30 %
Menge der Peakfraktion pro Well	142,5 µl LZS + 7,5 µl PF	135 µl LZS + 15 µl PF	127,5 µl LZS + 22,5 µl PF	120 µl LZS + 30 µl PF	112,5 µl LZS + 37,5 µl PF	105 µl LZS + 45 µl PF
Versuch 1				1x BNP 1x Kontr		
Versuch 2	2x BNP 2x Kontr	2x BNP 2x Kontr	2x BNP 2x Kontr	2x BNP 2x Kontr		
Versuch 3	1x BNP 1x Kontr	1x BNP 1x Kontr	1x BNP 1x Kontr	1x BNP 1x Kontr		
Versuch 4		2x BNP 2x Kontr		2x BNP 2x Kontr	2x BNP 2x Kontr	2x BNP 2x Kontr
Versuch 5		2x BNP 2x Kontr		2x BNP 2x Kontr	2x BNP 2x Kontr	2x BNP 2x Kontr
Ausgewertete Proben	3x BNP 3x Kontr	7x BNP 7x Kontr	3x BNP 3x Kontr	8x BNP 8x Kontr	4x BNP 4x Kontr	4x BNP 4x Kontr

Als weitere Kontrolle wurde der Laufpuffer aus der Gelchromatographie in den gleichen Konzentrationen verwendet. Zusätzlich wurden Zellen nur mit serumfreien Medium inkubiert, um zu testen, welche Auswirkungen die Inkubation mit diesem Medium auf die Vitalität der Zellen hat. Nach Zugabe der

Peakfraktionen zur Leukozytenzellsuspension wurde der Platteninhalt durch Antippen vorsichtig gemischt und bei 37 °C inkubiert. Nach 24 h wurden für jede Peakfraktion und jede Verdünnung 50 µl der Suspension mit 7-AAD-Puffer wie bereits beschrieben behandelt und mit dem Durchflusszytometer eingelesen.

Zur Auswertung wurde auch hier der Anteil lebender Zellen jeder Probe bestimmt. Der Mittelwert der lebenden Zellen wurde für die einzelnen Peakfraktionen (1, 2, 3, 4, 5), für die Verdünnungen (5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 % Anteil der Peakfraktion) und für die Gruppen (Inkubation mit BNP-Proben, Kontrollproben oder Laufpuffer) berechnet. Ziel dieses Versuches war es, zu überprüfen, ob die einzelnen Peakfraktionen aus der Gelchromatographie einen negativen Einfluss auf die Vitalität der Leukozyten haben und ob es einen Unterschied zwischen den Peakfraktionen aus BNP- und Kontrollkolostrum gibt.

Mit kolostralem IgG und Meerschweinchenkomplement

Bovine Leukozyten wurden aus je 30 ml EDTA Blut von gesunden Kälbern (1-28 d, n= 4), wie bereits beschrieben, gewonnen und in serumfreien Medium auf eine Konzentration von 2×10^7 Zellen/ml eingestellt. 150 µl Leukozytenzellsuspension wurden in eine sterile 96-Loch-Rundbodenplatte eingesät. In die Hälfte der Vertiefungen wurden 5 µl des Mitogens Concanavalin A (ConA, 1 µg/ml) zur Lymphozytenstimulation zugegeben. Durch Antippen der Platte wurde der Inhalt vorsichtig gemischt. Die Platte wurde über Nacht bei 37 °C im Brutschrank verwahrt.

Low-Tox Meerschweinchenkomplement wurde kurz vor Gebrauch, den Herstellerangaben entsprechend, in eiskaltem Aqua bidest gelöst und 1:20 (minimale vom Hersteller empfohlene Verdünnung) in eiskaltem PBS_o verdünnt.

Nach 24 h wurden Zellen vom gleichen Spendertier aus den Vertiefungen entnommen und in einem Röhrchen zusammengefasst (mit und ohne ConA getrennt). Dabei wurden sie durch ein Stahlnetz (Maschenweite 0,042 mm) filtriert, um eine Einzelzellsuspension zu erhalten. 50 µl Leukozytenzellsuspension wurde in die Vertiefung einer 96-Loch-Rundbodenplatte pipettiert und bei 1200 U/min (Megafuge 1.0, Heraeus) zentrifugiert. Nach Zugabe von Ziegenserum und einem Waschschrift (wie oben beschrieben) wurden 25 µl kolostrales IgG (200 µg/ml IgG) pro Vertiefung zugegeben und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurden 50 μ l Meerschweinchenkomplement bzw. PBS₀ (Kontrollen) zugegeben. Die Leukozyten wurden zusammen mit dem kolostralen IgG und dem Meerschweinchenkomplement für weitere 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 μ l PBS₀ gestoppt. Nach zwei Waschschritten wurden 25 μ l des FITC-konjugierten sekundären Antikörpers gegen bovines IgG und 100 μ l des 7-AAD-Puffers wie bereits beschrieben zugegeben. Die Zellen wurden im Durchflusszytometer analysiert.

Jede Probe (IgG_{BNP} n= 10; IgG_{Kontr} n= 10) wurde auf Zellen von zwei verschiedenen Spenderkälber getestet. Die lebenden Zellen und der Anteil IgG⁺ Zellen jeder Probe wurden, wie bereits beschrieben, bestimmt. Zum Vergleich der Ergebnisse wurden die Mittelwerte der IgG⁺ Zellen und der lebenden Zellen folgender Gruppen (jeweils mit BNP- und Kontrollproben) berechnet:

- Zellen mit IgG (n= 20)
- Zellen mit IgG und Zusatz von Meerschweinchenkomplement (n= 20)
- Zellen mit IgG und Zusatz von ConA (n= 20)
- Zellen mit IgG und Zusatz von ConA und Meerschweinchenkomplement (n= 20)

Ziel dieses Versuches war es, zu testen, ob sich mit Komplementzusatz eine Toxizität von IgG_{BNP}-Proben auf Leukozyten gesunder Kälber (ohne Vorbehandlung und/oder mit Proliferationsinduktion der Lymphozyten durch ConA) induzieren lassen würde.

3.4.4 Versuche zum Nachweis einer Bindungsreduktion von kolostralem IgG

Blockingtest mit MHC-Klasse I-reaktiven Antikörpern

MDBK-Zellen wurden, wie bereits beschrieben, vorbereitet und auf eine Konzentration von 2×10^7 Zellen/ml eingestellt. Der Versuch wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. In jede benötigte Vertiefung einer 96-Loch-Rundbodenplatte wurden 10^5 Zellen pipettiert. Anschließend wurden 25 μ l anti-MHC-Klasse I (IL-A88; IgG2a)-Antikörper oder PBS₀ als Kontrolle zugegeben (IZ 10 min). Die Zellen wurden dreimal gewaschen. 25 μ l eines Sekundärantikörpers (AlexaFluor 633 anti IgG2a) wurden zugegeben und für

10 min inkubiert. Nach weiteren zwei Waschschrritten wurden 10 µl Ziegenserum pro Vertiefung zugegeben, die Zellen noch einmal gewaschen und die Behandlung mit kolostralem IgG, wie bereits beschrieben, durchgeführt. Die Analyse erfolgte im Durchflusszytometer. Der Versuch wurde mit IgG_{BNP} (n= 9) und IgG_{Kontr} (n= 8) durchgeführt. Dabei wurden fünf der IgG_{BNP}-Proben und vier der IgG_{Kontr}-Proben doppelt getestet.

Die lebenden Zellen und der Anteil IgG+ Zellen wurden bestimmt (siehe oben). Der Anteil der für MHC-Klasse I positiven Zellen (MHC-I+) wurde in gleicher Weise bestimmt, wie der der IgG+ Zellen. Der Anteil der IgG+ Zellen der Probe, die mit MHC-Klasse 1-reaktivem Antikörper vorbehandelt wurde, wurde mit dem der korrespondierenden Probe (Kontrolle ohne Vorbehandlung mit MHC-Klasse 1-reaktiven Antikörpern) verglichen, um zu erheben, ob dieser MHC-Klasse I-reaktive Antikörper die Bindungsstelle für kolostrales IgG aus BNP-Kolostrum blockieren würde.

Vorinkubation von kolostralem IgG mit Viruszellkultureernte von Pestiviren

IgG_{BNP} Proben (n= 10) wurden mit Viruszellkultureernten der nicht zytopathogenen Pestiviren BVDV (Stamm New York) und BDV (Stamm X818), die beide auf MDBK-Zellen vermehrt wurden, sowie ESPV (Stamm Glentorf), das auf PK15-Zellen vermehrt wurde, vorinkubiert. Eine weitere Behandlung der Viruszellkultureernten nach Gefriertauen wurde nicht durchgeführt. Als Kontrollen dienten, neben PBS₀, Zellkulturüberstände nicht infizierter MDBK- und PK15-Zellen. Die Überstände wurden aus der Zellkultur entnommen und bei 1000 U/min (Megafuge 1.0, Heraeus) für 10 min zentrifugiert. Auch die Zellkulturüberstände wurden mit den IgG_{BNP}-Proben vorinkubiert. Die IgG_{BNP}-Proben wurden derartig mit PBS₀ vorverdünnt, dass eine endgültige IgG-Konzentration von ~200 µg/ml durch Vermischen der gleichen Anteile (jeweils 40 µl) von IgG- und Virussuspension erreicht wurde. Dabei wurde bei allen Pestiviren eine Virusmenge von ungefähr 10^{6,5} kulturinfektösen Dosen (KID₅₀)/ml verwendet. Die Proben wurden bei 37 °C für 30 min inkubiert.

Bovine Leukozyten von gesunden Kälbern (1-28 d, n= 9) wurden, wie bereits beschrieben, vorbereitet, auf eine Konzentration von 2×10^7 Zellen/ml eingestellt und mit Ziegenserum geblockt. Die mit den verschiedenen Pestiviren, beziehungsweise mit den Kontrollen, vorinkubierten IgG_{BNP}-Proben wurden auf ihre Bindung an die Leukozyten, wie bereits beschrieben (III.3.4.2), getestet. Die Analyse erfolgte mit dem Durchflusszytometer.

Von jeder IgG_{BNP}-Probe wurde also die Bindung an Leukozyten nach Vorinkubation mit folgenden Viren bzw. Kontrollen getestet:

- BVDV
- BDV
- ESPV
- MDBK- Zellkulturüberstand
- PK15- Zellkulturüberstand
- Oder PBS_o

Der Anteil lebender Zellen sowie der Anteil IgG⁺ Zellen wurde ausgehend von einer mit Zellkulturüberstand vorinkubierten Probe für jedes mit derselben IgG_{BNP}-Probe vorinkubiertes Pestivirus bestimmt.

IV. Ergebnisse

1 Virologische Untersuchungen

1.1 BTV-Antikörper Nachweis

Die Ergebnisse der virologischen Untersuchungen im Institut für Tiergesundheit in Pirbright sind der Tabelle IV.1 zu entnehmen. Bis auf den Nachweis von Antikörpern gegen BTV in allen Probenpools wurden weder Antikörper gegen EHDV, noch virales Genom von BTV oder EHDV nachgewiesen.

Tabelle IV.1 Untersuchungsergebnisse aus dem Institut für Tiergesundheit (Pirbright, England) zum Antikörper- (Ak) und Genomnachweis von Blauzungenvirus (BTV) und Epizootic Haemorrhagic Disease Virus (EHDV) (POS= positiv; NEG= negativ; KVN= Kein Virusgenomnachweis)

Gruppe Nr.	Probendetails	BTV Ak ELISA	BTV RT-PCR	EHDV Ak ELISA	EHDV RT-PCR
1	891/09: Serum, Zellkultur	POS	KVN	NEG	KVN
2	892/09 Serum, Zellkultur	POS	KVN	NEG	KVN
3	1006/09 Serum, EDTA-Blut, Leukozyten	POS	KVN	NEG	KVN
4	1007/09 Serum, EDTA-Blut, Leukozyten	POS	KVN	NEG	KVN

1.2 Nachweis von Circovirus-Genom

In keiner der Proben (n= 13), die nach QSA Vorschriften im LGL untersucht wurden, konnte in der PCR Circovirusgenom nachgewiesen werden.

Mit der PCR nach HALAMI et al. (2008) wurde in einer Knochenmarksprobe eines BNP-Kalbes und in vier Knochenmarksproben von Kontrollkälbern eine Bande auf der Höhe des zu erwartenden DNA-Segments (ca. 350 bp) detektiert. Bei den Thymusproben waren es zwei BNP-Proben und eine Kontrollprobe. Beim Test des Ultrazentrifugats der BK-KL3A Zellen wurde ebenfalls eine Bande auf der richtigen Höhe gefunden. Alle anderen Proben waren negativ. Zum Teil konnten die PCR-Fragmente in Wiederholungsversuchen nicht mehr nachgewiesen werden. Die Positivkontrolle war bei allen Versuchen positiv, was die korrekte Funktion der PCR bestätigt.

Sequenzierung von DNA-Fragmenten

Die Sequenzierung der Proben ergab Sequenzen von unterschiedlicher Länge. Tabelle IV.2 zeigt die Ergebnisse der Sequenzierung der PCR-Produkte aller sechs eingeschickten Proben.

Tabelle IV.2 Ergebnisse aus der Sequenzierung der DNA-Fragmente aus der Circovirus PCR nach HALAMI et al. (2008). Die Fragmente wurden über die Anwendung BLASTn 2.2.25 mit Sequenzen von porzinem Circovirus 2 (PCV-2) und dem PCV-2 Isolat PCV2-Ha08 auf Homologien geprüft.

Bezeichnung der DNA-Fragmente	Größte Homologie zu/ Quelle/ Übereinstimmung	Homologie zu PCV-2 Isolat PCV2-Ha08 (KAPPE et al., 2010)
84719/09a CN-S Knochenmark Kontrolle	PCV-2 Stamm PCV2/herd A (LOHSE et al., 2008) 99%	99%
84719/09b CN-AS Knochenmark Kontrolle	Verschiedene PCV-2 Isolate 99%	99%
BK CN-S Ultrazentrifugat BK- KL3A Zellen	Keine Sequenzübereinstimmungen mit PCV-2	
LungPCVa CN-S Positivkontrolle PCV-2: Schweinelunge	PCV-2 Stamm PCV2/herd A (LOHSE et al., 2008) 99%	98%
LungPCVb CN-AS Positivkontrolle PCV-2: Schweinelunge	Verschiedene PCV-2 Isolate 99%	99%

Eine Übereinstimmung von 99 % der Sequenzen mit Nukleotidsequenzen von PCV-2 aus der Gen-Datenbank (Taxonomie Identitätsnummer 85708) wurde bei einigen der sequenzierten Proben gefunden. Auch der Vergleich zu dem von KAPPE et al. (2010) isolierten Circovirus PCV2-Ha08 ergab eine Homologie von 99 % des Fragments aus dem Knochenmark des Kontrollkalbes und von 98 oder 99 % für die Fragmente aus der für PCV-2 positiv getesteten Schweinelunge. Das aus dem BK-KL3A Zellultrazentrifugat erhaltene, 165 Basen lange, DNA-Fragment stimmte mit keiner Nukleotidsequenz für PCV2 aus der Gen-Datenbank überein.

1.3 BVDV-Genom Nachweis

In keiner der untersuchten Knochenmarkproben von BNP- und Kontrolltieren konnte BVDV-Genom nachgewiesen werden.

1.4 Chiphybridisierung

Zwei Virusfamilien ergaben ein starkes Signal in den Chiphybridisierungen sowohl der BNP-, als auch der Kontrollserumproben. Das erste und stärkste Signal stammte von einem Entencircovirus und war in allen getesteten Serumproben detektierbar. Das zweite starke Signal stammte von einem pan-Blauzungenvirus Primer (Abbildung IV.1).

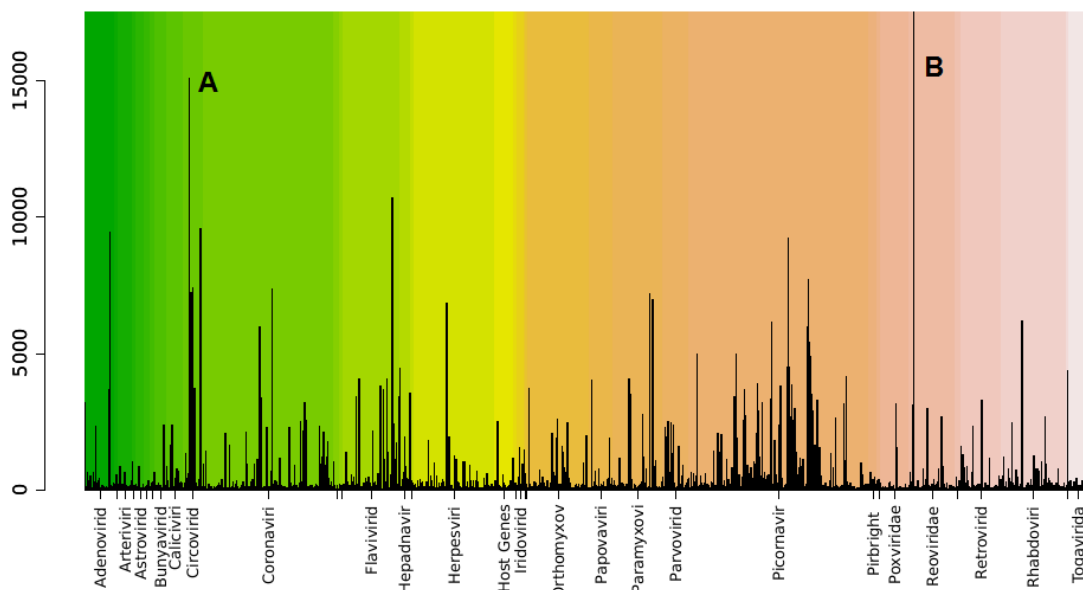


Abbildung IV.1 Heat map der Chiphybridisierung einer Serumprobe eines BNP-Kalbes mit dem DEFRA Biosecurity Chip. Stärkere Signale liefern ein Entencircovirus (A) und ein Pan-Blauzungenvirus Primer (B).

2 Leukozytopenie bei BNP-Kälbern

Ein erster Unterschied zwischen Proben von BNP- und Kontrollkälbern war nach der Gewinnung der peripheren Blutleukozyten zu erkennen. Das Leukozytenzellpellet am Boden des Röhrchens war am Ende bei Proben von BNP-Kälbern nur hauchdünn mit dem Auge erkennbar, während bei Proben von Kontrollkälbern das Zellpellet trotz der geringeren entnommenen Blutmenge deutlich sichtbar war.

Beim Vergleich der lebenden Zellen nach der Immunfärbung war auffallend, dass bei den BNP-Blutproben immer wieder Proben dabei waren, in denen die lebenden Zellen (\bar{x} 73,52 \pm 25,83; n= 9) im Vergleich zu den Kontrollblutproben (\bar{x} 89,46 \pm 4,12; n= 8) deutlich reduziert waren, obwohl alle Proben gleich behandelt wurden (Transport, Verarbeitung).

Bei fünf von neun getesteten BNP-Kälberblutproben (von verschiedenen Tieren) war in der Analyse der Daten eine Granulozytopenie festzustellen. Auffällig dabei war, dass es sich hier ausnahmslos um jene Proben mit einem deutlich reduzierten Anteil lebender Zellen handelte (\bar{x} 47,01 \pm 6,85). Abbildung IV.2 macht den Unterschied zwischen Proben von einem gesunden und einem BNP-Kalb deutlich.

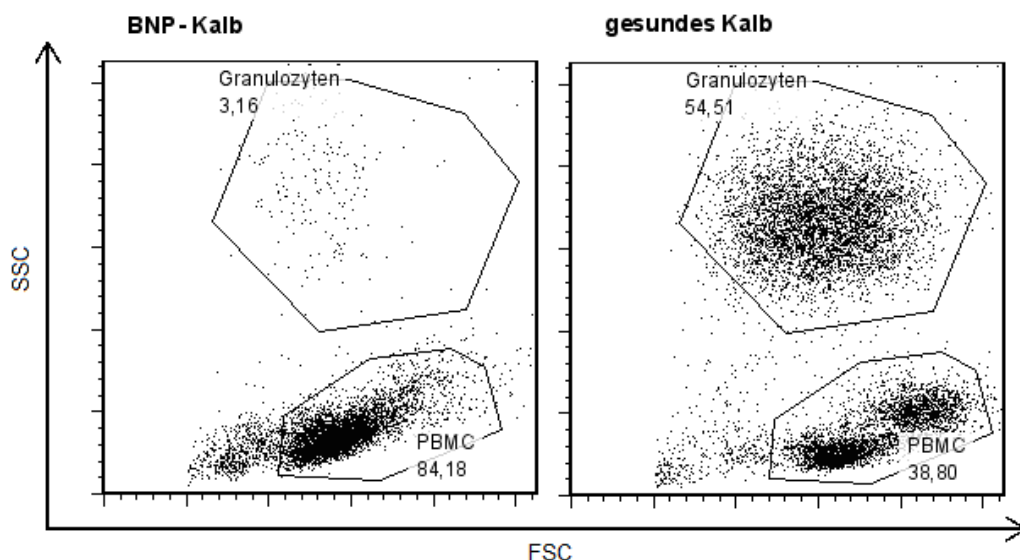


Abbildung IV.2 Vergleich der Zellpopulationen der Granulozyten und der peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) eines gesunden Kalbes mit denen eines BNP-Kalbes im Dot Plot (FSC gegen SSC) nach Ausschluss der toten Zellen.

Durch die Reaktion mit einem monoklonalen Antikörper (CD172a) lassen sich die Granulozyten und die Monozyten nochmal besser darstellen (Abbildung IV.3). Die Zellen in Abbildung IV.2 und Abbildung IV.3 stammen aus denselben Proben. So wird deutlich, dass auch das Setzen eines Fensters auf die Granulozytenpopulation im Dot Plot (FSC gegen SSC) ein recht genaues Ergebnis der Menge an Granulozyten in einer Probe liefert.

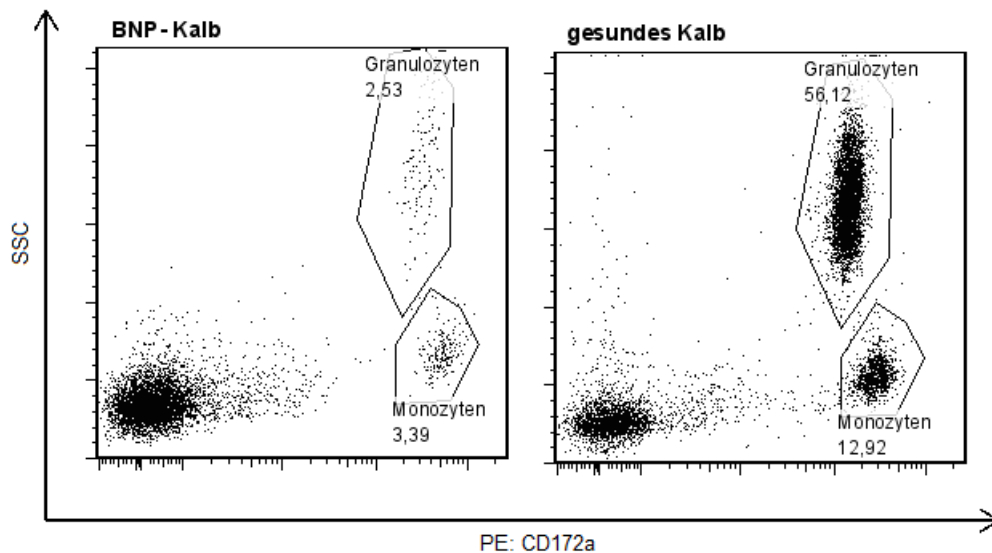


Abbildung IV.3 Vergleich der Granulozyten und der Monozyten eines gesunden Kalbes mit denen eines BNP-Kalbes nach Reaktion mit dem monoklonalen Antikörper CD172a im Dot Plot (PE: CD172a gegen SSC) nach Ausschluss der toten Zellen.

Bei zwei Blutproben der neun getesteten BNP-Kälber fiel dagegen eine geringere Anzahl an Lymphozyten und Monozyten (periphere mononukleäre Blutzellen) im Dot Plot (FSC gegen SSC) auf (Abbildung IV.4)

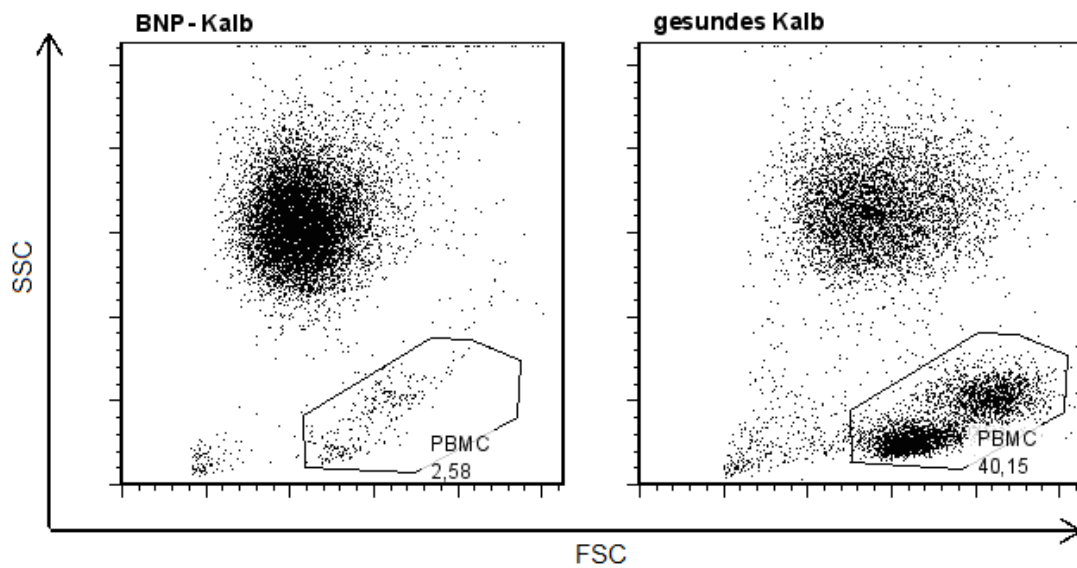


Abbildung IV.4 Stark reduzierter Anteil der peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) bei einem BNP-Kalb im Vergleich zu einem gesunden Kalb.

Der monoklonale Antikörper MM1A reagiert mit dem CD3-Antigen, das auf der Oberfläche von α/β - und γ/δ -Lymphozyten, aber nicht auf der von B-Lymphozyten, Monozyten oder Granulozyten exprimiert wird (DAVIS et al., 1993). Zum besseren Vergleich der getesteten Zellen aus Abbildung IV.4 wurden dieselben Proben in einem Überlagerungs-Histogramm (Overlay-Histogramm) in Abbildung IV.5 dargestellt.

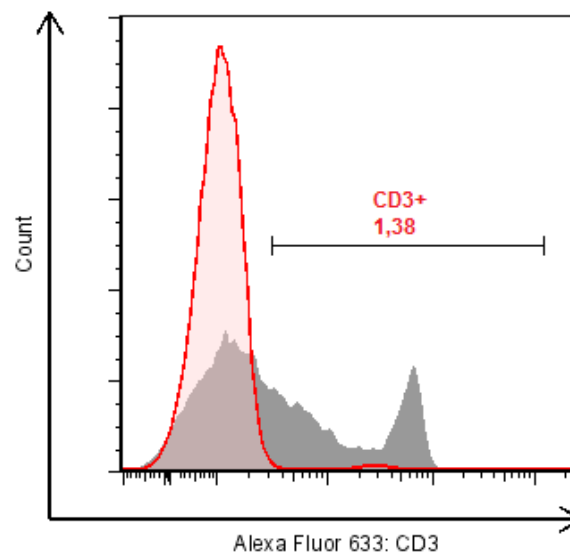


Abbildung IV.5 Überlagerungs-Histogramm zur Darstellung der reduzierten Anzahl an CD3+ Zellen in der Probe eines BNP-Kalbs (rot) im Vergleich zu der Probe eines gesunden Kalbes (grau; 43,03 % der Zellen sind CD3+).

Bei diesen beiden BNP-Blutproben ist also der Anteil an T-Lymphozyten tatsächlich reduziert. Aber auch der Anteil der Monozyten ist in diesen BNP-Blutproben deutlich niedriger als bei der des gesunden Vergleichskalbes, was sich erneut mithilfe des Granulozyten/Monozyten-reaktiven Antikörpers CD172a darstellen lässt (Abbildung IV.6)

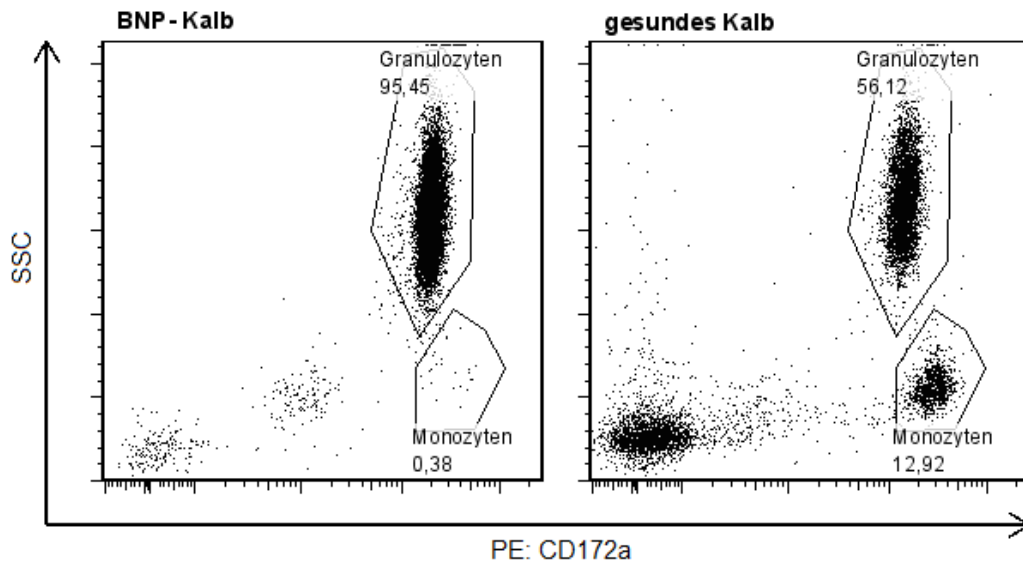


Abbildung IV.6 Deutlich geringerer Anteil an Monozyten in der Blutprobe eines BNP-Kalbes im Vergleich zu der Blutprobe eines gesunden Kalbes im Dot Plot (PE: CD172a gegen SSC).

Eventuell sind in den Blutproben der BNP-Kälber mit der Lymphozytopenie auch die B-Zellen von der Reduktion betroffen. Die beiden Proben der BNP-Kälber (1,40% und 0,15% CD21+ Zellen) haben im Vergleich zu der Probe des gesunden Kontrollkalbes (4,19% CD21+ Zellen) auch eine geringere Anzahl an CD21+ Zellen.

3 Fraktionierung von Kolostrum

3.1 Separation von kolostralen Proteinen aus Kolostralserum

Je 14 Kolostralserumproben von BNP- und Kontrollmüttern wurden aus den Kolostrumproben gewonnen und die enthaltenen Proteine mit Hilfe der Gelchromatographie aufgetrennt. Bei den BNP-Proben ergaben 13 von 14 Proben fünf deutlich abgrenzbare Peakfraktionen. Bei den Kontroll-Proben waren es zehn von 14 Proben. Bei den restlichen Proben waren nur vier Peakfraktionen abgrenzbar.

Ein Beispiel für ein Chromatogramm der Proteinseparation einer Kolostralserumproben zeigt Abbildung IV.7.

