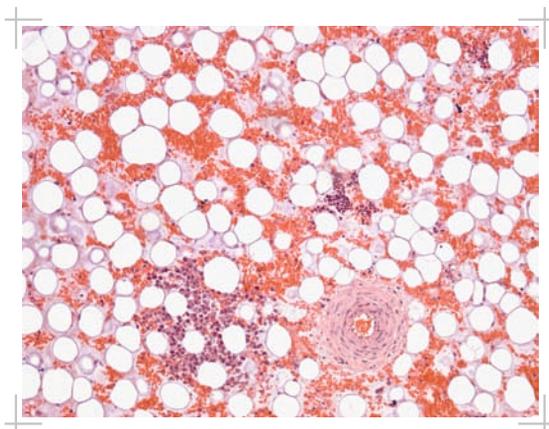


IMMUNHISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR BOVINEN NEONATALEN PANZYTOPENIE

KRYSTYNA SIUDAK



Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2015

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1st Edition 2015

© 2015 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Pathologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. M. Reinacher

**IMMUNHISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR
BOVINEN NEONATALEN PANZYTOPENIE**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Krystyna Siudak

Tierärztin aus Bocholt

Gießen 2015

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. M. Kramer

Gutachter: Prof. Dr. M. Reinacher
Prof. Dr. K. Doll

Tag der Disputation: 17. April 2015

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze der wissenschaftlichen Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus -Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Das Projekt war ein Teilprojekt des durch das Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) finanzierten Verbundprojekts „Ursachenermittlung der bei Kälbern auftretenden hämorrhagischen Diathese (Bovine Neonatale Panzytopenie)“.

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|------------|--|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 2 | Literaturübersicht | 3 |
| 2.1 | Literatur zur Bovinen Neonatalen Panzytopenie (BNP) | 3 |
| 2.1.1 | Klinisches Bild | 3 |
| 2.1.2 | Hämatologie | 4 |
| 2.1.3 | Ätiologie..... | 5 |
| 2.1.3.1 | Hereditär | 5 |
| 2.1.3.2 | Toxisch..... | 6 |
| 2.1.3.3 | Bovine Virusdiarrhoe (BVD)..... | 7 |
| 2.1.3.4 | Blauzungenvirus | 7 |
| 2.1.4 | Epidemiologie | 8 |
| 2.1.5 | Assoziation der BNP mit dem Impfstoff PregSure [®] BVD..... | 9 |
| 2.1.6 | Alloantikörper im Serum von Blutermutterkühen | 10 |
| 2.1.7 | Kolostrum-Assoziation..... | 11 |
| 2.1.8 | Pathohistologische Befunde | 12 |
| 2.1.8.1 | Befunde am Knochenmark | 12 |
| 2.1.8.2 | Weitere Befunde | 13 |
| 2.2 | Knochenmark | 14 |
| 2.2.1 | Knochenmarkveränderungen | 15 |
| 2.2.2 | Interpretation von HE-gefärbten Knochenmarkgewebeschnitten | 15 |
| 2.3 | Histologie und Immunhistologie | 16 |
| 2.3.1 | Gewebefixierung | 16 |
| 2.3.1.1 | Formalin-Fixierung | 17 |
| 2.3.1.2 | HOPE [®] -Fixierung | 18 |
| 2.3.2 | Antikörper für die Immunhistologie | 19 |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|------------|---|-----------|
| 2.3.2.1 | Immunglobulin G (IgG)..... | 19 |
| 2.3.2.2 | Gewinnung von IgG..... | 19 |
| 3 | Material und Methoden..... | 21 |
| 3.1 | Untersuchungsmaterial..... | 21 |
| 3.1.1 | Material zur Gewinnung und Herstellung der gebrauchsfertigen Antikörperlösung..... | 21 |
| 3.1.2 | Gewebeproben..... | 23 |
| 3.1.2.1 | Proben von Kälbern der Serumübertragungsstudie | 23 |
| 3.1.2.2 | Untersuchungsmaterial aus dem Sektionsgut | 24 |
| 3.1.3 | Madin Darby Bovine Kidney-Zellen (MDBK-Zellen) | 25 |
| 3.2 | Herstellung der Gewebeblöcke | 25 |
| 3.2.1 | Herstellung von paraffineingebetteten Gewebeblöcken aus Formalin-fixiertem Material..... | 26 |
| 3.2.2 | Herstellung von paraffineingebetteten Gewebeblöcken aus HOPE [®] -fixiertem Material..... | 26 |
| 3.2.2.1 | HOPE [®] -fixierte Gewebeproben | 26 |
| 3.2.2.2 | HOPE [®] -fixierte Leukozyten | 27 |
| 3.3 | Anfertigung histologischer Schnitte | 28 |
| 3.3.1 | Anfertigung von Formalin-fixierten Gewebeschnitten | 28 |
| 3.3.2 | Anfertigung von HOPE [®] -fixierten Schnitten..... | 28 |
| 3.4 | Antikörper für die immunhistologischen Untersuchungen..... | 29 |
| 3.4.1 | Seren..... | 29 |
| 3.4.1.1 | Gewinnung der IgG-Fraktion aus Kolostrum und Serum..... | 29 |
| 3.4.1.1.1 | Antikörpergewinnung aus Kolostrum | 30 |
| 3.4.1.1.2 | Antikörpergewinnung aus Serum | 33 |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|------------|---|-----------|
| 3.4.1.2 | Umpufferung der gewonnenen IgG-Fraktion | 33 |
| 3.4.1.3 | Proteinkonzentrationsmessungen mittels Photometrie | 33 |
| 3.4.1.4 | Kopplung der IgG-Antikörper zum immunhistologischen Nachweis | 34 |
| 3.4.1.5 | Adsorption von Antikörpern an Blutpulver | 37 |
| 3.4.1.5.1 | Herstellung von Blutpulver | 37 |
| 3.4.1.5.2 | Adsorption der HRP-markierten Antikörper an Blutpulver | 38 |
| 3.4.2 | Sekundärantikörper | 39 |
| 3.5 | Immunhistologie | 39 |
| 3.5.1 | Indirekter immunhistologischer Nachweis der Bindung von Alloantikörpern an MDBK-Zellen | 39 |
| 3.5.2 | Direkter immunhistologischer Nachweis der Bindung von Alloantikörpern an MDBK-Zellen..... | 41 |
| 3.5.3 | Immunhistologischer Nachweis der Bindung von Alloantikörpern am Gewebeschnitt mittels adsorbierten, HRP-markierten Antikörpern | 43 |
| 3.5.3.1 | Entparaffinierung und Rehydrierung | 43 |
| 3.5.3.1.1 | Entparaffinierung und Rehydrierung von Formalin-fixierten Gewebeschnitten..... | 43 |
| 3.5.3.1.2 | Entparaffinierung und Rehydrierung von HOPE [®] -fixierten Gewebeschnitten..... | 43 |
| 3.5.3.2 | Immunhistologische Untersuchung an Gewebeschnitten | 43 |
| 3.5.4 | Untersuchung zum Auftreten von Zellen mit positiver, jedoch granulärer zytoplasmatischer Reaktion in der Milz..... | 44 |
| 3.6 | Beurteilung und Auswertung der Immunhistologie | 45 |
| 3.6.1 | Nachweis der gebundenen Antikörper | 45 |
| 3.6.1.1 | Nachweise der gebundenen Antikörper an MDBK-Zellen..... | 45 |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|------------|---|-----------|
| 3.6.1.2 | Nachweise der gebundenen Antikörper an Gewebeschnitten..... | 46 |
| 3.6.1.2.1 | Auswertung der immunhistologischen Untersuchungen | 46 |
| 3.6.1.3 | Nachweis der gebundenen Antikörper an Leukozyten | 46 |
| 3.7 | Beurteilung der HE-gefärbten Gewebeschnitte | 47 |
| 3.8 | Statistische Analyse | 48 |
| 4 | Ergebnisse | 50 |
| 4.1 | Makroskopische und histologische Sektionsbefunde der Studienkälber | 50 |
| 4.2 | Histopathologische Untersuchungen an HE-gefärbten Schnitten des Knochenmarks | 52 |
| 4.2.1 | Anzahl der Fettzellen im Röhrenknochenmark..... | 54 |
| 4.2.2 | Erythropoese im Röhrenknochenmark..... | 56 |
| 4.2.3 | Leukopoese im Röhrenknochenmark..... | 57 |
| 4.2.4 | Thrombopoese im Röhrenknochenmark | 59 |
| 4.2.5 | Veränderung der Zellzahlen bei den Einzeltieren | 60 |
| 4.2.6 | Vergleich von Röhrenknochenmark mit spongiossem Mark | 65 |
| 4.2.7 | Besonderheiten bei der Untersuchung von HE-gefärbten Knochenmarkschnitten..... | 68 |
| 4.3 | Etablierung der Methode einer immunhistologischen Untersuchung | 69 |
| 4.3.1 | Messergebnisse zur Proteinkonzentrationsbestimmung mittels der Photometrie | 69 |
| 4.3.2 | Nachweis der Kopplung von Peroxidase an die IgG-Antikörper mittels Gelelektrophorese..... | 70 |
| 4.3.3 | Auswahlkriterien bezüglich der HOPE [®] -Methode | 71 |
| 4.3.4 | Ermittlung der Gebrauchsverdünnung der Peroxidase-gekoppelten Antikörperlösungen..... | 71 |

| | |
|--|-----------|
| 4.4 Immunhistologische Untersuchungen | 72 |
| 4.4.1 Untersuchungen zur Bindung der Alloantikörper an MDBK-Zellen..... | 72 |
| 4.4.1.1 Indirekter Nachweis der Bindung von Alloantikörpern an MDBK-Zellen | 72 |
| 4.4.2 Immunhistologische Untersuchungen zur Bindung der Alloantikörper an Gewebeschnitten und Leukozyten | 74 |
| 4.4.2.1 Untersuchungen zur Bindung der Alloantikörper an Knochenmarkgewebe..... | 74 |
| 4.4.2.1.1 Untersuchungen zur Bindung der Alloantikörper an Knochenmarkgewebe der Studienkälber | 74 |
| 4.4.2.1.2 Untersuchungen zur Bindung der Alloantikörper an Knochenmarkgewebe von 10 Kälbern aus dem Sektionsgut | 76 |
| 4.4.2.1.3 Untersuchungen zur Bindung der Alloantikörper an Knochenmarkgewebe von Kälbern mit spontaner BNP..... | 77 |
| 4.4.2.2 Untersuchungen zur Bindung der Alloantikörper an Thymus-, Milz-, Leber- und Nierengewebe von Studienkälbern | 77 |
| 4.4.2.3 Untersuchungen zur Bindung der Alloantikörper an aus dem Blut isolierte Leukozyten..... | 79 |
| 4.4.3 Merkmale der immunhistologisch positiven Zellen und weitere Beobachtungen | 79 |
| 4.4.4 Negativkontrollen der immunhistologischen Untersuchungen | 81 |
| 5 Diskussion | 82 |
| 5.1 Sektionsbefunde der Studienkälber..... | 82 |
| 5.2 Ergebnisse der Untersuchungen an Gewebe | 84 |
| 5.2.1 Ergebnisse der HE-gefärbten Knochenmarkschnitte der Studienkälber | 84 |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|------------|--|------------|
| 5.2.1.1 | Semiquantitative Auswertung der HE-gefärbten Knochenmarkschnitte..... | 84 |
| 5.2.1.2 | Zusätzliche Ergebnisse der HE-gefärbten Knochenmarkschnitte..... | 88 |
| 5.2.2 | Immunhistologie..... | 89 |
| 5.2.2.1 | Nachweis von "BNP-Antigen" an MDBK-Zellen | 90 |
| 5.2.2.2 | Nachweis von "BNP-Antigen" in Knochenmarkschnitten und an isolierten Leukozyten aus dem Blut | 90 |
| 5.2.2.3 | Ergebnisse in anderen Gewebeschnitten..... | 95 |
| 5.3 | Eignung der angewandten Methode | 96 |
| 5.3.1 | Probenmaterial | 96 |
| 5.3.2 | Fixierung | 99 |
| 5.4 | Bedeutung der Erkenntnisse für die Pathogenese der BNP | 100 |
| 6 | Zusammenfassung / Summary..... | 103 |
| 6.1 | Zusammenfassung..... | 103 |
| 6.2 | Summary | 106 |
| 7 | Literaturverzeichnis | 108 |
| 8 | Anhang | 117 |
| 8.1 | Tabellen..... | 117 |
| 8.2 | Lösungen, Puffer, Bezugsquellen..... | 128 |
| 8.2.1 | Lösungen und Puffer | 128 |
| 8.2.2 | Bezugsquellen für Chemikalien und Geräte..... | 130 |
| 9 | Abkürzungsverzeichnis | 133 |

1 Einleitung

Seit 2007 wird bei neugeborenen Kälbern vermehrt ein außergewöhnliches Krankheitsbild beobachtet, welches sich vor allem durch klinisch eindrucksvolle Blutungen, insbesondere in subkutanen Lokalisationen, äußert. Diese trugen dem Krankheitsbild beziehungsweise den betroffenen Tieren in reißerischen Zeitungsartikeln Namen wie „Bluterkälber“, „Bleeding Calf Syndrome“ und „Blutschwitzerkälber“ ein, wobei sich letztendlich in der Wissenschaft der Begriff der „Bovinen Neonatalen Panzytopenie“ (BNP) durchsetzte.

Anfangs waren sowohl die Ätiologie als auch die Pathogenese der Erkrankung völlig unklar. Erst durch grundlegende Ergebnisse einzelner Forschungsgruppen konnten nach und nach Erkenntnisse in dieser Hinsicht gewonnen werden. So wurde zum Beispiel eine auffällige Verbindung zu PregSure® BVD-geimpften Tieren festgestellt, aufgrund derer sich schnell die Gewissheit einer impfungsbedingten Ätiologie herauskristallisierte. PregSure® BVD, ein Impfstoff gegen die bovine Virusdiarrhoe der Firma Pfizer, wurde aufgrund einer Entscheidung der Zulassungsbehörde (EMA/434219/2010) im April 2010 schließlich vom Markt genommen. Es zeigte sich, dass Alloantikörper, welche vereinzelte Kühe als Reaktion im Verlauf einer Impfung mit PregSure® BVD gebildet hatten, über das Kolostrum an Kälber weitergegeben wurden, welche daraufhin in einigen Fällen mit den typischen Merkmalen der BNP-Erkrankung auffielen.

Ein zentrales Leitsymptom, welches mitunter für die massiven Blutungen mitverantwortlich gemacht wird, stellt eine histologisch nachgewiesene Panmyelophthase des Knochenmarks bei den betroffenen Kälbern dar. Es ist daher zu vermuten, dass sich die Zielzellen dieser induzierten Alloantikörper hauptsächlich im Knochenmark befinden. Bisher sind die Antigene noch unbekannt und die wenigen Forschungsergebnisse auf diesem Gebiet bisher überwiegend eher spekulativ.

Einleitung

Ziel dieser Arbeit war es, die Bindung von maternalen, BNP-spezifischen Antikörpern an Zellen von Kälbern im Gewebeschnitt, insbesondere im Knochenmark, mittels eines immunhistologischen Verfahrens darzustellen.

Hierfür galt es sowohl eine geeignete Methode zur Gewinnung der Antikörper zu etablieren, als auch ein immunhistologisches Protokoll zu erstellen, mit dem ein Nachweis solcher Antikörperbindungen im Gewebeschnitt möglich ist. Im Hinblick auf das Erkrankungsgeschehen der BNP sollte somit mittels der immunhistologischen Untersuchungen eine Bindung von Alloantikörpern an Knochenmarkzellen bestätigt werden und möglichenfalls eine nähere Charakterisierung der Zielzellen erfolgen, welche eine wichtige Rolle im Rahmen der Pathogenese spielen.

2 Literaturübersicht

2.1 Literatur zur Bovinen Neonatalen Panzytopenie (BNP)

In mehreren europäischen Ländern wurden von Tierärzten und Tierhaltern seit 2007 vermehrt Fälle von Kälbern mit erhöhter Blutungsneigung, sogenannten „Blutschwitzern“, berichtet (Friedrich et al., 2009c; Kappe et al., 2010). Etwa 2 Jahre später, im Dezember 2009, kamen Tierärzte für einen Wissensaustausch und die Diskussion bisheriger Erkenntnisse über dieses Erkrankungsgeschehen in Marseille zu einem Satellite Symposium unter dem Thema „Haemorrhagic Diathesis in Calves“ zusammen. Die vorherigen Bezeichnungen des Syndroms wie „haemorrhagic diathesis“, „bleeding calf syndrome“ oder im deutschsprachigen Raum auch „Blutschwitzen“ wurden durch den einheitlichen Fachbegriff „Bovine Neonatale Panzytopenie“ (BNP) ersetzt (Friedrich et al., 2011). Um die Erkrankung von ähnlichen Krankheitsbildern abzugrenzen, wurden Kriterien zur sicheren Diagnosestellung einer BNP definiert. Demnach war ein Kalb erst erkrankt, wenn folgende Aussagen zutrafen (Friedrich et al., 2009a):

1. Das Kalb ist nicht älter als 4 Wochen
2. Es besteht eine erhöhte Blutungsneigung
3. Hämatologisch sind Blutbildveränderungen in Form einer Thrombozytopenie ($< 200 \text{ G/l}$) und Leukopenie ($< 4 \text{ G/l}$) nachzuweisen
4. Es bestehen keine Anzeichen einer Septikämie
5. Antigen des Bovinen Virusdiarrhoe Virus (BVD) wurde bei dem betroffenen Tier nicht nachgewiesen
6. Histologisch zeigt das Knochenmark eine Panmyelophthise

Betroffene Tiere waren sowohl weiblichen als auch männlichen Geschlechts und gehörten unterschiedlichen Rassen an, eine Prädisposition in dieser Hinsicht konnte nicht festgestellt werden (Assad et al., 2012; Ballingall, 2011; Kappe et al., 2010; Witt et al., 2011).

2.1.1 Klinisches Bild

Eine klinische Symptomatik der Erkrankung trat bei betroffenen Tieren erst nach bereits länger bestehender Zytopenie auf und manifestierte sich im Durchschnitt um den 14. Lebenstag (Friedrich et al., 2011; Friedrich et al., 2009c). Von einer Beeinflussung des klinischen Bildes durch unterschiedliche Variablen, wie beispielsweise der Zeitpunkt der Kolostrumaufnahme,

das Kolostrum-Management oder die Menge des aufgenommenen Kolostrums, ist dabei grundsätzlich auszugehen.