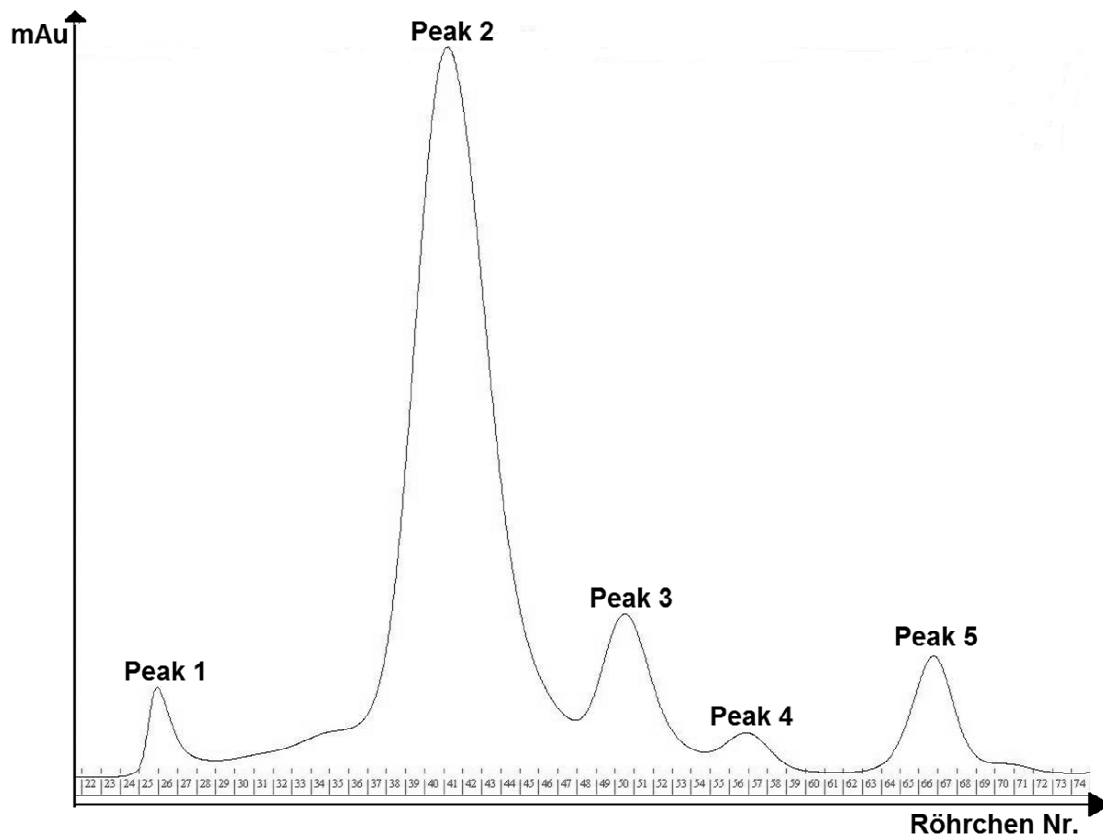


Abbildung IV.7 Beispiel für ein Chromatogramm nach der Proteinseparation einer Kolostralserumprobe mit fünf voneinander abgrenzbaren Peakfraktionen (Peak 1-5).

3.2 Nachweis von Immunglobulinen, Proteinen und BVDV-Antikörpern

3.2.1 Identifizierung von Immunglobulinen

Die Proteine der verschiedenen Peakfraktionen wurden unterschiedlichen Tests unterzogen. Zu Beginn wurden je zwei oder drei Proben aus der BNP- und der Kontroll-Gruppe in unterschiedlichen Verdünnungen mit ELISA-Kits zum Nachweis von bovinem IgA, IgG und IgM geprüft. Diese Vorversuche sind statistisch nicht auswertbar. Die Ziele dieser ersten Versuche waren zum einen der Nachweis, dass die Auftrennung der kolostralen Proteine nach dem Molekulargewicht in der Gelchromatographie funktioniert hat und zum anderen der Nachweis der verschiedenen Immunglobulinsubklassen in den einzelnen Peakfraktionen.

Für IgA wurde von allen getesteten Proben die Verdünnung 1:100 ausgewertet, für IgM 1:1000 und für IgG 1:100 000.

Einen Überblick über die erhaltenen Daten geben Tabelle IV.3, Tabelle IV.4 und Tabelle IV.5.

Tabelle IV.3 Gemessene Absorption (optische Dichte, O.D.-Werte) von sechs Proben bei 450 nm aus dem anti-bovinen IgA-ELISA; Probenverdünnung 1:100; NK= Negativkontrolle; n.v.= Probe nicht verfügbar

	Probe	Peak 1	Peak 2	Peak 3	Peak 4	Peak 5	NK
Kontrolle	LVG 827	0,820	0,406	0,140	0,118	n.v.	0,110
	LVG 862	0,886	0,526	0,152	0,141	n.v.	0,130
	LVG 753	1,547	1,082	0,343	0,194	0,180	0,160
BNP	BNP-6	1,119	0,280	0,122	0,111	0,103	0,102
	BNP-8	1,551	0,848	0,187	0,136	0,139	0,125
	BNP-11	0,817	0,822	0,182	0,122	0,119	0,125

Die gemessene Absorption war bei den im Anti-IgA ELISA getesteten Proben in den Peakfraktionen 1 und 2 am höchsten. In den Peakfraktionen 3 bis 5 nähern sich die O.D.-Werte immer mehr denen der Negativkontrollen an.

Tabelle IV.4 Gemessene Absorption (O.D.-Werte) von fünf Proben bei 450 nm aus dem anti-bovinen IgG-ELISA; Probenverdünnung 1:100 000; NK= Negativkontrolle; n.v.= Probe nicht verfügbar

	Probe	Peak 1	Peak 2	Peak 3	Peak 4	Peak 5	NK
Kontrolle	LVG 862	0,063	0,684	0,061	0,039	n.v.	0,021
	LVG 753	0,048	0,556	0,071	0,031	0,020	0,021
BNP	BNP-6	0,032	0,638	0,042	0,029	0,025	0,024
	BNP-8	0,041	1,170	0,083	0,035	0,019	0,024
	BNP-11	0,094	0,627	0,068	0,031	0,022	0,024

Die gemessene Absorption war bei allen im Anti-IgG ELISA getesteten Proben in der Peakfraktion 2 am höchsten. Wenn man die Verdünnung von 1:100 000 berücksichtigt, lässt sich sagen, dass in den anderen Fraktionen nur geringste Spuren von IgG nachweisbar sind.

Tabelle IV.5 Gemessene Absorption (O.D.-Werte) von fünf Proben bei 450 nm aus dem anti-bovinen IgM-ELISA; Probenverdünnung 1:1000; NK= Negativkontrolle; n.v.= Probe nicht verfügbar

	Probe	Peak 1	Peak 2	Peak 3	Peak 4	Peak 5	NK
Kontrolle	LVG 862	0,917	0,067	0,050	0,048	n.v.	0,049
	LVG 753	0,813	0,072	0,056	0,055	0,05	0,049
BNP	BNP-6	0,818	0,046	0,038	0,035	0,039	0,026
	BNP-8	0,768	0,049	0,029	0,028	0,032	0,034
	BNP-11	0,376	0,039	0,023	0,036	0,035	0,034

Die gemessene Absorption bei allen im Anti-IgM ELISA getesteten Proben ist in der Peakfraktion 1 am höchsten.

Diese Ergebnisse entsprechen denen der in der Literatur beschriebenen (AZWAI et al., 1996). Peakfraktion 1 ist IgM-reich und Peakfraktion 2 ist IgG-reich. Für eine bessere Separation von IgA wären weitere Reinigungsschritte nötig gewesen.

3.2.2 Bestimmung der IgG-Konzentration in Peakfraktion 2

Da im Kolostrum IgG₁ den Großteil der vorhandenen Proteine ausmacht (BARRINGTON et al., 2001), war für die nachfolgenden Versuche vor allem die IgG-reiche Peakfraktion 2 aller Proben von Interesse. Deshalb wurde schon im ELISA ein Fokus auf die weitere Analyse von Peakfraktion 2 gesetzt. Da die bereits beschriebenen Vorversuche mit einer Probenvorverdünnung von 1:100 000 gut auswertbar waren, wurden jetzt alle 28 Proben der BNP- und Kontrollgruppe vorverdünnt und im Doppelansatz getestet. Ein im ELISA-Kit enthaltener IgG-Standard wurde in verschiedene Konzentrationen verdünnt und ebenfalls im Doppelansatz getestet. Aus den beiden für jede Probe erhaltenen O.D.-Werten wurde der Mittelwert berechnet. Aus den Werten der IgG-Standardkonzentrationen wurde eine Standardkurve als abschnittsweise definierte Funktion berechnet. Die einzelnen Abschnitte sind als Geraden zwischen den Messpunkten definiert. Mithilfe dieser Standardkurve konnten die IgG-Konzentrationen der einzelnen BNP- (Tabelle IV.6) und Kontrollproben (Tabelle IV.7) berechnet werden.

Tabelle IV.6 IgG-Konzentrationen in der Peakfraktion 2 der BNP-Kolostrumproben

Probe BNP Nr.	\bar{x} O.D. 450 nm	IgG-Konzentration (mg/ml)
BNP-1	1,159	3,19
BNP-2	1,212	3,46
BNP-3	1,668	5,93
BNP-4	1,716	6,43
BNP-5	1,288	3,84
BNP-6	1,140	3,09
BNP-7	1,738	6,66
BNP-8	1,016	2,48
BNP-9	1,202	3,40
BNP-10	1,693	6,19
BNP-11	1,056	2,68
BNP-12	1,432	4,56
BNP-13	1,993	11,36
BNP-14	1,213	3,46
\bar{x} + Standard- abweichung	1,395 ±0,308	4,77 ± 2,39

Tabelle IV.7 IgG-Konzentrationen in der Peakfraktion 2 der Kontrollkolostrumproben

Probe LVG Nr.	\bar{x} O.D. 450 nm	IgG-Konzentration (mg/ml)
397	1,093	2,86
404	0,961	2,20
420	1,580	5,30
439	1,043	2,61
454	1,218	3,48
456	1,134	3,06
476	1,082	2,80
483	1,038	2,58
753	1,888	8,23
795	1,246	3,63
827	0,488	0,12
862	0,543	0,15
865	0,658	0,24
903	1,825	7,56
\bar{x} + Standardabweichung	1,128 ±0,421	3,20 ± 2,46

Wie aus Tabelle IV.6 und Tabelle IV.7 zu entnehmen ist, unterscheiden sich die IgG-Konzentrationen der einzelnen Proben untereinander zum Teil recht deutlich. Um die Proben standardisiert miteinander vergleichen zu können, wurden deshalb alle Proben in den unterschiedlichen Versuchen auf eine berechnete IgG-Konzentration von 200 µg/ml eingestellt. Da die Kontrollen LVG 827, 862 und 865 zu wenig IgG enthielten, wurden sie für weitere Versuche nicht mehr heran gezogen.

3.2.3 Proteinnachweis in den Peakfraktionen 1 bis 4

Da in den Peakfraktionen 3 bis 5 nur minimale Spuren von Immunglobulinen nachgewiesen werden konnten, wurde testweise eine Proteinauftrennung (SDS-PAGE) mit zwei BNP- und einer Kontrollprobe durchgeführt, um das Vorhandensein anderer Proteine zu überprüfen und eventuelle Unterschiede zwischen den Gruppen zu detektieren. Diese Versuche sollten nur einen Anhaltspunkt zum Vorhandensein anderer Proteine liefern. Die Versuche wurden unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Bei den

Ergebnissen war, soweit das bei der geringen Probenzahl zu beurteilen war, kein Unterschied zwischen BNP- und Kontrollproben festzustellen (Tabelle IV.8).

Tabelle IV.8 Übersicht über die Ergebnisse aus der Proteinauftrennung (SDS PAGE) für die getesteten Peakfraktionen 1–5 nach deren Separation durch Gelchromatographie

Peak-fraktion	Nicht-reduzierende Bedingungen: Molekulargewicht der erhaltenen Banden	Reduzierende Bedingungen: Molekulargewicht der erhaltenen Banden
1	Anfang des Gels	75 kDa 50 kDa 25 kDa
2	130-180 kDa	150 kDa 50 kDa 25kDa
3	75 kDa 50 kDa 15 kDa (stärkste Bande)	15 kDa (stärkste Bande)
4	15 kDa 10 kDa	15 kDa 10 kDa
5	Keine Bande sichtbar	Keine Bande sichtbar

Wie der Tabelle IV.8 zu entnehmen ist, sind in den Peakfraktionen 1-4 Proteine unterschiedlicher Größe nachweisbar. Nur in der Fraktion 5 findet sich keine Bande. Die Proteinauftrennung mittels SDS-PAGE bestätigt, dass die Auftrennung nach der Molekülgröße mithilfe der Gelchromatographie funktioniert hat. In Peakfraktion 1 befinden sich die größten Moleküle (IgM, 900kDa), in der Fraktion 4 mit einer Bande bei 10 kDa hingegen die kleinsten.

3.2.4 Nachweis von BVDV-Antikörpern

In allen getesteten Kolostralerumproben, sowohl von BNP-Müttern (n= 6), als auch von Kontrollmüttern (n= 7), waren Antikörper gegen BVDV nachweisbar. Dabei lag der Mittelwert der PP-Werte der 1 zu 10 Verdünnung bei den Kontrollproben bei 110 ($\pm 18,95$) und bei den BNP-Proben bei 136 ($\pm 20,70$).

Die auf eine IgG-Konzentration von 200 $\mu\text{g/ml}$ verdünnten Peakfraktion 2-Proben (kolostrales IgG) wurden daraufhin getestet. Sieben von elf Kontrollproben wurden positiv getestet (Bereich 10-22). Dabei lag der PP-Mittelwert der positiven Proben bei 16,57 ($\pm 4,58$). In allen BNP-Proben wurden Antikörper gegen BVDV nachgewiesen (Bereich 24-137). Der PP-Mittelwert lag hier bei 88,07 ($\pm 37,32$).

4 Bindung von IgG aus BNP-Kolostrum an bovine Zellen

4.1 IgG-Bindung an Leukozyten

Die Versuche wurden mit Leukozyten von 19 verschiedenen Kälbern (1-28 d) durchgeführt. Dabei wurden elf IgG-Proben aus Kontrollkolostrum ($\text{IgG}_{\text{Kontr}}$) und 14 IgG-Proben auf BNP-Kolostrum (IgG_{BNP}) verwendet. Nur Versuche mit mehr als 80 % lebenden Zellen wurden ausgewertet.

Bindung an die Gesamtleukozyten

Eine Übersicht über die Häufigkeit, mit der die Einzelproben getestet wurden, gibt Tabelle IV.9. Einige Proben wurden mehrmals mit den Zellen desselben Spendertieres getestet.

Tabelle IV.9 Anzahl der durchgeführten und ausgewerteten Versuche mit den verschiedenen IgG-Proben aus BNP-Kolostrum

Probe	Versuche mit > 80 % lebenden Zellen (ausgewertet)	Versuche mit < 80 % lebenden Zellen	Gesamtanzahl Versuche
BNP-1	17	3	20
BNP-2	9	1	10
BNP-3	12		12
BNP-4	13		13
BNP-5	13	1	14
BNP-6	12	1	13
BNP-7	18	2	20
BNP-8	19	2	21
BNP-9	13		13
BNP-10	12	1	13
BNP-11	15	2	17
BNP-12	10	1	11
BNP-13	9	3	12
BNP-14	24		24
GESAMT	196	17	213

Die wiederholten Versuche zeigten, dass IgG aus Kolostrumproben von BNP-Müttern (IgG_{BNP}) an die Leukozytenoberfläche gesunder Kälber bindet. In Proben, die mit IgG aus dem Kolostrum von gesunden Müttern ($\text{IgG}_{\text{Kontr}}$) oder nur mit dem Sekundärantikörper (FITC anti-bovine IgG) als Kontrolle behandelt wurden, lassen sich kaum IgG+ Zellen nachweisen. Abbildung IV.8 zeigt dies beispielhaft.

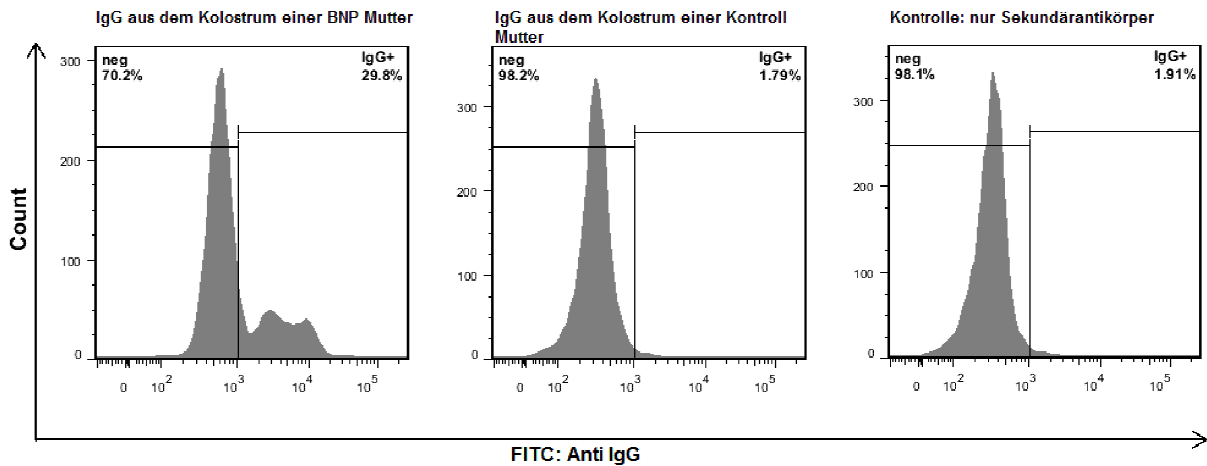


Abbildung IV.8 Beispiel für den Nachweis der Bindung von IgG aus dem Kolostrum einer BNP-Mutter an die Leukozytenoberfläche gesunder Kälber. Der Anteil IgG+ Zellen nach Inkubation mit IgG aus dem Kolostrum einer Kontrollmutter oder nur mit dem Sekundärantikörper ist deutlich geringer. Die Anteile der IgG+ Zellen sind im jeweiligen Histogrammfenster aufgeführt.

Alle IgG_{BNP} Proben wurden mit Zellen unterschiedlicher Leukozytenspender wiederholt auf ihre Bindung hin getestet. Auffällig hierbei war, dass der Anteil an IgG+ Zellen nie gleich war, obwohl die IgG-Konzentration der einzelnen Proben dieselbe blieb (vergleiche hierzu die Einzelprobenaufstellung in Anhang IX.3). In Abbildung IV.9 wird beispielhaft die Bindung von IgG_{BNP} aus der Kolostrumprobe BNP-5 an die Zellen verschiedener Spenderkälber zu verschiedenen Zeitpunkten dargestellt.

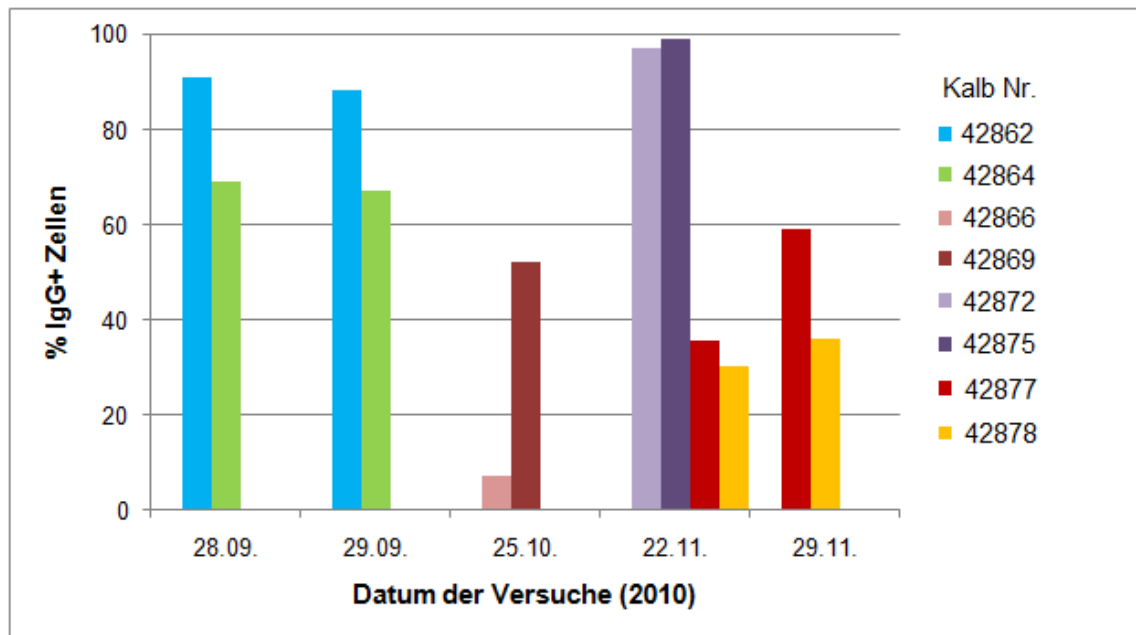


Abbildung IV.9 Beispielhafte Darstellung der variierenden prozentualen Anteile der IgG+ Zellen der Leukozyten verschiedener Spenderkälber (Kalb Nr.) nach Inkubation mit IgG_{BNP} aus der Kolostrumprobe BNP-5. Zellen vom selben Spendertier sind in gleicher Farbe dargestellt.

Obwohl die Zellen der verschiedenen Spendertiere am selben Tag mit derselben IgG_{BNP}-Probenverdünnung inkubiert wurden, wurden unterschiedliche Anteile an IgG+ Zellen gemessen. Vergleicht man den Anteil an IgG+ Zellen bei den Zellen vom gleichen Spenderkalb, die aber an unterschiedlichen Tagen mit IgG_{BNP} aus der Probe BNP-5 inkubiert wurden, stellt man fest, dass (bis auf die Zellen von Kalb Nr. 42877) sich die Werte der IgG+ Zellen eher entsprechen.

Letztendlich wurden die Daten aller IgG-Bindungstests mit mehr als 80 % lebenden Zellen der gesamten Leukozytenpopulation statistisch ausgewertet.

Das arithmetische Mittel der jeweiligen Reaktionsgruppen (IgG_{BNP}, IgG_{Kontr.}, Kontrolle nur mit 2.AK) wurde berechnet. Die Ergebnisse sind in Abbildung IV.10 dargestellt.

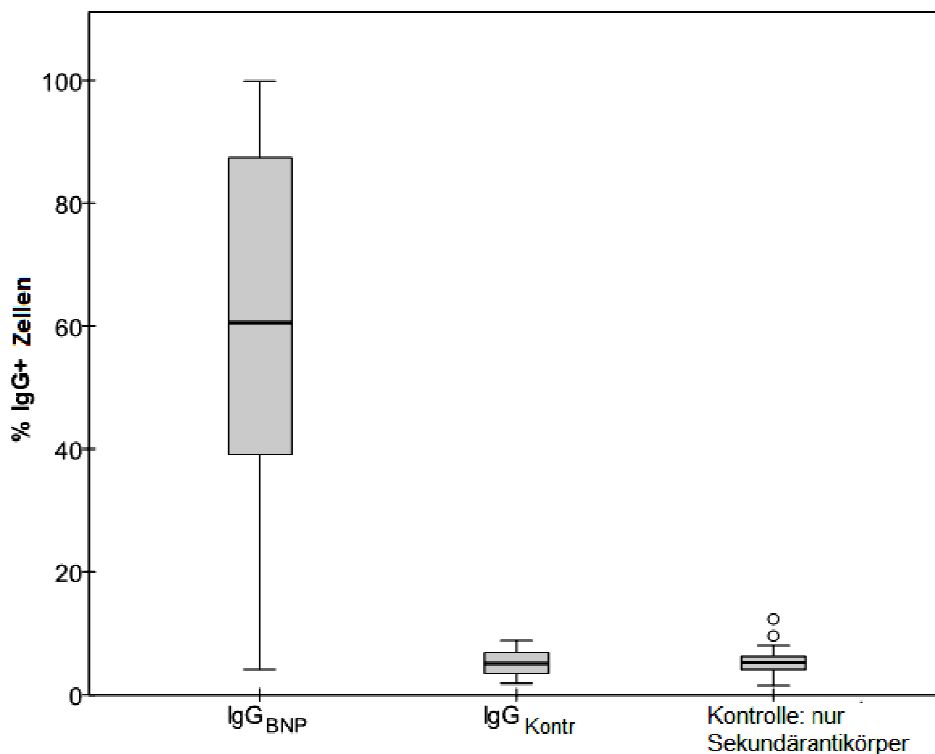


Abbildung IV.10 Statistische Auswertung der IgG+ Zellen im Boxplot nach Färbung der Leukozyten gesunder Kälber mit IgG aus BNP-Kolostrum (IgG_{BNP}), IgG aus Kontrollkolostrum (IgG_{Kontr}) und nur mit dem sekundären FITC-konjugierten Antikörpern gegen bovines IgG (Sekundärantikörper).

° = Ausreißer

Ein hochsignifikanter Unterschied ($p < 0,0001$) zwischen der Bindung von IgG_{BNP} und der Bindung von IgG_{Kontr}, beziehungsweise der Sekundärantikörper an die Leukozyten gesunder Kälber wurde mithilfe des Kruskal-Wallis-Tests, gefolgt vom Dunn-Test für paarweise multiple Vergleiche, berechnet. Es gab keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der Bindung von IgG_{Kontr} und der Bindung des Sekundärantikörpers ($p = 0,9999$).

Der Vergleich der lebenden Zellen nach Färbung mit IgG_{BNP} und IgG_{Kontr} mit dem Mann-Whitney *U*-Test zeigte, dass kein statistisch signifikanter Unterschied besteht ($p = 0,333$; $n = 264$).

Bindung von IgG_{BNP} an Granulozyten und PBMC

Zur Bestimmung der Bindung von kolostralem IgG an die einzelnen Leukozytensubpopulationen wurde einmalig eine Dichtegradientenzentrifugation von Leukozyten eines gesunden Kalbes durchgeführt. Das Ergebnis der Auftrennung (Granulozyten, PBMC) wurde mit dem Setzen der Fenster nach Analyse der Gesamtleukozyten verglichen (Abbildung IV.11).

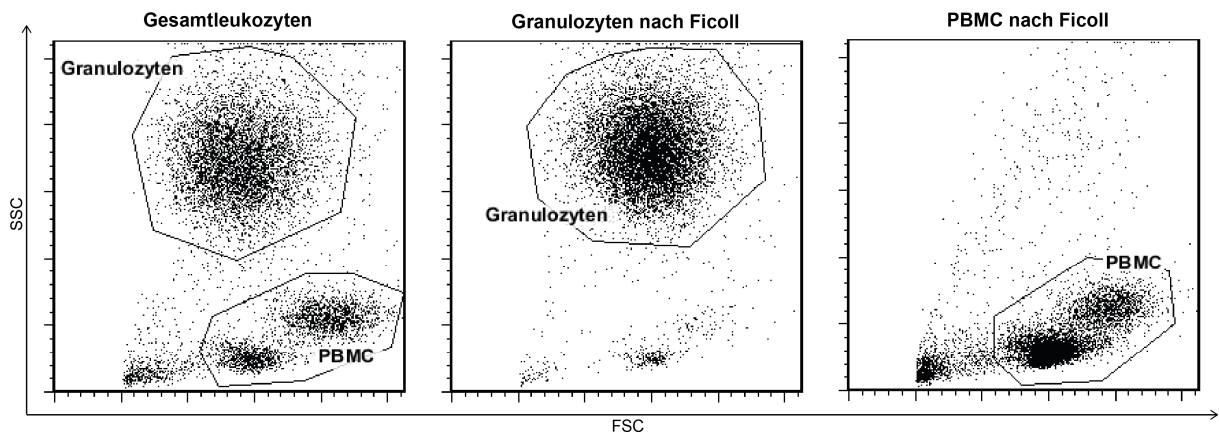


Abbildung IV.11 Vergleich der Leukozytensubpopulationen der Granulozyten und der peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) nach deren Trennung durch Dichtegradientenzentrifugation (Ficoll) mit dem Setzen der Fenster nach Analyse der Gesamtleukozyten im Dot Plot (FSC gegen SSC).

Daraus wurde geschlossen, dass sich das Setzen von Fenstern auf die Granulozyten und die PBMC im Dot Plot (FSC gegen SSC) sehr gut dazu eignet, um zuverlässig die Bindung von IgG_{BNP} an die beiden Subpopulationen zu evaluieren. Die Marker zur Bestimmung der IgG⁺ Zellen wurden, wie bereits bei den Leukozyten beschrieben, auch für die Granulozyten und die PBMC im Histogramm gesetzt.

Die Bindung von IgG_{BNP} und IgG_{Kontr} wurde im Vergleich zur Bindung des Sekundärantikörpers an beide Leukozytensubpopulationen ausgewertet.

Abbildung IV.12 lässt erkennen, dass IgG_{BNP} in einem deutlich höheren Ausmaß im Vergleich zu IgG_{Kontr} und den Sekundärantikörpern an die beiden Subpopulationen bindet. Dabei ist der Mittelwert der Bindung an die PBMC-Population (\bar{x} 83,52±21,41) höher als der an die Granulozyten (\bar{x} 44,52±39,09). Der Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben ergibt einen hochsignifikanten Unterschied ($p < 0,0001$; $n = 257$) zwischen der Bindung von IgG_{BNP} an die PBMC und an die Granulozyten.

Zudem ergibt der paarweise Vergleich nach der Methode von Dunn hochsignifikante Unterschiede ($p < 0,0001$) zwischen der Bindung von IgG_{BNP} und der von $\text{IgG}_{\text{Kontr}}$, sowie zwischen der Bindung von IgG_{BNP} und der Sekundärantikörper, sowohl an die PBMC-Population als auch an die Granulozyten. Die Bindung von $\text{IgG}_{\text{Kontr}}$ und die der Sekundärantikörper an die Granulozyten ($p = 0,999$), beziehungsweise an die PBMC-Population ($p = 0,830$) unterscheidet sich statistisch nicht.

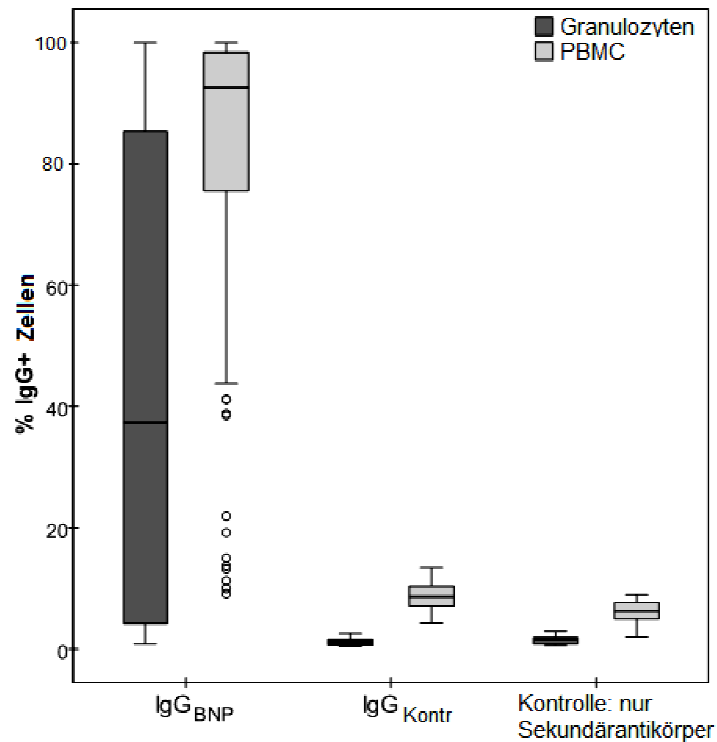


Abbildung IV.12 IgG aus BNP-Kolostrum (IgG_{BNP}) bindet in einem signifikant höheren Ausmaß an die peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) als an die Granulozyten von gesunden Spenderkälbern. IgG aus Kontrollkolostrum ($\text{IgG}_{\text{Kontr}}$) und die Sekundärantikörper binden im Vergleich dazu in einem signifikant geringeren Ausmaß an die Zellen.

° = Ausreißer

4.2 IgG Bindung an BK-KL3A- und MDBK-Zellen

Der Nachweis einer Bindung von kolostralem IgG an Zellen einer bovinen Zelllinie sollte erkennen lassen, ob der/die Antikörperligand/en allein auf Leukozyten vorkommen oder auch auf anderen bovinen Zellen. Der individuelle Faktor, der bei der Bindungsintensität an die Leukozyten der verschiedenen Kälber eine Rolle zu spielen scheint, sollte hierbei wegen der genetischen Homogenität der Zelllinien wegfallen. Untersucht werden konnten hierfür die BK-KL3A- und die MDBK-Zellen als Vertreter für bovine Zelllinien und die porcine PK15-Zelllinie als Kontrolle anderer Speziesherkunft.

BK-KL3A Zellen

Der Vergleich der lebenden Zellen mit dem Mann-Whitney *U*-Test für unabhängige Stichproben ergibt keinen statistisch signifikanten Unterschied ($n = 167$, $p = 0,793$) zwischen den beiden Gruppen (IgG_{BNP} und $\text{IgG}_{\text{Kontr}}$).

Es konnte klar gezeigt werden, dass IgG_{BNP} ($\bar{x} 24,17 \pm 20,28$) im Vergleich zu $\text{IgG}_{\text{Kontr}}$ ($\bar{x} 0,06 \pm 0,03$) und den sekundären Antikörpern ($\bar{x} 0,05 \pm 0,03$) an die Zellen dieser Zelllinie bindet. Der Kruskal-Wallis-Test für unabhängige Stichproben ergibt hochsignifikante Unterschiede ($n = 167$; $p < 0,0001$) zwischen den drei experimentellen Ansätzen (Zellen inkubiert mit IgG_{BNP} , $\text{IgG}_{\text{Kontr}}$ oder dem Sekundärantikörpern). Der Mann-Whitney *U*-Test für paarweise Vergleiche mit Bonferroni-Korrektur zeigt hochsignifikante Unterschiede zwischen den mit IgG_{BNP} inkubierten Proben und den mit $\text{IgG}_{\text{Kontr}}$, bzw. den nur mit den Sekundärantikörpern inkubierten Proben ($p < 0,0001$). Zwischen den mit $\text{IgG}_{\text{Kontr}}$ und den mit den Sekundärantikörpern inkubierten Proben konnte hingegen kein statistisch signifikanter Unterschied ($p = 0,999$) festgestellt werden (Hintergrundreaktionen).

Anhang IX.4.1 zeigt eine Einzelauflistung der mit den BK-KL3A Zellen getesteten IgG_{BNP}-Proben. Eine Probe (BNP-3) bindet nur zu einem sehr geringen Grad an die BK-KL3A Zellen (\bar{x} 0,38 %). Bei einigen IgG_{BNP}-Proben ist eine starke Variation in der Bindung zu beobachten (z.B. BNP-1 von 9,65-46,63 % IgG+ Zellen). Die Probe BNP-13 wurde am selben Tag dreimal mit derselben Antikörperverdünnung getestet und zwei weitere Male an anderen Tagen. Dabei ist auffallend, dass die Proben, die am selben Tag getestet wurden, ähnliche Anteile an IgG+ Zellen aufweisen, während die Werte der anderen Tage voneinander abweichen (Abbildung IV.13).

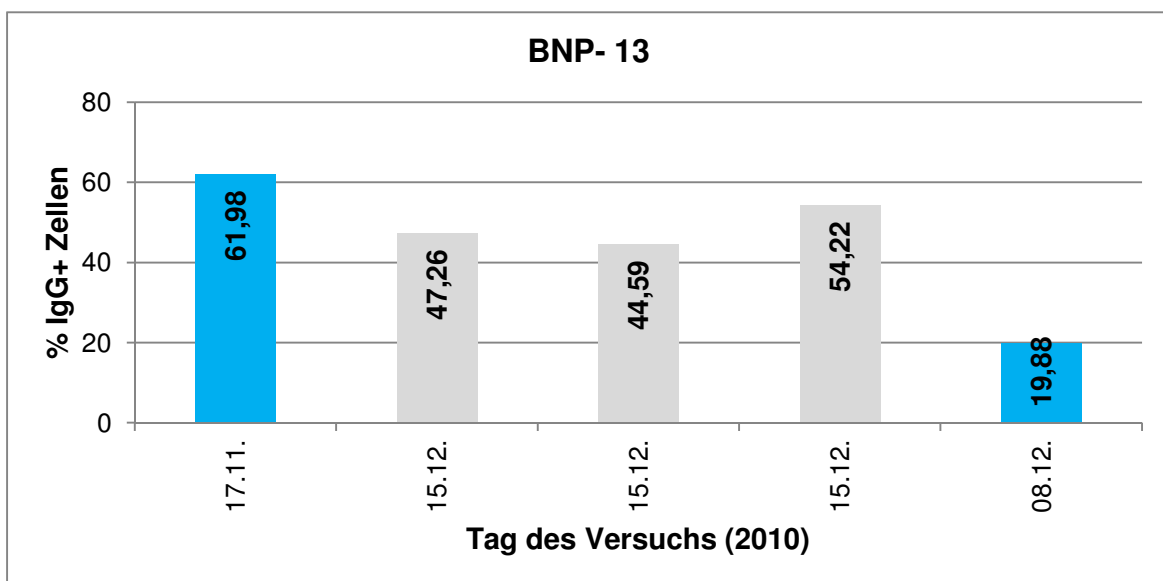


Abbildung IV.13 Vergleich des Anteils der IgG+ Zellen von BK-KL3A Zellen, die am selben Tag (hellgrau) mit IgG_{BNP} der Probe BNP-13 inkubiert wurden, mit dem von Zellen, die an einem anderen Tag (blau) mit IgG_{BNP} dieser Probe inkubiert wurden. Der Anteil der IgG+ Zellen eines jeden Versuchs ist in den Säulen angegeben.

MDBK-Zellen

Die vergleichende Analyse der lebenden Zellen mit dem Mann-Whitney *U*-Test für unabhängige Stichproben ergibt statistisch signifikante Unterschiede ($n=170$, $p < 0,0001$) zwischen den mit IgG_{BNP} (\bar{x} 92,02±7,43) und den mit IgG_{Kontr} inkubierten Zellen (\bar{x} 88,59±6,48).

IgG_{BNP} (\bar{x} 45,94±24,58) bindet im Vergleich zu IgG_{Kontr} (\bar{x} 0,11±0,31) und den sekundären Antikörpern (\bar{x} 0,06±0,06) explizit an die MDBK-Zellen. Der Kruskal-Wallis-Test für unabhängige Stichproben ergibt hochsignifikante Unterschiede ($n=179$; $p < 0,0001$) der Werte der IgG+ Zellen zwischen den drei Ansätzen

(Zellen inkubiert mit IgG_{BNP}, IgG_{Kontr} oder den Sekundärantikörpern allein). Der Mann-Whitney *U*-Test für paarweise Vergleich mit Bonferroni-Korrektur ergibt auch hier hoch signifikante Unterschiede zwischen den mit IgG_{BNP} und den mit IgG_{Kontr}, bzw. den nur mit den Sekundärantikörpern inkubierten Proben ($p < 0,0001$). Zwischen den mit IgG_{Kontr} und den nur mit den Sekundärantikörpern inkubierten Zellen gibt es wiederum keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,999$).

Anhang IX.4.2 zeigt eine Einzelauflistung der mit den MDBK-Zellen getesteten IgG_{BNP}-Proben. Die Probe BNP-3 bindet, wie bereits bei den BK-KL3A Zellen, nur in einem sehr geringen Ausmaß an die MDBK-Zellen (\bar{x} 3,26 IgG+ Zellen). Wie oben bereits beschrieben, variiert der Anteil der IgG+ Zellen auch hier bei den getesteten Einzelproben von Versuch zu Versuch zum Teil erheblich (z.B. BNP-6 von 7,69 - 63,46 % IgG+ Zellen). Wenn man aber die einzelnen Versuche, die mit IgG_{BNP} der Probe BNP-6 durchgeführt wurden, getrennt betrachtet, kann man feststellen, dass bei Versuchen, die am selben Tag mit derselben Antikörperverdünnung durchgeführt wurden, die prozentualen Anteile der IgG+ Zellen vergleichbar sind (Abbildung IV.14).

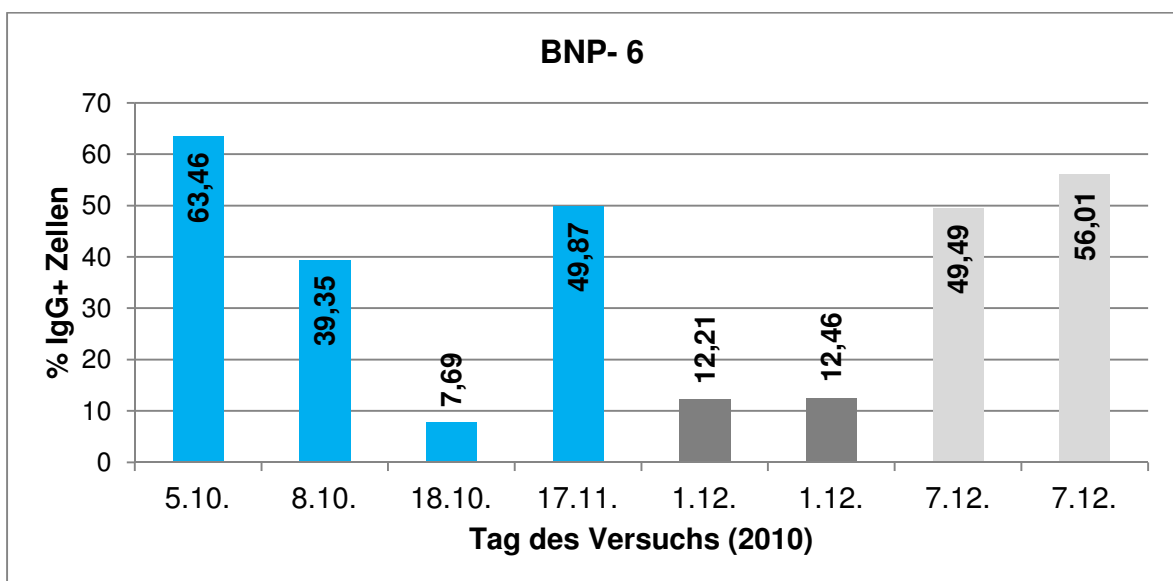


Abbildung IV.14 Vergleich des Anteils der IgG+ Zellen von MDBK Zellen, die am selben Tag (1.12. dunkelgrau; 7.12. hellgrau) mit IgG_{BNP} der Probe BNP-6 inkubiert wurden, mit dem von Zellen, die an einem anderen Tag (blau) mit IgG_{BNP} dieser Probe inkubiert wurden. Der Anteil der IgG+ Zellen eines jeden Versuchs ist in den Säulen angegeben.

PK15-Zellen

Der Vergleich der Analyse der lebenden Zellen mit dem Mann-Whitney *U*-Test für unabhängige Stichproben ergibt keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den mit IgG_{BNP} und den mit IgG_{Kontr} behandelten Proben (n= 90, p= 0,333).

Der Kruskal-Wallis-Test für unabhängige Stichproben (n= 95, p= 0,208) zeigt keinen statistisch signifikanten Unterschied in den Werten der IgG+ Zellen zwischen den mit IgG_{BNP} inkubierten Proben (\bar{x} 2,93±1,12) und den mit IgG_{Kontr} (\bar{x} 1,62±0,79) bzw. mit den Sekundärantikörpern (\bar{x} 0,08±0,04) inkubierten Proben.

Zusammenfassung

Die Mittelwerte der IgG+ Zellen nach Inkubation mit IgG_{BNP} wurden zum Vergleich der drei Zelllinien untereinander analysiert. Der Kruskal-Wallis-Test für unabhängige Stichproben (n= 230; p< 0,0001) zeigt hochsignifikante Unterschiede der Mittelwerte der IgG+ Zellen der drei Zelllinien an. Der anschließende paarweise Vergleich mit dem Mann-Whitney *U*-Test ergibt hochsignifikante Unterschiede zwischen den Werten für

- Die PK15-Zellen und die BK-KL3A-Zellen (p< 0,0001),
- Die PK15-Zellen und die MDBK-Zellen (p< 0,0001) und
- Die BK-KL3A-Zellen und die MDBK-Zellen (p< 0,0001).

In Abbildung IV.15 sind die Ergebnisse der statistischen Auswertungen aus diesen Versuchen dargestellt.

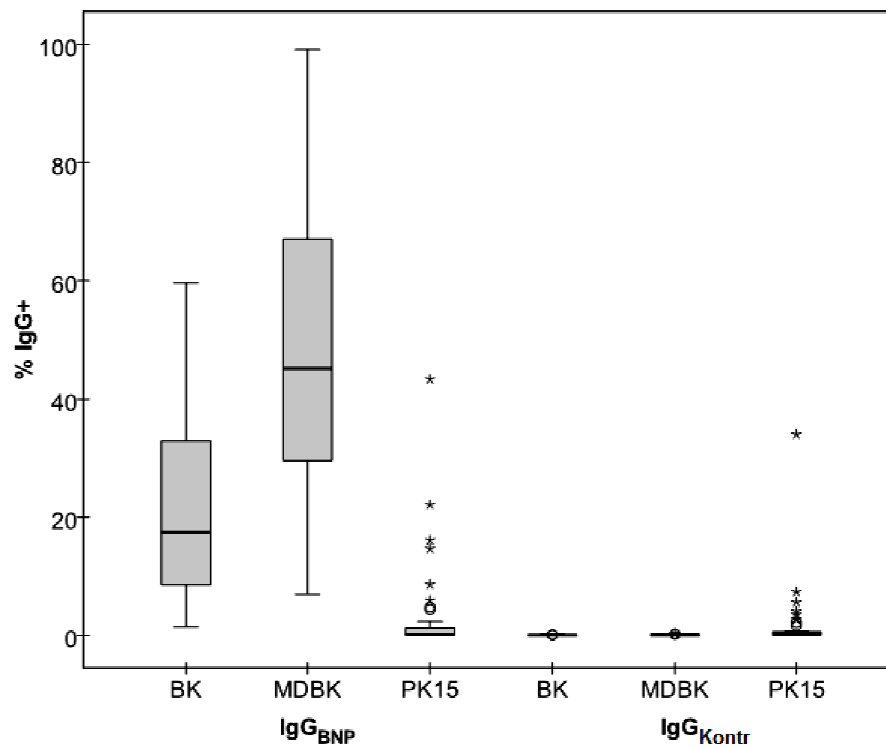


Abbildung IV.15 Statistische Auswertung des Anteils der IgG+ Zellen nach der Inkubation von Zellen der Zelllinien BK-KL3A (BK), MDBK und PK15 mit IgG aus BNP-Kolostrumproben (IgG_{BNP}) und IgG aus Kontrollkolostrumproben (IgG_{Kontr}).

◻ = Ausreißer * = Extremwerte

5 Toxizitätsprüfung von BNP-Proben

5.1 Einfluss von Serumproben auf die Zellvitalität

Serumproben von BNP- und Kontrolltieren wurden mit den Leukozyten von 16 verschiedenen Spenderkälbern getestet. Dabei wurden Vitalitätstests nach 24 und 48 Stunden Inkubation mit je einem Serum- oder FBS-Anteil von 20 %, beziehungsweise von 40 % durchgeführt. In Abbildung IV.16 sind die Ergebnisse des Versuchs dargestellt.

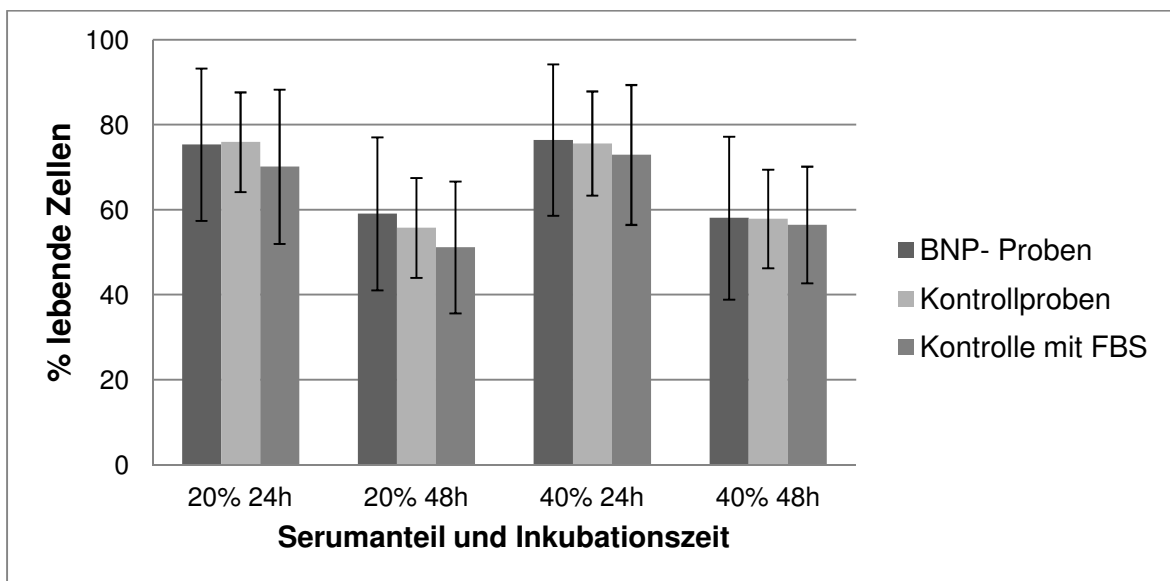


Abbildung IV.16 Anteil der lebenden Leukozyten von gesunden Kälbern nach Inkubation mit Serum von BNP- und Kontrolltieren oder mit FBS nach 24 und 48 Stunden.

Da dieser Versuch als Pilotversuch durchgeführt wurde, ist die Anzahl der getesteten Proben für eine statistische Auswertung zu gering. Es konnte kein deutlicher Unterschied zwischen den Anteilen der überlebenden Zellen nach Inkubation mit BNP- und Kontrollproben sowie mit FBS festgestellt werden. Dies gilt sowohl für den Vergleich der Proben in den einzelnen Versuchen, als auch für die berechneten Mittelwerte. Zum Teil waren sogar die Überlebensraten der Zellen, die mit FBS inkubiert wurden, etwas niedriger als jene, die mit BNP- oder Kontrollserum inkubiert wurden.

5.2 Einfluss von kolostralen Proteinen auf die Zellvitalität

Die Peakfraktionen 1-5 wurden mit Leukozyten von acht Spenderkälbern auf ihre Toxizität getestet. Der Anteil der lebenden Zellen der einzelnen Gruppen wurde im Vergleich zum Anteil der lebenden Zellen nach Inkubation mit dem in der Gelchromatographie verwendeten Laufpuffer beurteilt. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen IV.17 bis 22 dargestellt.

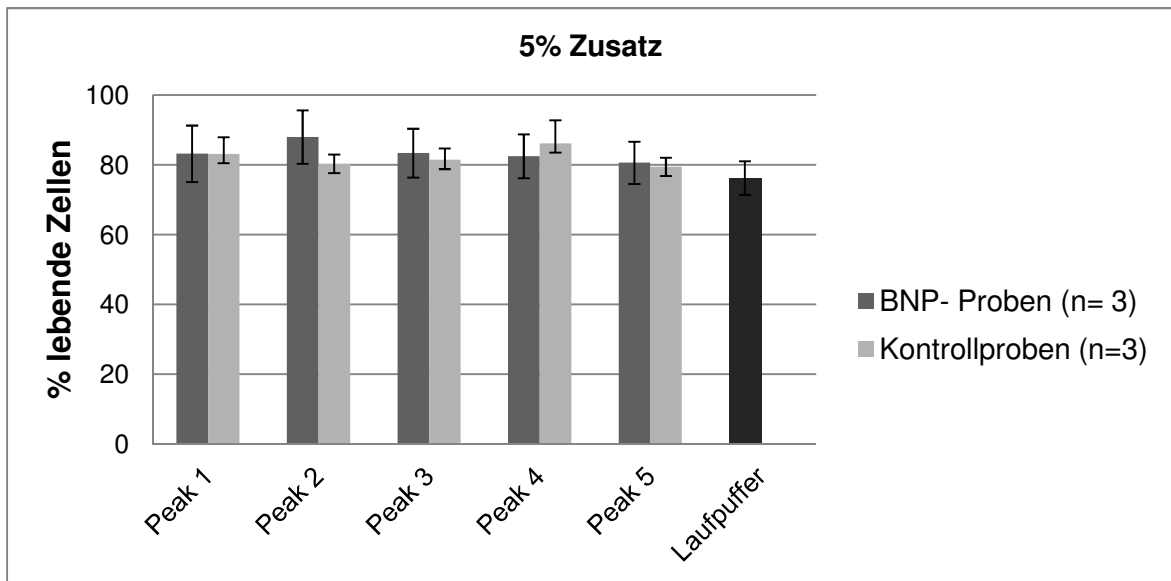


Abbildung IV.17 Anteil der überlebenden Leukozyten gesunder Kälber nach Inkubation mit einem Zusatz von 5 % der Peakfraktionen (Peak 1-5) von BNP- und Kontrollproben oder Laufpuffer nach 24 h.

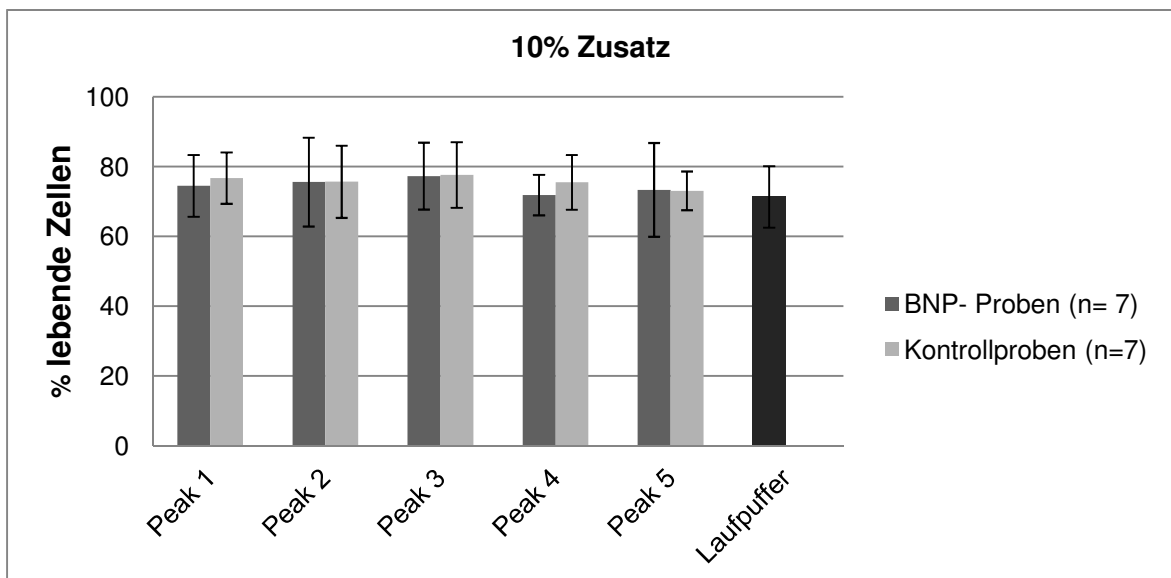


Abbildung IV.18 Anteil der überlebenden Leukozyten gesunder Kälber nach Inkubation mit einem Zusatz von 10 % der Peakfraktionen (Peak 1-5) von BNP- und Kontrollproben oder Laufpuffer nach 24 h.

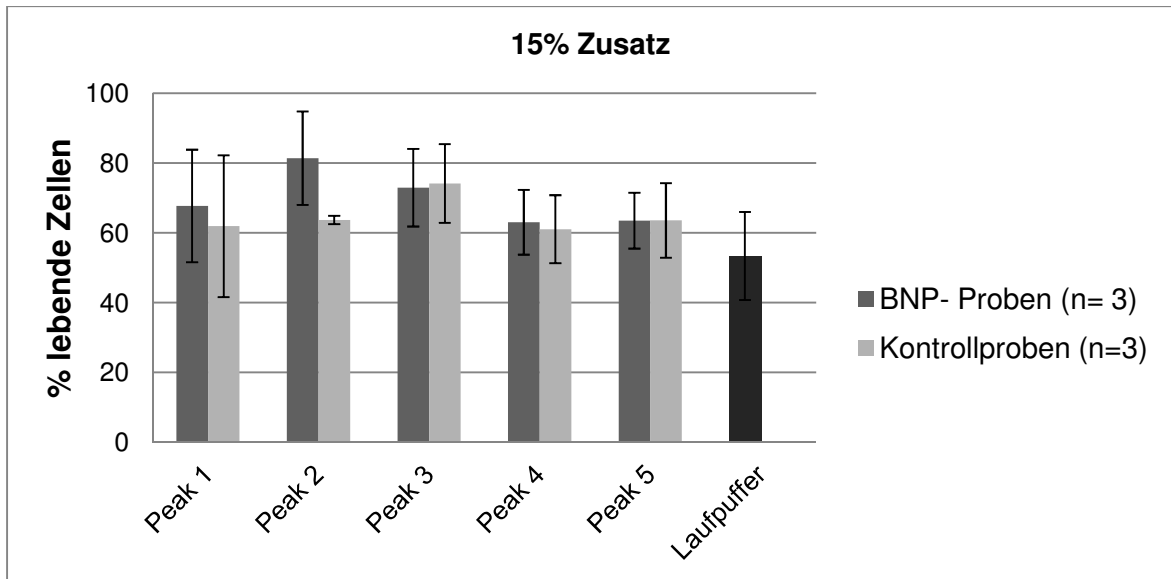


Abbildung IV.19 Anteil der überlebenden Leukozyten gesunder Kälber nach Inkubation mit einem Zusatz von 15 % der Peakfraktionen (Peak 1-5) von BNP- und Kontrollproben oder Laufpuffer nach 24 h.

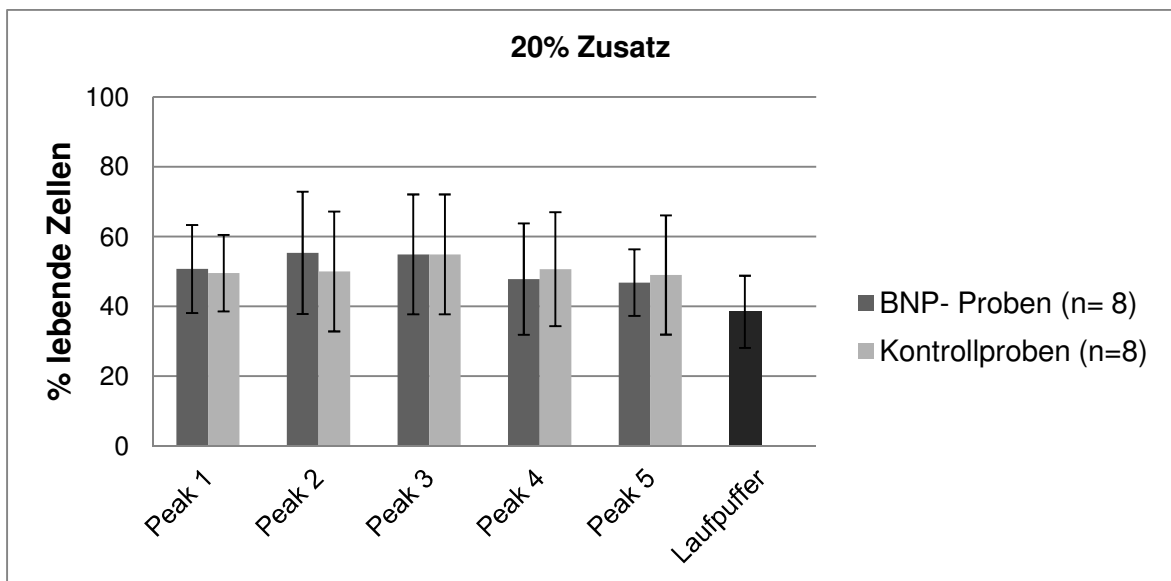


Abbildung IV.20 Anteil der überlebenden Leukozyten gesunder Kälber nach Inkubation mit einem Zusatz von 20 % der Peakfraktionen (Peak 1-5) von BNP- und Kontrollproben oder Laufpuffer nach 24 h.

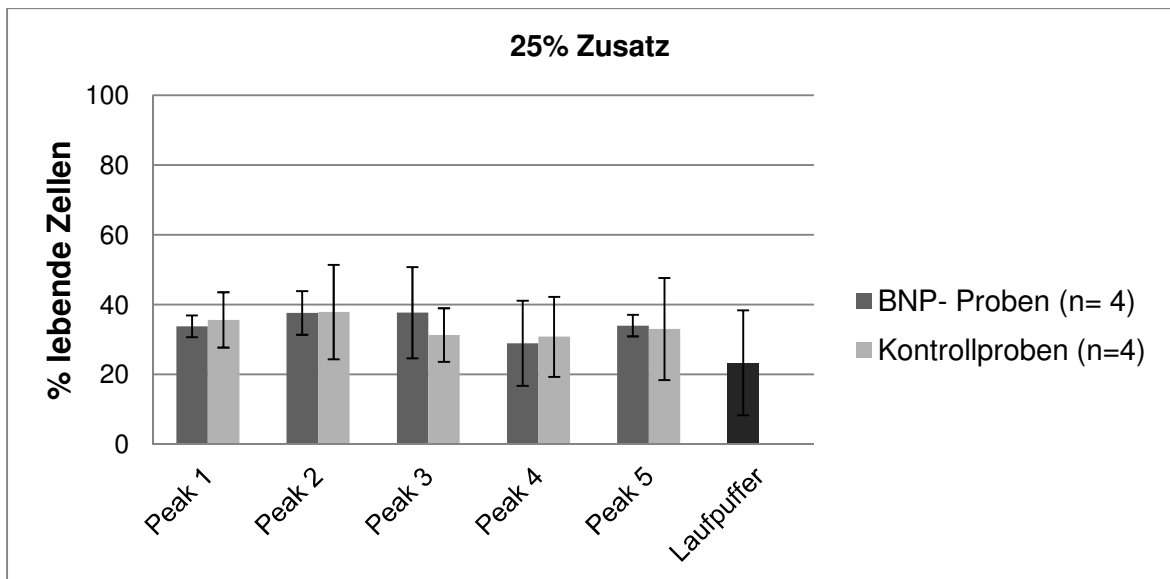


Abbildung IV.21 Anteil der überlebenden Leukozyten gesunder Kälber nach Inkubation mit einem Zusatz von 25 % der Peakfraktionen (Peak 1-5) von BNP- und Kontrollproben oder Laufpuffer nach 24 h.

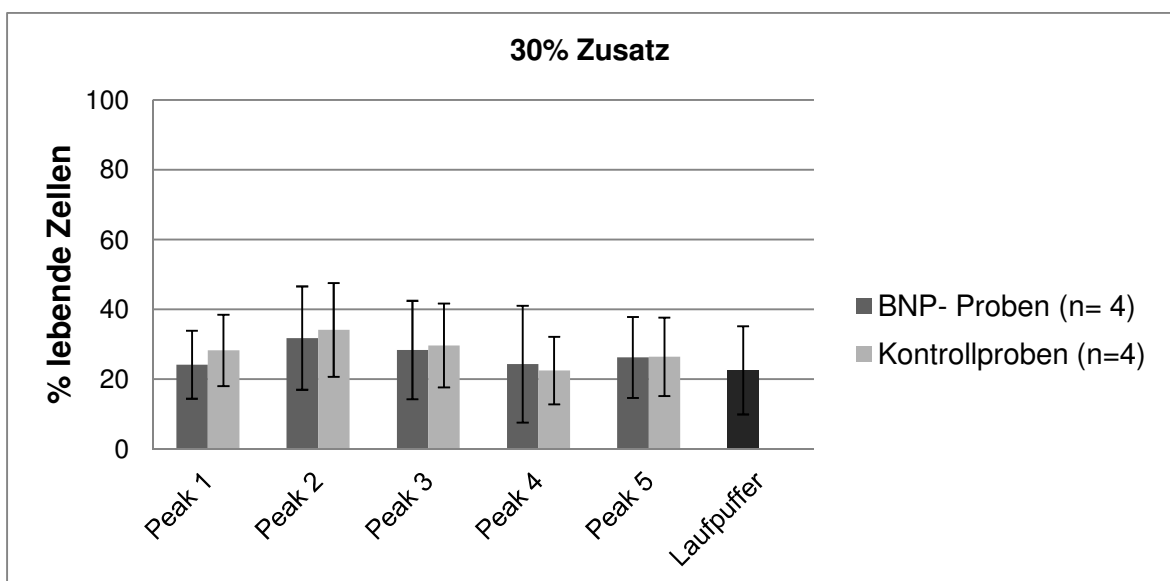


Abbildung IV.22 Anteil der überlebenden Leukozyten gesunder Kälber nach Inkubation mit einem Zusatz von 30 % der Peakfraktionen (Peak 1- 5) von BNP- und Kontrollproben oder Laufpuffer nach 24 h.