Primär zeigten die Kälber eine deutlich gesteigerte Blutungsneigung, welche sich insbesondere in der Form von Hautblutungen, Petechien auf Schleimhäuten und Melaena äußerte (Friedrich et al., 2009c). Solche Hautblutungen waren vor allem im Bereich der Augen und Ohren, am Rücken und an den distalen Gliedmaßen lokalisiert und vermutlich spontan durch Insektenstiche oder aber auch iatrogen über Injektionen verursacht worden (Friedrich et al., 2009c; Pardon et al., 2010).

Etwa 65 % der klinisch erkrankten Kälber wiesen zudem Fieber von bis zu 41,8 °C auf, welches trotz vielfältiger therapeutischer Maßnahmen in auffälliger Weise unverändert bestehen blieb. Im späteren Verlauf der Erkrankung war das Allgemeinbefinden der Tiere hochgradig gestört und viele Kälber entwickelten zusätzliche, entzündliche Begleiterkrankungen wie beispielsweise Durchfall, Pneumonien und Nabelentzündungen (Friedrich et al., 2009c; Henniger et al., 2014). In Relation zur Anzahl neugeborener Kälber betrachtet ist die Morbiditätsrate verhältnismäßig niedrig bei etwa 5 % anzusetzen, wohingegen die Mortalitätsrate nach einer klinischen BNP-Erkrankung einen sehr hohen Wert von bis zu 90 % erreichen kann (Kappe et al., 2010; Pardon et al., 2011; Penny et al., 2009). Die Mehrheit der Tiere verstirbt demnach recht schnell innerhalb von 5 Tagen nach dem Auftreten der ersten Symptome an den Folgen des Blutverlustes oder Sekundärinfektionen (Friedrich et al., 2009c; Pardon et al., 2010).

2.1.2 Hämatologie

Blutbilder von BNP-Kälbern zeigten hämatologisch auffällige Veränderungen mehrerer Zelltypen. So war vor allem ein massiver Abfall der Blutplättchen (Thrombozytopenie) und der weißen Blutkörperchen (Leukopenie) zu beobachten, wobei die Thrombozytopenie schon wenige Stunden nach der Kolostrumaufnahme in Erscheinung trat (Bell et al., 2013; Friedrich et al., 2011; Friedrich et al., 2009c; Pardon et al., 2010).

Wurden die einzelnen Leukozytenzahlen genauer im Leukogramm betrachtet, so zeichnete sich zumeist spezifisch eine starke Neutropenie im Differentialblutbild ab, während die Lymphozyten nahezu unverändert waren (Assad et al., 2012; Penny et al., 2009). Pardon et al. (2010) berichteten hingegen in ihrer Studie von einer geringeren Anzahl aller Leukozytenpopulationen im Blut; demnach war auch die Monozytenanzahl bei ihren hämatologischen Untersuchungen ebenso wie die Anzahl der Granulozyten und Lymphozyten erniedrigt.

Darüber hinaus wurden teilweise auch Veränderungen bezüglich der Erythrozytenzahlen berichtet, deren Ausprägungen mit hoher Wahrscheinlichkeit von dem Ausmaß der vorangegangenen Blutungen abhängig waren und sich klinisch in Form von deutlichen, nicht-regenerativen Anämien bei den betroffenen Tieren äußerten (Henniger et al., 2014; Krappmann et al., 2011; Pardon et al., 2010; Penny et al., 2009).

In einigen Studien wurden zudem Messungen der partiellen Thromboplastinzeit (PTT), welche Aufschluss über die Funktionsleistung des intrinsischen Gerinnungssystems gibt, erhoben. Während Krappmann et al. (2011) im Vergleich zu Messungen bei gesunden Kälbern (bis 33 Sekunden) wesentlich verlängerte Werte von bis zu 82 Sekunden PTT feststellten, beobachteten Penny et al. (2009) jedoch keine Veränderungen bezüglich dieses Parameters, so dass die Ergebnisse hinsichtlich einer möglicherweise vorliegenden, gestörten intrinsischen Gerinnung divergieren.

Bei der biochemischen Blutanalyse war in der Mehrheit der Fälle lediglich eine Hypoproteinämie feststellbar, welche vermutlich auf einen Proteinverlust durch die Blutungen zurückzuführen war (Pardon et al., 2010). Einige Kälber im entsprechenden Alter bis zu einem Monat hatten zwar verdächtig niedrige Thrombozyten- und Leukozytenzahlen unterhalb der physiologischen Referenzwerte, zeigten auf der anderen Seite aber keine klinische Blutungssymptomatik. In solchen Fällen wurde häufig von einer vorliegenden, subklinischen Form der BNP ausgegangen (Henniger et al., 2014; Witt et al., 2011).

2.1.3 Ätiologie

Zu Beginn der Erforschung der BNP gab es verschiedene Untersuchungsansätze im Hinblick auf eine mögliche Ursache der Erkrankung. So wurde auf Erbdefekte, toxische Substanzen und Virusinfektionen hin untersucht, welche bekannter- und erwiesenermaßen zu Blutungen und somit zu einem ähnlichen klinischen Bild wie das einer BNP führen konnten.

2.1.3.1 Hereditär

Anfangs gab es keine Anzeichen auf eine beeinflussende genetische Komponente, welche bei der Pathogenese der BNP eine Rolle spielen würde (Kappe et al., 2010).

So wurde zum Beispiel auf einen bei Holstein-Rindern in Europa bekannten Mangel an Gerinnungsfaktor XI untersucht, welcher durch die Insertion eines 76 bp-Segments in das Exon 12 des Faktor XI-Gens und einem darauffolgendem Einbau eines Stopcodons hervorgerufen

wird und ebenso wie eine BNP klinisch eine gesteigerte Blutungsneigung als Konsequenz verursacht (Brush et al., 1987). Untersuchungen auf diesen Defekt mittels einer Genotypisierung verliefen letztendlich alle mit einem negativen Ergebnis, so dass diesbezüglich kein Zusammenhang ersichtlich war (Krappmann et al., 2011).

Andererseits zeichneten sich im Verlauf weiterer Studien doch deutliche Hinweise auf eine genetische Beteiligung an dem Krankheitsgeschehen ab. Nach einer langwierigen Erstellung von F2-Kreuzungstieren zeigte sich eine familiären Häufung von BNP-Kälbern bei einem spezifischen Pedigree, obwohl ein einfacher Vererbungsweg des BNP-Phenotyps in Anbetracht weiterer Untersuchungen auf der Basis von Daten und Stammbaumanalysen ausgeschlossen werden konnte (Demasius et al., 2014; Krappmann et al., 2011). Deutskens et al. (2011) vermuteten in diesem Zusammenhang als genetisch beeinflussenden Faktor eine von der paternalen Seite vererbte ähnliche MHC I-Konstellation wie sie auf Madin Darby Bovine Kidney (MDBK)-Zellen vorkommt und betonten in ihrer Studie eine für die Erkrankung notwendige Kombination von ausgeprägten MHC I-Allelen zwischen Muttertier und Kalb.

2.1.3.2 Toxisch

Unterschiedliche Toxine können Schädigungen ähnlich dem Erkrankungsbild einer BNP im Organismus erzeugen. Von einigen Medikamenten ist beispielsweise bekannt, dass sie unerwünschte Nebenwirkungen in Form von Knochenmarkschäden mit darauffolgender Panzytopenie verursachen können (Lohrmann, 1984; Watson et al., 1980). Beim Rind existieren hier Berichte über die Antibiotika Sulfamethazin, Furazolidon und Chloramphenicol, welche zur Panzytopenie und hämorrhagischen Diathese aufgrund einer Panmyelophthase des Knochenmarks führen können (Ammann et al., 1996; Hofmann et al., 1974; Jorna and Postema, 1986).

Ebenfalls vermögen zum Beispiel auch Trichothecen, ein Mykotoxin, oder auch Dichlorovinylcysteine (DVCV)-Metaboliten, die beispielsweise bei der Herstellung von Sojamehl entstehen, Knochenmarkschäden und damit abnormale Zellzahlen im peripheren Blutsystem zu verursachen (Lock et al., 1996; Parent-Massin, 2004). Keine dieser bekannten, toxischen Substanzen konnte in den bisherigen Studien nachgewiesen werden, wobei eine Intoxikation durch ein bisher unbekanntes Agens als Auslöser der BNP von vornherein grundsätzlich nicht auszuschließen war (Friedrich et al., 2009c; Kappe et al., 2010).

2.1.3.3 Bovine Virusdiarrhoe (BVD)

Der Erreger der Bovinen Virusdiarrhoe zählt wie das klassische Schweinepestvirus zu dem Genus Pestivirus innerhalb der Familie der Flaviviridae. Dieses Virus ist ein weltweit verbreitetes, behülltes, einzelsträngiges RNA-Virus, welches einerseits bereits intrauterin auf das Kalb übertragen werden kann, andererseits jedoch auch akute Infektionen in immunkompetenten Kälbern und auch älteren Tieren auszulösen vermag (Becher et al., 2002; Corapi et al., 1989). Zwei Genotypen sind bekannt (Pellerin et al., 1994). Akute Krankheitsfälle, insbesondere wenn sie vom Genotyp 2 verursacht werden, können sich klinisch mit ähnlicher Symptomatik einer hämorrhagischen Diathese wie bei einer BNP-Erkrankung äußern (Corapi et al., 1989; Hamers et al., 2000). Hämatologisch sind 4-8 Tage nach der Infektion Lymphopenie, Neutropenie, Anämie und Thrombozytopenie festzustellen, wobei die geringe Anzahl der Blutplättchen die markanteste Blutbildveränderung darstellt. Der Wert an sich kann jedoch auch sehr individuell von Kalb zu Kalb unterschiedlich sein. Im Knochenmark eines an BVD erkrankten Kalbes zeigt sich abweichend zur BNP eine Hyperplasie der Megakaryozyten (Corapi et al., 1989). Diese reaktive Veränderung im hämatopoetisch aktiven Mark erklärt die schnelle Erholung der zuvor abgesunkenen Blutplättchenwerte und weist gleichzeitig deutlich auf einen virusinduzierten, lytischen Prozess in der Peripherie hin (Corapi et al., 1989; Spagnuolo et al., 1997). Eine spezifische Erkrankungsursache des Knochenmarks, wie es bei der BNP der Fall zu sein scheint, liegt demnach nicht vor.

Alle Nachweisversuche von Pestivirusgenom mittels PCR waren bisher bei BNP-Kälbern negativ, so dass ein Bezug zu einer Infektion mit dem BVDV ausgeschlossen werden konnte (Bell et al., 2010a; Friedrich et al., 2009c; Pardon et al., 2010; Penny et al., 2009; Witt et al., 2011).

2.1.3.4 Blauzungenvirus

Aufgrund der Tatsache, dass seit 2006 vermehrt Erkrankungen durch Infektionen mit dem Blauzungenvirus (BTV) in Mitteleuropa beobachtet wurden, galt es einen Zusammenhang mit den aufgetretenen BNP-Fällen auszuschließen (Toussaint et al., 2006). Aus diesem Grund wurden betroffene Tiere mittels PCR auf das Virusgenom untersucht, wobei dieses in keinem einzigen Fall nachgewiesen werden konnte (Friedrich et al., 2009c; Pardon et al., 2010). Ebenfalls war nicht von einer Assoziation zu der verpflichtenden Impfung gegen das BTV im Jahre 2008 auszugehen, da bereits in dem Jahr vor den ersten Impfungen Fälle von BNP auftraten (Pardon et al., 2010).

2.1.4 Epidemiologie

Retrospektive Beobachtungen lassen auf ein sporadisches Auftreten von Einzelfällen vor dem Jahr 2007 schließen (Ballingall, 2011; Friedrich et al., 2009c). Innerhalb Deutschlands fiel jedoch erst im Jahre 2007 zunächst im Bundesland Bayern ein vermehrtes Auftreten von jungen Kälbern mit Anzeichen einer hämorrhagischer Diathese auf, woraufhin es zeitnah zu gleichartigen Beobachtungen in anderen Bundesländern kam (Kasonta et al., 2012). Darauf folgend wurden auch die Nachbarstaaten Deutschlands, wie Belgien und die Niederlande, gefolgt von Frankreich, Großbritannien und weiteren europäischen Staaten auf eigene BNP-Erkrankungsfälle innerhalb ihres Landes aufmerksam (Friedrich et al., 2009c; Kappe et al., 2010; Kasonta et al., 2012). Allerdings waren nicht ausnahmslos alle Staaten in Europa betroffen und so schien es zunächst verwunderlich, dass zum Beispiel die Schweiz, Österreich und Skandinavien keine BNP-Fälle zu verzeichnen hatten (Kasonta et al., 2012). Eine Gemeinsamkeit der letztgenannten Länder konnte indes schnell identifiziert werden: es wurden keine Impfungen gegen das Bovine Virusdiarrhoe-Virus (BVDV) in diesen Staaten durchgeführt, während in den betroffenen Ländern routinemäßig gegen BVD geimpft wurde (Friedrich et al., 2011; Friedrich et al., 2009c; Kasonta et al., 2012).

Inzwischen weist Europa mehr als 4000 registrierte BNP-Fälle auf und allein in Deutschland wurden mehr als 3500 Fälle als Nebenwirkung des Impfstoffes PregSure[®] BVD über das Pharmakovigilanz-System gemeldet, wobei die Anzahl der Meldungen in den Jahren 2011 und 2012 im Vergleich zu den Jahren zuvor abnahm (Bastian et al., 2011; Jones et al., 2013; Kasonta et al., 2012). Die Prävalenzen in den einzelnen Bundesländern und auch in den verschiedenen Staaten waren dabei nicht gleichhoch, beispielsweise wies Niedersachsen im Vergleich zu Bayern eine wesentlich geringere, prozentuale Fallzahl an Neuerkrankungen auf (Kasonta et al., 2012). Hinsichtlich der Betrachtung einer einzelnen Rinderherde ist die Prävalenz grundsätzlich jedoch eher niedrig einzustufen, wobei in wenigen Ausnahmefällen Werte von bis zu 5 % erreicht wurden (Bell et al., 2010b). Hierbei ist anzumerken, dass ein erhöhtes Risiko der wiederholten Geburt eines Bluterkalbes durch dasselbe Muttertier gegeben ist und laut Beobachtungen von Besitzern sogar mehr als 50 % der Mutterkühe mit einem diagnostizierten Bluterkalb im darauffolgenden Jahr wiederum ein solches BNP-Kalb zur Welt gebracht hatten (Friedrich et al., 2011; Pardon et al., 2010).

Was die Muttertiere der BNP-Kälber anbetrifft waren 40 % der Tiere in der Studie von Pardon et al. (2010) Färsen und auch Demasius et al. (2014) berichten von einer annähernd gleichhohen Geburtenrate von Bluterkälbern bei Färsen und Tieren in der zweiten Laktation.

Jones et al. (2013) hingegen stellten in ihrer Studie fest, dass vergleichsweise bei Kühen in der zweiten Laktation oder älter ein erhöhtes Risiko zur Geburt eines Bluterkalbes bestand.

2.1.5 Assoziation der BNP mit dem Impfstoff PregSure[®] BVD

Im Allgemeinen induzieren Vakzinen zelluläre und/oder humorale Immunantworten auf spezifische Antigene (Thulin, 1975). Zur humoralen Immunabwehr gehört insbesondere auch die Bildung von Immunglobulin G (IgG), welches im Muttertier sowohl im Serum als auch parallel dazu im Kolostrum als Reaktion auf eine Impfung oder eine natürliche Interaktion mit einem Antigen spezifisch ansteigt (Wilson et al., 1972). Dabei ist nicht nur der genetische Hintergrund des Wirtes bei einer Impfung wichtig, sondern auch die Zusammensetzung und die Dosis sowohl der Vakzine selbst als auch der Adjuvantien sind entscheidend für eine individuelle Immunantwort (Furuichi and Koyama, 1976; Heriazon et al., 2011; Moingeon et al., 2001; Nakamura and Koyama, 1975; Rothel et al., 1998).

Epidemiologische Studien zeigten, dass bei nahezu sämtlichen Herkunftsbetrieben, bei denen BNP-Fälle aufgetreten waren, im Vorfeld Impfungen der Tiere mit PregSure[®] BVD (Pfizer, Karlsruhe, Deutschland) gegen BVD durchgeführt worden sind bzw. sich zumindest rückblickend eine Verbindung zu dem Impfstoff herstellen ließ (Friedrich et al., 2009c; Kaske et al., 2009; Pardon et al., 2010; Pardon et al., 2011). Berichte von BVDV-ungeimpften Muttertieren waren im Vergleich dazu verschwindend gering (Anonymus, 2011; Jones et al., 2013). Darauf folgende Studien zur These der Alloantikörperbildung durch die Impfung des Mittels PregSure[®] BVD konnten die Vermutung einer Assoziation zwischen der Vakzine und der BNP-Erkrankung zumeist untermauern, insbesondere da ansonsten keine alloreaktiven Immunantworten nach Impfungen mit anderen BVD-Impfstoffen beobachtet werden konnten (Bastian et al., 2011; Deutskens et al., 2011; Friedrich et al., 2011; Lambton et al., 2012; Sauter-Louis et al., 2012).

Grundsätzlich schien weder der Impfzeitpunkt vor der Geburt eine Rolle zu spielen, noch gab es einen haltbaren Zusammenhang bezüglich einer Abhängigkeit im Hinblick auf die erhaltenen Impfdosen-Anzahl (Demasius et al., 2014; Lambton et al., 2012). Obwohl keine direkte Relation zwischen der Menge an gebildeten Alloantikörpern und der Anzahl der Impfungen bestand, so ergaben die Messungen der Antikörper nach wiederholt verabreichten Impfdosen jedoch markante, individuelle Unterschiede bezüglich der gebildeten Alloantikörpertiter bei Kühen (Kasonta et al., 2012).

PregSure[®] BVD kam im Jahr 2005 auf den Markt und enthält laut der Produktinformation neben einem inaktivierten zytopathogenen Stamm BVDV Typ 1, welcher auf Madin Darby Bovine Kidney (MDBK)-Zellen gezogen wurde, als weiteren Hauptbestandteil das Öl-in-Wasser-Adjuvanz-System Procision A[®], welches aus Quil-A, Cholesterol, Amphigen Base und Drakeol 5 besteht (Summary of Product Characteristics, PregSure[®] BVD. <http://www.vmd.gov.uk/ProductInformationDatabase>). Quil A, das inhaltlich aus einer Mischung von Saponinen der Baumrinde von *Quillaja saponaria molina* besteht, bildet mit anderen Komponenten immunstimulierende Komplexe, sogenannte ISCOMS, welche sowohl antigenspezifische Antikörper (IgG₁, IgG₂) als auch eine T-Zell-Antwort (Th1 und Th2) induzieren (Aramaki et al., 1995; Lendemans et al., 2005; Sjolander et al., 1998; Sjolander et al., 1997). Demzufolge riefen die Bestandteile von PregSure[®] BVD in den geimpften Rindern eine langfristige und sehr starke Immunantwort gegen BVDV Typ 1 und aufgrund einer breiten Kreuzneutralisationsaktivität auch gegen den Typ 2 hervor, wobei die PregSure[®] BVD-vakzinierten Tiere deutlich höhere Titer als nicht-immunisierte Tiere und Tiere, welche einen anderen BVD-Impfstoff bekommen hatten, aufwiesen (Raue et al., 2011; Salt, 2004). Mit Hilfe einer Massenspektrometrie und der Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde daraufhin festgestellt, dass der Proteingehalt in der Vakzine im Vergleich zu anderen BVD-Impfstoffen verhältnismäßig hoch war und noch viele Moleküle enthalten waren, welche aus der MDBK-Zelllinie stammten (Euler et al., 2013).

Gegenüber den vielen Millionen verkauften PregSure[®] BVD-Vakzinen gab es statistisch betrachtet nur eine geringe Anzahl an Muttertieren mit klinisch erkrankten BNP-Kälbern, so dass neben dem Impfstoff an sich noch weitere Faktoren bei der Genese der Erkrankung eine beeinflussende Rolle spielen müssen (Bastian et al., 2011; Deuskens et al., 2011).

In Deutschland wurde PregSure[®] BVD schließlich im April 2010 vom Markt genommen (EMA/434219/2010), im Juni 2010 war dann von der Europäischen Kommission das Ruhen der Zulassung für ganz Europa angeordnet worden.

2.1.6 Alloantikörper im Serum von Blutermutterkühen

Eine „Blutermutterkuh“ ist ein weibliches Rind, welches eine Impfgeschichte mit PregSure[®] BVD aufweist und welches mindestens ein nachgewiesenes BNP-Kalb zur Welt gebracht hat. Als „empfindlich“ wurden folglich solche Kälber bezeichnet, deren Leukozyten mit einer Bindung von Alloantikörpern aus Blutermutterkuh-Serum reagierten (Bridger et al., 2011; Pardon et al., 2011).

Ein Nachweis von Alloantikörperbindungen an Leukozyten gelang erstmals Bridger et al. (2011) mittels einer Durchflusszytometrie. Die Arbeitsgruppe Bastian et al. (2011) konnte mit der gleichen Methode zeigen, dass in den Seren von Blutmutterkühen Alloantikörper enthalten waren, welche sowohl spezifisch für Oberflächenantigene auf bovinen Leukozyten waren als auch an Oberflächenantigene der MDBK-Zellen binden konnten. Sie gehörten der Klasse der Immunglobuline G an und ließen sich der Unterklasse der IgG₁-Antikörper zuordnen (Assad et al., 2012). Seren von Tieren, welche nicht BVD-geimpft oder eine andere BVD-Vakzine als PregSure[®] BVD erhalten hatten, zeigten diese Alloantikörperbindungen nicht. Ein ähnlicher Versuch veranschaulichte des Weiteren, dass es zwischen den Alloantikörper-enthaltenden Seren unterschiedlicher Kühe vergleichsweise große Unterschiede nicht nur bezüglich der Alloantikörper-Titerhöhe an sich gab, sondern auch bezüglich der spezifischen Bindungen an isolierten Leukozyten (Bastian et al., 2011). Diese Beobachtung weist auf eine Heterogenität der Alloantikörper hin und spricht womöglich dafür, dass die Alloantikörper an unterschiedliche Antigene binden und/oder die Zellen unterschiedlicher Individuen unterschiedliche, passende Antigene exprimieren.

In Kongruenz zur Spezies Rind zeigten ebenfalls Meerschweinchen, welche mit verschiedenen BVD-Impfstoffen immunisiert wurden, nur bei der PregSure[®] BVD-Vakzine eine Bildung von Alloantikörpern, welche ebenso nachgewiesenermaßen an bovine Leukozyten und MDBK-Zellen binden konnten (Bastian et al., 2011). Pardon et al. (2011) spezifizierten die Zielzellen genauer, indem sie feststellten, dass die Alloantikörper sowohl an Zellen im peripheren Blut als auch an Zellen aus dem Knochenmark banden.

Bridger et al. (2011) stellten schließlich eine Verknüpfung zur Kolostrum-Aufnahme her: in ihrer Studie zeigte sich, dass die Leukozyten aus Kälberblut nur wenige Stunden nach dem Konsum der Biestmilch mit ebensolchen Alloantikörpern überzogen waren.

2.1.7 Kolostrum-Assoziation

Während der Trächtigkeit werden Kälberfeten aufgrund der Plazenta epitheliochorialis nicht diaplazentar mit Immunglobulinen versorgt, so dass es für jedes Kalb nach der Geburt notwendig ist, möglichst schnell ausreichend schützende Antikörper über die Biestmilch aufzunehmen (Kruse, 1983). Bei Fohlen und Ferkeln sind kolostruminduzierte, alloimmune Thrombozytopenien bekannt, welche sich aufgrund einer Bindung von Antikörpern an spezifische, paternal vererbte Antigene auf den Thrombozyten und einer nachfolgenden Zerstörung derselben durch das Immunsystem ableiten lassen (Buechner-Maxwell et al., 1997; Forster,

2007).

Inzwischen ist nachgewiesen, dass auch das Auftreten einer BNP Kolostrum-assoziiert und dementsprechend mittels Kolostrum induzierbar ist (Bridger et al., 2011; Friedrich et al., 2011; Henniger et al., 2014; Schröter et al., 2011). Jedoch ist das Zielantigen bzw. sind die Zielantigene im Gegensatz zu den oben genannten Thrombozytopenien nicht nur auf den Blutplättchen zu finden sondern auch auf anderen Zelltypen, so dass vermutlich andere Faktoren bei der Ätiologie und Pathogenese der BNP eine Rolle spielen (Assad et al., 2012; Bastian et al., 2011; Bridger et al., 2011). Gleichwohl ist eine erste effektive Gegenmaßnahme zur Abwendung der BNP das konsequente Verwerfen des Kolostrums von BNP-Kühen (Bell et al., 2010a).

2.1.8 Pathohistologische Befunde

2.1.8.1 Befunde am Knochenmark

Pathohistologisch war sowohl im Röhrenknochenmark als auch im spongiosen Sternalmark von BNP-Kälbern ein Schwund aller drei Zelllinien, das heißt der Thrombopoese, Erythropoese und Myelopoese, zu beobachten; es lag folglich eine Panmyelophthase vor. Das Knochenmark stellte sich hypozellulär bis azellulär dar, wobei insbesondere die Megakaryozyten nahezu vollständig verschwunden waren (Friedrich et al., 2009c; Krappmann et al., 2011). Auch Pardon et al. (2010) und Lambton et al. (2012) berichten von einer Aplasie aller vorkommenden Zelllinien, wobei die letztere Studie diese jeweils mit einer Zellularität von < 25 % für jede Differenzierungslinie angibt.

Bei einer genaueren zytologischen Betrachtung der Knochenmarksschäden eines BNP-Kalbes beschränken sich diese häufig auf eine Schädigung der unreifen Vorläuferstufen für Thrombozyten, Lymphozyten und Monozyten und die ganz frühen Stadien der Vorläuferzellen von neutrophilen Granulozyten, Erythrozyten und eosinophilen Granulozyten (Bell et al., 2013). Bei einigen Tieren konnte allerdings eine erhöhte Anzahl der eosinophilen Vorläuferzellen beobachtet werden sowie aktivierte Makrophagen und in diesem Zusammenhang auch Erythrophagozytose (Bell et al., 2013; Laming et al., 2012; Pardon et al., 2010). Dabei gab es graduelle Unterschiede bezüglich der Knochenmarksveränderungen, welche in Hinsicht auf die Prognose einen wichtigen Einflussfaktor darstellten (Friedrich et al., 2011; Friedrich et al., 2009c).

Für derartige pathologische Veränderungen am Knochenmark sind verschiedene Ursachen bekannt. So kann es beispielsweise beim Jungrind nach einer Ganzkörperbestrahlung mit

Röntgenstrahlen zu einer hochgradigen Schädigung aller Zellreihen kommen (Johannsen et al., 1978). Infolge der resultierenden insuffizienten Thrombopoese kommt es zur Ausbildung einer hämorrhagischen Diathese, welche ebenfalls ein wichtiges Charakteristikum der BNP darstellt. Nach solch einer Bestrahlung entwickelten die Kälber im Versuch durch die Neutropenie bzw. Agranulozytose eine zunehmende Disposition für die Vermehrung obligat und fakultativ pathogener Keime, was zu einem vermehrten Auftreten von Sekundärinfektionen führte (Johannsen et al., 1978).

Ebenso litten auch Kälber mit einer Furazolidon-Vergiftung hämatologisch an einer Thrombozytopenie und Neutropenie, während histologisch im Knochenmark eine mehr oder weniger weitgehende Aplasie beobachtet werden konnte (Hofmann et al., 1974). Klinisch standen auch hier die ausgeprägten Hämorrhagien im Vordergrund und gleichermaßen konnte eine erhöhte Anfälligkeit für Sekundärinfektionen festgestellt werden.

2.1.8.2 Weitere Befunde

Erst bei einer pathologischen Untersuchung konnte das wahre Ausmaß der hämorrhagischen Diathese erfasst werden, wobei sich Art, Lokalisation und Intensität der Blutungen von Tier zu Tier unterschiedlich darstellten. So waren Petechien, Ekchymosen und flächige Hämorrhagien vor allem subserosal, subkutan und auch intramuskulär zu finden (Friedrich et al., 2009c). Längenmessungen der Oberschenkelknochen bei der Sektion ergaben zudem bei Kälbern nach der Aufnahme von BNP-Kolostrum signifikant niedrigere Werte und wurden als Hinweise für einen Minderwuchs gedeutet (Bell et al., 2013).

Bezüglich des Zellgehalts lymphatischer Organe gab es unterschiedliche Beobachtungen. Einerseits wurde neben den Befunden im Knochenmark und der Lymphozytopenie im Blut ebenfalls ein Schwund der Lymphozyten in lymphatischen Geweben beschrieben, wobei B- und T-Zellareale in Milz, Lymphknoten und/oder Thymus gleichermaßen betroffen waren, andererseits konnte in einer anderen Studie nach einer Verabreichung von BNP-Kolostrum an Kälber eine Vergrößerung von Thymus und Lymphknoten festgestellt werden, welche sich histologisch passend dazu dicht besiedelt darstellten (Bell et al., 2013; Pardon et al., 2010). In der letzteren Studie waren jedoch bei den Versuchskälbern, welche BNP-Kolostrum erhalten hatten, im Vergleich zu den Kontrollkälbern deutlich weniger scharf umschriebene Sekundär-Follikel nachzuweisen, was trotz des dichten Zellgehaltes auf eine immunologische Störung hinweisen könnte (Bell et al., 2013).

Die Muttertiere der BNP-Kälber zeigen keinerlei pathologische Auffälligkeiten (Assad et al., 2012; Bridger et al., 2011; Pardon et al., 2010).

2.2 Knochenmark

Das Knochenmark stellt den Hauptbildungsort sämtlicher Blutzellen dar und ist auch gleichzeitig ein primäres lymphatisches Organ, in dem sich Leukozyten aus Vorläuferzellen entwickeln (Travlos, 2006b). Unterschiedliche Stammzellen bilden die Vorläufer für die drei Zellreihen, die Thrombopoese, die Erythropoese und die Myelopoese, bei deren Entwicklung am Ende die reifen Blutplättchen, Erythrozyten und entsprechend die unterschiedlichen Leukozyten entstehen und über ein Kapillarsystem ins Blut abgegeben werden. Obwohl es keine spezifischen anatomischen Lokalisationen im Knochenmark gibt, an denen ein bestimmter Zelltyp auffindbar ist, ist das hämatopoetische Gewebe in sich jedoch organisiert (Gasper, 2000). So kann die Erythropoese im Gegensatz zur Myelopoese beispielsweise in inselförmigen, gut abgrenzbaren Einheiten beobachtet werden und Megakaryozyten sind direkt an den Endothelien der Gefäßsinus zu finden (Travlos, 2006b). Neben den hämatopoetischen Zellen ist ein Mikromilieu aus ortsansässigen retikulären Zellen, Fettzellen, Endothelzellen, Makrophagen sowie extrazellulärer Matrix vorhanden (Travlos, 2006b). Durch den kortikalen Knochen ziehen über Kanälchen versorgende Arterien indirekt ins Mark der langen Röhrenknochen, welche sich dort weiter bis hin zu kleinen Arteriolen und Kapillaren aufzweigen und schließlich Anastomosen mit Venen eines Venenplexus eingehen (Travlos, 2006b).

Beim Neonaten besteht das Knochenmark direkt nach der Geburt aus einer soliden Ansammlung hämatopoetischer Zellen. Im Verlaufe des Heranwachsens ziehen sich diese Zellen in den Röhrenknochen, den flachen Knochen und den Sternebrae in die Enden bzw. die Randbereiche zurück und der freigewordene Platz in der Markhöhle wird durch Adipozyten ersetzt. Dabei ist die altersabhängige Abnahme an blutbildenden Zellen regional unterschiedlich und vor allem speziesspezifisch, so dass im Gegensatz zum Hund und dem Menschen beim Rind nach 2 Monaten nur noch eine Knochenmarkspunktion aus dem Sternum oder den Wirbelfortsätzen aussagekräftige Erkenntnisse über eine hämatopoetische Aktivität liefern (Valli, 2000). In den ersten Lebensmonaten kann parallel zu diesem Umbau im Knochenmark dementsprechend eine hämatopoetische Inselbildung in histologischen Präparaten beobachtet werden.

2.2.1 Knochenmarkveränderungen

Eine Probenentnahme von Knochenmark zu diagnostischen Zwecken erfolgt normalerweise aus dem Sternum, dem Wirbel oder einem der Ossa femores (Elmore, 2006). Wird anschließend in solch einer Probe eine Abweichung der physiologischen Zelldichte gefunden, kann dies grundsätzlich ein Anzeichen einer systemischen Intoxikation oder eines primär toxischen Effekts direkt auf das Knochenmark darstellen (Elmore, 2006). Häufig sind Veränderungen im Knochenmark jedoch sekundärer Natur und somit vor allem die Folgen von hämatologischen Veränderungen und/oder Läsionen, welche an unterschiedlichen Lokalisationen peripher im Körper zu finden sind (Elmore, 2006). Beispielsweise ist eine erhöhte Erythropoese zumeist eine regenerative Antwort auf eine Anämie bzw. einen erhöhten Bedarf an Erythrozyten, wohingegen eine erhöhte Granulopoese eine häufige Reaktion auf entzündliche Prozesse darstellt (Travlos, 2006a; Wienbeck, 1938). Dabei sind sämtliche Beobachtungen immer in Relation zur Tierspezies, der Erkrankungsdauer und -schwere und dem Alter des Tieres abzuwägen (Travlos, 2006a).

In mehreren Studien wurde bei der BNP das Knochenmark pathohistologisch routinemäßig am Hämatoxylin-Eosin gefärbten Schnitt (HE-Schnitt) untersucht, wobei der Hauptbefund hierbei eine deutlich verringerte Zelldichte aller drei Zelllinien, die so genannte Panmyelophthise, darstellte (Friedrich et al., 2009c; Krappmann et al., 2011).

In diesem Zusammenhang wurden auch die Begriffe „Markhypoplasie“ bzw. „–aplasie“ verwendet, welche ebenfalls einen deutlichen bzw. sogar hochgradigen Schwund des Zellmarkes beschreiben und histologisch durch ein zellarmes bzw. zellfreies Markretikulum gekennzeichnet sind. Anstelle der hämatopoetischen Zellen sind bei solch einer Veränderung im Gewebeschnitt hauptsächlich Gefäßsinus und Adipozyten im Knochenmark anzutreffen (Travlos, 2006a).

Detailliertere Erläuterungen zu den Veränderungen am Knochenmark im Rahmen einer BNP finden sich unter 2.1.8.1.

2.2.2 Interpretation von HE-gefärbten Knochenmarkgewebeschnitten

Die Aussagekraft einer entnommenen Knochenmarksprobe steht primär immer in Verbindung mit der Qualität derselben und den daran angewandten Aufbereitungstechniken (Travlos, 2006a). Insbesondere sind vor allem Veränderungen nach der Probennahme wie pyknotische Zellkerne oder schlecht abgrenzbares, granuläres Zytoplasma, wie sie zum Beispiel durch die

Freisetzung von Enzymen aus den Granula der Granulozyten oder durch ungenügende bzw. zu langsame Gewebepenetration der Fixierlösung entstehen, von echten Veränderungen abzugrenzen (MacKenzie, 1990; Travlos, 2006a). Falls zusätzlich korrespondierende Blutwerte eines betroffenen Tieres vorliegen, so sollten diese immer mit in eine Interpretation der Beobachtungen am Knochenmark einbezogen werden (Elmore, 2006).

Ebenfalls ist bei unterschiedlichen Entnahmestellen, Geschlechtern, Stämmen und Spezies stets eine gewisse Variation der zytologischen Eigenschaften von Knochenmarkzellen zu bedenken, so dass eine passende Kontrollgruppe zum Vergleich bei der Auswertung von Knochenmarkproben nach Möglichkeit vorhanden sein sollte (Elmore, 2006; Travlos, 2006a). Ein angefertigter, Formalin-fixierter und HE-gefärbter Gewebeschnitt ist dabei für ein Screening des Knochenmarks geeignet, bei dem eine Schätzung der Zellularität möglich ist und sowohl degenerative als auch proliferative Veränderungen wie flächige Nekrosen entdeckt werden können (Elmore, 2006; MacKenzie, 1990). Für eine solche Beurteilung sollte der Schnitt jedoch möglichst dünn sein, um eine Betrachtung und Auswertung einer einzelnen Zelllage zu ermöglichen (MacKenzie, 1990). In einer höheren Vergrößerung lassen sich am Formalin-fixierten, HE-gefärbten Gewebeschnitt auch reifere Stadien erythroischer und myeloischer Zellen, Mastzellen und Megakaryozyten gut differenzieren. Für weitergehende, detailliertere Aussagen zur Zellmorphologie und des Zustandes unterschiedlicher Reifestadien wäre jedoch eine Anfertigung von Knochenmarkausstrichen und deren zytologische Untersuchung zur Bewertung notwendig (Bloom and Lewis, 1990; Elmore, 2006; Travlos, 2006b). Gleichermaßen ist auch eine definitive Identifikation von lymphopoetischen und stromalen Zellen, abgesehen von Adipozyten, in solch einem HE-Schnitt nicht möglich (Elmore, 2006; Travlos, 2006a, b).