Dieser Versuch wurde als Pilotversuch durchgeführt. Eine statistische Auswertung ist aufgrund der geringen Probenzahl, die jeweils von den einzelnen Verdünnungen getestet wurden, nicht möglich. Es ist kein wesentlicher Unterschied bezüglich der Überlebensrate von Leukozyten, die mit den Peakfraktionen aus BNP-Kolostrumproben und solchen, die mit Peakfraktionen aus Kontrollkolostrumproben inkubiert wurden, festzustellen. Die Überlebensrate von Zellen, die nur mit dem Laufpuffer inkubiert wurden, scheint im Allgemeinen

sogar niedriger zu sein, als nach Inkubation mit den Peakfraktionen. Dies bestätigt Abbildung IV.23. Hier wurden die Mittelwerte nach Zusatz der jeweiligen Anteile der Peakfraktionen (1-5) von BNP- und Kontrollkolostrumproben oder von Laufpuffer berechnet. Auch der Mittelwert der nur mit serumfreiem Medium inkubierten Zellen wurde berechnet und grafisch dargestellt (blaue Säule).

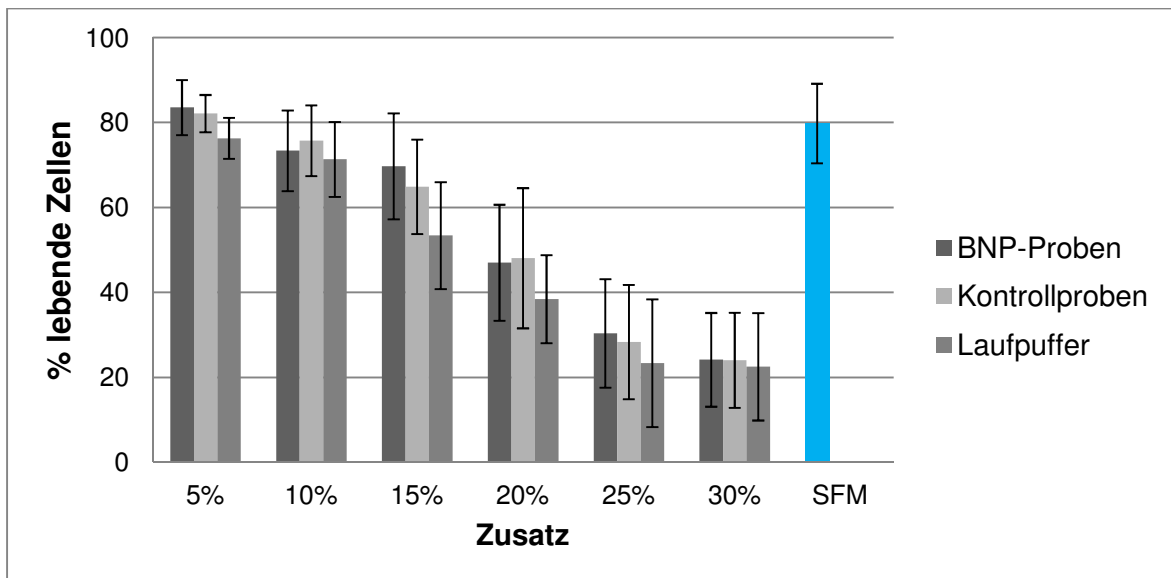


Abbildung IV.23 Mittelwerte der lebenden Leukozyten von gesunden Kälbern nach Inkubation (24 h) mit einem Zusatz von unterschiedlichen Anteilen der Peakfraktionen aus BNP- und Kontrollproben, Laufpuffer oder nur von serumfreiem Medium (SFM).

Es ist zu erkennen, dass der Laufpuffer anscheinend nur bei einem Zusatz von 5-10 % keine negative Auswirkung auf die Zellvitalität hat. Da sich aber BNP- und Kontrollproben in ihrem Einfluss auf die Zellvitalität nicht unterscheiden, ist dieser negative Effekt eindeutig auf den Laufpuffer zurückzuführen. Der Anteil überlebender Zellen nimmt mit Zunahme des Anteils des Laufpuffers (sowohl mit den Peakfraktionen als auch nur mit dem Laufpuffer) deutlich ab.

5.3 Toxizitätsprüfung mit Komplementzusatz

Dieser Versuch wurde mit Leukozyten von vier verschiedenen Spenderkälbern durchgeführt. Nach einer Inkubationszeit von 24 h mit oder ohne ConA-Zusatz wurden die Zellen mit IgG_{BNP} oder IgG_{Kontr} versetzt und anschließend entweder mit Meerschweinchenkomplement (MK) oder mit PBSO für 30 min bei 37 °C inkubiert. Der Versuchsaufbau sollte erkennen lassen, ob einer, und wenn welcher, dieser Faktoren einen Einfluss auf die Zellvitalität und/oder die IgG-Bindung hat. Für eine statistische Auswertung ist die Probenanzahl zu gering.

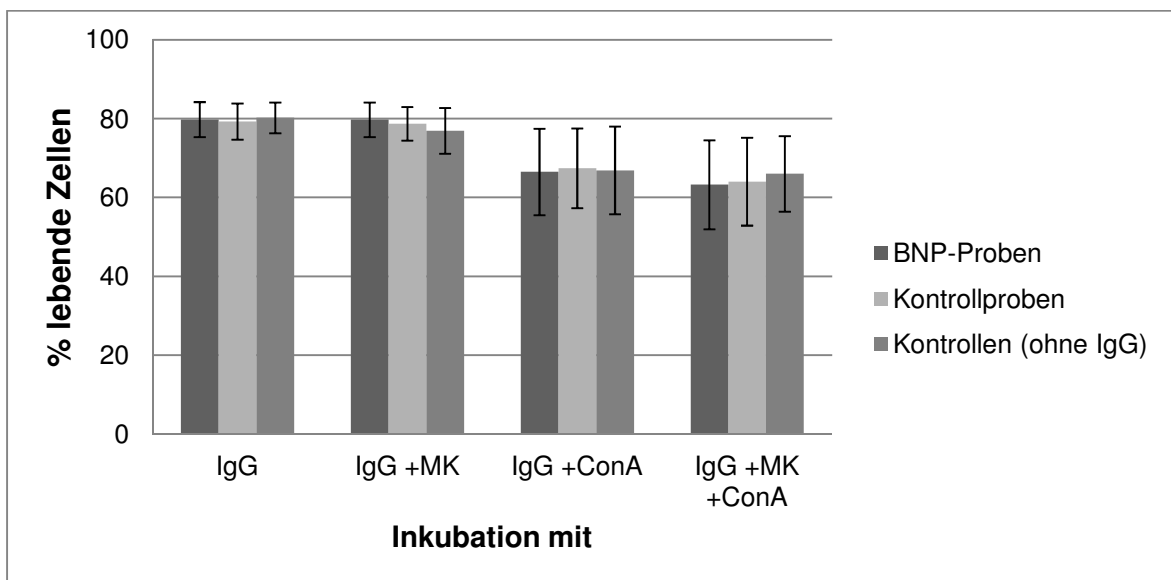


Abbildung IV.24 Anteil der lebenden Leukozyten von gesunden Spenderkälbern (n= 4) nach über-Nacht Inkubation mit oder ohne ConA-Zusatz, anschließender Inkubation mit IgG aus BNP- oder Kontrollproben und mit oder ohne Meerschweinchenkomplement (MK) für 30 min.

Abbildung IV.24 zeigt den Anteil der lebenden Zellen der verschiedenen Probengruppen. Es ist zu erkennen, dass die Leukozyten, die über Nacht mit ConA inkubiert wurden, eine etwas geringere Überlebensrate haben, als Zellen, die nur mit Medium inkubiert wurden. Das scheint aber unabhängig von der späteren Behandlung mit Meerschweinchenkomplement oder der Inkubation mit IgG zu sein. Das Meerschweinchenkomplement hatte in diesen Versuchen in Verbindung mit dem IgG der BNP-Proben keinen erkennbaren Einfluss auf die Zellvitalität.

Abbildung IV.25 zeigt die Bindung von IgG aus BNP- und Kontrollkolostrumproben, sowie nur des Sekundärantikörpers (Kontrollen), an die unterschiedlich behandelten Leukozyten. Wie bereits beschrieben (IV.4.1) bindet auch hier nur IgG aus BNP-Kolostrum an die Zellen. Der Anteil IgG+ Zellen liegt bei Leukozyten, die nur mit MK behandelt wurden, mit durchschnittlich 45,15 % ($\pm 22,85$) am niedrigsten und bei Zellen, die mit MK und ConA behandelt wurden mit 56,72 % ($\pm 24,53$) am höchsten. Die Mittelwerte der Zellen, die nur mit ConA behandelt wurden (\bar{x} 51,99 \pm 23,91 % IgG+ Zellen) und ohne jeden Zusatz (\bar{x} 50,94 \pm 24,96 % IgG+ Zellen) liegen dazwischen.

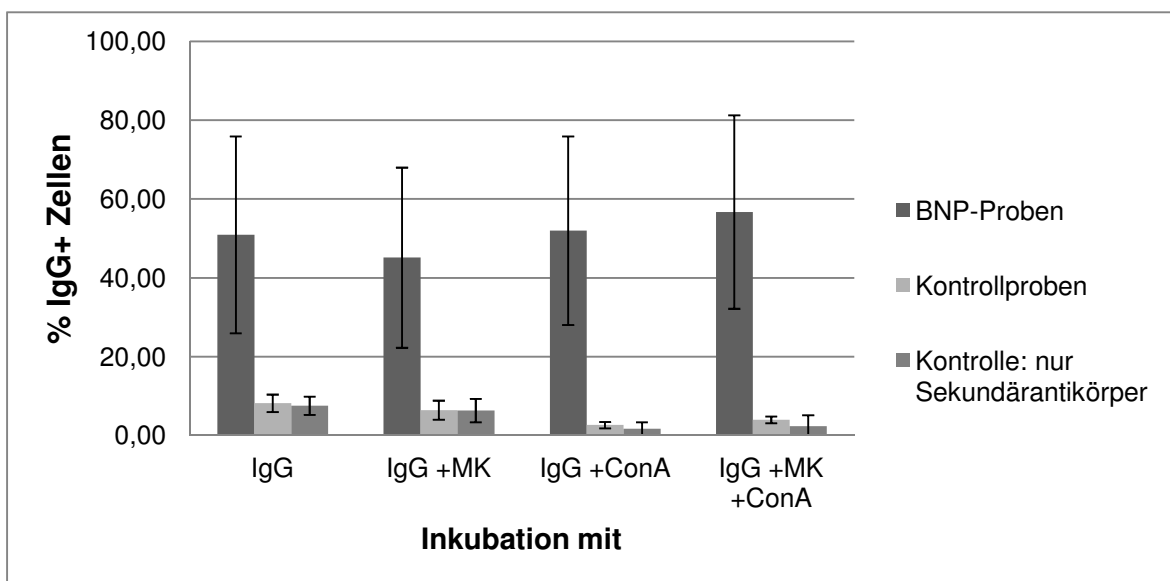


Abbildung IV.25 Bindung von IgG_{BNP} (BNP-Proben) an die Leukozyten gesunder Kälber nach deren Inkubation mit oder ohne ConA-Zusatz über Nacht und anschließender Inkubation mit Meerschweinchenkomplement (MK) für 30 min. Der Anteil IgG+ Zellen nach Inkubation mit IgG_{Kontr} (Kontrollproben) oder mit nur den Sekundärantikörpern ist deutlich geringer.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich bei diesen Versuchen durch den Zusatz von Meerschweinchenkomplement keine vitalitätsmindernden Einflüsse von IgG_{BNP} oder IgG_{Kontr} auf die Leukozyten gesunder Kälber nachweisen ließen. Auch die Reaktivität von IgG_{BNP} mit den Leukozyten änderte sich kaum.

6 IgG-Bindungsreduktion

6.1 MHC-Klasse I-reaktive monoklonale Antikörper

Fünf der neun IgG_{BNP}-Proben und vier der acht IgG_{Kontr}-Proben wurden zweimal mit den MDBK-Zellen getestet. Insgesamt wurden 14 Proben mit IgG_{BNP} und 12 Proben mit IgG_{Kontr} je einmal mit und einmal ohne Zusatz der MHC-Klasse I-reaktiven Antikörper (IL-A88) durchflusszytometrisch analysiert. Wie bereits beschrieben (vgl. IV.4.2) war auch in diesem Versuch eine Bindung von IgG_{BNP} an die MDBK-Zellen nachweisbar. Der Anteil IgG⁺ Zellen bei MDBK-Zellen, die mit IgG_{Kontr} oder nur mit den Sekundärantikörpern behandelt wurden, war deutlich niedriger. Bei den mit IgG_{BNP} und MHC-Klasse I-reaktiven Antikörpern inkubierten Zellen war bei im Durchschnitt 76,33 % der Zellen eine Bindung dieser Antikörper nachweisbar. Bei den mit IgG_{Kontr} inkubierten Zellen waren es 81,78 % der Zellen.

Beim Vergleich der korrespondierenden Proben mit und ohne MHC-Klasse I-Antikörperzusatz war bei vier von 14 mit IgG_{BNP} inkubierten Proben eine Reduktion der IgG⁺ Zellen nach Vorbehandlung mit dem MHC-Klasse I-reaktiven Antikörper festzustellen. Nur bei einer Probe (BNP-8) war diese Reduktion in beiden Tests nachweisbar (Abbildung IV.26). Der Mittelwert der Bindungsreduktion bei allen vier Proben lag bei 18,02 %.

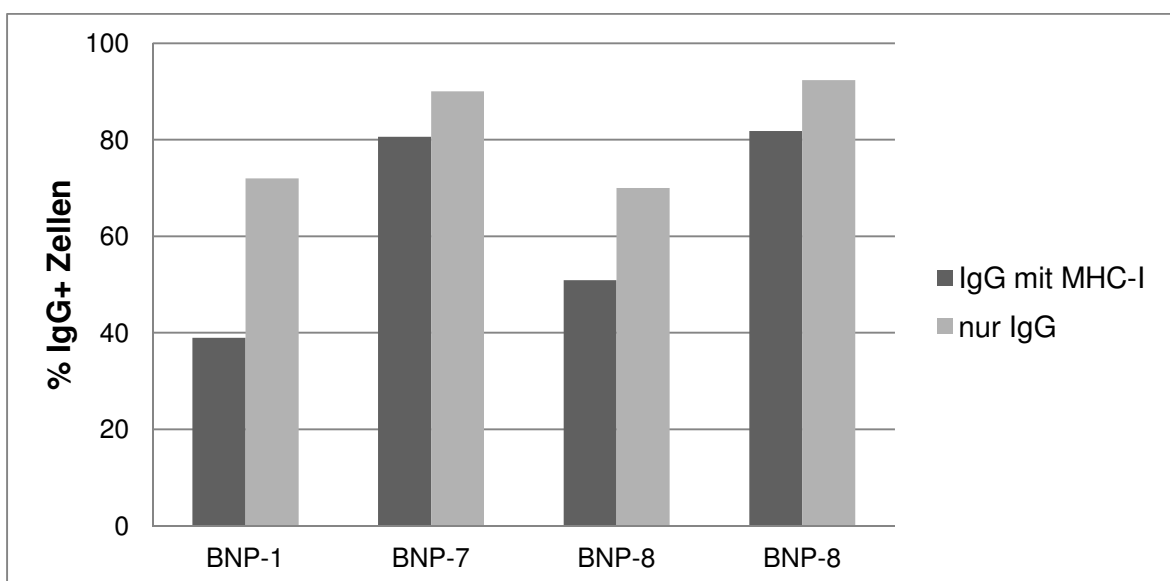


Abbildung IV.26 Bei vier von 14 mit IgG_{BNP} inkubierten Proben wurde eine Reduktion (> 5%) der IgG⁺ Zellen nach vorangegangenem Zusatz eines monoklonalen MHC-Klasse I-reaktiven Antikörpers (MHC-I) nachgewiesen.

Im Gegensatz dazu war bei sieben von 14 IgG_{BNP}-Proben eine Zunahme (> 5 %) der IgG+ Zellen um durchschnittlich 14,20 % nach vorherigem Zusatz des MHC-Klasse I-reaktiven Antikörpers festzustellen (Abbildung IV.27).

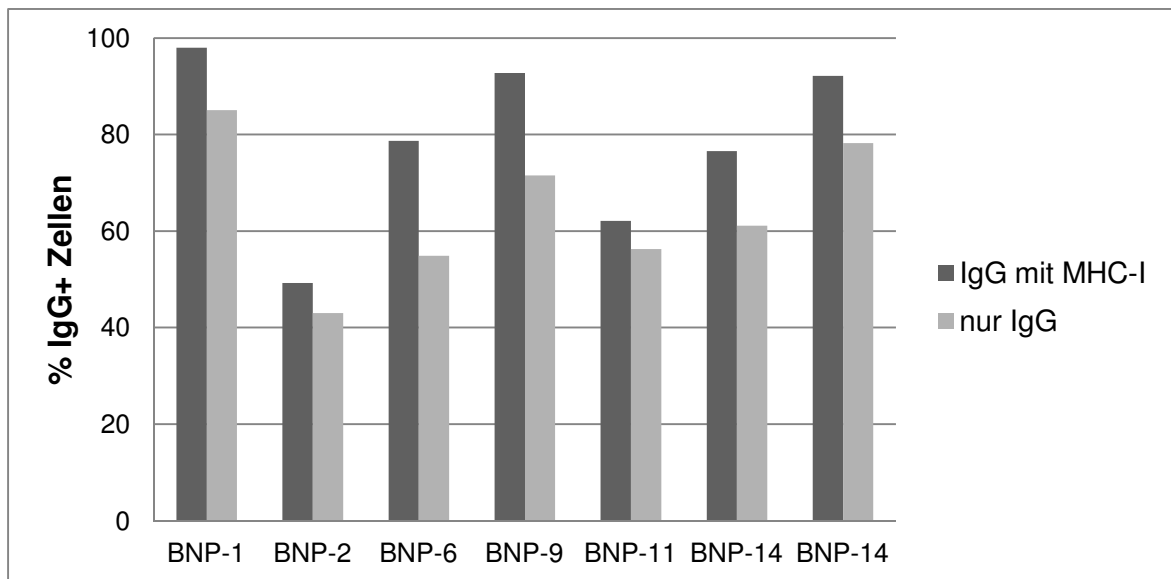


Abbildung IV.27 Bei sieben von 14 mit IgG_{BNP} gefärbten Proben wurde eine Zunahme (> 5%) der IgG+ Zellen nach vorheriger Inkubation mit einem monoklonalen MHC-Klasse I-reaktiven Antikörper (MHC-I) nachgewiesen.

Bei der IgG_{BNP}-Probe BNP-1 konnte beispielsweise einmal eine Reduktion und einmal eine Zunahme der IgG+ Zellen nach vorheriger Inkubation mit MHC-Klasse I-spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in diesem Versuch keine reproduzierbare Bindungsreduktion von IgG_{BNP} an MDBK-Zellen nach vorangehender Behandlung mit dem monoklonalen MHC-Klasse I-reaktiven Antikörper (IL-A88) nachweisbar war.

6.2 Bindungsreduktion nach Vorinkubation mit Viruszellkulturextrakt von Pestiviren

Zehn IgG_{BNP}-Proben wurden mit den Leukozyten neun verschiedener Spenderkälber zwischen vier- und achtmal inkubiert (58 Versuche). Es stellte sich heraus, dass bei fünf dieser Versuche keine Bindung der jeweiligen IgG_{BNP}-Probe an die Leukozyten nachweisbar war. In sechs Versuchen konnte zudem keine Bindungsreduktion nach Vorinkubation von IgG_{BNP} mit den Viruszellkulturextrakten von BVDV oder BDV festgestellt werden. Tabelle IV.10 gibt einen Überblick über die durchgeführten Versuche.

Tabelle IV.10 Verteilung der nachgewiesenen Leukozytenbindungsreduktionen (Abnahme der IgG⁺ Zellen) von IgG⁺ Zellen nach Vorinkubation mit Zellkulturernten des bovinen Virusdiarrhö Virus (BVDV) und des Border disease Virus (BDV) bei allen getesteten IgG_{BNP}-Proben (n= 10). Bindung und Reduktion beziehen sich auf BVDV.

Proben Nr.	Anzahl durchgeführter Experimente	IgG _{BNP} Bindungsreduktion nach Vorinkubation mit BVDV	Keine Bindung nachweisbar	Keine Reduktion nachweisbar	IgG _{BNP} Bindungsreduktion nach Vorinkubation mit BDV
BNP-1	6	4	1	1	4
BNP-2	6	6			6
BNP-4	6	5		1	3
BNP-5	6	5	1		5
BNP-6	6	6			6
BNP-7	8	5	1	2	5
BNP-9	6	5	1		5
BNP-10	4	4			3
BNP-11	4	3		1	2
BNP-12	6	4	1	1	3
Summe	58	47	5	6	42

Bei 42 Experimenten konnte eine Bindungsreduktion nach Vorinkubation mit Zellkulturernten von BVDV und BDV nachgewiesen werden. Nur Experimente, in denen eine Bindungsreduktion nach Vorinkubation mit Zellkulturernte von BVDV nachgewiesen wurde, wurden statistisch ausgewertet (n= 47). Bei jeder der zehn einzelnen IgG_{BNP}-Proben wurde mindestens dreimal eine Bindungsreduktion nachgewiesen (vgl. Tabelle IV.10).

Der Anteil der IgG⁺ Zellen nach Behandlung der Leukozyten mit IgG_{BNP}-Proben, die mit Zellkulturüberstand von MDBK-Zellen (\bar{x} 45,02±24,65) oder PK15-Zellen (\bar{x} 45,37±25,61) vorinkubiert wurden, unterschied sich statistisch nicht signifikant (p= 0,266, n= 47; t-Test) zu den gleichen, nur mit PBS vorbehandeltem IgG_{BNP}-Proben (\bar{x} 54,46±22,99). Auch der prozentuale Mittelwert der IgG⁺ Zellen, der mit den mit Zellkulturernte von ESPV vorinkubierten IgG_{BNP}-Proben erzielt wurde, unterschied sich nicht von dem der anderen eingesetzten Kontrollen (\bar{x} 46,86±22,80).

Da sich die Mittelwerte der Kontrollen PBS, MDBK und PK15 nicht signifikant unterschieden, wurde der Mittelwert aller Kontrollen berechnet und dieser als Referenzwert gleich 100% IgG+ Zellen gesetzt. Eine Normalisierung der Mittelwerte von BVDV, BDV und ESPV erfolgte, indem sie durch diesen Referenzwert geteilt wurden. Abbildung IV.28 zeigt die prozentualen Werte der verbliebenen IgG+ Zellen nach Vorinkubation der IgG_{BNP}-Proben mit Zellkulturextrakt von BVDV (\bar{x} 50,94±23,42) und BDV (\bar{x} 66,16±24,64) im Verhältnis zum Referenzwert (100 % Bindung).

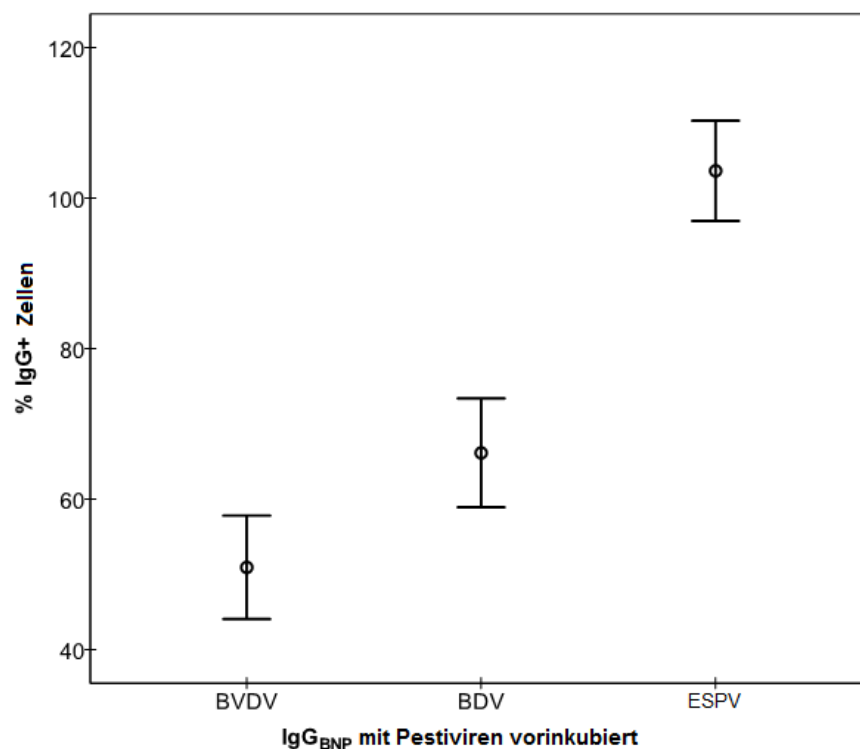


Abbildung IV.28 Der prozentuale Anteil IgG+ Zellen nach Inkubation der Leukozyten von gesunden Kälbern mit IgG aus BNP-Kolostrum (IgG_{BNP}) lässt sich signifikant durch Vorinkubation von IgG_{BNP}-Proben mit Zellkulturextrakt der ncp Pestiviren bovinen Virusdiarrhö Virus (BVDV) und Border disease Virus (BDV) reduzieren. Durch Vorinkubation mit Zellkulturextrakt des europäischen Schweinepest Virus (ESPV) lässt sich keine Bindungsreduktion auslösen. Die durch Vorinkubation der IgG_{BNP}-Proben mit Zellkulturextrakt von BVDV, BDV und ESPV erhaltenen Daten wurden durch Normalisierung in ein Verhältnis zur Referenzkontrolle (100 % IgG+ Zellen) gesetzt.

Eine hochsignifikante Bindungsreduktion ($p < 0,0001$) der IgG⁺ Zellen nach Vorinkubation von IgG_{BNP} mit Zellkulturextrakt von BVDV (49,0 % Reduktion) und BDV (33,8 % Reduktion) im Vergleich zu den mit den Kontrollen (Zellkulturüberstände MBDK, PK15 und PBS) vorinkubierten IgG_{BNP}-Proben wurde mithilfe der Varianzanalyse für verbundene Stichproben (ANOVA) und der Greenhouse-Geisser-Korrektur gefolgt vom einem *t*-Test für gepaarte Stichproben mit Bonferroni-Korrektur berechnet. Bemerkenswert ist, dass bei Leukozyten, die mit ESPV Zellkulturextrakt vorinkubierten IgG_{BNP}-Proben behandelt wurden ($\bar{x} 103,63 \pm 22,69$), überhaupt keine Bindungsreduktion im Vergleich zu den Kontrollen erfolgte ($p = 0,9999$).

Kein Einfluss des BVDV-Antikörpertiters der IgG_{BNP}-Proben auf die Bindungsreduktion

In allen IgG_{BNP}-Proben wurden im ELISA Antikörper gegen BVDV detektiert (IV.3.2.4). Daher war es von Interesse, ob die Höhe des festgestellten Antikörpertiters der einzelnen Proben mit der prozentualen Reduktion der IgG-Bindung nach Vorinkubation mit Zellkulturextrakt von BVDV oder BDV korreliert. Dazu wurde die mittlere prozentuale Bindungsreduktion jeder IgG_{BNP}-Probe nach Vorinkubation mit Zellkulturextrakt von BVDV gegenüber den mit Zellkulturüberstand bzw. PBS inkubierten Kontrollen berechnet und in einem Diagramm in Verbindung mit dem im ELISA gemessenen BVDV-Antikörpertiter dargestellt (Abbildung IV.29).

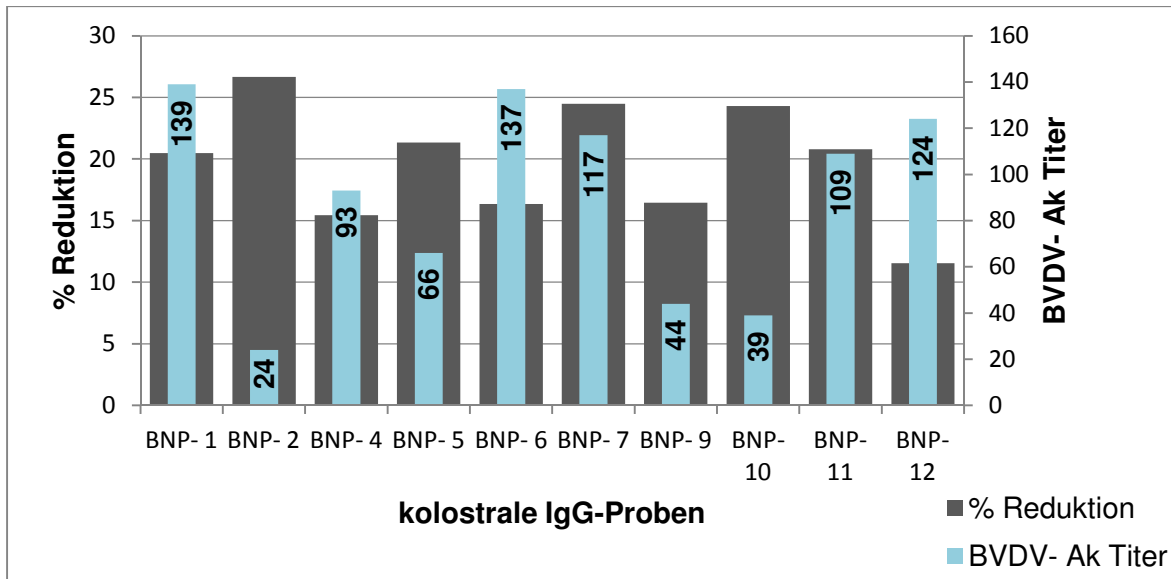


Abbildung IV.29 Es besteht kein direkter Zusammenhang zwischen der Höhe des im ELISA gemessenen BVDV-Antikörpertiters (BVDV-Ak Titer; blaue Säule) und der mittleren prozentualen Bindungsreduktion der einzelnen IgG_{BNP} -Proben (% Reduktion; graue Säulen) nach Vorinkubation mit Zellkulturernte von BVDV gegenüber den Kontrollen.

Abbildung IV.29 zeigt deutlich, dass die Höhe des BVDV-Antikörpertiters in den einzelnen IgG_{BNP} -Proben unabhängig von deren errechneten mittleren prozentualen Bindungsreduktion nach Vorinkubation mit Viruszellkulturernte von BVDV variiert.

V. Diskussion

1 Virologische Untersuchungen

Genom und Antikörpernachweis

In keiner der untersuchten Proben von BNP-Kälbern konnte BVD-, BTV- oder EHD-Virusgenom nachgewiesen werden. Auch andere Arbeitsgruppen konnten einen Zusammenhang der Entwicklung von BNP mit diesen Viren nicht bestätigen (FRIEDRICH et al., 2009; KAPPE et al., 2010; PARDON et al., 2010). Antikörper gegen BTV waren hingegen in den in Pirbright getesteten, aus Serum, Leukozyten und EDTA-Blut verschiedener BNP-Kälber gepoolten Proben nachweisbar. Das lässt vermuten, dass die Mütter dieser vier Kälber gegen BTV geimpft waren und ein Transfer der Antikörper über das Kolostrum stattgefunden hat (FRIEDRICH et al., 2009).

Nachweis von Circovirusgenom

Die Ergebnisse aus diesen Untersuchungen mit der PCR nach HALAMI et al. (2008) zum Nachweis von Circovirusgenom lassen keine Rückschlüsse auf die Beteiligung eines Circovirus in der Pathogenese von BNP zu. PCR-Fragmente der zu erwartenden Größe wurden sowohl in Knochenmarks- und Thymusproben von BNP-Kälbern, als auch von gesunden Kälbern nachgewiesen.

KAPPE et al. (2010) testeten Proben von fünf von 25 BNP- und einem von acht Kontrollkälbern positiv mit dieser Circovirus-PCR. Nach der Amplifizierung des kompletten Genoms wurde das Isolat aus Proben von einem BNP-Kalb als PCV2-Ha08 bezeichnet.

Sowohl die Sequenzen aus dem Kontrollknochenmark, als auch aus der für PCV-2 positiv getesteten Schweinelunge (Positivkontrolle) zeigten eine hohe Übereinstimmung (bis zu 99 %) mit verschiedenen, in der Gen-Datenbank gespeicherten PCV-2 Isolaten und Stämmen, darunter auch das Isolat PCV2-Ha08.

Da die in diesen Versuchen verwendeten Proben aus der Pathologie des LGL stammten und dort auch andere Tierarten (unter anderem Schweine) untersucht werden, wäre eine Kontamination mit porcinem Circovirus schon bei der Probenentnahme denkbar. Dagegen spricht aber, dass die nach QSA-Vorschriften des LGL getesteten Proben alle negativ waren. Andererseits könnte auch eine erst im Labor stattgefundene Kontamination den zumeist nicht reproduzierbaren Nachweis von Circovirusgenom in verschiedenen Proben erklären.