2.3 Histologie und Immunhistologie

2.3.1 Gewebefixierung

Bei einer Fixierung von Gewebeproben kommt es darauf an, deren Struktur möglichst dauerhaft zu konservieren. Hierbei sollen die Eigenschaften aus dem nativen in vivo-Zustand weitestgehend erhalten bleiben, insbesondere was den Aufbau, die Größe und die Lokalisation von Zellen und Strukturen betrifft (Kothmaier et al., 2011; Meyer and Hornickel, 2010). Durch das eingesetzte Fixanz kommt der Zellstoffwechsel zum Erliegen und eine Zersetzung des Gewebes durch Fäulnisprozesse und Autolyse wird sowohl wesentlich verringert als auch verzögert (Meyer and Hornickel, 2010; Ramos-Vara and Miller, 2014). Des Weiteren schützt

die Fixierung des Gewebes bei nachfolgenden, für eine zuverlässige pathologische Untersuchung notwendigen Prozessierungsschritten und zusätzlich vor der mechanischen Beanspruchung bei der Einbettung (Dapson, 1993; Mulisch et al., 2010a). Jedoch kann sich ein Fixierungsverfahren auch nachteilig auf anschließende Prozesse und damit Untersuchungsergebnisse auswirken und eine Beurteilung, beispielsweise aufgrund einer Artefaktbildung oder einer reaktiven Modifizierung vor allem der Proteine, erschweren und im ungünstigsten Fall unmöglich machen (Daneshtalab et al., 2010; Titford and Horenstein, 2005). Insbesondere Veränderungen von Proteinstrukturen können zu einer verminderten Verfügbarkeit reaktiver Epitope und somit zu falsch negativen Ergebnissen führen. Bei der Wahl des Fixanz sind dementsprechend mehrere Faktoren, wie beispielsweise die Gewebeart und die vorgesehene Untersuchungsmethode, zu berücksichtigen, um in dieser Hinsicht zuverlässige Resultate zu erhalten (Mulisch et al., 2010a; Titford and Horenstein, 2005).

2.3.1.1 Formalin-Fixierung

Formalin, eine kommerzielle 30-40 %ige wässrige Formaldehyd-Lösung, ist aufgrund vieler Vorteile das meistgenutzte Fixanz für die histologische Routinediagnostik (Mulisch et al., 2010a; Titford and Horenstein, 2005). Zum einen ist die Handhabung einfach und eine schnelle Penetration des Gewebes bei Raumtemperatur gewährleistet, zum anderen sind die Beschaffungskosten niedrig und eine langfristige Aufbewahrung des Probengewebes ist problemlos möglich (Kothmaier et al., 2011; Mulisch et al., 2010a). Die stabilisierende Wirkung zum Erhalt der Gewebestruktur beruht auf einer Methylenbrückenbildung und Vernetzung von Molekülen, wobei mit einer stärkeren Vernetzung auch eine verminderte Enzymaktivität und Antigenität einhergeht (Blaschitz et al., 2008; Fox et al., 1985; Mulisch et al., 2010a). Gleichzeitig werden auf diese Weise die autolytischen Vorgänge in der Zelle zum Stillstand gebracht (Meyer and Hornickel, 2010). Inzwischen gibt es zahlreiche Methoden, um solche Quervernetzungen, die eventuell zu einer Verdeckung und somit Blockierung antigener Strukturen führen, zumindest teilweise wieder zu lösen und dadurch Epitope, insbesondere für immunhistologische Reagenzien, zu demaskieren und auf diese Weise wieder zugänglich zu machen (Puchtler and Meloan, 1985; Shi et al., 1991). Im Allgemeinen wird solch ein Verfahren als „Antigen Retrieval“ bezeichnet (Shi et al., 1991).

Trotz der inzwischen bekannten Kanzerogenität von Formalin gilt ein HE-gefärbter, Formalin-fixierter, paraffineingebetteter Gewebeschnitt in der Histopathologie aufgrund der schnel-

len und reichlichen Informationslieferung und der geringen Kosten als „Goldstandard“ (Buesa, 2008).

2.3.1.2 HOPE[®]-Fixierung

Die HOPE[®] (Hepes-Glutamic Acid Buffer-Mediated Organic Solvent Protection Effect)-Fixierung stellt ein patentiertes (Patentschrift DE 10021390 C2), aldehydfreies Fixierungsverfahren dar, welches kommerziell von der Firma DCS (DCS Innovative Diagnostik Systeme Dr. Christian Sartori GmbH & Co. KG, Hamburg) vertrieben wird. Im Hinblick auf die Zusammensetzung werden lediglich grobe Angaben zur wässrigen Protektionslösung HOPE[®] I gegeben, bei der es sich um einen hyperosmolaren, organischen Puffer handelt, der verschiedene Aminosäuren in Konzentrationen zwischen 10-100 mM enthält und einen pH-Wert von 5,8-6,4 bei Raumtemperatur besitzt (Olert et al., 2001). Analog zur Formalin-Fixierung wird das Gewebestück, welches die Größe von 0,8 x 0,8 x 0,3 cm laut Herstelleranweisung nicht überschreiten sollte, im Anschluss an den Fixiervorgang und dem Entwässern in Paraffin eingebettet.

Olert et al. (2001) bescheinigten der Formalin-Alternative in seiner Publikation einen zum Formalinmaterial vergleichbaren Morphologieerhalt, eine geringe Zersetzung von Nukleinsäuren (DNA und RNA) und vorteilhafte Eigenschaften für immunhistologische Untersuchungen, da zum Beispiel keine Vorbehandlung zur Demaskierung von Antigenen notwendig sei. Sogar Antikörper, welche bisher lediglich für unfixiertes Gefriermaterial im Anschluss an eine Aufbereitung mittels der Gefrierschnitttechnik vorgesehen waren, können bei HOPE[®]-fixiertem Material eingesetzt werden. Der zugrundeliegende Wirkmechanismus des HOPE[®]-Fixierverfahrens ist derzeit nicht in den Einzelheiten bekannt bzw. publiziert. Grundsätzlich wird bei dem gewebeschonenden Fixieren nach der HOPE[®]-Methode die Probe zunächst in einer organischen Pufferlösung, der Protektionslösung HOPE[®] I, bei 0-4 °C inkubiert, welche das Gewebe per Diffusion komplett durchdringt. Zur nachfolgenden Dehydrierung der Probe wird ausschließlich eiskaltes Aceton verwendet, welches zur Ausfällung von Komponenten der Protektionslösung im Gewebe führt. Diese Präzipitate sollen nun nach Aussage des Herstellers zu einer Stabilisierung der Strukturen führen, so dass ein Schutz gegen die Einwirkung von aggressiven, organischen Lösungsmitteln gegeben ist. Die entwässerte Probe wird im Anschluss umgehend in reines Paraffin eingebettet, welches einen niedrigen Schmelzpunkt bei 52-54 °C aufweist und das verbliebene Aceton nun ebenso wie die Präzipitationen der Protektionslösung aus dem Gewebe verdrängt (Olert et al., 2001). Bei diesem Verfahren wer-

den Quervernetzungen von Proteinen vermieden, was folglich zu einer besseren Erhaltung der antigenen Strukturen führt.

2.3.2 Antikörper für die Immunhistologie

2.3.2.1 Immunglobulin G (IgG)

Die Fraktion des Immunglobulin G (IgG) beim Rind besteht aus zwei Unterklassen, dem IgG₁ und dem IgG₂, welche in verschiedenen Körperflüssigkeiten in unterschiedlichen Mengen vorhanden sind (Butler, 1983). Beide Isotypen bilden beim Rind die humorale Immunantwort auf intra- und auch extrazelluläre pathogene Erreger (Berghaus et al., 2006; Corbeil, 2002; Welsh et al., 2005).

Sowohl im Kolostrum als auch im Blutserum macht das IgG etwa 80 % des Gesamtimmunglobulins aus, wobei im Kolostrum durch einen selektiven Transport ein Verhältnis von IgG₁ zu IgG₂ von 90:10 erreicht wird, während im Blutserum selbst das Verhältnis der beiden Isotypen mit 56:44 nahezu gleichauf liegt (Copestake et al., 2006). Das im Kolostrum befindliche IgG₁ stammt ursprünglich aus dem Serum und damit dem Antikörperpool des Muttertieres und dient analog der anderen Immunglobuline dazu, das Kalb post partum passiv mit Antikörpern zu versorgen (Newby and Bourne, 1977). Dieses kann bis zu einer Zeit von etwa 24 Stunden nach der Geburt die Antikörper aus der Biestmilch über den Darm absorbieren, bevor die Darmschranke undurchlässig für Makromoleküle wird (Stott et al., 1979). Im neonatalen Blutkreislauf angelangt, besitzt das aufgenommene IgG₁ etwa eine Halbwertszeit von 16 Tagen, wobei gesunde Kälber ab dem 8. Lebenstag anfangen, zusätzlich endogenes IgG zu bilden (Husband et al., 1972). Demnach stimmt das Auftreten einer BNP bei bis zu einem Monat alten Jungtieren mit dem Zeitfenster der physiologischen Aktivität des kolostral aufgenommenen IgG₁ überein.

2.3.2.2 Gewinnung von IgG

Zur Gewinnung von IgG-Antikörpern über Affinitätsverfahren wird häufig Protein A, ein Antigen der Zellwände von *Staphylococcus aureus*-Stämmen, oder Protein G, ein Zellwandprotein aus Streptokokken der Gruppe G, verwendet (Forsgren and Sjoquist, 1966; Kronvall, 1973). Diese Moleküle besitzen die Eigenschaft, mit Hilfe von Fc-Rezeptoren die Fc-Domänen der IgGs und damit die Antikörper binden zu können, wobei es jedoch spezies- und klassenspezifische Unterschiede bezüglich der Bindungsaffinitäten an sich gibt

(Akerstrom and Bjorck, 1986). So kann mit Protein A zwar die bovine IgG₂-Fraktion gebunden werden, IgG₁-Antikörper, welche den Großteil der Antikörper des Kolostrums ausmachen, bleiben jedoch weitestgehend frei in der Lösung (Bjorck and Kronvall, 1984). Anders verhält es sich jedoch mit der Affinität zu Protein G, an welches beide IgG-Unterklassen des Rindes über den Fc-Rezeptor gebunden werden (Bastida-Corcuera et al., 1999; Bjorck and Kronvall, 1984). Da die vermuteten BNP-spezifischen Alloantikörper zur Gruppe der IgG₁-Unterklasse gehören sollten, wurde zur Gewinnung der Antikörper für die immunhistologische Untersuchung Protein G als Ligand in einer Affinitätschromatographie genutzt (Assad et al., 2012).

3 Material und Methoden

3.1 Untersuchungsmaterial

3.1.1 Material zur Gewinnung und Herstellung der gebrauchsfertigen Antikörperlösung

Für die Gewinnung von IgG-Antikörpern wurden gefrorene Kolostrum- und Serumproben verwendet (siehe Tabelle 1 und 2). Dabei stammten die Alloantikörper enthaltenden BNP-Seren von Blutmutterkühen, welche nachgewiesenermaßen mindestens ein Kalb mit klinischer BNP zur Welt gebracht hatten. Die Proben für die Negativ-Kontrollen stammten von Tieren, die nicht gegen BVD geimpft worden waren und sowohl vom Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere (mittels Durchflusszytometrie) als auch vom Institut für Virologie (mittels Immunpräzipitation) des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen negativ auf das Vorhandensein von Alloantikörpern getestet worden waren. Aufgrund der Tatsache, dass nicht von Beginn der Studie an sämtliche Seren zur Verfügung standen, basieren die Experimente auf verschiedenen Antikörperlösungen. Das verwendete Mischkolostrum vom Institut für Tierzucht und Vererbungsforschung der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover (TiHo) stammt ebenfalls von Blutmutterkühen, weitere Angaben oder zusätzliche Tierdaten liegen diesbezüglich jedoch nicht vor.

Tabelle 1: IgG aus Kolostrum

| | Tiere | Ohrmarkennummer |
|------------------------------|---------------------|------------------------|
| <i>Blutmutterkühe</i> | | |
| | ➤ VT 131, „Jolande“ | DE 05xxxxx131 |
| Mischbluterkolostrum: | ➤ * (TiHo Hannover) | |
| Negativkontrolltier | ➤ VT 682 | DE 06xxxxx682 |

* keine Angaben vorhanden

Material und Methoden

Tabelle 2: IgG aus Serum

| | Tiere | Ohrmarkennummer |
|-----------------------------------|---------------------|------------------------|
| <i>Blutmutterkühe</i> | | |
| Mischbluterserum: | ➤ VT 131, „Jolande“ | DE 05xxxxx131 |
| | ➤ VT 214 „Anna“ | DE 05xxxxx214 |
| | ➤ VT 242 „Frieda“ | DE 05xxxxx242 |
| | ➤ VT 201 „Ilse“ | DE 05xxxxx201 |
| | ➤ VT 988 „Dörte“ | DE 07xxxxx988 |
| | ➤ VT 215 „Berta“ | DE 05xxxxx134 |
| | ➤ Kuh 92 | DE 05xxxxx133 |
| | ➤ „Rebe“ | DE 06xxxxx338 |
| <i>Negativkontrolltier</i> | | |
| | ➤ * | DE 76xxxxx6/26 |

* keine Angaben vorhanden

Vorversuche mit den zubereiteten Antikörperlösungen zeigten, dass eine bedeutende Anzahl an isolierten Antikörpern alloreaktiv an Zellbestandteilen im Gewebeschnitt band und so insbesondere in der Negativkontrolle unerwünschte Farbeffekte infolge solcher Bindungen hervorgerufen wurden. Aufgrund dessen wurde zusätzlich zu der Verwendung einer höheren Verdünnungsstufe vor der Inkubation mit den Gewebeschnitten eine Adsorption von Antikörpern an Blutpulver einer Blutmutterkuh durchgeführt mit dem Ziel, die Qualität der immunhistologischen Ergebnisse deutlich zu verbessern und somit vor allem eine möglichst reaktionsfreie Negativkontrolle zu erhalten. Bei diesem Prozess sollten alloreaktive IgG-Antikörper, welche neben den spezifischen BNP-Antikörpern ansonsten auch im Gewebe binden würden, durch exponierte Antigene der Blutzellen weggefangen und so aus der Lösung entfernt werden. Unerwünschte Bindungen würden auf diese Weise auf ein Minimum reduziert. BNP-spezifische Alloantikörper hingegen blieben frei in der Lösung, da Blutmutterkühe das gesuchte Zielantigen nicht besitzen bzw. exprimieren und es somit auf den aufbereiteten Blutzellen einer solchen Kuh keine passenden Antigene zur Bindung der BNP-Alloantikörper gibt. Das Blut zur Herstellung von Blutpulver stammte von der nachgewiesenen Blutmutterkuh „Berta“ (DE 05xxxxxx34) aus der Klinik für Wiederkäuer der Justus-Liebig-Universität Gießen.

3.1.2 Gewebeproben

Es wurde eine repräsentative Anzahl an Knochenmarkproben von insgesamt 65 Kälbern untersucht. Die Proben stammten von Tieren, welche entweder im Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen während einer Serumübertragungsstudie (siehe 3.1.2.1) seziiert wurden, oder Tieren, die in der Routinediagnostik vorlagen (siehe 3.1.2.2). Dabei wurde darauf geachtet, dass die Zeitspanne zwischen dem Tod des Tieres und der Probenentnahme nicht mehr als 24 Stunden betrug. Die Sammlung der Proben umfasste einen Zeitraum von ca. 1,5 Jahren (13.12.2011-1.7.2013). Die Vorberichte mit den Angaben bezüglich des Alters, der Rasse, des Geschlechtes, der Herkunft, der Ohrmarkennummer und der Tagebuchnummer wurden aus den EasyVet-Daten des Fachbereichs Veterinärmedizin entnommen. Eine diesbezügliche tabellarische Übersicht findet sich im Anhang unter 8.1.1 bis 8.1.3. Zur Gewinnung der Proben wurden etwa erbsengroße Gewebestücke entnommen.

3.1.2.1 Proben von Kälbern der Serumübertragungsstudie

Der Tierversuch zur Serumübertragungsstudie erfolgte im Rahmen eines Verbundprojektes des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) zur Untersuchung der BNP und war vorschriftsmäßig genehmigt. Die Versuchskälber (K1-K56) wurden nach ihrer Geburt vom Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere der Justus-Liebig-Universität Gießen und zum Teil auch vom Institut für Virologie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen auf ihre „Empfänglichkeit“ getestet. Hierbei stuften beide Institute die Tiere mittels verschiedener Untersuchungsmethoden (Durchflusszytometrie bzw. Western Blot) aufgrund einer Reaktivität der Kälberleukozyten mit Antikörpern aus BNP-Serum als positiv, also empfänglich, oder aufgrund fehlender Reaktivität als negativ und somit nicht-empfänglich ein (siehe Anhang, Tabelle 8.1.1). Im Alter von 5-7 Tagen wurden die ausgewählten Kälber für den weiteren Versuch in die Klinik für Wiederkäuer der Justus-Liebig-Universität Gießen verbracht und dort aufgestellt. Am 10. Lebenstag bekamen die Kälber schließlich gewichts- und gruppenabhängig Serum transfundiert, welches randomisiert entweder gepooltes BNP-Serum oder getestetes Negativ-Serum war. Nach einer Verdünnung des Serums mit physiologischer Kochsalzlösung auf ein Volumen von 2 Litern wurde es über die Vena jugularis appliziert. Auch wurden den Tieren von Beginn an in verschiedenen Zeitabständen Blutproben entnommen (insgesamt bis zur Euthanasie 42 Proben von jedem Tier) und diese hinsichtlich der Anzahl unterschiedlicher

Blutzellen im Verlaufe des Versuchs quantitativ ausgewertet. Die Werte wurden mit den physiologischen Referenzbereichen der einzelnen Zelltypen verglichen und die Kälber als thrombozytopenisch, lymphopenisch oder unverändert eingruppiert (siehe Anhang, Tabelle 8.1.1). Knochenmarkspirate wurden bei den Kälbern an den Lebenstagen 9 (ante transfusionem) und 13 (post transfusionem) aus der Metaphyse des Os femoris gewonnen. Am 30. Lebenstag wurden die Tiere schließlich euthanasiert und sezziert. Zusätzlich zu den erhobenen makroskopischen Befunden wurde bei allen obduzierten Tieren neben Röhrenknochenmark ein Spektrum an Organproben (ZNS, Leber, Niere, Milz, Lunge, Darm, Mesenteriallymphknoten) für eine pathohistologische und teils immunhistologische Untersuchung entnommen. Überdies wurde bei einigen der Versuchskälber (n = 27) spongiöses Knochenmark aus dem Sternum beprobt, um nachfolgend einen Vergleich zum Röhrenknochenmark betreffend der Zellularität durchführen zu können (siehe Anhang, Tabelle 8.1.5).

Die Kälber K4, K18 und K50 mussten aufgrund eines vorzeitigen Todes von der klinischen Studie ausgeschlossen werden. Dennoch wurden die Knochenmarkproben der Kälber K18 und K50 immunhistologisch untersucht, die Ergebnisse gingen jedoch aufgrund des unterschiedlichen Todeszeitpunktes nicht in die statistische Auswertung mit ein.

Des Weiteren standen von 3 Kälbern der Versuchsstudie (K35, K38 und K39) isolierte Leukozyten aus dem Blut als Zellsuspension zur Verfügung. Das Blut wurde vor der Serumtransfusion entnommen und die Leukozytenisolation anschließend vom Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt. Die Leukozyten wurden immunhistologisch ebenfalls auf eine Bindung von Alloantikörpern untersucht, um eine Aussage über die Expression von Zielantigenen auf diesen Blutzellen treffen zu können.

3.1.2.2 Untersuchungsmaterial aus dem Sektionsgut

Um die Methode vor dem eigentlichen Tierversuch zu etablieren, wurden im Vorfeld einige Knochenmarkproben aus den Ossa femores von 10 frisch toten Tieren unterschiedlichen Alters im Rahmen der Routinediagnostik am Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen gewonnen und zu Versuchszwecken genutzt. Sie waren aus anderen Gründen als einer BNP gestorben bzw. euthanasiert worden, so dass primär davon auszugehen war, dass es sich bei den Proben um überwiegend physiologisches, unverändertes Knochenmark handelte. Aufgrund nachfolgender, erwähnenswerter immunhistologischer Ergebnisse werden die Resultate neben denen der beprobten Kälber aus der Serumübertragungs-

studie ebenfalls in dieser Arbeit mit aufgeführt.

Zusätzlich wurden auch vier in Routinesektionen diagnostizierte BNP-Kälber, welche sowohl in der Sektion als auch in der histologischen Untersuchung des Knochenmarks die typischen Charakteristika einer BNP-Erkrankung aufwiesen, immunhistologisch auf eine Bindung von Alloantikörpern an Zielzellen untersucht. Die vorhandenen Tierdaten zu diesen Kälbern sind in den Tabellen 8.1.2 und 8.1.3 aufgelistet.

3.1.3 Madin Darby Bovine Kidney-Zellen (MDBK-Zellen)

Neben dem eigentlichen Ziel eines Nachweises von Alloantikörperbindungen im Gewebe wurden parallel dazu zusätzlich kultivierte MDBK-Zellen auf Reaktionen mit den hergestellten Antikörperlösungen getestet. Diese Untersuchungen wurden anlässlich vorheriger Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen durchgeführt, welche eine Kontamination der Vakzine PregSure[®] BVD mit antigenen Bestandteilen der MDBK-Zellen, auf denen der zytopathogene Stamm des BVDV Typ 1 für den Impfstoff vermehrt wurde, für die Bildung der BNP-spezifischen Alloantikörper verantwortlich machten (Deutskens et al., 2011; Euler et al., 2013). Sofern gekoppelte Antikörper aus einem Blutmutterkuh-Serum dementsprechend sowohl an Oberflächenantigene der MDBK-Zellen binden als auch an Zielzellen im Knochenmark, spräche das folglich für diese These der Entstehung der Alloantikörper.

MDBK-Zellen wurden im Jahre 1957 aus renalem Gewebe eines adulten Stiers gewonnen und für die Herstellung des Impfstoffs PregSure[®] BVD als Wirtszellen genutzt (Bastian et al., 2011; Madin and Darby, 1958). Eine Population dieser Zelllinie wurde aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere der Justus-Liebig-Universität Gießen übernommen und in 25 cm²-Kulturflaschen im Brutschrank bei 37 °C und 0,5 % CO₂-Begasung kultiviert. Das Nährmedium bestand aus 5 ml RPMI 1640 pro Kulturflasche, dem 10 % fetales Kälberserum und 1 % Penicillin/Streptomycin zugesetzt wurde.

3.2 Herstellung der Gewebeblöcke

Für die Etablierung eines funktionierenden immunhistologischen Protokolls wurde Probenmaterial in unterschiedlicher Weise aufgearbeitet und zur Anfertigung von Schnitten eingebettet. Zunächst erfolgte ein Ansatz mit Formalin-fixierten Knochenmarkproben aus dem Oberschenkelknochen, insbesondere für die nachfolgenden immunhistologischen Untersuchungen wurde jedoch letztendlich eine Aufarbeitung der untersuchten Gewebeproben nach der

HOPE[®]-Methode durchgeführt.

3.2.1 Herstellung von paraffineingebetteten Gewebelöcken aus Formalin-fixiertem Material

Knochenmarkgewebeprobe sowie sämtliche Proben der parenchymatösen Organe wurden direkt nach der Entnahme am Sektionstag (30. Tag) für mindestens 24 Stunden in 10 %igem Formalin fixiert. Im Anschluss daran erfolgte eine routinemäßige Prozessierung der Proben im Gewebereinbettungsautomaten (Tissue Tek[®] VIPTM 5 Jr., Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen), wobei etwa 2 mm dünne entnommene Probenstücke des spongiösen Knochenmarks zuvor mittels einer Dinatrium-EDTA-Lösung (pH 7,4; siehe unter 8.2.1 im Anhang) über etwa 3 Tage entkalkt wurden. Im Anschluss an die automatisierte Prozessierung wurden die Proben manuell an einer Ausgießstation (Tissue Tek[®] TECTM 5, Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen) in geeignete Ausgießformen verbracht und bei 65 °C mit Paraffin (Roti[®]-Plast, Schmelzpunkt 56-58 °C, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) ausgegossen. Die Lagerung der fertigen Blöcke erfolgte bei Raumtemperatur bis zur weiteren Verwendung.

3.2.2 Herstellung von paraffineingebetteten Gewebelöcken aus HOPE[®]-fixiertem Material

3.2.2.1 HOPE[®]-fixierte Gewebeprobe

Grundlegend erfolgte die Fixierung gemäß dem Protokoll des Herstellers DCS Innovative Diagnostik-Systeme Dr. Christian Sartori GmbH und Co. KG, Hamburg. Die erbsengroßen Gewebeprobe (ca. 0,8 x 0,8 x 0,3 cm) stammten alle aus Gewebebereichen ohne Organkapsel, um ein besseres Eindringen der Fixierlösung zu gewährleisten. Nach der Entnahme erfolgte eine direkte Überführung in ein Aceton-festes Reagenzröhrchen (15 ml, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) mit vorgekühlter (0-4 °C) HOPE[®] I-Fixierlösung. Danach wurden die Probenröhrchen für 48-72 Stunden auf Eis inkubiert und die Gewebeprobe nach dem Schema der Abb.1 weiterverarbeitet.

Eine Abweichung der Fixationsdauer gab es bei den für die immunhistologische Untersuchung vorgesehenen Proben der Studienkälber K47-49, diese lagen insgesamt bis zu ihrer Weiterverarbeitung etwa 5 Tage gekühlt in der HOPE[®] I-Fixierlösung.

Nach der 8-stündigen Entwässerung wurden die Proben schließlich in vorgewärmtes, niedrigschmelzendes Paraffin umgebettet und dort über Nacht im Wärmeschrank bei 55 °C belassen.

Am nächsten Tag wurde das durchtränkte Gewebestück zentral in eine Einbettungsform gelegt und mit frischem, flüssigem Paraffin übergossen. Sofort im Anschluss wurde die Form für wenige Minuten auf einer Eisschale gekühlt und der fertige Paraffinblock schließlich bei 0-4 °C bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank gelagert.

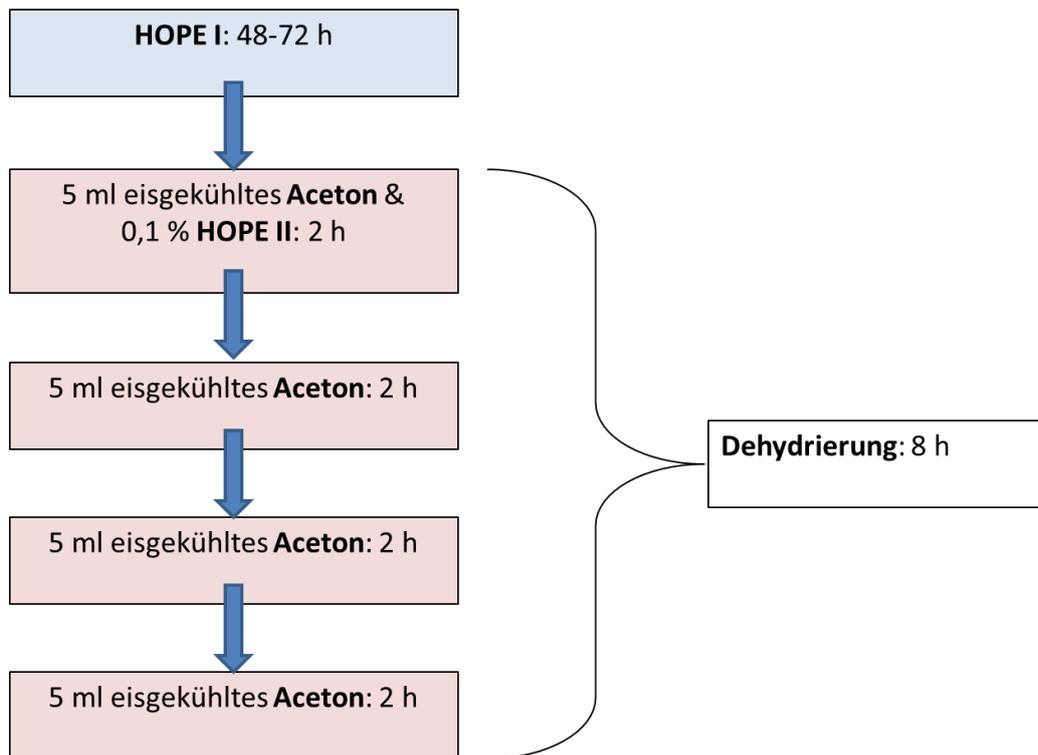


Abbildung 1: Schema zur Bearbeitung HOPE[®]-fixierter Gewebeproben

3.2.2.2 HOPE[®]-fixierte Leukozyten

Die vitalen, isolierten Leukozyten aus dem Blut der drei Studienkälber K35, K38 und K39 wurden jeweils in ein Eppendorfgefäß mit etwa 3,5 ml vorgekühlter (0-4 °C) HOPE[®] I-Fixierlösung verbracht und für 24 Stunden auf Eis inkubiert. Eine Dehydrierung der Zellen erfolgte ebenfalls nach dem Schema der Abbildung 1, wobei die Volumina nur 3,5 ml betragen und die Zellen zwischen den Schritten für das Wechseln der Lösungen abzentrifugiert wurden (Hettich, 10000 g). Am Ende der Entwässerung wurde ein Zellpellet erstellt (Hettich, 10000 g), mit dem ebenso wie mit den HOPE[®]-fixierten Gewebeproben (siehe unter 3.2.2.1) verfahren wurde.

3.3 Anfertigung histologischer Schnitte

3.3.1 Anfertigung von Formalin-fixierten Gewebeschnitten

Der Großteil der angefertigten Schnitte von Formalin-fixiertem Gewebe wurde im Anschluss mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt, nur einige wenige wurden für die Etablierung des immunhistologischen Nachweises der Bindung von BNP-Alloantikörpern ungefärbt weiter verwendet.

1. Um eine gute Schneidbarkeit zu gewährleisten wurden die Probenblöcke vor dem Schneiden für 30 min bei -20 °C auf einer mit Eis gefüllten Schale vorgekühlt.
2. Anschließend wurde der jeweilige Block in ein Rotationsmikrotom (RM 2255, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nußloch) eingespannt, mit dem ca. 1-2 µm dicke Schnitte angefertigt wurden.
3. Der fertige Schnitt gelangte zunächst auf die Oberfläche eines vorbeschrifteten Objektträgers (SuperFrost®Plus-Objektträger, R. Langenbrinck, Teningen), auf dem sich wenige Tropfen raumtemperiertes Leitungswasser befanden.
4. Mittels des Objektträgers wurde der Schnitt dann auf ein beheiztes Streckbad (42-45 °C) umgebettet, so dass sich bestehende Falten glätteten. Der faltenfreie Schnitt wurde schließlich vorsichtig mit einem Pinsel zurück auf den Objektträger aufgezogen, wobei auf eine möglichst zentrale Lokalisation des Schnittes geachtet wurde.
5. Zuletzt wurden die angefertigten Schnitte bei Raumtemperatur über Nacht luftgetrocknet und am darauffolgenden Tag verwendet.

Die Bezugsquellen für alle verwendeten Chemikalien, Materialien und Geräte sind im Anhang unter dem Punkt 8.2.2 aufgeführt.

3.3.2 Anfertigung von HOPE®-fixierten Schnitten

HOPE®-fixierte Schnitte dienen sowohl für eine immunhistologische Untersuchung des Knochenmarks der Versuchskälber (30. Tag) als auch für eine histologische Untersuchung bezüglich des Zellgehaltes im Knochenmark vor (9. Tag) und nach (13. Tag) der Serumübertragung. Die fertigen Gewebeschnitte wurden für die histologische Beurteilung anschließend routinemäßig HE-gefärbt, die für die immunhistologischen Untersuchungen vorgesehenen Schnitte wurden ungefärbt belassen.

- 1.-3. Wie unter 3.3.1 beschrieben.
4. Der auf dem Objektträger befindliche Schnitt wurde daraufhin auf ein warmes Streckbad (35-37 °C) platziert und nach der sichtbaren Glättung unverzüglich wieder auf den Objektträger aufgezogen, um ein schnell eintretendes Auseinanderstreben des Gewebes zu vermeiden.
5. Im Anschluss daran wurden die fertigen Schnitte ebenfalls über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und am nächsten Tag verwendet.

3.4 Antikörper für die immunhistologischen Untersuchungen

3.4.1 Seren

Für den immunhistologischen Nachweis der Bindung von BNP-spezifischen Alloantikörpern an Zellen bzw. Gewebe wurden IgG-Antikörper von Blutmutterkühen genutzt. Äquivalent dazu wurde als Negativ-Kontrolle ein Kontrollserum, welches die IgG-Antikörper eines negativ auf Alloantikörper getesteten Tieres enthielt, auf dieselbe Art und Weise hergestellt. Bei einer Inkubation mit dem Negativ-Kontrollserum sollten keine Antikörper an das Gewebe binden und ein Nachweis demnach mit einem negativen Ergebnis verlaufen.

3.4.1.1 Gewinnung der IgG-Fraktion aus Kolostrum und Serum

Die Gewinnung von IgG aus dem Kolostrum bzw. Serum erfolgte mittels einer Protein G-Säule (1 ml Hi-Trap[®] Protein G column, GE Healthcare, Uppsala, Schweden). Protein G ist ein bakterielles Zellwandprotein aus einer humanen Gruppe G Streptokokken-Stamm (G148) und besitzt eine pH-abhängige Bindungsaffinität für IgG (Bjorck and Kronvall, 1984). Es bindet bezogen auf die zwei Immunglobulin G-Subtypen bei der Kuh sowohl IgG₁ als auch IgG₂, wobei IgG₁ das Hauptglobulin in der Kuhmilch bzw. des Kolostrums darstellt (Bastida-Corcuera et al., 1999; Bjorck and Kronvall, 1984; Butler, 1969).

Vorherige Studien erzielten beim Rind Ausbeuten von bis zu über 90 % IgG aus wässrigen Proben und belegen damit bei dieser Spezies die deutlich überlegene Effektivität der Affinitätschromatographie mit Protein G im Vergleich zu Protein A (Akerstrom and Bjorck, 1986; Aybay and Imir, 2000; Verdoliva et al., 2002).

3.4.1.1.1 Antikörpergewinnung aus Kolostrum

Der Fettanteil des Kolostrums und das Casein, welches etwa 80 % der Proteinfraction in der Milch ausmacht, mussten vor dem Auftragen auf die Protein G-Säule weitestgehend entfernt werden, um eine optimale Gewinnung der Immunglobuline zu erzielen (Copestake et al., 2006; Wong et al., 1996). Das Milchfett konnte durch ein Herunterkühlen der Kolostrumprobe und eine anschließende Zentrifugation phasisch von den wässrigen Bestandteilen der Milch abgetrennt werden. Das Casein wurde mittels einer Säurepräzipitation ausgefällt. Eine anschließende, unverzügliche Neutralisation der angesäuerten Probe erfolgt mittels einer PD-10 Entsalzungssäule (GE Healthcare, Uppsala, Schweden). Die folgende Affinitätschromatographie mittels Protein G-Säule wurde nach Protokollen des Herstellers durchgeführt, wobei manuell mit einer Luerspritze leichter Druck ausgeübt wurde, so dass die Tropfgeschwindigkeit ca. 1 ml/min betrug. Ein verkürztes Schema zur Affinitätschromatographie mit anschließendem Pufferwechsel ist in der Abbildung 2 dargestellt.

1. Eine Kolostrumprobe von etwa 10 ml wurde in einem 15 ml Probenröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) zur Ausfällung der Casein-Fraktion mit 1 M HCl auf einen pH-Wert von 4,6 angesäuert und für 15 min bei 4 °C stehen gelassen.
2. Danach wurde das ausgefallene Casein bei ebensolch niedriger Temperatur abzentrifugiert (4 °C, 15 min, 3939 g, Labofuge 400R, Heraeus), so dass an der Probenoberfläche gleichzeitig eine Erstarrung des Milchfettes zu einer pastösen Masse erfolgte.
3. Das Fett, welches sich als oberste Schicht gesammelt hatte, wurde mittels eines Spatels entfernt und die wässrige Phase in ein neues Probenröhrchen pipettiert.
4. Unverzüglich erfolgte eine pH-Neutralisation der angesäuerten, entfetteten Milch mit Hilfe einer PD-10 Entsalzungssäule, wobei diese zuvor mit 25 ml 20 mM Na-Phosphat-Puffer (pH 7; siehe unter 8.2.1 im Anhang) äquilibriert wurde.
5. Im Anschluss wurde die neutralisierte Kolostrum-Lösung durch einen 0,45 µm Filter filtriert und die Probe darauffolgend nach und nach auf eine mit 20 mM Na-Phosphat-Puffer (10 ml, pH 7) äquilibrierte HiTrap Protein G-Säule (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) aufgetragen.
6. Es folgte ein Nachspülen der Säule mit 10 ml 20 mM Na-Phosphat-Puffer (pH 7), um die restlichen, ungebundenen Moleküle aus der Säule zu entfernen.
7. Die gebundene IgG-Fraktion wurde anschließend mit 5 ml Elutionspuffer (0,1 M Glycin-HCl, pH 2,7; siehe unter 8.2.1 im Anhang) von der Säulenmatrix abgelöst und

Material und Methoden

das Eluat fraktioniert zu je einem Milliliter in insgesamt fünf vorbereiteten Eppendorfgefäßen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) aufgefangen, welche zur Neutralisation des Eluats jeweils mit 120 µl 1 M Tris-HCl Puffer (pH 9; siehe unter 8.2.1 im Anhang) gefüllt waren.