Die Untersuchung von großen Probenanzahlen von BNP-Kälbern in England mit verschiedenen PCR-Methoden zum Nachweis von Circovirusgenom ergaben durchgehend nur negative Ergebnisse (WILLOUGHBY et al., 2010).

Die Chiphybridisierungen mit dem DEFRA Biosecurity Chip ergaben in allen getesteten Serumproben (BNP- und Kontrollkälber), neben einem Signal mit der Fänger-Nukleotidsequenz eines pan-BTV-Primers, auch ein Signal mit der Sequenz, die spezifisch für ein Entencircovirus ist.

Die Ergebnisse der eigenen PCR-Untersuchungen und der Sequenzierungen lassen die Beteiligung eines Circovirus an der Pathogenese von BNP unwahrscheinlich erscheinen. Zudem konnten KAPPE et al. (2010) Circovirusgenom nur in einer geringen Anzahl an BNP-Proben und in einer Kontrollprobe nachweisen.

2 Vergleich der peripheren Leukozytensubpopulationen von BNP-Kälbern und gesunden Kälbern

Ein typischer hämatologischer Befund ist neben der Thrombozytopenie die hochgradige Leukozytopenie bei allen BNP-Kälbern (FRIEDRICH et al., 2009; PARDON et al., 2010). Durch die Darstellung der Oberflächenantigene von Leukozyten mithilfe von fluorchromkonjugierten Antikörpern und deren Erfassung durch die Durchflusszytometrie können eine große Anzahl an Zellen der verschiedenen Subpopulationen voneinander differenziert werden. Deshalb wurden in dieser Arbeit Zellen aus Blutproben von BNP-Kälbern und von gesunden Kälbern analysiert und miteinander verglichen. Eine statistische Auswertung war aufgrund der geringen Anzahl der untersuchten Blutproben der für diese Arbeit zugänglichen BNP-Kälber (n= 9) nicht möglich.

Den ersten Hinweis auf die Leukozytopenie der an BNP erkrankten Kälber lieferten die um ein fünffaches höheren Blutvolumina, die den BNP-Kälbern (mind. 50 ml) im Vergleich zu den gesunden Kälbern (10 ml) entnommen werden mussten, um eine ausreichende Menge an Zellen für die Durchflusszytometrie gewinnen zu können. Nach der Erythrozytenlyse und dem ersten Zentrifugationsschritt war bei allen untersuchten Proben von BNP-Kälbern das Zellpellet nur hauchdünn mit dem Auge erkennbar. Im Gegensatz dazu war das Pellet bei den Proben der gesunden Kälber, trotz der geringeren Blutmenge, deutlich zu erkennen.

Bei der Beurteilung der Leukozytensubpopulationen muss beachtet werden, dass die Blutentnahme und die anschließende Evaluation der Anteile der verschiedenen Subpopulationen immer nur eine Momentaufnahme darstellt.

Neutrophile Granulozyten haben beispielsweise eine Zirkulationszeit (definiert als die Zeitspanne, die ein neutrophiler Granulozyt im Blut verbringt, bevor er ins Gewebe migriert) von sechs bis zehn Stunden. Das bedeutet, dass die Population der neutrophilen Granulozyten im Blut zwei- bis dreimal pro Tag erneuert wird (THRALL et al., 2004). Monozyten haben beim Rind eine Zirkulationshalbwertszeit von 20-23 Stunden bevor sie ins Gewebe migrieren und zu Makrophagen reifen (WEISS & SOUZA, 2010). Unreife T-Zellen wandern aus dem Knochenmark in den Thymus. Ausgereifte T-Zellen verlassen den Thymus und zirkulieren über das Lymphsystem und das Blut in den Körpergeweben und Organen. Bei diesen Zellen ist eine ständige Zirkulation wichtig, da es die Chance der T-Zellen erhöht, mit ihrem spezifischen Antigen in Kontakt zu treten (DAY, 2010).

Um also eine Aussage über die Entwicklung der verschiedenen Leukozytensubpopulationen im Verlauf der Krankheit machen zu können, wäre es nötig gewesen, den Kälbern in regelmäßigen Zeitabständen Blut zu entnehmen und zu analysieren. Da die hier untersuchten Kälber aber zumeist schon im moribunden Zustand in die Klinik eingeliefert wurden, konnte nur einmalig Blut entnommen werden, bevor die Tiere aufgrund ihres schlechten Zustandes euthanasiert werden mussten oder von selbst verstarben.

Zusammenfassend lässt sich aus diesen Versuchen schließen, dass alle getesteten Blutproben von BNP-Kälbern eine deutlich niedrigere Zahl an Leukozyten im Vergleich zu den Proben von gesunden Kälbern enthielten. Dies wurde zuvor bereits von anderen Arbeitsgruppen beschrieben (FRIEDRICH et al., 2009; PARDON et al., 2010).

Bei manchen Blutproben der BNP-Kälber schienen eher die Granulozyten in stark reduzierter Zahl vorhanden zu sein, bei anderen die Lymphozyten. Jeweils die andere Leukozytensubpopulation erschien dann in größerer Zahl als bei den gesunden Kontrollkälbern, weil durch das Fehlen einer Population einfach mehr Zellen der anderen Population erfasst wurden. Bei der zytologischen Untersuchung peripherer Blutproben von BNP-Kälbern beschreiben auch PARDON et al. (2010) in den meisten Fällen eine Granulozytopenie. BELL et al. (2010) beschreiben sowohl eine Neutro- als auch eine Lymphopenie bei betroffenen Kälbern.

3 Identifikation von kolostralen Immunglobulinen und Proteinen

Kolostrale Immunglobuline

Den Ergebnissen aus dem ELISA nach zu folgen, findet sich IgM nach der Proteinseparation von Kolostralserum vor allem in der Peakfraktion 1. Unter nicht reduzierenden Bedingungen befand sich die Hauptbande von Peakfraktion 1 noch ganz am Anfang des zur Auftrennung verwendeten Polyacrylamidgels, was sich durch die Größe von IgM (ca. 960 kDa) erklären lassen würde. Unter reduzierenden Bedingungen wurden die Disulfidbrücken hingegen gespalten und IgM ist zum Teil in seine Untereinheiten zerfallen (Banden bei 75 kDa= schwere+ leichte Kette; Banden bei circa. 50 kDa= schwere Kette; Banden bei 25 kDa= leichte Kette).

IgG (ca. 180 kDa) ist den ELISA-Ergebnissen zufolge vor allem in Peakfraktion 2 zu finden. Das stimmt auch mit den Ergebnissen aus der Proteinauftrennung (SDS-PAGE) überein. Unter nicht reduzierenden Bedingungen war in den getesteten Proben die stärkste Bande in der Peakfraktion 2 bei einem Molekulargewicht im Bereich von 130-180 kDa zu finden, was mit der Tatsache

übereinstimmt, dass IgG₁ den größten Anteil der Proteine im Kolostrum ausmacht (KORHONEN et al., 2000). Unter reduzierenden Bedingungen wiederum findet man Banden im zu erwartenden Bereich der Molekulargewichte der schweren und leichten Ketten. Da anscheinend nicht alle Disulfidbrücken der Immunglobuline gespalten wurden, war auch hier noch eine, im Vergleich deutlich schmalere, Bande im Bereich von ca. 150 kDa zu finden.

Dass IgA als Monomer (ca. 180 kDa) und Dimer (ca. 360 kDa) vorliegt, erklärt, warum es nach der Proteinseparation durch die Gelchromatographie im anti-IgA ELISA sowohl in Peakfraktion 1 (sekretorisches, dimeres IgA, 360 kDa), als auch in Peakfraktion 2 (monomeres IgA, 180 kDa) zu finden war. Um IgA besser separieren zu können, wären weitere Reinigungsschritte nötig.

Im ELISA waren in den Peakfraktionen 3, 4 und 5 nur Spuren von Immunglobulinen nachweisbar. Die Daten aus der Proteinauftrennung zeigen aber, dass in den Peakfraktionen 3 und 4 andere Proteine nachweisbar sind. Nur in Peakfraktion 5 findet sich keine Bande und somit keine erkennbaren Proteine. Was letztendlich die Absorption des Lichts in dieser Fraktion in der Gelchromatographie verursacht, bleibt in dieser Arbeit ungeklärt.

Die Proteinauftrennung mittels SDS-PAGE macht außerdem deutlich, dass die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht durch die Gelchromatographie gut funktioniert hat. Selbst mit nur einem Reinigungsschritt erhält man für die meisten Proteinfaktionen relativ saubere Auftrennungen.

Nachweis von Antikörpern gegen das bovine Virusdiarrhövirus in Peakfraktion 2

Trotz der Tatsache, dass die Kontrollmütter derzeit nicht gegen BVDV geimpft werden, konnten in allen getesteten Kolostralerumproben, sowie in über der Hälfte der getesteten Peakfraktion 2-Proben, Antikörper gegen BVD nachgewiesen werden. Das kann zum Einen daran liegen, dass Tiere aus Impfbetrieben zugekauft wurden, die schon einen Antikörpertiter hatten. Zum Anderen werden bei Rindern auch nach überstandener Infektion mit BVDV noch über einen langen Zeitraum Antikörper gebildet und die BVDV-Antikörper-Seroprävalenz bei Rindern in Deutschland liegt bei 60 bis 80 % (BRENDDEL, 2005). Zu erwarten war hingegen, dass alle Peakfraktion 2-Proben von

BNP-Müttern Antikörper gegen BVDV enthalten würden, da diese Tiere mindestens einmal geimpft wurden. Die Impfung der BNP-Mütter erfolgte in allen Fällen höchst wahrscheinlich mit der Vakzine PregSure-BVD® (Pfizer), die als besonders effektiv in der BVDV-Antikörperinduktion beschrieben wird (HARMEYER et al., 2004).

4 Reaktivität von IgG aus BNP-Kolostrum mit bovinen Zellen

In diesen Untersuchungen wurde der Nachweis erbracht, dass aus dem Kolostrum von BNP-Müttern isolierte IgG-Antikörper an die Leukozyten von gesunden, neugeborenen und nicht genetisch verwandten Kälbern, sowie an Zellen der bovinen Zelllinien BK-KL3A und MDBK binden. IgG aus dem Kolostrum von Kontrollmüttern bindet hingegen nicht an diese Zellen. Eine unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers konnte durch Inkubation nur dieses Antikörpers mit den jeweiligen Zellen ausgeschlossen werden. Bindungen, die dabei an die Zellen festgestellt wurden, wurden als Hintergrundreaktionen gewertet.

Es war auffällig, dass oftmals IgG aus derselben BNP-Probe in unterschiedlich starkem Ausmaß an die Leukozyten von verschiedenen Spenderkälbern gebunden hat, obwohl die IgG-Konzentration nicht verändert wurde. Auch in einem von BRIDGER et al. (2010) beschriebenen Versuch wurde festgestellt, dass IgG aus Serum von BNP-Müttern in unterschiedlich starkem Ausmaß an bovine Leukozyten der dort verwendeten, nicht genetisch verwandten Spenderkälber, bindet.

BRIDGER et al. (2010) führten noch ein weiteres Experiment durch. Dabei wurde vier Kälbern das Kolostrum ihrer leiblichen BNP-Mütter gefüttert und in den Blutproben der Anteil der IgG+ Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Der prozentuale Anteil der IgG+ Zellen stieg nach der Kolostrumaufnahme markant an und korrespondierte proportional mit der Schwere der BNP-Erkrankung der Kälber.

Betrachtet man diese Tatsache in Verbindung mit den Ergebnissen aus dieser Arbeit, wäre die Schlussfolgerung zu ziehen, dass die Menge des mit dem Kolostrum aufgenommenen IgG nicht der einzige ausschlaggebende Faktor für die Entwicklung von BNP sein kann. Wäre das der Fall, sollte bei derselben Menge an

IgG aus derselben BNP-Kolostrumprobe eine vergleichbare Bindung an die Leukozyten unterschiedlicher Kälber zu beobachten sein.

Auch FRIEDRICH et al. (2011) beobachteten in ihrem Kolostrumfütterungsversuch, dass nur eines von zwei genetisch nicht verwandten Kälbern, die dieselbe Mischung aus BNP-Kolostrum erhalten hatten, tatsächlich BNP-Symptome entwickelte. Die im Serum gemessene Immunglobulinkonzentration war nach der Kolostrumaufnahme jedoch bei beiden Kälbern gleich.

Diese Ergebnisse könnten zum einen durch eine unterschiedlichen Epitopstruktur der individuellen Leukozytenoberflächenliganden, zum anderen aber auch durch die Expression des IgG-bindenden Antigens auf der Zelloberfläche in verschieden starkem Ausmaß zu erklären sein (BRIDGER et al., 2010). Es ist bekannt, dass Blutzellen in ihren diversen Entwicklungs- oder Aktivierungsstadien verschiedene Oberflächenantigene exprimieren und die Antigendichte variieren kann. Diese Tatsache wird beispielsweise für die Evaluierung des Immunstatus von HIV-Patienten genutzt (CHATTOPADHYAY & ROEDERER, 2010) und könnte auch hier eine Möglichkeit darstellen, warum die Bindung der IgG_{BNP}-Proben so unterschiedlich ausfiel.

Bei den Bindungstests, in denen anstatt der bovinen Leukozyten die Zelllinien BK-KL3A oder MDBK verwendet wurden, sollten individuelle Faktoren irrelevant sein. Es wurden aber ebenfalls variierende Anteile an IgG⁺ Zellen festgestellt. Wenn man jedoch den Anteil der IgG⁺ Zellen von Zellen, die am selben Tag mit derselben Probe inkubiert wurden, betrachtet, findet man, im Gegensatz zu den am selben Tag mit IgG inkubierten Leukozyten verschiedener Spenderkälber, ähnliche Werte. Es wäre also möglich, dass hier die Varianz auf andere Einflüsse, wie beispielsweise eine veränderte, lagerungsbedingte IgG-Konzentration in den verwendeten Probenverdünnungen, zurückzuführen ist. BARNETT et al. (1998) beschreiben unter anderem den Einfluss des pH-Wertes des zur Erythrozytenlyse verwendeten Puffers, der Inkubationstemperatur oder der gewählten Antikörperkonzentration auf die Antikörperbindungskapazität von Zellen. Diese Vermutung müsste in weiteren Wiederholungsversuchen überprüft werden.

Die Tatsache, dass IgG aus BNP-Kolostrum sowohl an Leukozyten, als auch an die beiden bovinen Zelllinien bindet, kann als Anhaltspunkt für die weitere Suche nach dem Liganden genutzt werden. Auch die signifikant erhöhte Bindung von IgG_{BNP} an die PBMC-Zellpopulation im Vergleich zu den Granulozyten könnte einen Hinweis geben.

5 Zellzerstörende Wirkung von Immunglobulin aus BNP-Proben

Die fetale oder neonatale alloimmune Thrombozytopenie (FNAIT) tritt beim menschlichen Fötus bzw. Neugeborenen mit einer Häufigkeit von 1:5000 auf. Die Mutter bildet Antikörper gegen ein Thrombozyten-spezifisches Antigen, das aufgrund einer Inkompatibilität zwischen den Thrombozytenantigenen (human platelet antigens) der Eltern nur auf den fetalen, nicht aber auf den maternalen Thrombozyten exprimiert wird. Diese spezifischen IgG-Antikörper passieren die Plazenta und gelangen so in den Fötus, wo sie die Zerstörung der Thrombozyten verursachen (PORCELIJN et al., 2008). Die transplazentare Passage von Immunglobulinen ist durch die Plazenta epitheliochorialis des Rindes nicht möglich, weswegen die Kälber die maternalen Antikörper über das Kolostrum aufnehmen müssen (SCHNORR & KRESSIN, 2006). Bei neugeborenen Kälbern und Fohlen können über das Kolostrum aufgenommene, maternale Antikörper zu einer Isoerythrolyse oder auch isohämolytische Anämie genannten Erkrankung führen (STORMONT, 1975; SEINO, 2010). Ein derartiger Mechanismus wäre auch für BNP denkbar, da der Zeitraum zwischen der Kolostrumaufnahme und den ersten Veränderungen der Blutwerte bei BNP mit drei bis sechs Stunden sehr kurz ist (BRIDGER et al., 2010; FRIEDRICH et al., 2011)

In den Bindungstests wurde jedoch bisher kein zellzerstörender Effekt des kolostralen IgG_{BNP} auf die peripheren Leukozyten von jungen Spenderkälbern oder die Zellen der bovinen Zelllinien festgestellt, die die drastische Thrombozyto- und Leukopenie der BNP-Kälber erklären könnte.

Die Zellen in den Toxizitätstests wurden mit den verschiedenen BNP-Proben über einen Zeitraum von 30 min (kolostrales IgG mit Komplementzusatz), 24 Stunden (kolostrale Peakfraktionen 1- 5) oder 24 und 48 Stunden (Serum von BNP-Kälbern und -Müttern) inkubiert. Anzumerken ist hierzu aber, dass die Pathogenese von

BNP offensichtlich im Knochenmark abläuft und Knochenmarkzellen in dieser Arbeit nicht zur Verfügung standen. Beim Menschen ist bekannt, dass sich beispielsweise Stamm- und Vorläuferzellen aus der Nabelschnur biologisch von denen im adulten Knochenmark oder peripherem Blut unterscheiden (MAYANI, 2010). Beim Rind wurden Unterschiede zwischen dem hämatopoetischen System von Embryonen und erwachsenen Rindern festgestellt (KRITZENBERGER & WROBEL, 2004). Derartige Unterschiede könnten eine Erklärung dafür darstellen, dass nur die Kälber und nicht die Mutterkühe von BNP betroffen sind.

Möglichkeit einer Komplement-vermittelten Zellzerstörung

Die Aktivität von Komplementfaktoren wurde sowohl im Serum von Kälberföten (TRIGLIA & LINSKOTT, 1980), als auch direkt im Kolostrum nachgewiesen. In Verbindung mit den aus dem Kolostrum absorbierten Antikörpern spielt das Komplementsystem eine wichtige Rolle in der Entwicklung der passiven Immunität neugeborener Kälber (KORHONEN et al., 2000).

Das C3b/C4b bindende regulatorische Membrankofaktorprotein/CD46 (MCP/CD46_{bov}) findet sich auf allen bovinen Blutzellen, inklusive der Erythrozyten, wieder und ist auch in vielen Geweben nachweisbar (ANTALIKOVA et al., 2007). Beim Menschen (MCP/CD46_{hum}) sind vier Isoformen, die durch alternatives Splicing eines 46 kb Gens entstehen, bekannt. (RILEY-VARGAS et al., 2004). MCP/CD46_{hum} dient als Kofaktor für Plasmaserinprotease-Faktor I zur Spaltung der Komplementfaktoren C3b und C4b. Die eigenen Zellen werden so von der Komplement-vermittelten Zerstörung geschützt (MAURER et al., 2004). MCP/CD46_{bov} wurde außerdem als zellulärer Rezeptor für BVDV identifiziert (MAURER et al., 2004) und wäre durch die eventuelle Verbindung von BNP mit einer Impfung gegen BVDV (FRIEDRICH et al., 2009; BRIDGER et al., 2010) von Interesse. Würde beispielsweise der MCP/CD46_{bov} vermittelte Schutz vor Komplement-vermittelter Zerstörung der Kälberzellen durch die Bindung von IgG_{BNP} beeinflusst werden, wäre dies ein wichtiger Hinweis auf den bisher ungeklärten Mechanismus der Zellzerstörung.

Da kolostrales IgG_{BNP} allein auf bovine Zellen keinen Einfluss hatte, wurde eine komplementvermittelte Zytotoxizität in Betracht gezogen. Es gelang jedoch in keinem der in dieser Arbeit durchgeführten Toxizitätstests, eine Reduktion der Zellvitalität der peripheren Leukozyten, ob mit oder ohne Komplementzusatz, nachzuweisen.

Die Inkubationszeit des kolostralen IgG mit Meerschweinchenkomplement-Zusatz auf bovinen Leukozyten war mit 30 min die kürzeste. Eine Bindung von kolostralem IgG_{BNP} an Leukozyten oder Zellen der Zelllinien wurde bereits nach 10 min nachgewiesen. Andere Autoren beschreiben eine Inkubationszeit für Meerschweinchenkomplement bei unterschiedlichen, nicht bovinen Zellen von 20 min (MCKINNON et al., 1981), 45 min (KORBELIK & DOUGHERTY, 1999) oder 60 min (D'COSTA & HURWITZ, 2002) bei 37 °C. Da dieser Versuch als Pilotversuch nur zweimal durchgeführt wurde, schien eine Inkubationszeit von 30 min angemessen.

Aber auch im Serum von erwachsenen Rindern und Kälbern ist Komplement vorhanden (TRIGLIA & LINSKOTT, 1980) und somit aller Wahrscheinlichkeit nach auch in den getesteten Seren von BNP-Kälbern und BNP-Müttern. Der Nachweis, dass IgG aus dem Serum von BNP-Müttern an Leukozyten gesunder Kälber bindet, gelang erst kürzlich. BRIDGER et al. (2010) zeigten, dass der Anteil der Leukozyten im Blut von an BNP erkrankten Kälbern, die den IgG-Alloantikörper (IgG+ Zellen) gebunden hatte, im Lauf der Erkrankung abnimmt. Im Serum werden die zellulären Bestandteile (und somit die IgG+ Zellen) des Blutes durch Zentrifugation entfernt und es ist zu bezweifeln, ob zum Zeitpunkt der Blutentnahme bei den in dieser Arbeit zur Serumgewinnung geprobten BNP-Kälbern überhaupt noch ungebundene Alloantikörper im Blut zu finden waren.

Es wäre jedoch möglich, dass zumindest im getesteten Serum von BNP-Müttern sowohl Komplementfaktoren als auch die IgG-Alloantikörper vorhanden gewesen sind. Die Schlussfolgerung wäre, dass die Alloantikörper bei diesen Versuchen in Verbindung mit Komplement für einen wesentlich längeren Zeitraum (bis zu 48 Stunden) mit den Leukozyten in Kontakt waren. Trotzdem konnte in dem Ansatz mit peripheren Leukozyten kein toxischer Effekt auf die Zellen im Vergleich zu den Kontrollen (IgG_{Kontr} und FBS) festgestellt werden.

In FBS sind verschiedene Komplementkomponenten zu finden (TRIGLIA & LINSOTT, 1980), wobei zu beachten ist, dass auch kommerziell erhältliches Tierserum „ein Supplement mit undefinierten und variablen Komponenten“ ist (VAN DER VALK et al., 2010). Deswegen gestaltet es sich schwierig, eine Erklärung dafür zu finden, dass zum Teil die mit FBS inkubierten Zellen eine etwas geringere Überlebensrate hatten als solche Zellen, die mit Serum von BNP- oder Kontrolltieren inkubiert wurden.

Einfluss von anderen kolostralen Proteinen auf bovine Leukozyten

Neben IgG wurde auch versucht, den Einfluss anderer gereinigter, kolostraler Proteine (Peakfraktionen 1 bis 5) auf die Leukozyten gesunder Kälber zu testen. Es stellte sich aber heraus, dass anscheinend alleine der Laufpuffer aus der Gelchromatographie schon eine zellzerstörende Wirkung hat und diese nur bei einem Anteil der jeweiligen Peakfraktion von fünf bis zehn Prozent an der Gesamtzellsuspension vernachlässigbar scheint. Ab einem Laufpufferanteil von 15 bis 20 % überlebte nicht einmal mehr die Hälfte der Zellen für 24 Stunden. Bei einem Zusatz von 5 bis 10 % der Peakfraktionen konnte kein Effekt auf die Zellvitalität festgestellt werden.

6 IgG-Bindungsreduktion

Aus BNP-Kolostrum separiertes IgG bindet sowohl an Leukozyten gesunder Kälber als auch an die bovinen Zelllinien BK-KL3A und MDBK. Die Frage nach dem Liganden auf den Zellen ist derzeit noch nicht geklärt. In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Tests durchgeführt, um Hinweise auf mögliche Liganden auf den Zellen zu erhalten.

Zum einen wurden MDBK-Zellen vor der Inkubation mit IgG_{BNP} mit MHC-Klasse I-reaktiven Antikörpern behandelt, um eventuell die Bindungsstellen auf den Zellen zu blockieren. Zum anderen wurde IgG_{BNP} vor der Behandlung der Leukozyten gesunder Kälber mit der Viruszellkulturernste verschiedener Pestiviren inkubiert, um zu eruieren, ob die Antikörper an die Viruspartikel binden.

Somit wäre eventuell die Bindungsstelle des Antikörpers für die Zelle blockiert und dadurch könnte eine geringere Bindung an die Zellen festgestellt werden.

6.1 MHC-Klasse I als möglicher zellulärer Ligand für IgG_{BNP}

Ein erster Ansatz war, dass ein zelluläres Antigen mit einem genetisch bedingten Unterschied eine Möglichkeit für einen zellulären Liganden für IgG_{BNP} darstellen könnte. Der Gedanke entstand aus der Tatsache heraus, dass die Bindungstests mit IgG_{BNP} oftmals verschiedene Anteile an IgG⁺ Zellen bei Leukozyten verschiedener Spenderkälber ergaben, obwohl dieselbe IgG_{BNP}-Probe verwendet wurde.

Moleküle des MHC-Komplexes haben einen hohen genetischen Polymorphismus bei verschiedenen Arten. Das ist zum Beispiel der Grund dafür, warum transplantiertes Gewebe eines Organismus in einem anderen Organismus eine starke Immunantwort hervorruft. Mit größter Wahrscheinlichkeit wird das transplantierte Gewebe MHC-Moleküle tragen, denen der Empfänger zuvor nie ausgesetzt war. MHC-Klasse I-Moleküle werden auf nahezu allen Zellen des Körpers exprimiert. In der Trächtigkeit werden die MHC-Klasse I-Moleküle auf den Trophoblasten vieler Spezies runter reguliert. Diese Tatsache wird als wichtiger Punkt in der Überlebensstrategie des Fötus im Mutterleib bei vielen Säugetierarten angesehen (BAINBRIDGE et al., 2001).

Bei MHC-Klasse I-Molekülen ist die Generation und Erhaltung der Diversität in den Genen eine wichtige evolutionäre Strategie. Beim Menschen werden drei hochgradig polymorphe klassische MHC-Klasse I Gene exprimiert (Human leukocyte Antigen; HLA). Andere Spezies erhalten die Diversität durch die Generation von Haplotypen, die ausgesprochen variabel bezüglich der Anzahl und der Kombination der transkribierten Gene sind. Beim Rind scheinen beide Strategien eine Rolle zu spielen. Es wurde beschrieben, dass Rinder multiple (sechs oder mehr) klassische MHC-Klasse I Gene haben und dass davon für gewöhnlich zwischen einem und drei der Genabschnitte transkribiert werden. Manche dieser Kombinationen treten häufiger auf, andere seltener (BIRCH et al., 2006).

Die hier verwendeten MHC-Klasse I-reaktiven Antikörper (IL-A88) reagieren mit einer monomorphen Determinante auf bovinen MHC-Klasse I-Molekülen und sollten sich deshalb gut eignen, Moleküle der verschiedenen Typen auf der Zelloberfläche zu detektieren. Die Ergebnisse aus diesem Versuch waren jedoch variabel. Zum Teil konnte eine Reduktion der IgG_{BNP}-Bindung nach

Vorbehandlung mit MHC-Klasse I-reaktiven Antikörpern an die MDBK-Zelloberfläche detektiert werden, zum Teil aber auch eine Steigerung. Eine Blockierung der Bindungsstelle mit diesem speziellen Antikörper erschien eher unwahrscheinlich. Da keine weiteren Antikörper gegen bovine MHC-Klasse I-Moleküle zur Verfügung standen und andere Versuche vielversprechendere Hinweise lieferten, wurden diese Versuche nicht mehr weiter verfolgt.

BALLINGAL et al. (2011) typisierten den polymorphen MHC-Klasse II-Genort *DRB3* von 48 BNP- und 68 Kontrollkälbern von Holsteinrindern, der häufig mit variierenden Immunantworten und Antikörper-vermittelten Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht wird. Der Vergleich der Allelhäufigkeiten zwischen erkrankten und gesunden Tieren zeigte jedoch keine signifikanten Unterschiede. Somit ist es unwahrscheinlich, dass eine Prädisposition für BNP beim Holsteinrind mit MHC-Klasse II-Molekülen in Verbindung steht.

6.2 Bindungsreduktion durch Vorinkubation von IgG_{BNP} mit Pestivirus Zellkulturextrakt

Da bisher die einzige epidemiologische Gemeinsamkeit der BNP-Mütter die Impfung mit einem im Jahr 2004 auf den Markt gekommenen Impfstoff gegen BVDV ist (FRIEDRICH et al., 2009; FRIEDRICH et al., 2011), war es naheliegend, mit diesem Virus und zwei weiteren verwandten Pestiviren, dem BDV und dem ESPV, Experimente durchzuführen. Tatsächlich konnte eine Reduktion der Bindung von IgG_{BNP} nach dessen Vorinkubation mit Viruszellkulturextrakt von BVDV und, in einem geringeren Ausmaß, auch mit BDV nachgewiesen werden. Eine Bindungsreduktion nach Vorinkubation mit Viruszellkulturextrakt von BDV wurde in etwas weniger Experimenten nachgewiesen, als nach Vorinkubation mit BVDV. Die Vorinkubation mit Viruszellkulturextrakt von ESPV hingegen verursachte keine Bindungsreduktion.

Interessanterweise ist BVDV-Typ 1 genetisch näher mit ESPV als mit BDV verwandt (BECHER et al., 2003). Allerdings sind die einzigen natürlichen Wirte für ESPV Wild- und Hausschweine, während sowohl für BVDV als auch für BDV eine artenübergreifende Übertragung in der Ordnung der Paarhufer (*Artiodactyla*) beschrieben wird. Schweine sind beispielsweise für Infektionen mit BVDV und BDV genauso empfänglich wie Wiederkäuer (LE PORTIER et al., 2006). Für einen

spezifischen, IgG_{BNP}-reaktiven Liganden auf der Oberfläche von Wiederkäuerzellen (Leukozyten, Zelllinien) spricht der exklusive Bezug zu den mit Zellkulturernte der Pestiviren BVDV und BDV vorinkubierten IgG_{BNP}-Proben unter Ausschluss von ESPV. Letzteres könnte durch den Einsatz einer größeren Zahl verschiedener Stämme der drei Pestiviren, unter Einbeziehung des im Impfstoff verwendeten, cytopathogenen BVDV Stammes, der hier nicht zur Verfügung stand, bestätigt werden.

VAN RIJN (2007) beschreibt den Unterschied zwischen ESPV und anderen Pestiviren, wie BVDV Typ I, BVDV Typ II und BDV (hier definiert als Nicht-ESPV). Neben der bereits erwähnten Speziespezifität wird die kreuzneutralisierende Fähigkeit von E2-Antikörpern gegen Nicht-ESPV-Stämme zu anderen Nicht-ESPV-Stämmen beschrieben. ESPV-Stämme werden hingegen nicht neutralisiert. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass eine Variabilität in einer oder mehr Aminosäuren die Affinität/Avidität beeinflussen und in Unterschieden in der Kreuzneutralisation resultieren. Diese Tatsache würde mit den in dieser Arbeit präsentierten Ergebnissen übereinstimmen, in denen eine Bindungsreduktion von IgG_{BNP} nach Vorinkubation mit Viruszellkulturernte von BVDV und BDV, aber nicht mit ESPV nachgewiesen wurde.

Außerdem wurden die hier verwendeten Pestiviren BVDV und BDV im Gegensatz zu ESPV in der bovinen Zelllinie MDBK vermehrt. Da die Virussuspension nach der Ernte nicht weiter gereinigt wurde, könnte die Bindungsreduktion auch auf die Präsenz von Zelldebris oder Virus-assoziiertem Zellmaterial zurückzuführen sein. Die entsprechenden zur Kontrolle mitgeführten Zellkulturüberstände von nicht infizierten MDBK-Zellen wurden allerdings zentrifugiert, so dass dies eine Erklärung dafür sein könnte, warum hier keine Bindungsreduktion nachweisbar war. Weitere Versuche in diese Richtung zur Absicherung und besseren Erklärung dieser Ergebnisse sind deshalb nötig.