8. Nach Gebrauch wurde die Säule sofort mit 5 ml 20 mM Na-Phosphat-Puffer (pH 7) reäquilibriert und bis zur Wiederverwendung mit 20 % Ethanol bei 4-8 °C aufbewahrt.

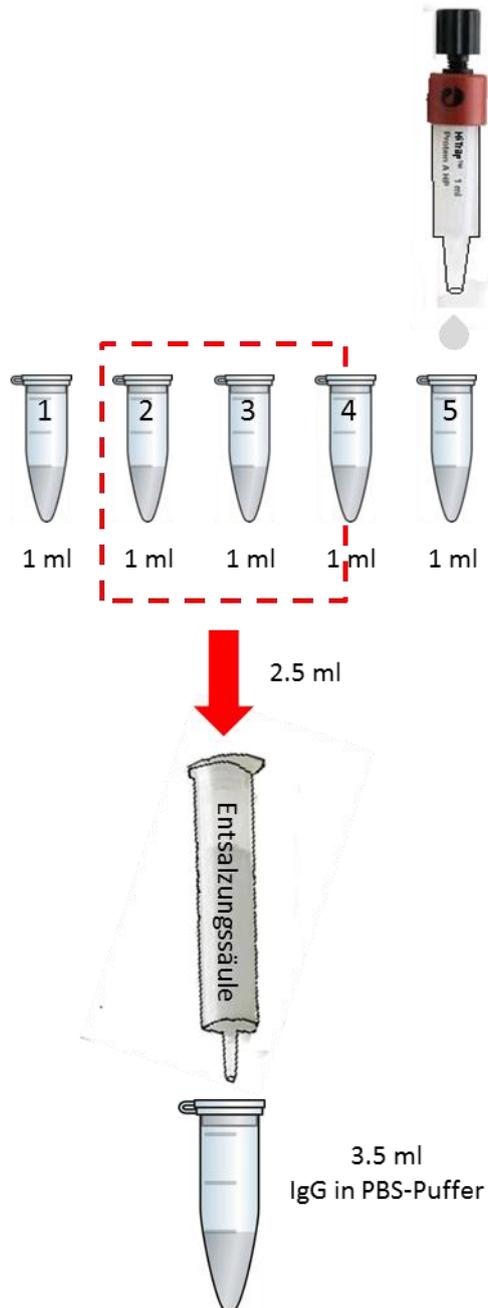


Abbildung 2: Gewinnung des IgG mittels Protein G

(Quelle: <http://www.gelifesciences.com>; Stand: 17.3.14)

3.4.1.1.2 Antikörpergewinnung aus Serum

2 ml Serum wurde in einem Verhältnis von 1:3 mit 20 mM Na-Phosphat-Puffer (pH 7; siehe unter 8.2.1 im Anhang) verdünnt und durch einen Filter (Rotilabo[®]-Spritzenfilter; 0,45 µm) filtriert. Anschließend erfolgte eine Weiterverarbeitung der Probe wie unter 3.4.1.1.1 ab dem Schritt 5 beschrieben.

3.4.1.2 Umpufferung der gewonnenen IgG-Fraktion

Das saure Eluat aus der Protein G-Säule wurde mit einer basischen Tris-HCl-Lösung (pH 9; siehe unter 8.2.1 im Anhang) neutralisiert. Tris weist jedoch eine reaktive primäre Amino-Gruppe auf, welche bei einer späteren Kopplung der Immunglobuline an Marker wie Peroxidase stören könnte. Um diese potentielle Fehlerquelle auszuschließen, erfolgte ein Pufferwechsel zu PBS (pH 7,4; siehe unter 8.2.1 im Anhang) mittels einer PD-10 Entsalzungssäule (siehe dazu auch Abb. 2). Zunächst wurde die Säule mit PBS (25 ml, pH 7,4) äquilibriert. Da nach Anleitung des Herstellers das Probenvolumen zum Auftragen auf die Säule mindestens 2,5 ml betragen soll, wurden die zuvor gewonnenen Fraktionen des Protein G-Säulen-Eluats gepoolt. Dabei wurden die unterschiedlich hohen IgG-Konzentrationen der einzelnen Eluate beachtet, so dass die letztendliche Probe sich aus den Fraktionen 2, 3 und einem geringeren Anteil der Fraktion 4 zusammensetzte, um eine möglichst hohe IgG-Endkonzentration nach dem Pufferwechsel sicherzustellen. Die Elution erfolgte im Anschluss mit 3,5 ml PBS (pH 7,4), eine gleichzeitige Verdünnung der Probe war dabei unvermeidlich.

3.4.1.3 Proteinkonzentrationsmessungen mittels Photometrie

Die photometrische, quantitative Bestimmung der Proteinkonzentration beruht auf einer Eigenabsorption der Proteine von UV-Strahlung. In erster Linie ist die Absorption von der Anzahl der Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin in der Proteinsequenz abhängig.

Zur Bestimmung der vorliegenden IgG-Konzentration in der gewonnenen Lösung wurden photometrisch Absorptionswerte bei 230 nm und 260 nm gemessen. Zuvor wurde das Gerät (UV-1202 Spektrophotometer, Shimadzu Europa GmbH, Duisburg) auf den Reagentien-Leerwert (PBS, pH 7,4; siehe unter 8.2.1 im Anhang) geeicht.

Die Messergebnisse basierten auf einer Probenmenge von 5 µl in 995 µl PBS (pH 7,4), wobei

eine gute Durchmischung der Lösungen durch mehrmaliges Schwenken der Quarz-Küvette (Hellma[®], Suprasil[®] Typ 105.202.008-QS) erreicht wurde.

Verwendete Regression:

Proteinkonzentration ($\mu\text{g/ml}$) = $183 \times \text{Absorption}_{230} - 75,8 \times \text{Absorption}_{260}$ (Shimadzu Corporation, 1990)

3.4.1.4 Kopplung der IgG-Antikörper zum immunhistologischen Nachweis

Die Immunhistologie kennt unterschiedliche Methoden zum Nachweis von Antigen-Antikörperbindungen im Gewebeschnitt. In Bezug auf die folgenden immunhistologischen Untersuchungen kann vor allem zwischen einer direkten Methode und einer indirekten Methode unterschieden werden. Bei der direkten Methode ist der Marker an den Primärantikörper gekoppelt, bei der indirekten an einen Sekundärantikörper, der an den Primärantikörper bindet (Mulisch et al., 2010b).

Da die isolierten IgG-Antikörper aus der Kuh stammen und diese anschließend vorwiegend auf einem Gewebeschnitt der gleichen Spezies Rind eingesetzt werden sollen, muss hierbei aufgrund des endogen vorhandenen IgG im Gewebe, welches sonst von einem Sekundärantikörper gegen bovines IgG ebenfalls gebunden würde, die direkte Nachweismethode angewendet werden (Mulisch et al., 2010b). Zwar sind auch die MDBK-Zellen boviner Abstammung, das Fehlen von IgG in der Zellkultur macht jedoch unter diesen Bedingungen eine indirekte Bindungsnachweismethode mittels eines Sekundärantikörpers möglich. Diese wurde aufgrund der möglichen Bindung einer größeren Anzahl an Markermolekülen an den Primärantikörper mit dem Vorteil einer Signalverstärkung entsprechend als zusätzliche Bestätigung der Bindung von Antikörpern an MDBK-Zellen durchgeführt.

Enzyme werden aufgrund ihrer Eigenschaften selektiv in der Immunhistologie als Markersubstanzen eingesetzt (Avrameas and Uriel, 1966; Nakane, 1971). An Antikörper gekoppelt setzen sie ein zugegebenes Substrat um, woraufhin eine Farbreaktion stellvertretend die Bindung der gekennzeichneten Antikörper an ein Epitop im Gewebe für das Auge sichtbar macht (Mulisch et al., 2010b).

Die Kopplung der Immunglobuline an das Enzym Meerrettich-Peroxidase erfolgte in dieser Arbeit mittels des Lightning Link HRP Conjugation Kits (Novus Biologicals[®], Cambridge, United Kingdom) nach der Anleitung des Herstellers.

Material und Methoden

1. Eine Lösung mit 4 mg IgG-Antikörper in 1 ml PBS Puffer (pH 7,4; siehe unter 8.2.1 im Anhang) wurde hergestellt.
2. Zu diesem Ansatz wurden 100 µl LL-Modifier-Reagenz pipettiert und das Gemisch danach gut mit dem Vortexer gemischt.
3. Anschließend wurde die Lösung auf die lyophilisierte Meerrettich-Peroxidase gegeben und nach Verschließen des Gefäßes abermals gevortext.
4. Die weitere Inkubation fand über einen Zeitraum von 3 h bei Raumtemperatur statt.
5. Nach dieser Zeit wurden noch 100 µl LL-Quencher-Reagenz zu der Lösung dazupipettiert und diese abermals für weitere 30 min bei Raumtemperatur stehen gelassen.
6. Der anschließend gebrauchsfertige, mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelte Antikörper wurde zur Aufbewahrung im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

Um eine erfolgreiche Kopplung der Peroxidase an die Antikörper zu überprüfen, wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Nach dem Auftragen von umgerechnet jeweils etwa 10 µg Protein auf das Gel konnte die freie Peroxidase von an Protein gebundener Peroxidase anhand der unterschiedlichen Bandenmuster unterschieden werden. Die auf Spur 1 aufgetragene, aktivierte Peroxidase besitzt nach Angaben des Herstellers (Peroxidase, activated, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) eine Molekülmasse von 44.000 Da. Die Molekülmasse eines IgG-Antikörpers beträgt im Gegensatz dazu etwa 160.000 Da und würde demnach mit einer Bindung von mindestens einem Peroxidase-Molekül ein molekulares Gewicht von ≥ 200.000 Da aufweisen.

Dabei ist allerdings zu beachten, dass die Gesamtladung der Moleküle und damit ein wichtiger Parameter für die Laufgeschwindigkeit innerhalb des elektrischen Feldes unbekannt war. Somit war anhand des Gels lediglich ein Vergleich zwischen Proteinen mit gebundener Peroxidase und Proteinen ohne Peroxidase möglich, jedoch konnte kein Rückschluss anhand der Laufweite auf die tatsächlich vorliegenden Molekülmassen gezogen werden.

1. Zunächst wurde ein kleines, 2 %iges Agarosegel (1,6 g Agarose, 80 ml 0,1 M Tris-HCl Puffer, pH 9; siehe unter 8.2.1 im Anhang) in einer kleinen Flachgel-Elektrophoresekammer (Keutz, Reiskirchen) angefertigt.
2. Die Gelelektrophorese-Kammer wurde nach ausreichender Aushärtung des Gels mit Puffer (0,1 M Tris-HCl Puffer, pH 9) aufgefüllt, bis der Flüssigkeitsspiegel etwa 0,5 cm oberhalb der Geloberfläche lag.
3. Die unterschiedlichen Komponenten der Proben wurden entsprechend dem Schema der Tabelle 3 zusammenpipettiert und mit jeweils einem Slot Abstand in die dafür vorgesehenen Vertiefungen gegeben. Die jeweils hinzugefügten 2 µl Loading Dye (6x Orange, MBI Fermentas, St. Leon-Rot) dienten dabei der Erhöhung der Dichte der Proben, um ein einfacheres Beladen des Gels zu ermöglichen.
4. Nach dem Auftragen der Proben wurde eine elektrische Spannung von 60 V für 2 h an die Kammer angelegt.
5. Im Anschluss daran wurde das fertige Gel auf einer Glasplatte mit dem Skalpell für eine Küvette passend zurechtgeschnitten und in eine solche hinein gelegt.
6. 0,1 g Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid (DAB, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf) wurde in 200 ml Imidazol-Puffer gelöst (pH 7,1; siehe unter 8.2.1 im Anhang) und die verbliebenen festen Bestandteile mittels Filter entfernt.
7. Die DAB-Lösung wurde daraufhin mit 70 µl H₂O₂ (Perhydrol[®] 30 % H₂O₂ p. a., Merck KGaA, Darmstadt) versetzt und zu dem Gel in die Küvette gegossen, welches anschließend für 5 min abgedunkelt bei Raumtemperatur auf einem Tischrüttler auf niedriger Stufe in ständiger Bewegung gehalten wurde.
8. Nach der enzymatischen Farbreaktion wurde das Gel nach der Entnahme aus der Küvette zur Dokumentation fotografiert.

Tabelle 3: Pipettierschema der Gelelektrophorese (Probenvolumen jeweils 12 µl) zum Nachweis von Kopplungsprodukten mit Peroxidase

| Spur 1 | Spur 3 | Spur 5 | Spur 7 |
|--|--|--|--|
| Aktivierte Peroxidase, 0,625 µl + 9,375 µl PBS/BSA 1 % + 2 µl Loading Dye* | Gekoppelter AK, Negativserum, 2,5 µl + 7,5 µl PBS/BSA 1 % + 2 µl Loading Dye* | Gekoppelter AK, Mischkolostrum, 2,5 µl + 7,5 µl PBS/BSA 1 % + 2 µl Loading Dye* | Aktivierte Peroxidase, 0,625 µl + 9,375 µl PBS/BSA 1 % + 2 µl Loading Dye* (Erst 30 min vor Lauf-Ende aufgetragen!) |

* Loading Dye Solution (6x Orange, MBI Fermentas, St. Leon-Rot)

3.4.1.5 Adsorption von Antikörpern an Blutpulver

Wie bereits unter 3.1.1 erläutert, zeigten erste Testversuche mit den gekoppelten Antikörperlösungen an HOPE[®]-fixierten Knochenmarkgewebeproben einen störenden Einfluss von zahlreichen, alloreaktiven Antikörpern. Zur Reduktion dieser unerwünschten Antikörperbindungen auf ein Minimum und um eine saubere Negativkontrolle zu erhalten, wurde Blut der Blutmutterkuh „Berta“ für eine Adsorption von Antikörpern genutzt. Aufbereitet sollten die antigenen Strukturen der Blutbestandteile den Großteil der in der Lösung befindlichen Alloantikörper binden und somit gleichzeitig aus der Lösung entfernen. Dem Gedanken nach blieben BNP-spezifische Alloantikörper im Gegensatz zu den anderen allerdings frei, da eine Blutmutterkuh der Logik nach keine eigenen Zielantigene diesbezüglich exprimiert. Auf diesem Wege war eine Selektion hinsichtlich der BNP-auslösenden Alloantikörper möglich.

3.4.1.5.1 Herstellung von Blutpulver

1. Circa 500 ml Blut wurden frisch aus der Jugularvene einer Blutmutterkuh (siehe unter 3.1.1) gewonnen und in einem dicht verschlossenen Behälter bei Raumtemperatur etwa 3 h stehen gelassen.
2. Nach dem Gerinnungsprozess wurde der flüssige Überstand verworfen und das schwammartige, koagulierte Blut mit einem Stabmixer (Phillips, 600 W, HR1365) bis zur breiigen Konsistenz zerkleinert.
3. Danach wurde der Masse das 4-fache Volumen an Aceton hinzugefügt und alles einmal kräftig mit einem Metallstab durchgerührt. Die Gefäßöffnung wurde mit Parafilm verschlossen und das Blut-Aceton-Gemisch für 1 h bei Raumtemperatur stehen gelassen.

4. Anschließend wurde der Aceton-Überstand vom Sediment dekantiert und zur möglichst vollständigen Entfernung des Acetons das Sediment zusätzlich abzentrifugiert (Hettich, Rotina 48 RC, 3 min, 1200 g).
5. Es folgten 3 Waschschrte mit einem Überschuss an Leitungswasser, welches jeweils immer durch ein Abzentrifugieren der festen Bestandteile wieder entfernt wurde (je 3 min, 1200 g).
6. Danach wurde abermals eine Entwässerung mit Aceton (insgesamt 3 x) durchgeführt, wobei bei jedem Aufschwemmen mit Aceton eine Einwirkzeit von 5 min und eine Abzentrifugation (3 min, 1200 g) folgten.
7. Die entwässerte Blutmasse wurde zuletzt in Petrischalen ausgebreitet und diese zum Trocknen bei 37 °C über Nacht in den Brutschrank gestellt.
8. Am darauffolgenden Tag wurden die getrockneten Blutbrocken mit einer elektrischen Kaffeemühle zu Pulver gemahlen (Krups 75, Typ 203, Karstadt Gießen) und feuchtigkeitsgeschützt gelagert.

3.4.1.5.2 Adsorption der HRP-markierten Antikörper an Blutpulver

Eine Adsorption der Antikörper an das Blutpulver erfolgte immer unmittelbar vor deren Einsatz in der immunhistologischen Untersuchung. Die bei der Adsorption verwendeten Mengen bzw. Konzentrationen an Blutpulver und Antikörperlösung wurden anhand einer durchgeführten Verdünnungsreihe ermittelt. Dabei wurde explizit darauf geachtet, dass die eingesetzte Gebrauchslösung des Negativserums im Gewebe keinerlei Anfärbung von Zellen erzeugte, während die gebundenen BNP-Antikörper des Bluterserums deutlich als Braunfärbung zu erkennen waren.

1. In einem 2,2 ml großen Eppendorfgefäß wurden 160 mg des gemahlten Blutpulvers zunächst zweimal mit TBS (pH 7,6; siehe unter 8.2.1 im Anhang) für 5 min rehydriert und im Anschluss daran abzentrifugiert (Hettich, 7500 g).
2. Danach wurde ein Volumen von insgesamt 500 µl bestehend aus markierten Antikörpern in der vorgesehenen Gebrauchsverdünnung von 1:400 in TBS hinzugefügt und intensiv auf einem Vortexer (Heidolph, RE AX 1 DR) mit dem Blutpulver für etwa 1 min bei Raumtemperatur gemischt.
3. Anschließend wurde die Suspension für weitere 2 h im Kühlschrank bei 4 °C inkubiert.