Interessanterweise korreliert die Bindungsreduktion von IgG_{BNP} nach Vorinkubation mit Viruszellkulturernte von BVDV aber nicht mit den BVDV-Titern in den einzelnen IgG_{BNP}-Proben. Dies kann als Hinweis auf eine durch die Bindung von in den Viruszellkulturernten enthaltenen MDBK-Zellfragmenten ausgelöste Reduktion gewertet werden. Es würde ferner die Bindung der IgG_{BNP}-Proben an die bovinen Nierenzelllinien erklären.

7 Bildung autoreaktiver IgG-Antikörper

7.1 Zelluläre Liganden für IgG_{BNP}

In dieser Arbeit wurden, außer den beschriebenen Experimenten, keine weiteren Untersuchungen, weder zur Entstehung der IgG_{BNP}-Antikörper, noch zu einem möglichen zellulären Liganden durchgeführt. Die hier beschriebenen Theorien verbleiben deshalb auf einer rein spekulativen Ebene.

CD34

CD34 ist ein Transmembran-Glykoprotein, das auf hämatopoetischen Vorläuferzellen und Endothelzellen exprimiert wird (KATZ et al., 1985; FINA et al., 1990; BROWN et al., 1991). Beim Rind wurden zwei alternative Spleißvarianten der CD34 mRNA beschrieben. Es wird von Endothelzellen und hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimiert (NIKU et al., 2007). Auf normalen hämatopoetischen Knochenmarkszellen des Menschen wird CD34 nicht mehr exprimiert. Die Zellen reifen heran und werden in die Peripherie entlassen (FACKLER et al., 1995).

Eine Reaktivität von IgG_{BNP} mit CD34-Molekülen auf hämatopoetischen Vorläuferzellen des Knochenmarks würde eventuell die Pathogenese im Knochenmark erklären. Allerdings haben diese Arbeit und andere Untersuchungen (BRIDGER et al., 2010) bisher nur gezeigt, dass die IgG-Alloantikörper an periphere Blutleukozyten binden. Eine Expression von CD34 auf peripheren Blutleukozyten ist beim Rind bisher nicht beschrieben. Daher müsste ein zweiter Ligand für IgG_{BNP} auf den Blutzellen in Betracht gezogen werden.

Die Bindung, sowie eine eventuell zellschädigende Wirkung von IgG_{BNP} auf Vorläuferzellen aus dem Knochenmark neugeborener Kälber bleiben noch zu untersuchen.

Membran-Kofaktorprotein/CD46

Ein weiteres, denkbares Beispiel für einen Liganden wäre das bovine Membran-Kofaktorprotein/CD46 (MCP/CD46_{bov}), welches wie bereits erwähnt, als zellulärer Rezeptor für BVDV identifiziert wurde (MAURER et al., 2004).

Beim Menschen interagiert CD46/MCP mit mindestens sieben Pathogenen, spielt eine Rolle in der Reproduktion (RILEY-VARGAS et al., 2004) und stimuliert die Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen zu T-regulatorischen Zellen vom Phänotypen 1 (Tr1-Zellen) durch Quervernetzung mit CD3. Tr1-Zellen stellen einen wichtigen Faktor zur Kontrolle von autoreaktiven Zellen dar (KEMPER et al., 2003) und es wurde spekuliert, ob Defekte der Tr1-Zellen in der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen des Menschen eine grundlegende Rolle spielen könnten. Ein Zusammenhang mit Multipler Sklerose wurde bereits nachgewiesen (ASTIER et al., 2006).

Die viralen Glykoproteine E2 und E^{rns} sind die viralen Liganden, die für die Adsorption der Pestiviren an die Zelle verantwortlich sind (ROMAN SOSA, 2009). Das E2 Glykoprotein konnte als MCP/CD46_{bov}-bindender Ligand des BVDV-Virusstammes NADL identifiziert werden, während weder E2 von ESPV noch E^{rns} von BVDV eine Bindung zeigten (HIMMELREICH, 2003). In einer aktuelleren Studie von Roman Sosa (2009) werden die für die Bindung von MCP/CD46_{bov} verantwortlichen Aminosäuresequenzbereiche identifiziert und unter verschiedenen BVDV- und ESPV-Stämmen verglichen. Dabei wurden vor allem Ladungsunterschiede als mögliche Ursache für das unterschiedliche Bindungsverhalten von BVDV und ESPV E2 Glykoprotein an MCP/CD46_{bov} angesehen. Auch beim Schwein wurde ein, zum humanen MCP/CD46 analoges, Molekül identifiziert (MCP/CD46_{porc}) (VAN DEN BERG et al., 1997) und eine Übereinstimmung von 50 % der kompletten Aminosäuresequenz von MCP/CD46_{porc} und MCP/CD46_{bov} nachgewiesen (MAURER et al., 2004).

Diese Unterschiede zwischen MCP/CD46_{porc} und MCP/CD46_{bov} wäre als theoretische Ursache für die nicht nachweisbare Reduktion der IgG⁺ Zellen nach Vorinkubation von IgG_{BNP} mit Viruszellkulturernete von ESPV denkbar.

KREY et al. (2006) zeigten in einem Experiment, dass die Infektion von MDBK-Zellen mit verschiedenen BVDV-Stämmen (unter anderem auch der in dieser Arbeit verwendete Stamm New York) durch Vorinkubation der Zellen mit MCP/CD46_{bov}-Antikörper deutlich reduziert werden kann, die Antikörper jedoch eine Infektion mit BDV und ESPV nicht inhibieren. Dabei wurden allerdings Unterschiede in der Stärke der Bindungsreduktion, abhängig vom zur Infektion verwendeten BVDV-Stamm und –Isolat, deutlich. Das ließ die Schlussfolgerung zu, dass nicht alle BVDV-Stämme nur MCP/CD46_{bov} zur Infektion der Zelle nutzen. Der in dieser Arbeit verwendete Stamm New York gehörte allerdings zu den Stämmen, bei denen eine Reduktion festgestellt wurde und somit eine Infektion über MCP/CD46_{bov} wahrscheinlich ist.

Die hier verwendeten Pestiviren BVDV und BDV wurden beide auf MDBK-Zellen vermehrt. Auch MDBK-Zellen exprimieren MCP/CD46_{bov} (MAURER et al., 2004), so dass auch im Falle einer Reduktion durch MDBK-Zelltrümmer dieses Oberflächenprotein als zellulärer Ligand für IgG_{BNP} in Frage kommen könnte.

In den hier durchgeführten Experimenten wurde eine unterschiedlich starke Bindungsreduktion nach Vorinkubation von IgG_{BNP} mit Viruszellkulturen von BVDV oder BDV bei Leukozyten von unterschiedlichen Spenderkälbern nachgewiesen. Der verwendete BVDV-Stamm (New York) war hierbei immer derselbe. Wie bereits oben erwähnt, wird eine Kreuzneutralisation von Antikörpern gegen BVDV und BDV gegen das jeweilige andere Virus beschrieben. Eine Kreuzneutralisation eines Antikörpers gegen BDV mit ESPV wurde nur bei einem ESPV-Stamm nachgewiesen. Sonst hatten Antikörper gegen die Nicht-ESPV-Stämme keine Wirkung auf ESPV (VAN RIJN, 2007).

Hinsichtlich der unterschiedlich starken Bindung von IgG_{BNP} an bovine Zellen und der unterschiedlich starken Bindungsreduktion nach Vorinkubation mit Viruszellkulturen von BVDV und BDV stellt sich die Frage, welche anderen Faktoren einen Einfluss auf die Bindung der Antikörper haben könnten.

7.2 Möglicher Einfluss einer genetischen Prädisposition

KRAPPMANN et al. (2010) weisen auf die Möglichkeit hin, dass eine individuelle und wahrscheinlich genetische Prädisposition in der Pathogenese von BNP eine Rolle spielen könnte, obwohl eine Mutation im Koagulationsfaktor XI nicht mit BNP assoziiert ist.

In den hier durchgeführten Reduktionsversuchen mit IgG_{BNP} gab es einige Proben, bei denen keine Bindung an die Leukozyten mancher Spenderkälber und folglich auch keine Reduktion nach Vorinkubation mit Viruszellkulturernste von BVDV nachzuweisen war. Zudem schwankte der Anteil IgG⁺ Zellen nach Inkubation mit derselben IgG_{BNP}-Probe bei der Bindung an verschiedene Spenderleukozyten bei allen IgG-Proben.

Es gebären bei weitem nicht alle Kühe, die mit dem besagten Impfstoff geimpft wurden, Kälber, die BNP-Symptome entwickeln. Selbst wenn man voraussetzt, dass nicht alle Kälber Symptome entwickeln und deswegen unentdeckt bleiben und viele Fälle von den Landwirten nicht gemeldet werden, ist die Inzidenz von BNP in der Praxis eher gering. Man kann also davon ausgehen, dass nur wenige Mutterkühe überhaupt diese Antikörper entwickeln und über das Kolostrum an die Kälber weitergeben (FRIEDRICH et al., 2011).

Ein möglicher Bezug zwischen dem Genotyp des Wirtes und dessen Empfindlichkeit für unerwünschte Vakzinwirkungen wird in der Literatur beschrieben und beruht wahrscheinlich neben dem MHC-Komplex auch auf anderen Genen. Genetische Charakteristiken können für eine geringe, für keine, oder sogar für eine gegenläufige Immunreaktion des Wirtes auf die Vakzine und ihre Komponenten verantwortlich sein, wie es bereits für Maul- und Klauenseuche beschrieben wurde (GLASS, 2004).

Während Impfstoffe aus vermehrungsfähigen, attenuierten Erregern (Lebendimpfstoffe) eine Vielfalt an Proteinen mit naiven Epitopstrukturen beinhalten, wird dem Wirt bei sogenannten Spaltvakzinen oftmals nur noch ein einziges Protein mit entsprechend weniger Epitopen präsentiert. Dies reduziert die Wahrscheinlichkeit, dass alle Tiere auf die Antigenstrukturen reagieren. Bei der Spaltvakzine TickGARD (Biotech Australia Pty. Ltd.) wurden beispielsweise Unterschiede in der Immunreaktion auf den Impfstoff von Tier zu Tier beobachtet. Dabei wurde die Deletion von nur einer Aminosäure in der Antigenbindungsstelle

des bovinen MHC-Klasse II *DRB3* als Ursache für eine bessere Erkennung des im Impfstoff enthaltenen Antigens von, für diese Deletion homozygoten, Tieren beschrieben (SITTE et al., 2002). BALLINGAL et al. (2011) konnten jedoch keinen Zusammenhang der Entwicklung von BNP mit dem MHC-Klasse II-Lokus *DRB3* bei Holsteinrindern nachweisen.

An der Entwicklung einer Spaltvakzine für BVDV, basierend auf dem E2-Glykoprotein, wird bereits gearbeitet. Trotzdem werden derzeit zur Impfung gegen BVDV attenuierte Lebendimpfstoffe, sowie Impfstoffe mit einem inaktivierten Virus verwendet (THOMAS et al., 2009). Lebendimpfstoffe gegen BVDV resultieren in einer stabilen Immunität, die der nach einer natürlichen Infektion entspricht (BAKER, 1987). Inaktivierte Impfstoffe müssen hingegen mehrmals appliziert werden, um eine belastbare Grundimmunität zu erreichen (RADOSTITIS et al., 2000).

7.3 Mögliche Rolle des Impfstoffes

Das Glykoprotein E2 von BVDV wird derzeit als das Virushüllprotein mit der höchsten Immunogenität angesehen. Es induziert die Bildung neutralisierender Antikörper und stellt wohl ein entscheidendes Antigen zur Evaluation der Potenz eines Vakzins dar (PECORA et al., 2009). Die protektive Potenz der Impfung allein mit dem E2 Glykoprotein, das durch ein rekombinantes Parapoxvirus exprimiert wird, wurde auch im Schwein gegen eine ESPV Belastungsinfektion nachgewiesen (VOIGT et al., 2007).

Die bei den BNP-Müttern hauptsächlich verwendete Vakzine PregSure-BVD® (Pfizer) enthält einen inaktivierten zytopathogenen BVDV Typ 1-Stamm mit einem E2-Antigenanteil von 5000 RE (relative Einheiten, gemessen mittels ELISA gemäß interner Prüfprozedur des Herstellers) (SALT et al., 2004). Ein Herstellungsprotokoll der Zellkulturernte des Impfvirus, insbesondere der Reinigungsschritte in der Produktion war nicht verfügbar.

PregSure-BVD® wurde Mitte des Jahres 2004 zugelassen und auf den Markt gebracht. Nach Herstellerangaben war der Impfstoff „zur aktiven Immunisierung weiblicher Rinder im zuchtreifen Alter (Kühe und Färsen)“ bestimmt. Zur Grundimmunisierung sollte der Impfstoff im Abstand von drei Wochen zweimal subkutan appliziert werden und die letzte Impfung sollte für einen fetalen Schutz gegen eine intrauterine BVDV Typ 1-Infektion mindestens 14 Tage vor der Belegung/ Besamung erfolgen. Eine Aufrechterhaltung des Impfschutzes sollte durch eine einmalige Injektion zwölf Monate später erfolgen (TEICH, 2006).

Adjuvantien werden zur Verbesserung der Immunantwort des Wirtes auf die im Impfstoff enthaltenen Antigene mit unterschiedlichen Zielen, wie zum Beispiel der Verbesserung der Immunogenität schwacher Antigene (Vakzine aus inaktivierten Erregern) oder der Verlängerung und Beschleunigung der Immunantwort, eingesetzt. Dabei sind die genauen Wirkmechanismen der Adjuvantien aufgrund der Komplexität der ausgelösten Kaskade der verschiedenen Reaktionen zumeist nicht erkennbar (SINGH & O'HAGAN, 2003). Der im besagten Impfstoff verwendete Adjuvans-Komplex QuilA/Cholesterin/Amphigen® wurde bei diesem Impfstoff erstmalig eingesetzt und kombiniert Nanotechnologie und Mikrofluidisationstechnik (HARMEYER et al., 2004). PIONTOWSKI (2010) beschreibt die Wirkungsweise des Adjuvantien-Komplexes des fraglichen Impfstoffes, der zu einer stark gesteigerten Immunogenität führt, unter Bezug auf das derzeit nicht mehr erhältliche technische Datenblatt des Impfstoffherstellers. QuilA verbindet sich mit Cholesterol zu Helix-ähnlichen Strukturen. Dieser Komplex wird unter Bildung eines Nanokomplexes an die BVD-Viruspartikel angekoppelt. Die Nanokomplexe gehen eine Bindung mit den Amphigen®-Mikrotröpfchen ein und verstärken dadurch nochmals die Immunogenität. Die gesamte Verbindung wird so durch die Antigen-präsentierenden Zellen im Zielorganismus aufgenommen.

Die Produktion von inaktivierten BVDV-Impfstoffen in großen Mengen bringt die Herausforderung mit sich, Proteinantigene aufzubereiten, für die der Wirt immunologisch hoch reaktiv ist (PECORA et al., 2009). Bei inaktivierten Impfstoffen gegen BVDV ist vor allem auch die Protektion des Fötus ein wichtiges Ziel. Neben dem jetzt vom Markt genommenen Impfstoff PregSure-BVD® (Pfizer) sind in der Bundesrepublik Deutschland nur zwei weitere inaktivierte Impfstoffe zum Schutz vor fetaler BVDV-Infektion zugelassen (MOßBRUGGER, 2005).

Der in einer Studie erhobene, mittlere neutralisierende Antikörpertiter nach zweimaliger Impfung zur Grundimmunisierung von Färsen mit dem Impfstoff nach Herstellerangaben lag bei 2436 mit einem Maximalwert von über 4069 (HARMEYER et al., 2004). Bei einem anderen, zur Fetoprotektion zugelassenen, inaktivierten Impfstoff lag der durchschnittliche Antikörpertiter nach drei Anwendungen bei 496 (PIONTKOWSKI, 2010).

Die Infektion von Mäusen mit *Leishmania major* scheint eine frühe Th₂-Antwort zu induzieren, die aber bei resistenten Mäusen frühzeitig durch IL12-abhängige Mechanismen in eine (für die Kontrolle der Infektion wichtige) Th₁-Antwort umgeleitet wird. Bei empfänglichen Mäusen, wie zum Beispiel BALB/c-Mäusen, wird die Th₂-Antwort beibehalten und dominiert das klinische Bild (SACKS & NOBEN-TRAUTH, 2002). Derzeit ist kein Impfstoff gegen Leishmaniose für den Menschen zugelassen. Zum Teil wird dafür das Fehlen des richtigen Adjuvans verantwortlich gemacht (BADIEE et al., 2007). Der Schutz durch Impfung ist abhängig von der Fähigkeit des Impfstoffes, die passende und selbst regulierende Immunantwort für ein bestimmtes Pathogen auszulösen. Als essentielle Rolle eines Adjuvans wird dabei die Beeinflussung der Entwicklung der CD4+ T-Zellen in Richtung Th₁ oder Th₂ angesehen (AFONSO et al., 1994). Eventuell liegt bei der Impfung mit PregSure-BVD® das Problem in der übermäßigen Antikörperproduktion und damit in einer einseitigen, deregulierten Beeinflussung der Immunantwort.

Denkbar wäre also, dass eine eventuelle Überstimulation des Immunsystems (TSUMIYAMA et al., 2009), beispielsweise durch die starke Adjuvanswirkung, ausgelöst wird, und damit zu einer Antikörperbildung, zum Beispiel gegen den zellulären Liganden des E2-Glykoproteins, geführt hat. Aber auch eine Antikörperbildung gegen eventuell noch im Impfstoff vorhandene Zellfragmente der Produzentenzelllinie des Impfvirus aufgrund der starken Adjuvanswirkung wäre vorstellbar.

7.4 Entstehung von Autoimmunität

In von TSUMIYAMA et al. (2009) durchgeführten Versuchen wurden für Autoimmunerkrankungen nicht anfällige Mäuse wiederholt mit Staphylococcus Enterotoxin B oder Ovalbumin immunisiert. Diese Überstimulation des Immunsystems kann die kritische Grenze der Selbstregulation brechen und führte in diesem experimentellen Ansatz zur Bildung von Autoantikörpern. Somit kann durch Überstimulation den Autoren nach aus jeder Immunantwort auf körperfremde Antigene jederzeit eine Autoreaktivität entstehen.

Der Zusammenhang zwischen der Entstehung verschiedener Autoimmunerkrankungen beim Menschen und Impfungen unterschiedlicher Art wird kontrovers diskutiert (RUBINSTEIN, 2004; TISHLER & SHOENFELD, 2004; SALEMI & D'AMELIO, 2010).

WAISBREN (2008) beschreibt für seine Hypothese zur Entstehung von Autoimmunität nach Vakzinierung folgende Voraussetzungen:

- Je ein virusähnliches Antigen des Wirtes (Empfänger der Vakzine) und eines aus dem Impfstoff, die sich chemisch ergänzen, formen ein Doppelantigen
- Eines dieser Antigene besitzt dabei immunologische Ähnlichkeiten mit einem im Wirt exprimierten Peptid (molekulare Mimikry) (SAINT-REMY, 2010). Dabei ähnelt das Wirtspeptid dem Antigen der Vakzine
- Ein immunologisch aktives Adjuvans ist vorhanden (z.B. in der Vakzine)
- Der Wirt hat eine bestimmte genetische Veranlagung (z.B. HLA- Muster)

BRENDEL beschreibt (2005), dass bei circa 60-80 % der Tiere in der Rinderpopulation Antikörper gegen BVDV im Serum nachweisbar sind. Obwohl die hier verwendeten Kontrollkolostren von Müttern stammen, die nicht gegen BVDV geimpft wurden, waren auch bei neun der in dieser Arbeit untersuchten IgG_{Kontr}-Proben BVDV-Antikörper nachweisbar, was auf eine natürliche Infektion der Tiere schließen lässt (FRIEDRICH et al., 2011).

Langlebige antigenspezifische Plasmazellen (MANZ & RADBRUCH, 2002) können über einen langen Zeitraum Antikörper auch in Abwesenheit des entsprechenden Antigens sezernieren. Diese Plasmazellen sind enorm resistent gegenüber immunsuppressiven Maßnahmen oder entzündungshemmenden Medikamenten (HOYER et al., 2008).

7.5 Problematik langlebiger Plasmazellen

HOYER et al. (2008) beschreiben derartige Plasmazellen auch in Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen. Langlebige Plasmazellen können im Knochenmark von Menschen wahrscheinlich über Jahre hinweg überleben (MOSER et al., 2006). Während der Erstkontakt mit einem Antigen zur Bildung von antikörpersezernierenden Plasmablasten mit einer Lebensspanne unter einer Woche führt, verlassen Plasmablasten, die während der zweiten Immunantwort auf ein Antigen generiert wurden, das sekundäre lymphoide Gewebe und migrieren beispielsweise in das Knochenmark oder in chronisch entzündete Gewebe, wo sie zu Plasmazellen reifen (ODENDAHL et al., 2005).

Solche Plasmazellen könnten ein Grund dafür sein, dass manche Mutterkühe auch noch Jahre nach der Impfung Alloantikörper im Kolostrum haben, die BNP bei ihren Kälbern verursachen können. Untersuchungen zur Existenz und Persistenz alloreaktiver Antikörper und möglicher pathophysiologischer Konsequenzen bei den Muttertieren (z. B. Einflüsse auf die Hämatopoese) sind für das Verständnis des Gesamtbildes der BNP unerlässlich.

VI. Zusammenfassung

Die bovine neonatale Panzytopenie (BNP) ist ein seit 2006 auftretendes Krankheitsbild mit hoher Mortalität, bei dem neugeborene Kälber an einer hämorrhagischen Diathese aufgrund einer Panmyelophthise erkranken.

Vielfältige mikrobiologisch-diagnostische Untersuchungen ergaben, wie bei anderen Arbeitsgruppen auch, keinen Hinweis auf ein infektiöses Geschehen in Zusammenhang mit BNP.

IgG wurde, neben anderen Proteinen, aus Kolostrumproben von BNP- und Kontrollmüttern gereinigt, identifiziert und quantifiziert. In anschließenden Versuchen konnte eine signifikant höhere Bindung von IgG aus BNP-Kolostrum (IgG_{BNP}) im Vergleich zu IgG aus Kontrollkolostrum ($\text{IgG}_{\text{Kontr}}$) an die peripheren Leukozyten genetisch nicht verwandter, junger Kälber nachgewiesen werden. Dabei war eine Bindung sowohl an Granulozyten, als auch an die peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) nachweisbar, wobei die Bindung an die PBMC-Population signifikant höher war. Zudem wurde eine signifikante Bindung von IgG_{BNP} an die bovinen Zelllinien MDBK und BK-KL3A nachgewiesen. Eine Bindung an die porcine Zelllinie PK15 war nicht festzustellen.

Die mögliche Toxizität von kolostralen Proteinen und von Serumproben, die von durch BNP betroffenen Kälbern und den Mutterkühen gewonnen wurden, wurde in verschiedenen Ansätzen mit oder ohne Komplementzusatz mit peripheren Leukozyten gesunder Kälber getestet. Es war weder ein Einfluss auf die Zellvitalität, noch ein Unterschied zwischen BNP- und Kontrollproben festzustellen.

Da ein Zusammenhang von BNP mit dem, mittlerweile vom europäischen Markt genommenen, Impfstoff PregSure-BVD® (Pfizer) gegen die bovine Virusdiarrhö diskutiert wird, wurden Versuche zur Reduktion der Bindung von IgG_{BNP} an die Leukozyten neugeborener Kälber mit Viruszellkulturen verschiedener Pestiviren und den dazugehörigen Zellüberständen durchgeführt. Eine Vorinkubation von IgG_{BNP} mit Zellkulturen des, in MDBK-Zellen vermehrten, bovinen Virusdiarrhövirus (BVDV) und des, ebenfalls in MDBK-Zellen vermehrten, Border Disease Virus (BDV) ergab eine signifikante Reduktion der Bindung an die Leukozyten im Vergleich zu den Kontrollen. Interessanterweise war nach Vorinkubation mit Viruszellkultur des, in PK15-Zellen vermehrten, verwandten Pestivirus der europäischen Schweinepest (ESPV) keine Reduktion nachweisbar.

Sowohl bei den Bindungstests, als auch bei den Reduktionsversuchen war es auffällig, dass dieselben IgG_{BNP}-Proben unter gleichen Bedingungen in unterschiedlich starkem Ausmaß an die Leukozyten verschiedener Spenderkälber gebunden haben. Dies würde die bereits von anderen Arbeitsgruppen vorgeschlagene genetische Prädisposition in Zusammenhang mit der Entwicklung von BNP unterstützen. Erste Versuche zur Charakterisierung der/des Liganden der kolostralen Antikörper durch Versuche zur Reduktion der Bindung durch Vorbehandlung von MDBK-Zellen mit MHC-Klasse I-reaktiven, monoklonalen Antikörpern erbrachten keine eindeutigen Ergebnisse.

Die Ergebnisse sprechen für einen oder mehrere wiederkäuerspezifische Zelliganden von IgG_{BNP}, die entweder mit den Pestiviren BVDV und BDV assoziiert sind oder aber, hinsichtlich der Bindung an MDBK- und BK-KL3A-Zellen, auch mit Zellfragmenten aus der Produzentenzelllinie des Impfvirus in Verbindung stehen. Ein Zusammenhang mit dem Einsatz des BVDV-Impfstoffes PregSure-BVD® (Pfizer) erscheint möglich, da Impfstoffkomponenten die Bildung der leukozytenreaktiven IgG-Alloantikörper verursacht haben könnten. Ergänzend könnte eine genetische Prädisposition eine wichtige Rolle in der Entwicklung von BNP spielen.

VII. Summary

Bovine neonatal pancytopenia:

Laboratory experiments in context with etiological research

Bovine neonatal pancytopenia (BNP) is a newly emerging disease that has been occurring since 2006 in neonatal calves showing dramatic and mostly lethal hemorrhagic diathesis due to panmyelophthisis.

As found by other research groups, broad spectrum microbial diagnostics did not reveal an infectious process linked to BNP.

Among other proteins, IgG was purified and identified from colostrum samples of BNP and control dams and additionally quantified. In subsequent experiments a significantly higher binding of IgG from BNP colostrum (IgG_{BNP}) compared to IgG from control colostrum (IgG_{Kont}) to the peripheral blood leukocytes of non related young calves was detected. Thereby a binding to both the granulocytes and the peripheral blood mononuclear cells (PBMC) could be demonstrated, whereas the binding to the PBMC population was significantly higher. Furthermore, a significant IgG reaction with the bovine cell lines BK-KL3A and MDBK was found. No binding occurred to the porcine cell line PK15.

Possible toxicity of colostrum proteins and serum samples from BNP affected calves and dams was tested in several approaches with or without addition of complement with peripheral blood leukocytes of healthy donor calves. The experiments showed no influence on cell vitality and no differences between BNP- and control samples.

Since there is evidence that BNP might be linked to the use of the PregSure-BVD® vaccine (Pfizer) for prevention of bovine virus diarrhoea virus (BVDV), IgG pre-incubation experiments were carried out with cell culture harvests of different pestiviruses and non infected cell culture supernatants. A significant reduction of binding of IgG_{BNP} to the leukocytes of newborn calves was confirmed by pre-incubation of IgG_{BNP} with crude cell culture harvests of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and border disease virus (BDV), both multiplied in MDBK cells, when compared to the controls. Interestingly, pre-incubation with a crude cell culture harvest of the related European swine fever virus (ESPV), multiplied in PK15 cells, revealed no reduction.

It was noticeable in both the binding assays and in the reduction experiments that the same IgG_{BNP} samples bound in varying degrees to the leukocytes of different donor calves under standardized conditions. This observation supports the possible link of BNP to a genetic predisposition suggested by other research groups. First attempts to characterize the binding reduction by a pretreatment of MDBK cells with MHC-class I reactive monoclonal antibodies did not provide clear results.

So far, the results allude to one or more ruminant cell surface ligands of IgG_{BNP}, which are possibly linked to either ruminant pestivirus (BVDV and BDV) components or, regarding the binding to MDBK and BK-KL3A cells, to cell debris in the virus harvest used in the vaccine. The generation of the IgG alloantibodies and the application of the BVDV vaccine PregSure-BVD® (Pfizer) seem to be linked as vaccine components could have induced the alloantibodies. Additionally, a genetic predisposition could play an important role in the development of BNP.

VIII. Literaturverzeichnis

- Afonso LC, Scharon TM, Vieira LQ, Wysocka M, Trinchieri G, Scott P. The adjuvant effect of interleukin-12 in a vaccine against *Leishmania major*. *Science* 1994; 263: 235-7.
- Albert LJ, Inman RD. Molecular mimicry and autoimmunity. *N Engl J Med* 1999; 341: 2068-74.
- Allan GM, McNeilly F, McNair I, Curran MD, Walker I, Ellis J, Konoby C, Kennedy S, Meehan B. Absence of evidence for porcine circovirus type 2 in cattle and humans, and lack of seroconversion or lesions in experimentally infected sheep. *Arch Virol* 2000; 145: 853-7.
- Alonso-Amelot ME, Castillo U, Smith BL, Lauren DR. Bracken ptaquiloside in milk. *Nature* 1996; 382: 587.
- Ammann VJ, Fecteau G, Helie P, Desnoyer M, Hebert P, Babkine M. Pancytopenia associated with bone marrow aplasia in a Holstein heifer. *Can Vet J* 1996; 37: 493-5.
- Antalikova J, Simon M, Jankovicova J, Horovska L. Identification of MCP/CD46 analogue on bovine erythrocytes using the new monoclonal antibody IVA-520. *Vet Immunol Immunopathol* 2007; 115: 155-9.
- Astier AL, Meiffren G, Freeman S, Hafler DA. Alterations in CD46-mediated Tr1 regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Clin Invest* 2006; 116: 3252-7.
- Azwai SM, Carter SD, Woldehiwet Z. Immunoglobulins of camel (*Camelus dromedarius*) colostrum. *J Comp Pathol* 1996; 114: 273-82.
- Badiee A, Jaafari MR, Khamesipour A. *Leishmania major*: immune response in BALB/c mice immunized with stress-inducible protein 1 encapsulated in liposomes. *Exp Parasitol* 2007; 115: 127-34.
- Bainbridge DR, Sargent IL, Ellis SA. Increased expression of major histocompatibility complex (MHC) class I transplantation antigens in bovine trophoblast cells before fusion with maternal cells. *Reproduction* 2001; 122: 907-13.

- Baker JC. Bovine viral diarrhoea virus: a review. *J Am Vet Med Assoc* 1987; 190: 1449-58.
- Ballingall KT, Nath M, Holliman A, Laming E, Steele P, Willoughby K. Lack of evidence for an association between MHC diversity and the development of bovine neonatal pancytopenia in Holstein dairy cattle. *Vet Immunol Immunopathol* 2011;
- Barnett D, Storie I, Wilson GA, Granger V, Reilly JT. Determination of leucocyte antibody binding capacity (ABC): the need for standardization. *Clin Lab Haematol* 1998; 20: 155-64.
- Barrington GM, McFadden TB, Huyler MT, Besser TE. Regulation of colostrumogenesis in cattle. *Livestock Production Science* 2001; 70: 95-104.
- Becher P, Avalos Ramirez R, Orlich M, Cedillo Rosales S, König M, Schweizer M, Stalder H, Schirrmeyer H, Thiel HJ. Genetic and antigenic characterization of novel pestivirus genotypes: implications for classification. *Virology* 2003; 311: 96-104.
- Bell CR, Scott PR, Sargison ND, Wilson DJ, Morrison L, Howie F, Willoughby K, Penny CD. Idiopathic bovine neonatal pancytopenia in a Scottish beef herd. *Vet Rec* 2010; 167: 938-40.
- Bernadina WE, Franken P. A simple method for the demonstration of factors in bovine colostrum capable of causing anaemia in lambs reared free from maedi on bovine colostrum. *Vet Immunol Immunopathol* 1985; 10: 297-303.
- Birch J, Murphy L, MacHugh ND, Ellis SA. Generation and maintenance of diversity in the cattle MHC class I region. *Immunogenetics* 2006; 58: 670-9.
- Braun U, Schmid T, Muggli E, Forster E, Nuss K. [Haemorrhage caused by thrombocytopenia in 3 calves]. *Schweiz Arch Tierheilkd* 2008; 150: 553-7.
- Brendel TS. Prävalenz und weitere epidemiologische Betrachtungen der Bovinen Virusdiarrhoe Virus (BVDV)- Infektion in bayerischen Rinderherden. 2005. Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin, Ludwig Maximilians Universität, München
- Bridger PS, Bauerfeind R, Wenzel L, Bauer N, Menge C, Thiel H-J, Reinacher M, Doll K. Detection of colostrum derived alloantibodies in calves with bovine neonatal pancytopenia. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2010;

- Brown J, Greaves MF, Molgaard HV. The gene encoding the stem cell antigen, CD34, is conserved in mouse and expressed in haemopoietic progenitor cell lines, brain, and embryonic fibroblasts. *Int Immunol* 1991; 3: 175-84.
- Chattopadhyay PK, Roederer M. Good cell, bad cell: flow cytometry reveals T-cell subsets important in HIV disease. *Cytometry A* 2010; 77: 614-22.
- Coppock RW, Hoffmann WE, Gelberg HB, Bass D, Buck WB. Hematologic changes induced by intravenous administration of diacetoxyscirpenol in pigs, dogs, and calves. *Am J Vet Res* 1989; 50: 411-5.
- Corbière F, Foucras G, Lacroux C, Meyer G, Schelcher F (2009) Haemorrhagic diathesis syndrome: clinical and epidemiological findings of 48 suspected cases in France 2007-2009. In: Satellite Symposium "Haemorrhagic diathesis in calves" of the 1st European Buiatrics Forum, Marseille, Frankreich
- D'Costa S, Hurwitz JL. Antibody and pre- plus post-transplant prednisone treatments support T cell-depleted stem cell engraftment without drug-induced morbidity. *Bone Marrow Transplant* 2002; 29: 553-6.
- Davis WC, MacHugh ND, Park YH, Hamilton MJ, Wyatt CR. Identification of a monoclonal antibody reactive with the bovine orthologue of CD3 (BoCD3). *Vet Immunol Immunopathol* 1993; 39: 85-91.
- Day MJ. Biology of Lymphocytes and Plasma Cells. In: Schalm's Veterinary Hematology, 6th edn. Weiss DJ, Wardrop KJ, eds. Ames, Iowa, USA: Wiley-Blackwell 2010: 358-66.
- Dubay SA, deVos JC, Jr., Noon TH, Boe S. Epizootiology of hemorrhagic disease in mule deer in central Arizona. *J Wildl Dis* 2004; 40: 119-24.
- Ellis-Iversen J, Colloff A (2009) Epidemiological analysis of GB cases. In: Satellite Symposium "Haemorrhagic diathesis in calves" of the 1st European Buiatrics Forum, Marseille, Frankreich
- Fackler MJ, Krause DS, Smith OM, Civin CI, May WS. Full-length but not truncated CD34 inhibits hematopoietic cell differentiation of M1 cells. *Blood* 1995; 85: 3040-7.
- Fina L, Molgaard HV, Robertson D, Bradley NJ, Monaghan P, Delia D, Sutherland DR, Baker MA, Greaves MF. Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood* 1990; 75: 2417-26.

- Fischer JR, Hansen LP, Turk JR, Miller MA, Fales WH, Gosser HS. An epizootic of hemorrhagic disease in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) in Missouri: necropsy findings and population impact. *J Wildl Dis* 1995; 31: 30-6.
- Fletcher AL, Malhotra D, Turley SJ. Lymph node stroma broaden the peripheral tolerance paradigm. *Trends Immunol* 2011; 32: 12-8.
- Friedrich A, Rademacher G, Weber B, Kappe E, Carlin A, Assad A, Sauter-Louis C, Hafner-Marx A, Büttner M, Böttcher J, Klee W. Gehäuftes Auftreten von hämorrhagischer Diathese infolge Knochenmarksschädigung bei jungen Kälbern. *Tierärztliche Umschau* 2009; 64: 423 - 31.
- Friedrich A, Büttner M, Rademacher G, Klee W, Weber BK, Müller M, Carlin A, Assad A, Hafner-Marx A, Sauter-Louis CM. Ingestion of colostrum from specific cows induces Bovine Neonatal Pancytopenia (BNP) in some calves. *BMC Vet Res* 2011; 7: 10.
- Gentile A, Rosignoli C, Pravettoni D, Testoni S, Bettini G, Belloli A (2009) Pancytopenia and haemorrhagic diathesis in calves: Italian experience. In: Satellite Symposium "Haemorrhagic diathesis in calves" of the 1st European Buiatrics Forum, Marseille, Frankreich
- Gillespie JH, Baker JA, Mc EK. A cytopathogenic strain of virus diarrhea virus. *Cornell Vet* 1960; 50: 73-9.
- Glass EJ. Genetic variation and responses to vaccines. *Anim Health Res Rev* 2004; 5: 197-208.
- Halami MY, Nieper H, Müller H, Johne R. Detection of a novel circovirus in mute swans (*Cygnus olor*) by using nested broad-spectrum PCR. *Virus Res* 2008; 132: 208-12.
- Harmeyer S, Antonis S, Gadd T, Salt JS, Jahnecke S, Brune A. Schutz vor transplazentarer Infektion mit BVDV nach Impfung mit einer neuen inaktivierten BVD- Vakzine (PregSure BVD). *Tierärztl. Umschau* 2004; 59: 663-8.
- Himmelreich A. Molekulare Charakterisierung der Interaktion zwischen dem zellulären Rezeptor CD46 und dem viralen Liganden von BVDV. 2003. Institut für Virologie, Justus- Liebig- Universität, Gießen

- Hoffmann-Fezer G, Hoffmann R, Hofmann W. [Chronic furazolidone poisoning in the calf. 2. Studies on the bone marrow]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 1974; 81: 59-63.
- Hofmann W. [Hemorrhagic diathesis in calves caused by chronic furazolidone poisoning]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 1972; 79: 289-92.
- Hofmann W, Hoffmann R, Hoffmann-Fezer G. [Chronic furazolidone poisoning in calves. I. Clinical, hematological and morphological studies]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 1974; 81: 53-8.
- Hoyer BF, Mumtaz IM, Yoshida T, Hiepe F, Radbruch A. How to cope with pathogenic long-lived plasma cells in autoimmune diseases. *Ann Rheum Dis* 2008; 67 Suppl 3: iii87-9.
- Janka GE. Hemophagocytic syndromes. *Blood Rev* 2007; 21: 245-53.
- Janzen E, Clark T. Thrombocytopenia in weaned beef calves. *Can Vet J* 1995; 36: 45-6.
- Jones RH, Roughton RD, Foster NM, Bando BM. Culicoides, the vector of epizootic hemorrhagic disease in white-tailed deer in Kentucky in 1971. *J Wildl Dis* 1977; 13: 2-8.
- Kappe EC, Halami MY, Schade B, Alex M, Hoffmann D, Gangl A, Meyer K, Dekant W, Schwarz BA, Johne R, Buitkamp J, Bottcher J, Muller H. Bone marrow depletion with haemorrhagic diathesis in calves in Germany: characterization of the disease and preliminary investigations on its aetiology. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 2010; 123: 31-41.
- Katz FE, Tindle R, Sutherland DR, Greaves MF. Identification of a membrane glycoprotein associated with haemopoietic progenitor cells. *Leuk Res* 1985; 9: 191-8.
- Keller SL, Jefferson BJ, Jacobs RM, Wood RD. Effects of noncytopathic type 2 bovine viral diarrhoea virus on the proliferation of bone marrow progenitor cells. *Can J Vet Res* 2006; 70: 20-7.
- Kemper C, Chan AC, Green JM, Brett KA, Murphy KM, Atkinson JP. Activation of human CD4+ cells with CD3 and CD46 induces a T-regulatory cell 1 phenotype. *Nature* 2003; 421: 388-92.

- Kondo Y, Kakami M, Kawaguchi H, Miyake F, Urisu A, Asano Y, Kojima S. Transient pancytopenia associated with parvovirus infection in a healthy child. *Pediatr Int* 2002; 44: 695-7.
- Korbelik M, Dougherty GJ. Photodynamic therapy-mediated immune response against subcutaneous mouse tumors. *Cancer Res* 1999; 59: 1941-6.
- Korhonen H, Marnila P, Gill HS. Milk immunoglobulins and complement factors. *British Journal of Nutrition* 2000; 84 Supplement 1: S75-80.
- Krappmann K, Weikard R, Gerst S, Wolf C, Kuhn C. A genetic predisposition for bovine neonatal pancytopenia is not due to mutations in coagulation factor XI. *Vet J* 2010;
- Krey T, Himmelreich A, Heimann M, Menge C, Thiel HJ, Maurer K, Rumenapf T. Function of bovine CD46 as a cellular receptor for bovine viral diarrhoea virus is determined by complement control protein 1. *J Virol* 2006; 80: 3912-22.
- Kritzenberger M, Wrobel KH. Histochemical in situ identification of bovine embryonic blood cells reveals differences to the adult haematopoietic system and suggests a close relationship between haematopoietic stem cells and primordial germ cells. *Histochem Cell Biol* 2004; 121: 273-89.
- Kuscu B, Gürel A. Lesions in the thymus and bone marrow in chicks with experimentally induced chicken infectious anaemia disease. *J Vet Sci* 2008; 9: 15-23.
- Le Portier M-F, Mesplède A, Vannier P. Classical Swine Fever and other Pestiviruses. In: *Diseases of Swine*. Straw BE, Zimmerman JJ, D'Allaire S, Taylor DJ, eds. Ames, Iowa, USA: Blackwell Publishing 2006: 309- 22.
- Lohse L, Botner A, Hansen AS, Frederiksen T, Dupont K, Christensen CS, Baekbo P, Nielsen J. Examination for a viral co-factor in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Microbiol* 2008; 129: 97-107.
- Lunn DP, Butler DG. Idiopathic thrombocytopenic purpura in a Holstein bull. *Can Vet J* 1991; 32: 559-61.
- Macaulay D. Thrombocytopenia following sulphadimidine. *Br Med J* 1954; 2: 1269-70.

- Manz RA, Radbruch A. Plasma cells for a lifetime? *Eur J Immunol* 2002; 32: 923-7.
- Martina BE, Koraka P, Osterhaus AD. Dengue virus pathogenesis: an integrated view. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22: 564-81.
- Maurer K, Krey T, Moennig V, Thiel HJ, Rumenapf T. CD46 is a cellular receptor for bovine viral diarrhoea virus. *J Virol* 2004; 78: 1792-9.
- Mayani H. Biological differences between neonatal and adult human hematopoietic stem/progenitor cells. *Stem Cells Dev* 2010; 19: 285-98.
- Mbassa GK, Balemba O, Maselle RM, Mwaga NV. Severe anaemia due to haematopoietic precursor cell destruction in field cases of East Coast Fever in Tanzania. *Vet Parasitol* 1994; 52: 243-56.
- McKinney LL., Weakley F, Elridge A, Campbell R, Cowan J, Picken Jr. J, Biester H. S-(1,2-Dichlorovinyl)-L-cysteine: An agent causing fatal aplastic anemia in calves. *J Am Chem Soc* 1957; 79: 3932- 3.
- McKinnon KP, Hale AH, Ruebush MJ. Elicitation of natural killer cells in beige mice by infection with vesicular stomatitis virus. *Infect Immun* 1981; 32: 204-10.
- Moennig V, Floegel-Niesmann G, Greiser-Wilke I. Clinical signs and epidemiology of classical swine fever: a review of new knowledge. *Vet J* 2003; 165: 11-20.
- Moser K, Muehlinghaus G, Manz R, Mei H, Voigt C, Yoshida T, Dorner T, Hiepe F, Radbruch A. Long-lived plasma cells in immunity and immunopathology. *Immunol Lett* 2006; 103: 83-5.
- Moßbrugger I. Untersuchungen der immunisierenden Eigenschaften von MVA-exprimiertem Nichtstrukturprotein 3 (NS3) des Virus der Bovinen Virusdiarrhoe (BVDV) im Rind. 2005. Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin, Ludwig- Maximilians-Universität, München
- Nayar GP, Hamel AL, Lin L, Sachvie C, Grudeski E, Spearman G. Evidence for circovirus in cattle with respiratory disease and from aborted bovine fetuses. *Can Vet J* 1999; 40: 277-8.

- Nielsen J, Vincent IE, Botner A, Ladekaer-Mikkelsen AS, Allan G, Summerfield A, McCullough KC. Association of lymphopenia with porcine circovirus type 2 induced postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Immunol Immunopathol* 2003; 92: 97-111.
- Niku M, Pessa-Morikawa T, Ra R, Ekman A, Iivanainen A. Expression of CD34 mRNA and protein in cattle. *Vet Immunol Immunopathol* 2007; 117: 162-72.
- Nol P, Kato C, Reeves WK, Rhyan J, Spraker T, Gidlewski T, VerCauteren K, Salman M. Epizootic hemorrhagic disease outbreak in a captive facility housing white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*), bison (*Bison bison*), elk (*Cervus elaphus*), cattle (*Bos taurus*), and goats (*Capra hircus*) in Colorado, U.S.A. *J Zoo Wildl Med* 2010; 41: 510-5.
- Odendahl M, Mei H, Hoyer BF, Jacobi AM, Hansen A, Muehlinghaus G, Berek C, Hiepe F, Manz R, Radbruch A, Dorner T. Generation of migratory antigen-specific plasma blasts and mobilization of resident plasma cells in a secondary immune response. *Blood* 2005; 105: 1614-21.
- Olafson P, Mac CA, Fox FH. An apparently new transmissible disease of cattle. *Cornell Vet* 1946; 36: 205-13.
- Pardon B, Steukers L, Dierick J, Ducatelle R, Saey V, Maes S, Vercauteren G, De Clercq K, Callens J, De Bleecker K, Deprez P. Haemorrhagic diathesis in neonatal calves: an emerging syndrome in Europe. *Transbound Emerg Dis* 2010; 57: 135-46.
- Parent-Massin D. Haematotoxicity of trichothecenes. *Toxicol Lett* 2004; 153: 75-81.
- Pecora A, Perez Aguirreburualde MS, Rodriguez D, Seki C, Levy MS, Bochoeyer D, Dus Santos MJ, Wigdorovitz A. Development and validation of an ELISA for quantitation of bovine viral diarrhoea virus antigen in the critical stages of vaccine production. *J Virol Methods* 2009; 162: 170-8.
- Pellerin C, van den Hurk J, Lecomte J, Tussen P. Identification of a new group of bovine viral diarrhoea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *Virology* 1994; 203: 260-8.
- Penny CD, Bell C, Morrison L, Howie F, Willoughby K. Pancytopenia and haemorrhage in young beef calves. *Vet Rec* 2009; 164: 762.

- Perrin G, Polack B. Bovine colostrum warning. *Vet Rec* 1988; 122: 240.
- Pilling D, Vakil V, Gomer RH. Improved serum-free culture conditions for the differentiation of human and murine fibrocytes. *J Immunol Methods* 2009; 351: 62-70.
- Piontkowski A. Bovine Neonatale Panzytopenie (BNP)– „Blutschwitzen der Kälber“: Versuch einer ätiologischen Annäherung <http://www.amtstieraerzte.de/fachthemen/tierseuchenbekaempfung/432-blutschwitzen-der-kaelber.html>, Düsseldorf: Bundesverband der beamteten Tierärzte 2010:
- Porcelijn L, Van den Akker ES, Oepkes D. Fetal thrombocytopenia. *Semin Fetal Neonatal Med* 2008; 13: 223-30.
- Potgieter LN, Jones JB, Patton CS, Webb-Martin TA. Experimental parvovirus infection in dogs. *Can J Comp Med* 1981; 45: 212-6.
- Pringle CR. Virus taxonomy at the XIth International Congress of Virology, Sydney, Australia, 1999. *Arch Virol* 1999; 144: 2065-70.
- Radostitis O, Gay C, Blood D, Hinchcliff K (2000) *Veterinary medicine: A textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses*. Elsevier Limited, Philadelphia, USA
- Rebhun WC, French TW, Perdrizet JA, Dubovi EJ, Dill SG, Karcher LF. Thrombocytopenia associated with acute bovine virus diarrhea infection in cattle. *J Vet Intern Med* 1989; 3: 42-6.
- Ridpath JF, Neill JD, Frey M, Landgraf JG. Phylogenetic, antigenic and clinical characterization of type 2 BVDV from North America. *Vet Microbiol* 2000; 77: 145-55.
- Riley-Vargas RC, Gill DB, Kemper C, Liszewski MK, Atkinson JP. CD46: expanding beyond complement regulation. *Trends Immunol* 2004; 25: 496-503.
- Rolle M, Mayr A (2007) *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*. Enke, Stuttgart, Deutschland

- Roman Sosa J. Identifizierung der für die Bindung an den zellulären, bovinen Rezeptor CD46 verantwortlichen Sequenzbereiche innerhalb des Glykoproteins E2 von BVDV (NADL). 2009. Institut für Virologie, Justus-Liebig- Universität, Gießen
- Rosenfeld SJ, Young NS. Viruses and bone marrow failure. *Blood Rev* 1991; 5: 71-7.
- Rubinstein E. Vaccination and autoimmune diseases: the argument against. *Isr Med Assoc J* 2004; 6: 433-5.
- SAC. SAC Veterinary Services disease surveillance report for May. *Vet Rec* 2008; 163: 103-6.
- Sacks D, Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 845-58.
- Saint-Remy JM. Autoantibodies to coagulation factors. *Haemophilia* 2010; 16: 56-60.
- Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 2005; 6: 345-52.
- Salemi S, D'Amelio R. Could autoimmunity be induced by vaccination? *Int Rev Immunol* 2010; 29: 247-69.
- Salt JS, Antonis AFG, Peters AR, Brune A, Janecke S, Traeder W, Harmeyer SS. PregSure BVD- eine neue inaktivierte BVD- Vakzine: Breite Kreuzneutralisation von europäischen BVDV-Typ-1- und Typ-2-Stämmen und signifikante Verbesserung der Fertilität nach Testinfektionen. *Tierärztl Prax* 2004; 32: 191-5.
- Sandals WC, Povey RC, Meek AH. Prevalence of bovine parvovirus infection in Ontario dairy cattle. *Can J Vet Res* 1995; 59: 81-6.
- Schmid I, Uittenbogaart CH, Keld B, Giorgi JV. A rapid method for measuring apoptosis and dual-color immunofluorescence by single laser flow cytometry. *J Immunol Methods* 1994; 170: 145-57.
- Schnorr B, Kressin M (2006) Embryologie der Haustiere. Enke Verlag, Stuttgart

- Schoemaker NJ, Dorrestein GM, Latimer KS, Lumeij JT, Kik MJ, van der Hage MH, Campagnoli RP. Severe leukopenia and liver necrosis in young African grey parrots (*Psittacus erithacus erithacus*) infected with psittacine circovirus. *Avian Dis* 2000; 44: 470-8.
- Segales J, Mateu E. Immunosuppression as a feature of postweaning multisystemic wasting syndrome. *Vet J* 2006; 171: 396-7.
- Seino KK. Immune mediated Anemias in Ruminants and Horses. In: Schalm's Veterinary Hematology, 6th edn. Weiss D, Wardrop KJ, eds. Ames, Iowa, USA: Wiley-Blackwell 2010: 233-8.
- Shimada A, Onozato T, Hoshi E, Togashi Y, Matsui M, Miyake Y, Kobayashi Y, Furuoka H, Matsui T, Sasaki N, Ishii M, Inokuma H. Pancytopenia with bleeding tendency associated with bone marrow aplasia in a Holstein calf. *J Vet Med Sci* 2007; 69: 1317-9.
- Shope RE, Macnamara LG, Mangold R. A Virus-Induced Epizootic Hemorrhagic Disease of the Virginia White-Tailed Deer (*Odocoileus Virginianus*). *J Exp Med* 1960; 111: 155-70.
- Siepelmeier F-J, Resch K. Tierseuchen kennen keine Grenzen- Ein Bericht über den Umgang mit dem Ostküstenfieber (Theileriose) in der afrikanischen Praxis. *Deutsches Tierärzteblatt* 2009; 4: 468-9.
- Singh M, O'Hagan DT. Recent advances in veterinary vaccine adjuvants. *Int J Parasitol* 2003; 33: 469-78.
- Sitte K, Brinkworth R, East IJ, Jazwinska EC. A single amino acid deletion in the antigen binding site of BoLA-DRB3 is predicted to affect peptide binding. *Vet Immunol Immunopathol* 2002; 85: 129-35.
- Slifka MK, Matloubian M, Ahmed R. Bone marrow is a major site of long-term antibody production after acute viral infection. *J Virol* 1995; 69: 1895-902.
- Smolenaars AJG, Mars MH (2009) Epidemiologic and diagnostic results of haemorrhagic disease syndrome in calves in The Netherlands. In: Satellite Symposium "Haemorrhagic diathesis in calves" of the 1st European Buiiatrics Forum, Marseille, Frankreich
- Stöber M. Hämorrhagische Diathesen. In: Innere Medizin und Chirurgie des Rindes. Dirksen G, Gründer H-D, Stöber M, eds. Berlin: Parey 2007: 247- 53.

- Stockmann S. Cases of poisoning in cattle feeding on meal from soya bean after extraction of the oil. *J Comp Pathol Ther* 1916; 29: 95 -107.
- Stormont C. Neonatal isoerythrolysis in domestic animals: a comparative review. *Adv Vet Sci Comp Med* 1975; 19: 23-45.
- Stubbings DP. Feeding cows' colostrum to newborn lambs. *Vet Rec* 1983; 112: 393-4.
- Summerfield A, Knoetig SM, Tschudin R, McCullough KC. Pathogenesis of granulocytopenia and bone marrow atrophy during classical swine fever involves apoptosis and necrosis of uninfected cells. *Virology* 2000; 272: 50-60.
- Summerfield A, Zingle K, Inumaru S, McCullough KC. Induction of apoptosis in bone marrow neutrophil-lineage cells by classical swine fever virus. *Journal of General Virology* 2001; 82: 1309-18.
- Teich K. Die BVD-Verordnung des Bundes und die Strategie der Länder. *Nutztierpraxis* 2006; 17: 20-9.
- Thomas C, Young NJ, Heaney J, Collins ME, Brownlie J. Evaluation of efficacy of mammalian and baculovirus expressed E2 subunit vaccine candidates to bovine viral diarrhoea virus. *Vaccine* 2009; 27: 2387-93.
- Thrall MA, Baker DC, Campbell TW, DeNicola D, Fettmann MJ, Lassen ED, Rebar A, Weiser G (2004) *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry*. Lippincott Williams & Wilkins, Maryland, USA
- Tischer I, Bode L, Apodaca J, Timm H, Peters D, Rasch R, Pociuli S, Gerike E. Presence of antibodies reacting with porcine circovirus in sera of humans, mice, and cattle. *Arch Virol* 1995; 140: 1427-39.
- Tishler M, Shoenfeld Y. Vaccination may be associated with autoimmune diseases. *Isr Med Assoc J* 2004; 6: 430-2.
- Todd D. Circoviruses: immunosuppressive threats to avian species: a review. *Avian Pathol* 2000; 29: 373-94.
- Toutenburg H, Heumann C (2008) *Deskriptive Statistik*. Springer Verlag, Berlin

- Trepanier LA. Idiosyncratic toxicity associated with potentiated sulfonamides in the dog. *J Vet Pharmacol Ther* 2004; 27: 129-38.
- Triglia RP, Linscott WD. Titers of nine complement components, conglutinin and C3b-inactivator in adult and fetal bovine sera. *Mol Immunol* 1980; 17: 741-8.
- Truyen U, Addie D, Belak S, Boucraut-Baralon C, Egberink H, Frymus T, Gruffydd-Jones T, Hartmann K, Hosie MJ, Lloret A, Lutz H, Marsilio F, Pennisi MG, Radford AD, Thiry E, Horzinek MC. Feline panleukopenia. ABCD guidelines on prevention and management. *J Feline Med Surg* 2009; 11: 538-46.
- Tsumiyama K, Miyazaki Y, Shiozawa S. Self-organized criticality theory of autoimmunity. *PLoS One* 2009; 4: e8382.
- van den Berg CW, Perez de la Lastra JM, Llanes D, Morgan BP. Purification and characterization of the pig analogue of human membrane cofactor protein (CD46/MCP). *J Immunol* 1997; 158: 1703-9.
- van der Valk J, Brunner D, De Smet K, Fex Svenningsen A, Honegger P, Knudsen LE, Lindl T, Noraberg J, Price A, Scarino ML, Gstraunthaler G. Optimization of chemically defined cell culture media--replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. *Toxicol In Vitro* 2010; 24: 1053-63.
- van Rijn PA. A common neutralizing epitope on envelope glycoprotein E2 of different pestiviruses: implications for improvement of vaccines and diagnostics for classical swine fever (CSF)? *Vet Microbiol* 2007; 125: 150-6.
- VLA. Veterinary Laboratories Agency disease surveillance report for England and Wales for February. *Vet Rec* 2009; 164
- Voigt H, Merant C, Wienhold D, Braun A, Hutet E, Le Potier MF, Saalmuller A, Pfaff E, Buttner M. Efficient priming against classical swine fever with a safe glycoprotein E2 expressing Orf virus recombinant (ORFV VrV-E2). *Vaccine* 2007; 25: 5915-26.
- Waisbren BA, Sr. Acquired autoimmunity after viral vaccination is caused by molecular mimicry and antigen complementarity in the presence of an immunologic adjuvant and specific HLA patterns. *Medical Hypotheses* 2008; 70: 346-8.
- Weiss DJ, Miller DC. Bone marrow necrosis associated with pancytopenia in a cow. *Vet Pathol* 1985; 22: 90-2.

- Weiss DJ, Adams LG. Aplastic anemia associated with trimethoprim-sulfadiazine and fenbendazole administration in a dog. *J Am Vet Med Assoc* 1987; 191: 1119-20.
- Weiss DJ, Evanson OA, Sykes J. A retrospective study of canine pancytopenia. *Vet Clin Pathol* 1999; 28: 83-8.
- Weiss DJ, Souza CD. Monocytes and Makrophages and their Disorders. In: Schalm's Veterinary Hematology, 6th edn. Weiss DJ, Wardrop KJ, eds. Ames, Iowa, USA: Blackwell-Wiley 2010: 298-306.
- Willoughby K, Gilray J, Maley M, Dastjerdi A, Steinbach F, Banks M, Scholes S, Howie F, Holliman A, Baird P, McKillen J. Lack of evidence for circovirus involvement in bovine neonatal pancytopenia. *Vet Rec* 2010; 166: 436-7.
- Winter A. The feeding of cow colostrum to neonatal lambs and kids. 1990. University of Liverpool, Liverpool
- Winter A. Bovine neonatal pancytopenia, and anaemia in lambs caused by feeding cow colostrum. *Vet Rec* 2011; 168: 84.
- Winter AC, Clarkson MJ. Farm investigations of anaemia in lambs caused by feeding cow colostrum. *Vet Rec* 1992; 131: 213-6.
- Yadin H, Brenner J, Bumbrov V, Oved Z, Stram Y, Klement E, Perl S, Anthony S, Maan S, Batten C, Mertens PP. Epizootic haemorrhagic disease virus type 7 infection in cattle in Israel. *Vet Rec* 2008; 162: 53-6.
- Yeruham I, Avidar Y, Harrus S, Fishman L, Aroch I. Immune-mediated thrombocytopenia and putative haemolytic anaemia associated with a polyvalent botulism vaccination in a cow. *Vet Rec* 2003; 153: 502-4.
- Yetgin S, Cetin M, Ozyurek E, Aslan D, Uckan D. Parvovirus B19 infection associated with severe aplastic anemia in an immunocompetent patient. *Pediatr Hematol Oncol* 2004; 21: 223-6.
- Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol* 2000; 7: 203-14.

IX. Anhang

1 Tabellenverzeichnis

Tabelle III.1 Überblick über die Herkunft und die Verteilung der BNP-Kolostren.....	29
Tabelle III.2 Überblick über die asservierten Kontrollkolostren aus dem Lehr- und Versuchsgut der LMU München.....	30
Tabelle III.3 Anzahl der in der Pathologie des LGL entnommenen Knochenmark- und Thymusproben von BNP- und Kontrollkälbern	31
Tabelle III.4 Übersicht über die nach Pirbright versendeten Proben zur virologischen Diagnostik.....	45
Tabelle III.5 Untersuchungen zum Genomnachweis von Circovirus (CV) und bovinem Virusdiarrhö Virus (BVDV) in verschiedenen Proben von BNP- und Kontrolltieren nach QSA-Vorschriften am Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit	48
Tabelle III.6 Reaktionsvolumina und -konzentrationen der Mastermix-Komponenten für beide Runden der PCR nach HALAMI et al. (2008)	51
Tabelle III.7 Thermalprofil für die beiden Runden der PCR nach HALAMI et al. (2008).....	52
Tabelle III.8 Mit der PCR nach HALAMI et al. (2008) untersuchte Proben zum Nachweis von Circovirusgenom	53
Tabelle III.9 Verwendete Antikörperkombinationen zur Darstellung und Analyse von bovinen Leukozytensubpopulationen in der Durchflusszytometrie	62
Tabelle III.10 Überblick zu den verwendeten Anteilen der Peakfraktionen (PF) 1-5 aus der Gelchromatographie, jeweils von BNP-Müttern (BNP) und Kontrollmüttern (Kontr) mit der Leukozytensuspension (LZS) in den einzelnen Versuchen.....	69
Tabelle IV.1 Untersuchungsergebnisse aus dem Institut für Tiergesundheit (Pirbright, England) zum Antikörper- (Ak) und Genomnachweis von Blauzungenvirus (BTV) und Epizootic Haemorrhagic Disease Virus (EHDV).....	74
Tabelle IV.2 Ergebnisse aus der Sequenzierung der DNA-Fragmente aus der Circovirus PCR nach HALAMI et al. (2008). Die Fragmente wurden über die Anwendung BLASTn 2.2.25 mit Sequenzen von porcinem Circovirus 2 (PCV-2) und dem PCV-2 Isolat PCV2-Ha08 auf Homologien geprüft.....	76

Tabelle IV.3 Gemessene Absorption (optische Dichte, O.D.-Werte) von sechs Proben bei 450 nm aus dem anti-bovinen IgA-ELISA; Probenverdünnung 1:100; NK= Negativkontrolle; n.v.= Probe nicht verfügbar.....	83
Tabelle IV.4 Gemessene Absorption (O.D.-Werte) von fünf Proben bei 450 nm aus dem anti-bovinen IgG-ELISA; Probenverdünnung 1:100 000;	84
Tabelle IV.5 Gemessene Absorption (O.D.-Werte) von fünf Proben bei 450 nm aus dem anti-bovinen IgM-ELISA; Probenverdünnung 1:1000;	84
Tabelle IV.6 IgG-Konzentrationen in der Peakfraktion 2 der BNP-Kolostren.....	86
Tabelle IV.7 IgG-Konzentrationen in der Peakfraktion 2 der Kontrollkolostren.....	87
Tabelle IV.8 Übersicht über die Ergebnisse aus der Proteinauftrennung (SDS PAGE) für die getesteten Peakfraktionen 1–5 nach deren Separation durch Gel-chromatographie.....	88
Tabelle IV.9 Anzahl der durchgeführten und ausgewerteten Versuche mit den verschiedenen IgG-Proben aus BNP-Kolostrum	90
Tabelle IV.10 Verteilung der nachgewiesenen Leukozytenbindungsreduktionen (Abnahme der IgG+ Zellen) von IgG+ Zellen nach Vorinkubation mit Zellkultur-ernten des bovinen Virusdiarrhö Virus (BVDV) und des Border disease Virus (BDV) bei allen getesteten IgG _{BNP} -Proben (n= 10). Bindung und Reduktion beziehen sich auf BVDV.	110