4. Nach dieser Zeit wurde das Sediment nochmals für 1 min aufgeschwemmt und dann schließlich wieder abzentrifugiert (Hettich, 7500 g).
5. Der Überstand wurde als fertige, adsorbierte Antikörpergebrauchslösung mit einer Pipette abgezogen und in ein neues Eppendorfgefäß gefüllt.

Dieses wurde bis zum Auftragen der Antikörperlösung auf die Gewebeschnitte bzw. die Zellen bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

3.4.2 Sekundärantikörper

Als Sekundärantikörper zum indirekten Nachweis von gebundenen Antikörpern an MDBK-Zellen wurde bei einem Versuch ein Kaninchen anti-Rind IgG (H+L)-Antikörper der Firma Cappel (inzwischen MP Biomedicals, Eschwege) eingesetzt. Der Antikörper ist Peroxidase-gekoppelt und wurde für die Inkubation in einem Verhältnis von 1:100 in TBS (pH 7,6; siehe unter 8.2.1 im Anhang) verdünnt.

3.5 Immunhistologie

3.5.1 Indirekter immunhistologischer Nachweis der Bindung von Alloantikörpern an MDBK-Zellen

Ein indirekter immunhistologischer Nachweis von IgG-Antikörpern an MDBK-Zellen erfolgte mit einem polyklonalen Sekundär-Antikörper aus dem Kaninchen (siehe 3.4.2).

1. Das Medium der MDBK-Zellen wurde mit einer Pipettierhilfe aus der 25 cm²-Zellkulturflasche entfernt und die Zellen mit vorgewärmter PBS-Lösung (5 ml, pH 7,4; siehe unter 8.2.1 im Anhang) einmalig gewaschen.
2. Nach dem Absaugen des PBS Puffers wurden die Zellen mit 3 ml 0,25 %iger Trypsin/EDTA-Lösung (PAA The Cell Culture Company, Pasching, Österreich) überschichtet und zur Ablösung für 12 min im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.
3. Nach der Ablösung und Vereinzelung der Zellen wurden 3 ml des Mediums zum Abstoppen der enzymatischen Aktivität hinzugefügt, die komplette Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert und dieses dann zentrifugiert (37 °C, 200 g/1200 rpm, 7 min).
4. Im Anschluss daran wurde der Überstand abgesaugt und das übrige Zellpellet mit 3 ml Medium resuspendiert.

5. Eine 1:10-Verdünnung dieser Suspension mit einer entsprechenden Menge an Medium wurde in die Lab Tek[®] II Chamber slides-Kammern (Fisher Scientific GmbH, Schwerte) eingesät (8-kammerig: 25 µl Zellsuspension + 225 µl Medium) und eine Anhaftung der Zellen für 24 h im Brutschrank (37 °C, 0,5 % CO₂) ermöglicht.
6. Am nächsten Tag wurde nach einer mikroskopischen Sichtkontrolle zur Überprüfung der erfolgreichen Zelladhäsion das Medium aus allen Kammern abgesaugt. Es folgte anschließend ein zweimaliges Waschen der Zellen mit PBS (pH 7,4).
7. In die einzelnen Kammern wurde je 250 µl einer ungekoppelten IgG-Lösung (siehe dazu Tabelle 4) zügig eingebracht und der gekammerte Objektträger anschließend für 30 min im Kühlschrank bei 4 °C inkubiert. Als Negativ-Kontrolle für das Vorliegen von endogener Peroxidase wurde zusätzlich eine Kammer nur mit PBS (pH 7,4) anstelle der Antikörperlösung beschichtet.
8. Nach wiederholtem zweimaligen Waschen der Zellen mit PBS (pH 7,4) zur Entfernung von ungebundenen Antikörpern wurde das Kammersystem abmontiert und der Objektträger unmittelbar im Anschluss daran für 10 min in eiskaltem Methanol fixiert. Es folgte eine Trocknung an der Luft.
9. Danach wurde der Objektträger auf ein mit TBS (pH 7,6; siehe unter 8.2.1 im Anhang) benetztes Coverplate[™] (Life Science International, Frankfurt am Main) aufgespannt und in eine zugehörige Halterung eingesetzt.
10. Es erfolgte ein zweimaliges Durchspülen der Coverplates[™] mit etwa 2 ml TBS für jeweils 5 min.
11. Im Anschluss daran wurden 100 µl (Verdünnung 1:100 in TBS, pH 7,6) des Sekundärantikörpers Kaninchen anti-Rind IgG (H+L) in den Coverplate[™]-Schlitz eingebracht und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.
12. Danach folgten 2 weitere Waschschritte wie unter Schritt 10 beschrieben, ein dritter wurde nach der Entnahme des Objektträgers aus dem Coverplate[™] in einer Küvette in TBS für weitere 5 min durchgeführt.
13. Während der Spülungen wurde 0,05 % 3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid (DAB, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf) in 200 ml Imidazol-Puffer (pH 7,1; siehe unter 8.2.1 im Anhang) gelöst, die festen Bestandteile abfiltriert und der Lösung frisch 0,01 % H₂O₂ (Perhydrol[®] 30 % H₂O₂ p. a., Merck KGaA, Darmstadt) zugesetzt.
14. Danach wurde der Objektträger in die Küvette mit der DAB-Lösung gestellt und unter ständigem Rühren mittels Magnetrührer für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert.

15. Es folgten nochmals mehrere Waschstritte (3 x in TBS jeweils für je 5 min, dann 1 x für 5 min in Aqua dest.).
16. In einer Papanicolaous Hämatoxylin-Lösung (1:10 in Aqua dest.) wurde der Objektträger anschließend etwa 30 s gegengefärbt, wobei das darauffolgende Bläuen in lauwarmem Leitungswasser 5 min in Anspruch nahm.
17. Zum Entwässern wurde der Schnitt durch die aufsteigende Alkoholreihe geführt und nach dem 3-maligen Klären in Roti-Histol[®] im Eindeckautomaten (TissueTec[®]) mit Folie eingedeckt.

Tabelle 4: Ungekoppelte Antikörper für einen indirekten Nachweis auf MDBK-Zellen

| Antikörper aus | Verdünnung mit TBS/BSA 1 % | Volumen |
|----------------------|----------------------------|---------|
| Mischbluterkolostrum | 1:100 | 250 µl |
| - Negativkolostrum | 1:100 | 250 µl |
| Serum VT 131 | 1:100 | 250 µl |
| - Negativserum | 1:100 | 250 µl |

3.5.2 Direkter immunhistologischer Nachweis der Bindung von Alloantikörpern an MDBK-Zellen

Für den direkten immunhistologischen Nachweis wurden MDBK-Zellen vital mit einer Antikörperlösung inkubiert und die Bindung der markierten und wie unter 3.4.1.5.2 adsorbierten Antikörper mit dem Chromogen Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid (DAB, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnellendorf) dargestellt. Als interne Prozesskontrolle wurde ungekoppeltes Mischbluterkolostrum aus Hannover verwendet, ebenfalls in einer Verdünnung von 1:50.

1. Das Einsäen der MDBK-Zellen in die Kammern des Lab Tek[®] II Chamber slides erfolgte wie bei 3.5.1 bei den Schritten 1.-6. beschrieben.
2. Anschließend wurde analog zu den Untersuchungen an Gewebeschnitten ein Blocking mit angerührter, 10 %iger fettfreier Milch (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnellendorf) für 30 min bei 4 °C durchgeführt.
3. Nach dem Absaugen des Blocking-Serums wurden die Lösungen mit den markierten Antikörpern in einer Verdünnung von 1:50 (siehe dazu auch Tabelle 5) nach dem Schema der Abbildung 2 aufgetragen und für 30 min bei 4 °C inkubiert.

Material und Methoden

4. Nach dreimaligem Waschen der Zellen mit PBS (pH 7,4; siehe unter 8.2.1 im Anhang) zur Entfernung von nichtstrukturell gebundenen Antikörpern und der Ablösung des Kammersystems wurde der Objektträger für 10 min in eiskaltem Methanol fixiert und anschließend luftgetrocknet.
5. Die Farbreaktion mit DAB und die darauffolgenden Schritte wurden wie unter 3.5.1 Punkt 12. - 17. beschrieben durchgeführt.

Tabelle 5: Markierte Antikörper für einen direkten Nachweis auf MDBK-Zellen

| Antikörper aus | Verdünnung mit TBS/BSA 1 % | Volumen |
|----------------------|----------------------------|---------|
| Mischbluterkolostrum | 1:50 | 250 µl |
| - Negativkolostrum | 1:50 | 250 µl |
| Mischbluterserum | 1:50 | 250 µl |
| - Negativserum | 1:50 | 250 µl |

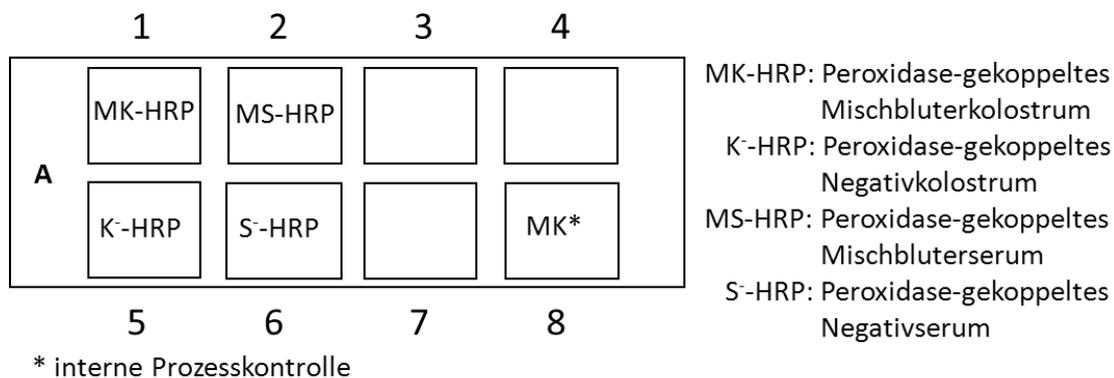


Abbildung 3: Pipettierschema zum direkten immunhistologischen Nachweis am LabTek[®] II Chamber Slide

3.5.3 Immunhistologischer Nachweis der Bindung von Alloantikörpern am Gewebeschnitt mittels adsorbierten, HRP-markierten Antikörpern

3.5.3.1 Entparaffinierung und Rehydrierung

3.5.3.1.1 Entparaffinierung und Rehydrierung von Formalin-fixierten Gewebeschnitten

1. Die Objektträger mit Formalin-fixiertem Material wurden zur Entfernung des Paraffins zunächst für insgesamt 10 min in Xylol-Ersatz (Roti-Histol[®], Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) getaucht.
2. Es folgte eine Rehydrierung der Schnitte mittels einer absteigenden Alkoholreihe (2 x Isopropanol, 1 x 96 % Alkohol, 1 x 80 % Alkohol) für jeweils 3 min.

3.5.3.1.2 Entparaffinierung und Rehydrierung von HOPE[®]-fixierten Gewebeschnitten

Die Entparaffinierung und Rehydrierung des HOPE[®]-Materials basierte auf der Anleitung des Herstellerprotokolls.

1. Eine ausreichende Anzahl an Standküvetten mit Isopropanol wurde in einem Wasserbad auf eine Temperatur von 61 °C erwärmt.
2. Danach wurden maximal 4 Objektträger in eine Standküvette hineingesetzt und für insgesamt 15 min (nach 5 min in eine frische Küvette umgesetzt, nach weiteren 10 min dann in 3. Küvette intensiv gewaschen) im heißen Isopropanol entparaffiniert und im Anschluss daran luftgetrocknet.
3. Als nächstes wurden die Schnitte für 10 min in eisgekühltes, 70 %iges Aceton getaucht.
4. Unmittelbar danach wurden die noch feuchten Objektträger durch eine Küvette mit Aqua dest. geschwenkt und dann sofort zur Rehydrierung des Gewebes für weitere 10 min in eine zweite Küvette mit frischem Aqua dest. gestellt.
5. Abschließend folgte eine Trocknung der Schnitte auf einer Wärmeplatte für 1-2 min bei 45 °C.

3.5.3.2 Immunhistologische Untersuchung an Gewebeschnitten

Die entparaffinierten und rehydrierten Gewebeschnitte wurden im nächsten Schritt immunhistologisch untersucht. Die dabei verwendeten Verdünnungen der Antikörperlösungen sind in Tabelle 6 aufgeführt.

1. Zur Inaktivierung der endogenen Peroxidase wurden die Objektträger in eine Küvette mit TBS (pH 7,6; siehe unter 8.2.1 im Anhang) und frisch zugesetztem 0,5 % H₂O₂ (Perhydrol[®] 30 % H₂O₂ p.a.) gestellt und bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert.
2. Der nächste Schritt bestand aus zweimaligem Waschen in Küvetten mit TBS für jeweils 5 min.
3. Danach wurden die Schnitte auf mit TBS benetzte Coverplates[™] (Life Science International, Frankfurt am Main) aufgebracht und in eine zugehörige Halterung eingesetzt.
4. Es folgte ein 2-maliges Durchspülen der Coverplates[™] mit TBS für jeweils 5 min.
5. Für das anschließende Blocking wurde auf jeden Schnitt 100 µl 10 %ige, fettfreie Milch (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf) aufgetragen und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.
6. Anschließend wurden 100 µl der HRP-Antikörper-Lösung in den Einfüllschlitz pipettiert und die Halterung zur Inkubation der Schnitte für 12-18 h bei 4 °C in den Kühlschrank gestellt.
7. Am nächsten Tag wurden die Coverplates[™] zunächst 2-malig mit TBS für jeweils 5 min durchgespült.
8. Die nachfolgende Farbreaktion mit DAB und die darauffolgenden Schritte wurden wie unter 3.5.1 Punkt 13. - 17. beschrieben durchgeführt.

Tabelle 6: Tabelle der verwendeten Antikörper-Verdünnungsstufen

| Material | Verdünnung mit TBS | Volumen |
|--------------------------------------|--------------------|---------|
| Formalin-fixierte Schnitte | 1:50 | 100 µl |
| HOPE [®] -fixierte Schnitte | 1:400 | 100 µl |

3.5.4 Untersuchung zum Auftreten von Zellen mit positiver, jedoch granulärer zytoplasmatischer Reaktion in der Milz

Nach Inkubationen von Meerrettichperoxidase-gekoppelten Seren mit Milzgewebe zeigten vereinzelte makrophagenartige Zellen eine granuläre, zytoplasmatische Braunfärbung. Histologisch waren diese von den anderen positiven Zellen mit membranöser Reaktion unterscheidbar. Zur näheren Aufklärung der Ursache dieser granulär gefärbten Zellen wurde ein Versuch durchgeführt, bei dem einzelne Komponenten der Inkubationsschritte des immunhistologischen Protokolls durch TBS-Puffer (pH 7,6; siehe unter 8.2.1 im Anhang) ersetzt wur-

den. Als Gewebe wurde Milz des Kalbes K21 verwendet, welches Zellen mit granulärer Anfärbung im Milzgewebe aufwies.

- 1.-5. Die Anfertigung von 8 HOPE®-Schnitten erfolgte wie unter 3.3.2 beschrieben.
6. Zunächst wurde eine Adsorption der HRP-gekoppelten AK-Lösungen (Blutermischserum und Negativ-Serum) an Blutpulver wie unter 3.4.1.5.2 beschrieben durchgeführt.
7. Die anschließende Entparaffinierung und Rehydrierung der Gewebeschnitte erfolgte wie unter 3.5.3.1.2 beschrieben.
8. Die Immunhistologie wurde wie unter 3.5.3.2 beschrieben durchgeführt, wobei jeweils ein Gewebeschnitt mit der AK-Lösung aus Blutermischserum und ein Gewebeschnitt mit der AK-Lösung aus Negativ-Serum inkubiert wurde. Zwei Gewebeschnitte wurden komplett nach Protokoll inkubiert, bei zwei weiteren wurde das Wasserstoffperoxid durch TBS ersetzt. Beim dritten Inkubationsansatz wurden die AK-Lösungen durch TBS ersetzt und im letzten Ansatz wurden sowohl das H₂O₂ als auch die AK-Lösungen durch TBS-Puffer ausgetauscht, um gegebenenfalls eine Reaktion durch das DAB nachzuweisen (siehe dazu Tabelle 7).

Tabelle 7: Schema der verschiedenen Versuchsansätze zur Untersuchung der Ursache der granulären, positiven Reaktionen an Zellen in der Milz

| | <u>Ansatz 1</u> | <u>Ansatz 2</u> | <u>Ansatz 3</u> | <u>Ansatz 4</u> |
|--|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| TBS/ H₂O₂ | x | TBS | x | TBS |
| Ads. AK | x | x | TBS | TBS |
| DAB | x | x | x | x |

x: die Komponenten wurden nach Protokoll verwendet

3.6 Beurteilung und Auswertung der Immunhistologie

3.6.1 Nachweis der gebundenen Antikörper

3.6.1.1 Nachweise der gebundenen Antikörper an MDBK-Zellen

Eine positive Reaktion stellte sich immunhistologisch als braune, zellassoziierte Anfärbung der Zellmembran dar (+). Keine Anfärbung entsprach einem negativen Ergebnis und ist so zu interpretieren, dass keine Antikörper an die Zellen gebunden haben (-).

3.6.1.2 Nachweise der gebundenen Antikörper an Gewebeschnitten

Im Falle von gebundenen Antikörpern an Gewebeschnitten stellte sich eine positive Reaktion ebenfalls als braune, zellassoziierte Anfärbung der Zellmembran dar, welche bei einer gleichzeitig durchgeführten Inkubation mit Antikörpern aus Negativserum nicht zu beobachten war. Zur Beurteilung wurden diesbezüglich jedoch nur solche Areale betrachtet, welche sich nicht direkt am Rande des Gewebestückes befanden, keinerlei Schneideartefakte wie Risse oder Falten zeigten und eine gute, morphologische Detailerkennbarkeit aufwiesen.

3.6.1.2.1 Auswertung der immunhistologischen Untersuchungen

Die Anzahl an positiven Zellen wurde semiquantitativ in ein 3-stufiges Schema (Tabelle 8) eingeordnet und somit nochmals in die Grade geringgradig positiv (+), mittelgradig positiv (++) und hochgradig positiv (+++) unterteilt. Negative Schnitte, bei denen sich keinerlei Braunfärbung einer Zellmembran mittels der Immunhistologie darstellen ließen, wurden mit einem „-“ gekennzeichnet.

Auffällige Merkmale hinsichtlich des markierten Zelltyps und der Lokalisation der Zellen wurden ebenfalls, wenn vorhanden, erfasst und dokumentiert.