2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung III.1 Definition der lebenden Zellen eines Versuchs durch Setzen eines Fensters auf die 7-AAD-negativen Zellen im Dot Plot (7-AAD vs. FSC).....	63
Abbildung III.2 Auswertung der Oberflächenantigenfärbung am Beispiel von mit CD3-reaktiven Antikörpern behandelten Zellen. Die Berechnung CD3-positiver Zellen erfolgte durch Setzen eines Markers in der Histogrammdarstellung der Fluoreszenz (Alexa Fluor 633) und Vergleich der Isotypkontrolle (hellgrau) mit der CD3-gefärbten Probe (dunkelgrau).	64
Abbildung III.3 Beispiel für das Setzen der Marker in einer Kontrolle, die nur mit den Sekundärantikörpern inkubiert wurde. Diese Grenzen werden auf die zugehörigen Proben zur Bestimmung der IgG+ Zellen übertragen.....	66
Abbildung III.4 Exemplarische Darstellung eines vertikalen Boxplots über einem Zahlenstrahl.	67
Abbildung IV.1 Heat map der Chiphybridisierung einer Serumprobe eines BNP-Kalbes mit dem DEFRA Biosecurity Chip. Stärkere Signale liefern ein Entencircovirus (A) und ein Pan-Blauzungenvirus Primer (B). ...	77
Abbildung IV.2 Vergleich der Zellpopulationen der Granulozyten und der peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) eines gesunden Kalbes mit denen eines BNP-Kalbes im Dot Plot (FSC gegen SSC) nach Ausschluss der toten Zellen.....	78
Abbildung IV.3 Vergleich der Granulozyten und der Monozyten eines gesunden Kalbes mit denen eines BNP-Kalbes nach Reaktion mit den monoklonalen Antikörpern CD172a im Dot Plot (PE: CD172a gegen SSC) nach Ausschluss der toten Zellen.....	79
Abbildung IV.4 Stark reduzierter Anteil der peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) bei einem BNP-Kalb im Vergleich zu einem gesunden Kalb.....	80
Abbildung IV.5 Überlagerungs-Histogramm zur Darstellung der reduzierten Anzahl an CD3+ Zellen in der Probe eines BNP-Kalbs (rot) im Vergleich zu der Probe eines gesunden Kalbes (grau; 43,03 % der Zellen sind CD3+).	80
Abbildung IV.6 Deutlich geringerer Anteil an Monozyten in der Blutprobe eines BNP-Kalbes im Vergleich zu der Blutprobe eines gesunden Kalbes im Dot Plot (PE: CD172a gegen SSC).....	81

- Abbildung IV.7 Beispiel für ein Chromatogramm nach der Proteinseparation einer Kolostralseumprobe mit fünf voneinander abgrenzbaren Peakfraktionen (Peak 1-5).82
- Abbildung IV.8 Beispiel für den Nachweis der Bindung von IgG aus dem Kolostrum einer BNP-Mutter an die Leukozytenoberfläche gesunder Kälber. Der Anteil IgG⁺ Zellen nach Inkubation mit IgG aus dem Kolostrum einer Kontrollmutter oder nur mit dem Sekundärantikörper ist deutlich geringer. Die Anteile der IgG⁺ Zellen sind im jeweiligen Histogrammfenster aufgeführt.91
- Abbildung IV.9 Beispielhafte Darstellung der variierenden prozentualen Anteile der IgG⁺ Zellen der Leukozyten verschiedener Spenderkälber (Kalb Nr.) nach Inkubation mit IgG_{BNP} aus der Kolostrumprobe BNP-5. Zellen vom selben Spendertier sind in gleicher Farbe dargestellt.92
- Abbildung IV.10 Statistische Auswertung der IgG⁺ Zellen im Boxplot nach Färbung der Leukozyten gesunder Kälber mit IgG aus BNP-Kolostrum (IgG_{BNP}), IgG aus Kontrollkolostrum (IgG_{Kontr}) und nur mit dem sekundären FITC-konjugierten Antikörpern gegen bovines IgG (Sekundärantikörper).93
- Abbildung IV.11 Vergleich der Leukozytensubpopulationen der Granulozyten und der peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) nach deren Trennung durch Dichtegradientenzentrifugation (Ficoll) mit dem Setzen der Fenster nach Analyse der Gesamtleukozyten im Dot Plot (FSC gegen SSC).94
- Abbildung IV.12 IgG aus BNP-Kolostrum (IgG_{BNP}) bindet in einem signifikant höheren Ausmaß an die peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) als an die Granulozyten von gesunden Spenderkälbern. IgG aus Kontrollkolostrum (IgG_{Kontr}) und die Sekundärantikörper binden im Vergleich dazu in einem signifikant geringeren Ausmaß an die Zellen.95
- Abbildung IV.13 Vergleich des Anteils der IgG⁺ Zellen von BK-KL3A Zellen, die am selben Tag (hellgrau) mit IgG_{BNP} der Probe BNP-13 inkubiert wurden, mit dem von Zellen, die an einem anderen Tag (blau) mit IgG_{BNP} dieser Probe inkubiert wurden. Der Anteil der IgG⁺ Zellen eines jeden Versuchs ist in den Säulen angegeben.97
- Abbildung IV.14 Vergleich des Anteils der IgG⁺ Zellen von MDBK Zellen, die am selben Tag (1.12. dunkelgrau; 7.12. hellgrau) mit IgG_{BNP} der Probe BNP-6 inkubiert wurden, mit dem von Zellen, die an einem anderen Tag (blau) mit IgG_{BNP} dieser Probe inkubiert wurden. Der Anteil der IgG⁺ Zellen eines jeden Versuchs ist in den Säulen angegeben.98

- Abbildung IV.15 Statistische Auswertung des Anteils der IgG⁺ Zellen nach der Inkubation von Zellen der Zelllinien BK-KL3A (BK), MDBK und PK15 mit IgG aus BNP-Kolostrum (IgG_{BNP}) und IgG aus Kontrollkolostrum (IgG_{Kontr}). 100
- Abbildung IV.16 Anteil der lebenden Leukozyten von gesunden Kälbern nach Inkubation mit Serum von BNP- und Kontrolltieren oder mit FBS nach 24 und 48 Stunden. 101
- Abbildung IV.17 Anteil der überlebenden Leukozyten gesunder Kälber nach Inkubation mit einem Zusatz von 5 % der Peakfraktionen (Peak 1-5) von BNP- und Kontrollproben oder Laufpuffer nach 24 h. 102
- Abbildung IV.18 Anteil der überlebenden Leukozyten gesunder Kälber nach Inkubation mit einem Zusatz von 10 % der Peakfraktionen (Peak 1-5) von BNP- und Kontrollproben oder Laufpuffer nach 24 h. 102
- Abbildung IV.19 Anteil der überlebenden Leukozyten gesunder Kälber nach Inkubation mit einem Zusatz von 15 % der Peakfraktionen (Peak 1-5) von BNP- und Kontrollproben oder Laufpuffer nach 24 h. 103
- Abbildung IV.20 Anteil der überlebenden Leukozyten gesunder Kälber nach Inkubation mit einem Zusatz von 20 % der Peakfraktionen (Peak 1-5) von BNP- und Kontrollproben oder Laufpuffer nach 24 h. 103
- Abbildung IV.21 Anteil der überlebenden Leukozyten gesunder Kälber nach Inkubation mit einem Zusatz von 25 % der Peakfraktionen (Peak 1-5) von BNP- und Kontrollproben oder Laufpuffer nach 24 h. 104
- Abbildung IV.22 Anteil der überlebenden Leukozyten gesunder Kälber nach Inkubation mit einem Zusatz von 30 % der Peakfraktionen (Peak 1-5) von BNP- und Kontrollproben oder Laufpuffer nach 24 h. 104
- Abbildung IV.23 Mittelwerte der lebenden Leukozyten von gesunden Kälbern nach Inkubation (24 h) mit einem Zusatz von unterschiedlichen Anteilen der Peakfraktionen aus BNP- und Kontrollproben, Laufpuffer oder nur von serumfreiem Medium (SFM)..... 105
- Abbildung IV.24 Anteil der lebenden Leukozyten von gesunden Spenderkälbern (n= 4) nach über-Nacht Inkubation mit oder ohne ConA-Zusatz, anschließender Inkubation mit IgG aus BNP- oder Kontrollproben und mit oder ohne Meer-schweinchenkomplement (MK) für 30 min. 106

- Abbildung IV.25 Bindung von IgG_{BNP} (BNP-Proben) an die Leukozyten gesunder Kälber nach deren Inkubation mit oder ohne ConA- Zusatz über Nacht und anschließender Inkubation mit Meerschweinchenkomplement (MK) für 30 min. Der Anteil IgG⁺ Zellen nach Inkubation mit IgG_{Kontr} (Kontrollproben) oder mit nur den Sekundärantikörpern ist deutlich geringer..... 107
- Abbildung IV.26 Bei vier von 14 mit IgG_{BNP} inkubierten Proben wurde eine Reduktion (> 5%) der IgG⁺ Zellen nach vorangegangenem Zusatz eines monoklonalen MHC-Klasse I-reaktiven Antikörpers (MHC-I) nachgewiesen..... 108
- Abbildung IV.27 Bei sieben von 14 mit IgG_{BNP} gefärbten Proben wurde eine Zunahme (> 5%) der IgG⁺ Zellen nach vorheriger Inkubation mit einem monoklonalen MHC-Klasse I-reaktiven Antikörper (MHC-I) nachgewiesen..... 109
- Abbildung IV.28 Der prozentuale Anteil IgG⁺ Zellen nach Inkubation der Leukozyten von gesunden Kälbern mit IgG aus BNP-Kolostrum (IgG_{BNP}) lässt sich signifikant durch Vorinkubation von IgG_{BNP}-Proben mit Zellkulturen der ncp Pestiviren bovinus Virusdiarrhö Virus (BVDV) und Border disease Virus (BDV) reduzieren. Durch Vorinkubation mit Zellkulturen des europäischen Schweinepest Virus (ESPV) lässt sich keine Bindungsreduktion auslösen. Die durch Vorinkubation der IgG_{BNP}-Proben mit Zellkulturen von BVDV, BDV und ESPV erhaltenen Daten wurden durch Normalisierung in ein Verhältnis zur Referenzkontrolle (100 % IgG⁺ Zellen) gesetzt. 111
- Abbildung IV.29 Es besteht kein direkter Zusammenhang zwischen der Höhe des im ELISA gemessenen BVDV-Antikörpertiters (BVDV-Ak Titer; blaue Säule) und der mittleren prozentualen Bindungsreduktion der einzelnen IgG_{BNP}-Proben (% Reduktion; graue Säulen) nach Vorinkubation mit Zellkulturen von BVDV gegenüber den Kontrollen..... 113

3 Detaillierte Daten zur Bindung der IgG_{BNP}-Proben an die Leukozyten gesunder Kälber

BNP- 1

Datum	Spenderkalb Nr.	% Lebende Zellen	% IgG+
31.08.2010	42632	88,03	85,24
01.09.2010	1	94,02	28,33
01.09.2010	2	80,71	56,15
01.09.2010	3	87,24	71,21
06.10.2010	42865	86,60	79,90
19.10.2010	42867	89,90	55,40
25.10.2010	42866	89,70	21,70
25.10.2010	42869	87,20	48,90
02.11.2010	42870	90,50	76,30
02.11.2010	42872	88,20	97,60
02.11.2010	42868	91,90	99,60
05.11.2010	42870	90,30	76,50
05.11.2010	42875	90,60	66,30
15.11.2010	42873	89,00	84,60
15.11.2010	42874	90,40	97,20
29.11.2010	42877	94,00	49,00
29.11.2010	42878	95,10	33,10
Mittelwert			66,30
Standardabweichung			24,38

BNP- 2

Datum	Spenderkalb Nr.	% Lebende Zellen	% IgG+
01.09.2010	1	88,45	17,81
01.09.2010	2	80,17	33,82
01.09.2010	3	85,84	21,94
19.10.2010	42867	89,10	45,50
12.11.2010	42876	85,00	80,60
15.11.2010	42873	85,60	30,10
15.11.2010	42874	81,00	88,30
29.11.2010	42877	95,10	41,30
29.11.2010	42878	94,10	26,10
Mittelwert			42,83
Standardabweichung			25,22

BNP- 3

Datum	Spenderkalb Nr.	% Lebende Zellen	% IgG+
28.09.2010	42862	81,90	15,20
28.09.2010	42864	83,90	56,20
29.09.2010	42862	82,36	8,39
29.09.2010	42864	84,12	53,46
15.11.2010	42873	85,10	51,40
15.11.2010	42874	80,60	40,60
22.11.2010	42877	93,20	25,10
22.11.2010	42878	91,20	17,10
22.11.2010	42872	91,20	17,10
22.11.2010	42875	92,20	44,60
29.11.2010	42877	95,50	46,80
29.11.2010	42878	95,30	25,40
Mittelwert			33,45
Standardabweichung			17,12

BNP- 4

Datum	Spenderkalb Nr.	% Lebende Zellen
31.08.2010	42632	88,94
01.09.2010	1	90,96
01.09.2010	2	81,62
01.09.2010	3	88,26
28.09.2010	42862	84,40
28.09.2010	42864	86,10
06.10.2010	42865	86,30
06.10.2010	42862	82,00
19.10.2010	42867	89,60
12.11.2010	42875	81,60
12.11.2010	42876	88,30
15.11.2010	42873	90,30
15.11.2010	42874	91,20

Mittelwert
Standardabweichung

% IgG+
44,03
27,21
53,33
33,33
54,30
72,40
86,60
69,80
40,70
61,70
27,90
56,10
49,00

Mittelwert
Standardabweichung

BNP- 5

Datum	Spenderkalb Nr.	% Lebende Zellen
28.09.2010	42862	87,40
28.09.2010	42864	85,10
29.09.2010	42862	87,79
29.09.2010	42864	85,26
25.10.2010	42866	87,20
25.10.2010	42869	87,70
15.11.2010	42873	86,60
22.11.2010	42877	93,60
22.11.2010	42878	91,88
22.11.2010	42872	93,72
22.11.2010	42875	90,80
29.11.2010	42877	96,00
29.11.2010	42878	95,00

Mittelwert
Standardabweichung

% IgG+
90,90
69,10
88,44
67,03
7,30
52,10
96,70
35,60
30,42
97,30
98,90
59,20
36,10

Mittelwert
Standardabweichung

BNP- 6

Datum	Spenderkalb Nr.	% Lebende Zellen
31.08.2010	42632	88,79
01.09.2010	1	90,81
01.09.2010	2	81,08
01.09.2010	3	86,72
28.09.2010	42862	83,40
28.09.2010	42864	86,10
06.10.2010	42865	86,80
06.10.2010	42862	81,20
19.10.2010	42867	90,30
12.11.2010	42876	88,40
15.11.2010	42873	86,90
15.11.2010	42874	91,50

Mittelwert
Standardabweichung

% IgG+
45,26
26,70
57,01
32,03
38,80
75,10
89,70
40,70
36,90
27,90
43,30
53,90

Mittelwert
Standardabweichung

BNP- 7

Datum	Spenderkalb Nr.	% Lebende Zellen
31.08.2010	42632	90,19
01.09.2010	1	91,45
01.09.2010	2	82,71
01.09.2010	3	86,29
06.10.2010	42865	84,80
06.10.2010	42862	81,60
19.10.2010	42867	89,20
25.10.2010	42866	90,20
25.10.2010	42869	86,20
02.11.2010	42870	87,70
02.11.2010	42872	89,10
02.11.2010	42868	91,00
05.11.2010	42870	90,40
05.11.2010	42875	88,40
15.11.2010	42873	90,10
15.11.2010	42874	90,00
29.11.2010	42877	82,70
29.11.2010	42878	94,70

Mittelwert
Standardabweichung

% IgG+
4,11
34,04
57,26
36,99
97,20
95,20
71,10
8,92
84,60
81,70
78,50
99,90
70,70
28,50
85,80
99,80
91,00
48,80

Mittelwert
Standardabweichung

BNP- 8

Datum	Spenderkalb Nr.	% Lebende Zellen
01.09.2010	1	90,11
01.09.2010	2	80,34
01.09.2010	3	87,06
28.09.2010	42862	85,40
28.09.2010	42864	85,50
06.10.2010	42865	87,40
06.10.2010	42862	81,00
19.10.2010	42867	89,80
25.10.2010	42866	89,70
25.10.2010	42869	87,70
02.11.2010	42870	87,90
02.11.2010	42872	89,30
02.11.2010	42868	91,50
05.11.2010	42870	90,40
05.11.2010	42875	89,40
15.11.2010	42873	90,40
15.11.2010	42874	91,40
29.11.2010	42877	93,90
29.11.2010	42878	93,80

Mittelwert
Standardabweichung

% IgG+
44,07
57,88
79,41
94,90
82,50
89,50
96,60
72,10
53,20
65,10
89,60
99,60
99,90
74,10
91,80
97,70
99,60
73,80
45,30

Mittelwert
Standardabweichung

BNP- 9

Datum	Spenderkalb Nr.	% Lebende Zellen
31.08.2010	42632	91,77
01.09.2010	1	90,21
01.09.2010	2	82,05
01.09.2010	3	89,21
28.09.2010	42862	83,00
28.09.2010	42864	84,30
06.10.2010	42865	87,40
06.10.2010	42862	81,50
19.10.2010	42867	89,50
12.11.2010	42875	81,80
12.11.2010	42876	86,40
15.11.2010	42873	89,70
15.11.2010	42874	90,40

Mittelwert
Standardabweichung

% IgG+
21,39
12,70
41,55
22,89
42,20
63,40
70,30
56,30
30,50
72,70
7,92
46,50
39,70

Mittelwert
Standardabweichung

BNP- 10

Datum	Spenderkalb Nr.	% Lebende Zellen	% IgG+
31.08.2010	42632	90,19	60,38
01.09.2010	1	89,94	47,12
01.09.2010	2	81,02	45,17
01.09.2010	3	84,78	45,85
19.10.2010	42867	89,50	30,50
15.11.2010	42873	82,50	74,90
22.11.2010	42877	92,40	50,30
22.11.2010	42878	89,80	41,50
22.11.2010	42872	89,80	41,50
22.11.2010	42875	92,90	68,10
29.11.2010	42877	94,60	86,00
29.11.2010	42878	94,00	76,40
Mittelwert			55,64
Standardabweichung			17,16

BNP- 11

Datum	Spenderkalb Nr.	% Lebende Zellen	% IgG+
25.10.2010	42866	88,42	9,13
25.10.2010	42869	86,20	47,29
02.11.2010	42870	87,80	83,50
02.11.2010	42872	88,50	97,90
02.11.2010	42868	91,00	99,80
05.11.2010	42870	91,20	57,00
05.11.2010	42875	87,20	74,30
12.11.2010	42875	81,60	91,40
12.11.2010	42876	88,10	83,60
15.11.2010	42873	84,70	88,20
15.11.2010	42874	80,30	98,30
22.11.2010	42877	93,40	29,90
22.11.2010	42878	91,90	22,20
22.11.2010	42872	91,90	22,20
22.11.2010	42875	90,60	93,40
Mittelwert			66,54
Standardabweichung			32,27

BNP- 12

Datum	Spenderkalb Nr.	% Lebende Zellen	% IgG+
31.08.2010	42632	89,34	38,28
01.09.2010	1	89,77	4,83
01.09.2010	2	81,88	22,48
01.09.2010	3	87,35	43,63
19.10.2010	42867	86,40	39,30
25.10.2010	42866	86,30	8,69
25.10.2010	42869	86,80	35,20
12.11.2010	42876	88,00	81,60
15.11.2010	42873	84,40	47,60
15.11.2010	42874	80,80	96,10
Mittelwert			41,77
Standardabweichung			28,81

BNP- 13

Datum	Spenderkalb Nr.	% Lebende Zellen	% IgG+
28.09.2010	42862	84,90	94,30
28.09.2010	42864	84,70	79,90
29.09.2010	42862	85,88	92,93
29.09.2010	42864	84,98	75,75
12.11.2010	42876	88,50	92,20
15.11.2010	42873	83,00	15,30
15.11.2010	42874	80,40	99,40
29.11.2010	42877	95,60	29,90
29.11.2010	42878	95,50	8,06
Mittelwert			65,30
Standardabweichung			36,82

BNP- 14

Datum	Spenderkalb Nr.	% Lebende Zellen	% IgG+
31.08.2010	42632	89,77	99,32
01.09.2010	1	91,84	29,21
01.09.2010	2	82,11	60,69
01.09.2010	3	86,12	88,82
28.09.2010	42862	85,10	95,80
28.09.2010	42864	86,00	80,80
06.10.2010	42865	87,80	93,30
06.10.2010	42862	81,90	97,70
19.10.2010	42867	88,80	66,20
25.10.2010	42866	87,50	83,60
25.10.2010	42869	87,60	70,20
02.11.2010	42870	87,30	92,40

Fortsetzung BNP- 14

Datum	Spenderkalb Nr.	% Lebende Zellen	% IgG+
02.11.2010	42872	89,30	99,70
02.11.2010	42868	90,30	99,80
05.11.2010	42870	90,60	81,30
05.11.2010	42875	87,50	96,60
15.11.2010	42873	89,50	99,40
15.11.2010	42874	91,10	99,90
22.11.2010	42877	93,80	40,00
22.11.2010	42878	91,10	37,50
22.11.2010	42872	91,10	37,50
22.11.2010	42875	89,50	99,00
29.11.2010	42877	96,10	62,30
29.11.2010	42878	94,80	53,10
Mittelwert			79,84
Standardabweichung			20,44

4 Detaillierte Daten zur Bindung von IgG_{BNP} an bovine Zelllinien

4.1 Bindung an BK-KL3A Zellen

BNP- 1

Datum	% Lebende Zellen	% IgG+
05.10.2010	92,89	35,41
08.10.2010	91,04	21,02
18.10.2010	87,83	19,95
21.10.2010	91,62	9,65
26.10.2010	91,37	46,63
17.11.2010	96,54	43,00
04.12.2010	98,00	13,37
08.12.2010	96,32	7,82
Mittelwert		24,61
Standardabweichung		15,15

BNP- 2

Datum	% Lebende Zellen	% IgG+
05.10.2010	95,19	16,01
08.10.2010	87,43	3,79
18.10.2010	88,02	3,29
21.10.2010	93,70	1,43
17.11.2010	97,56	34,17
08.12.2010	96,26	3,49
Mittelwert		10,36
Standardabweichung		12,80

BNP- 3

Datum	% Lebende Zellen	% IgG+
17.11.2010	97,65	0,84
15.12.2010	97,53	0,16
15.12.2010	98,24	0,53
15.12.2010	97,90	0,30
15.12.2010	97,97	0,06
Mittelwert		0,38
Standardabweichung		0,31

BNP- 4

Datum	% Lebende Zellen	% IgG+
05.10.2010	91,84	22,10
08.10.2010	89,53	4,84
18.10.2010	88,40	13,34
21.10.2010	90,83	6,01
17.11.2010	97,40	47,14
04.12.2010	98,08	4,73
Mittelwert		16,36
Standardabweichung		16,52

BNP- 5

Datum	% Lebende Zellen	% IgG+
26.10.2010	89,35	35,68
17.11.2010	96,04	51,72
08.12.2010	96,39	13,25
15.12.2010	97,98	44,78
15.12.2010	98,19	37,56
Mittelwert		36,60
Standardabweichung		14,51

BNP- 6

Datum	% Lebende Zellen	% IgG+
05.10.2010	92,85	11,86
08.10.2010	90,13	2,54
18.10.2010	87,13	2,03
21.10.2010	92,07	4,59
17.11.2010	97,58	31,26
04.12.2010	98,19	0,96
08.12.2010	97,18	0,56
Mittelwert		7,69
Standardabweichung		11,08

BNP- 7

Datum	% Lebende Zellen	% IgG+
05.10.2010	93,47	56,12
08.10.2010	86,35	26,10
18.10.2010	88,97	25,69
21.10.2010	90,15	13,62
26.10.2010	91,10	47,98
08.12.2010	96,82	20,72
Mittelwert		31,71
Standardabweichung		16,59

BNP- 8

Datum	% Lebende Zellen	% IgG+
05.10.2010	94,86	43,51
08.10.2010	88,17	20,15
18.10.2010	88,01	17,36
21.10.2010	90,00	11,90
26.10.2010	90,14	59,60
17.11.2010	95,14	63,82
04.12.2010	98,42	18,16
08.12.2010	96,19	9,09
Mittelwert		30,45
Standardabweichung		21,92

BNP- 9

Datum	% Lebende Zellen	% IgG+
05.10.2010	87,91	26,52
08.10.2010	89,50	8,12
18.10.2010	89,15	10,31
21.10.2010	89,43	5,61
08.12.2010	96,91	7,20
Mittelwert		11,55
Standardabweichung		8,54

BNP- 10

Datum	% Lebende Zellen	% IgG+
05.10.2010	93,34	39,92
08.10.2010	89,70	18,12
18.10.2010	87,92	17,54
21.10.2010	92,57	12,40
17.11.2010	97,46	77,22
Mittelwert		33,04
Standardabweichung		26,87

BNP- 11

Datum	% Lebende Zellen	% IgG+
26.10.2010	89,53	36,02
17.11.2010	97,12	67,42
04.12.2010	98,38	9,13
08.12.2010	96,24	8,89
15.12.2010	98,27	27,48
Mittelwert		29,79
Standardabweichung		24,10

BNP- 12

Datum	% Lebende Zellen	% IgG+
05.10.2010	93,22	38,39
08.10.2010	91,07	14,88
18.10.2010	87,43	7,08
21.10.2010	91,06	9,03
17.11.2010	96,96	71,68
08.12.2010	96,81	5,36
Mittelwert		24,40
Standardabweichung		26,16

BNP- 13

Datum	% Lebende Zellen	% IgG+
17.11.	93,08	61,98
15.12.	97,71	47,26
15.12.	97,94	44,59
15.12.	98,36	54,22
08.12.	96,67	19,88

Mittelwert	45,59
Standardabweichung	15,87

BNP- 14

Datum	% Lebende Zellen	% IgG+
05.10.2010	93,00	55,08
08.10.2010	83,45	30,38
18.10.2010	87,92	43,64
21.10.2010	90,32	29,04
26.10.2010	90,35	47,57

Mittelwert	41,14
Standardabweichung	11,23

4.2 Bindung an MDBK-Zellen

BNP- 1

Datum	% Lebende Zellen	% IgG+
05.10.2010	87,26	76,29
08.10.2010	82,83	64,48
18.10.2010	77,22	13,36
26.10.2010	94,19	99,10
04.11.2010	94,45	52,96
17.11.2010	96,68	61,22
01.12.2010	97,61	36,72
01.12.2010	97,30	23,59
07.12.2010	96,90	79,54
07.12.2010	96,63	77,81
Mittelwert		58,51
Stanardabweichung		27,05

BNP- 2

Datum	% Lebende Zellen	% IgG+
05.10.2010	91,86	43,35
08.10.2010	79,78	23,87
18.10.2010	77,38	7,17
17.11.2010	97,09	22,86
01.12.2010	96,89	5,62
01.12.2010	97,29	3,05
07.12.2010	97,46	50,94
07.12.2010	96,27	51,13
Mittelwert		26,00
Stanardabweichung		20,23

BNP- 3

Datum	% Lebende Zellen	% IgG+
17.11.2010	97,46	6,99
15.12.2010	90,76	2,17
15.12.2010	87,69	4,24
15.12.2010	91,71	1,70
15.12.2010	90,29	1,21
Mittelwert		3,26
Stanardabweichung		2,38

BNP- 4

Datum	% Lebende Zellen	% IgG+
05.10.2010	89,72	57,11
08.10.2010	81,83	28,34
18.10.2010	77,00	7,39
17.11.2010	96,96	48,55
01.12.2010	97,08	11,26
01.12.2010	97,21	10,09
Mittelwert		27,12
Stanardabweichung		21,41

BNP- 5

Datum	% Lebende Zellen	% IgG+
26.10.2010	93,23	91,63
17.11.2010	96,95	42,72
01.12.2010	97,59	38,59
01.12.2010	97,72	31,15
07.12.2010	96,94	55,60
07.12.2010	97,02	57,07
Mittelwert		52,79
Stanardabweichung		21,48

BNP- 6

Datum	% Lebende Zellen	% IgG+
5.10.	89,61	63,46
8.10.	76,16	39,35
18.10.	77,74	7,69
17.11.	97,41	49,87
1.12.	97,81	12,21
1.12.	98,12	12,46
7.12.	95,34	49,49
7.12.	97,25	56,01
Mittelwert		36,32
Stanardabweichung		22,24

BNP- 7

Datum	% Lebende Zellen	% IgG+
05.10.2010	90,07	79,19
08.10.2010	82,71	75,06
18.10.2010	76,53	42,08
26.10.2010	91,98	97,04
04.11.2010	92,19	55,94
01.12.2010	98,55	50,42
07.12.2010	96,85	56,41
07.12.2010	97,13	71,46
Mittelwert		65,95
Stanardabweichung		17,96

BNP- 8

Datum	% Lebende Zellen	% IgG+
05.10.2010	90,49	80,51
08.10.2010	73,55	51,37
18.10.2010	74,24	40,14
26.10.2010	92,25	27,53
04.11.2010	92,47	59,77
17.11.2010	96,46	55,41
01.12.2010	97,55	38,81
01.12.2010	97,26	40,59
07.12.2010	96,03	76,34
07.12.2010	97,24	61,96
Mittelwert		53,24
Stanardabweichung		17,01

BNP- 9

Datum	% Lebende Zellen	% IgG+
05.10.2010	90,49	65,79
08.10.2010	77,27	43,54
18.10.2010	76,96	30,12
01.12.2010	97,59	16,73
01.12.2010	97,80	17,30
07.12.2010	97,32	74,14
07.12.2010	97,33	61,75
Mittelwert		44,20
Stanardabweichung		23,62

BNP- 10

Datum	% Lebende Zellen	% IgG+
05.10.2010	88,33	69,77
08.10.2010	80,36	68,32
18.10.2010	77,17	33,74
17.11.2010	97,66	65,11
01.12.2010	97,37	23,51
01.12.2010	97,50	34,44
Mittelwert		49,15
Stanardabweichung		20,78

BNP- 11

Datum	% Lebende Zellen	% IgG+
26.10.	91,31	28,93
4.11.	91,71	38,28
17.11.	97,42	42,92
1.12.	97,06	39,31
1.12.	97,57	34,49
7.12. Platte 1	97,43	74,68
7.12. Platte 1	97,12	63,26
7.12. Platte 2	98,59	82,54
7.12. Platte 2	98,18	77,36
Mittelwert		53,53
Stanardabweichung		20,82

BNP- 12

Datum	% Lebende Zellen	% IgG+
05.10.2010	88,41	62,49
08.10.2010	82,69	46,83
18.10.2010	77,75	30,32
17.11.2010	97,49	43,62
01.12.2010	98,24	24,17
01.12.2010	97,40	17,13
07.12.2010	97,69	61,66
07.12.2010	97,35	58,19
Mittelwert		43,05
Stanardabweichung		17,56

BNP- 13

Datum	% Lebende Zellen	% IgG+
17.11.2010	97,38	55,37
01.12.2010	98,57	50,46
07.12.2010	97,27	74,30
07.12.2010	97,58	70,97
07.12.2010	97,18	57,79
07.12.2010	97,29	52,68
Mittelwert		60,26
Stanardabweichung		9,95

BNP- 14

Datum	% Lebende Zellen	% IgG+
05.10.2010	91,14	83,75
08.10.2010	82,54	84,42
18.10.2010	77,04	32,88
26.10.2010	90,86	10,51
04.11.2010	92,45	42,44
Mittelwert		50,80
Stanardabweichung		32,52

X. Danksagung

Zum Schluss möchte ich all denjenigen danken, die mich in der Entstehung dieser Arbeit unterstützt haben:

Herrn Prof. Dr. Mathias Büttner danke ich für die vielfältigen Weiterbildungsmöglichkeiten, für die stetige Unterstützung und Beratung in allen Fragen und für die Möglichkeit, dieses hochinteressante Thema bearbeiten zu dürfen.

Herrn Prof. Dr. Rüdiger Wanke danke ich für seine Betreuung als Doktorvater.

Dem Bayerischen Staatsministerium für Umwelt und Gesundheit danke ich für die Finanzierung dieser Arbeit.

Prof. Dr. Dirk Werling hat mir meine unzähligen Fragen zur Durchflusszytometrie geduldig beantwortet und mich beraten. Dafür danke ich ihm herzlich.

Bei Dr. Annette Friedrich möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit bedanken.

Bei Dr. Stefan Nüske bedanke ich mich herzlich für alle zur Verfügung gestellten Proben.

Ein großes Dankeschön möchte ich allen Mitarbeitern des LGL aussprechen, die mich während meiner Arbeit dort immer und in allen Fragen unterstützt haben. Dies gilt vor allem für Heike Lang, Susi Gellert, Birgit von Kölle-Braun, Dr. Frank Just, Dr. Antonie Neubauer-Juric, Dr. Nicholas Schramek und Dr. Hendrik Preuß. Ebenfalls ein besonderes Dankeschön gebührt neben Dr. Angela Hafner-Marx auch den Mitarbeitern der Pathologie für die Überlassung der Organproben von BNP- und Kontrollkälbern. Katharina Schneider danke ich herzlich für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Daten.

Bei Steffi möchte ich mich für die tolle Zusammenarbeit und den Beistand in guten wie in schlechten Zeiten bedanken.

Meiner Familie, meinen Freunden und meinem Freund Max danke ich für die unermüdliche Unterstützung und für den seelischen Beistand in den letzten Jahren.