Tabelle 8: Schema zur semiquantitativen Auswertung der immunhistologischen Untersuchungen

| | |
|-----|---|
| - | Keine markierten Zellen vorhanden |
| + | Wenige markierte Zellen erkennbar |
| ++ | Deutliche Markierung von zahlreichen Zellen |
| +++ | Sehr viele Zellen markiert und teils flächenhaft angefärbtes Erscheinungsbild |

3.6.1.3 Nachweis der gebundenen Antikörper an Leukozyten

Von 3 Studienkälbern (K35, K38 und K39) standen isolierte Leukozyten aus dem Blut für immunhistologische Untersuchungen zur Verfügung (siehe dazu auch unter 3.1.2.1). Die angefertigten Zellpellets wurden aufgrund ihrer eingeschränkten Anzahl an beurteilbaren Zellen analog wie unter 3.6.1.1 beschrieben lediglich in immunhistologisch reaktiv (+), oder eben nicht reaktiv (-) eingestuft.

3.7 Beurteilung der HE-gefärbten Gewebeschnitte

Eine semiquantitative Einschätzung des Zellgehaltes im Knochenmark erfolgte mikroskopisch sowohl an HOPE[®]-fixierten (9. und 13. Lebenstag) als auch an Formalin-fixierten Gewebeschnitten (30. Tag). Dabei wurde insbesondere auf das Vorkommen aller drei Zellreihen des Knochenmarks (myelo-poetische Reihe, erythro-poetische Reihe und thrombo-poetische Reihe) geachtet und das Mengenverhältnis von Fettgewebe zu hämatopoetisch aktivem Gewebe beurteilt. Schnitte, welche nicht mindestens die Fläche einer 40-fachen mikroskopischen Vergrößerung an Knochenmark aufwiesen, wurden als nicht beurteilbar eingestuft. Bei allen anderen erfolgte eine semiquantitative Auswertung für die einzelnen Zellreihen unter Einbeziehung des zuvor beurteilten Vorkommens von Adipozyten nach dem Schema der Tabelle 9. Dabei wurde der physiologische „Normalzustand“ (++) auf den sich die Zellzahl-Beurteilungen letztendlich jeweils beziehen, anfangs basierend auf einem Durchschnittswert der beobachteten Zellen unbehandelter Kälber (9. Tag) festgelegt.

Zusätzliche Auffälligkeiten im Knochenmark wurden unabhängig davon ebenfalls dokumentiert. Ferner wurden die angefertigten Organschnitte unter dem Mikroskop auf pathologische Veränderungen, insbesondere in Form von Entzündungen, überprüft.

Tabelle 9: Schema zur semiquantitativen Auswertung der Zellen im Knochenmark

| Symbol | Fett | Erythropoese | Leukopoese | Thrombopoese |
|--------|---|---|--|---|
| - | Nicht vorhanden | | | |
| + | Wenige, vereinzelte Fettzellen | Merklich weniger Inseln als normal | Merklich weniger leukopoetische Zellen als normal | 1 Megakaryozyt im 400x-Sichtfeld |
| ++ | 25-50 % des analysierten Gesichtsfeldes | Durchschnittlich viele Inseln („Normalzustand“) | Durchschnittlich viele leukopoetische Zellen („Normalzustand“) | Durchschnittlich viele Megakaryozyten („Normalzustand“) |
| +++ | > 50 % des analysierten Gesichtsfeldes | Merklich mehr Inseln als normal | Merklich mehr leukopoetische Zellen als normal | Merklich mehr Megakaryozyten als normal |
| ++++ | - | Erheblich mehr Inseln als normal | Erheblich mehr leukopoetische Zellen als normal | Erheblich mehr Megakaryozyten als normal |

3.8 Statistische Analyse

Für das Vorkommen der vier gewählten Entzündungslokalisationen (Thrombophlebitis, Endokarditis, Pneumonie, Enteritis) und den Vergleich der Verteilung innerhalb der beiden Studienkälber-Serumgruppen wurden Häufigkeitstabellen angefertigt. Darauf basierend wurden anschließend exakte Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests (WMW) durchgeführt. Analog dazu wurde ebenfalls zur Berechnung eines Zusammenhanges zwischen dem Vorliegen einer Endokarditis und einer erhöhten Leukopoese am 30. Lebenstag ein exakter Wilcoxon-Mann-Whitney-Test angewendet.

Die Untersuchung des Zusammenhanges zwischen der Zellzahl der einzelnen Zelltypen (Fettzellen, Erythropoese, Leukopoese, Thrombopoese) im Röhrenknochenmark und der Zellzahl im Sternalmark wurde ebenso wie der Zusammenhang zwischen den Serumgruppen und der Zellzahl zu einem bestimmten Zeitpunkt mit Hilfe einer Korrelationsanalyse unter Verwendung des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman (r_s) berechnet. Ebenfalls wurde der Spearman-Koeffizient für eine Gegenüberstellung zwischen den Serumgruppen und den erzielten immunhistologischen Ergebnissen angewendet. Zum Vergleich von Röhren- mit Sternalmark wurde zusätzlich zum Korrelationskoeffizienten nach Spearman für jeden Zelltyp auch ein McNemar-Test durchgeführt. Dieser Test zählt zur Gruppe der Chi-Quadrat-Tests und stellt einen Test auf Symmetrie dar. Dabei geht die Nullhypothese davon aus, dass sich Stichproben hinsichtlich eines dichotomen Merkmals nicht unterscheiden, also eine gleiche Ausprägung des Merkmals vorliegt. Für einen Zusammenhang von Zellzahl-Veränderungen über die Zeit wurde der Friedman-Test angewendet, welcher zur Untersuchung von drei oder mehr Stichproben auf Gleichheit eines Lageparameters dient. Betrachtet werden diesbezüglich die einzelnen Zelltypen eines jeden Kalbes über die drei Probenentnahmezeitpunkte (9. Tag, 13. Tag, 30. Tag) hinweg. Zur statistischen Prüfung der Gruppen- und Zeit-Einflüsse auf Signifikanz wurde eine Kovarianzanalyse mit Messwiederholungen bezüglich der Zeit durchgeführt. Demzufolge war mit dieser Berechnung eine Überprüfung des Zeiteffekts und der Serumdosisabhängigkeit (= Kovariable) unter Beachtung der Serumgruppe möglich. Auch dieses Rechenverfahren wurde für alle Zelltypen durchgeführt.

Für die Untersuchung eines Zusammenhanges zwischen den immunhistologischen Ergebnissen auf BNP-Empfänglichkeit der Kälber und den jeweiligen Ergebnissen der anderen Institute (Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig-Universität Gießen; Institut für Virologie des Fachbereichs Veterinärmedizin, Justus-Liebig-Universität Gießen) wurde ein partieller Rangkoeffizient erstellt. Bei diesem wurde der Faktor Zeit herausgerechnet, um den Vergleich aufgrund der verschiedenen Testzeitpunkte (Testzeitpunk-

te der anderen Institute: 9. Lebenstag; Zeitpunkt der Immunhistologie: 30. Lebenstag) durchführen zu können.

Die Berechnungen wurden am Institut für Biomathematik und Datenverarbeitung der Justus-Liebig-Universität Gießen mit Hilfe des Statistikprogrammpaketes BMDP/Dynamic, Release 8.1 (Dixon, 1993) erstellt. Die Erstellung der Häufigkeitstabellen, die Berechnung sowohl des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman als auch des partiellen Rangkorrelationskoeffizienten, die Anwendung des McNemar-Tests und die Anwendung des Friedman-Tests basierten auf dem Programm BMDP4F. Der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test wurde auf Grundlage des Programms BMDP3D erstellt. Aufgrund des hohen Anteils an Rangbindung wurde anschließend beim Vergleich der zwei Serumgruppen der exakte Wert mit dem Programm „StatXact“ berechnet (Cytel Studio, 2010). Die Kovarianzanalyse wurde mit dem Programm BMDP2V durchgeführt.

Bei der Bewertung statistischer Signifikanzen wurde ein Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ zugrunde gelegt, das heißt Ergebnisse mit $p \leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

4 Ergebnisse

4.1 Makroskopische und histologische Sektionsbefunde der Studienkälber

Die Kälber der Versuchsstudie wurden am 30. Lebenstag seziert und makroskopisch und histologisch auf pathologische Veränderungen untersucht. Häufig waren bei den Tieren entzündliche Prozesse zu finden, welche sich lokal in einem oder auch verstreut in mehreren Organ-systemen manifestiert hatten. In erster Linie waren bei fast 70 % der Studienkälber chronische, thrombotische Endokarditiden auffällig, welche überwiegend im rechten Herzohr, an der Trikuspidalklappe und zum Teil auch parietal im rechten Ventrikel zu finden waren. Bei etwa der Hälfte der Tiere konnte makroskopisch eine Enteritis festgestellt werden, deren Entzündungsqualität sich katarrhalisch darstellte. Dabei war bei einigen betroffenen Kälbern zusätzlich ein Blutaustritt in das Darmlumen zu beobachten. Die diagnostizierten Pneumonien ($\approx 60\%$) wiesen im Allgemeinen einen katarrhalisch-eitrigen Charakter auf und waren typischerweise überwiegend in den Spitzenlappen lokalisiert. Auch die Entzündungen im Bereich einer oder beider Jugularvenen waren durch eine vorwiegend eitrig Komponente gekennzeichnet. Die statistischen Analysen ergaben eine signifikante Korrelation zwischen dem Auftreten einer Endokarditis und dem transfundierten Serum ($p = 0,023$), demzufolge Kälber der BNP-Serumgruppe mit einer höheren Wahrscheinlichkeit eine Endokarditis aufwiesen als Kälber der Kontrollgruppe. Eine statistisch signifikante Korrelation zwischen dem Vorliegen einer Endokarditis im Zusammenhang mit einer gesteigerten Leukopoese (30. Tag) konnte auf der Basis des Signifikanzniveaus von $\alpha = 0,05$ allerdings nicht belegt werden. Bei der Betrachtung der Kälber der Kontrollgruppe zeigten diese im Vergleich zu den Tieren der BNP-Serumgruppe eine höhere Tendenz zur Ausbildung einer Pneumonie. Statistisch war dieser Zusammenhang bei einem p -Wert von $p = 0,009$ signifikant.

Ergebnisse

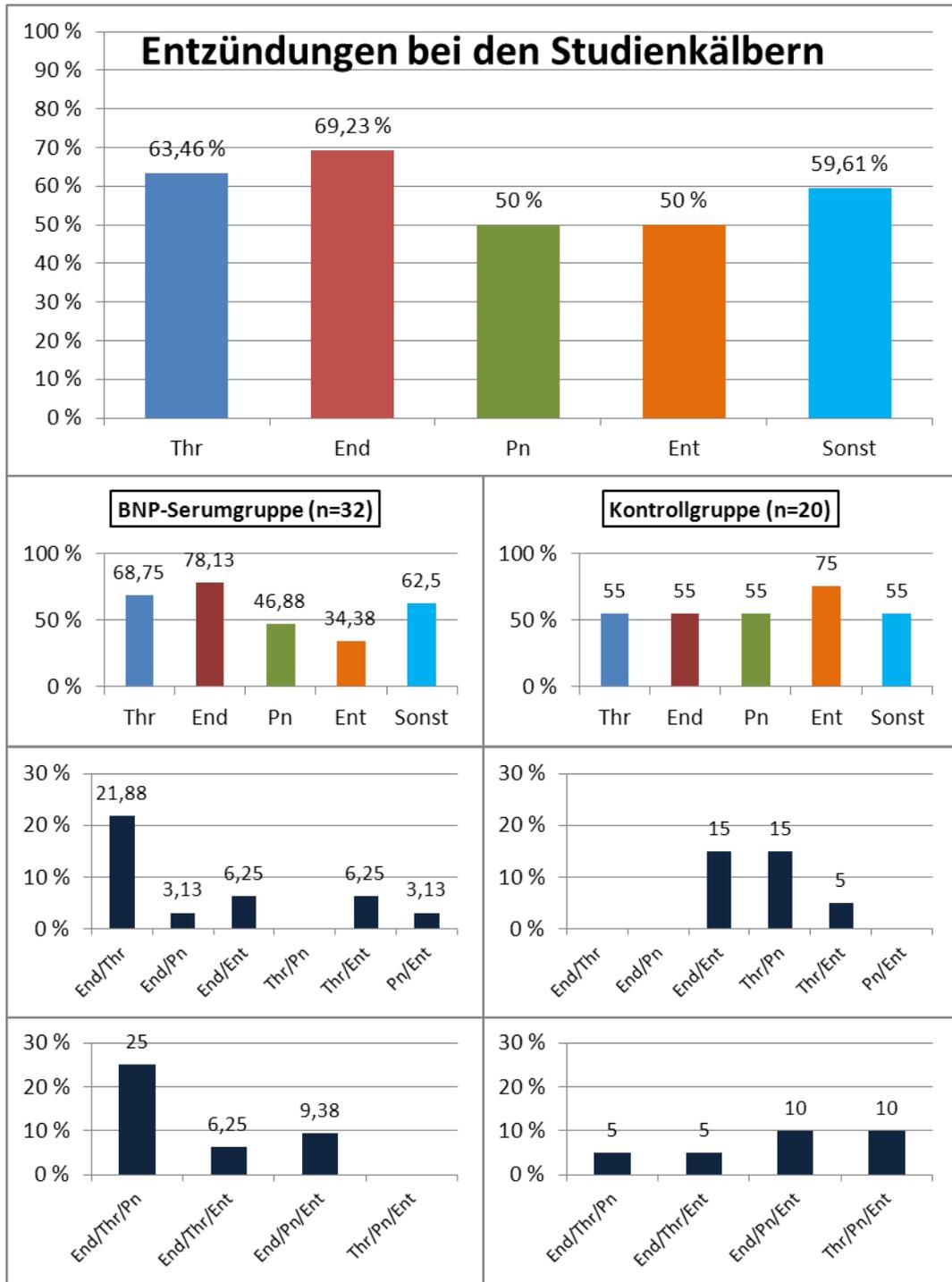


Abbildung 4: Darstellung der Entzündungen der Studienkälber insgesamt (oben) und innerhalb der einzelnen Serumgruppen (BNP-Serumgruppe: linksseitig; Kontrollgruppe: rechtsseitig) in Prozent (Thr: Thrombophlebitis; End: Endokarditis; Pn: Pneumonie; Ent: Enteritis; Sonst: sonstige Entzündungen). Der Anteil der Kälber, welche alle 4 ausgewählten Entzündungsformen aufwies (End/Thr/Pn/Ent), betrug in der BNP-Serumgruppe 3,13 % und in der Kontrollgruppe 15 %.

In Hinsicht auf BNP-typische Blutungen ins Gewebe oder auf den Schleimhäuten konnte lediglich bei Kalb 44 eine Glossitis mit assoziierten Blutungen und bei Kalb 10 eine fokale Blutung am Blasenhals beobachtet werden. Sonstige Blutungen oder andere Hinweise auf eine klinisch ausgeprägte BNP fanden sich bei keinem der obduzierten Tiere.

Eine detaillierte Auflistung der entzündlichen Veränderungen bei den einzelnen Versuchskälbern findet sich im Anhang in Tabelle 8.1.4.

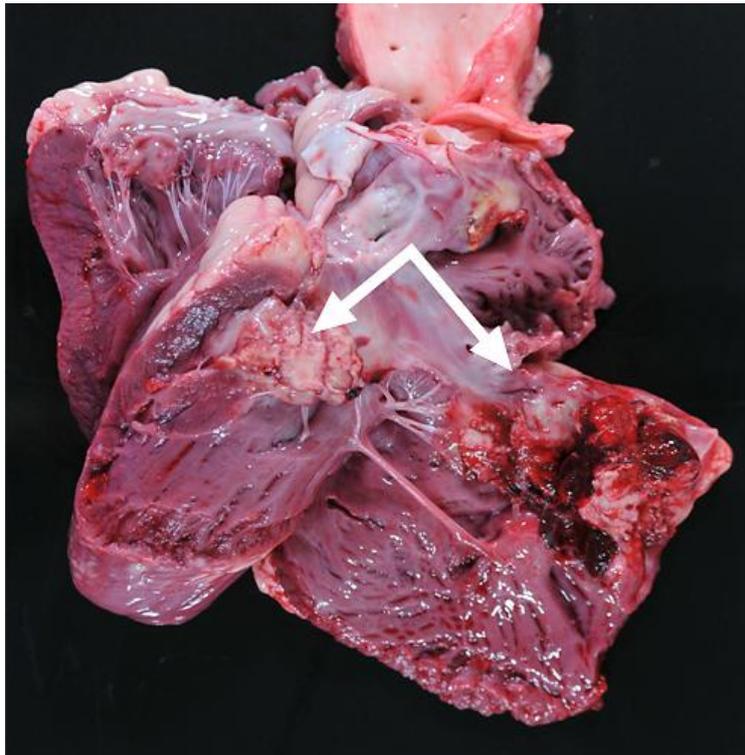


Abbildung 5: Hochgradige multifokale thrombosierende Endokarditis valvularis (Pfeile) an der Trikuspidalklappe des rechten Ventrikels; K25

4.2 Histopathologische Untersuchungen an HE-gefärbten Schnitten des Knochenmarks

Die entnommenen Biopsien am 9. und auch am 13. Lebenstag der Kälber zeigten untereinander verglichen deutliche Qualitätsunterschiede. Zum einen waren in mehreren der aufbereiteten Proben kein oder nur sehr wenig Knochenmarksgewebe enthalten, so dass einige der Biopsien aufgrund ihres geringen Anteils an zusammenhängendem Knochenmark die Kriterien des

angelegten Auswertungsschemas nicht erfüllten und folglich im weiteren Verlauf der Untersuchungen nicht beurteilt werden konnten. Zumeist war in solchen Schnitten anstelle des Knochenmarks nahezu ausschließlich Blut und Fettgewebe zu finden (siehe dazu Abb. 6). Zum anderen gab es merkliche Varianzen was den Erhalt der Zellmorphologie anbetraf, so dass eine Unterscheidung der verschiedenen Zellreihen zwar grundsätzlich noch möglich war, sich bei vielen Schnitten ein gezielteres Ansprechen einzelner Zellen jedoch als nicht durchführbar erwies. Trotz dieser eingeschränkten Detailerkennbarkeit konnten Zellen der Erythropoese, Leukopoese und der Thrombopoese in allen Schnitten anhand der zellulären Charakteristika voneinander abgegrenzt werden, so dass eine semiquantitative Erfassung möglich war. Die detaillierten Ergebnisse der semiquantitativen Auswertungen der einzelnen Zelltypen sind im Anhang in Tabelle 8.1.5 zu finden.

Bei keiner auswertbaren Knochenmarksprobe konnte eine Panmyelophthise beobachtet werden, welche ein Anzeichen für eine durch das übertragene Serum induzierte BNP-Erkrankung hätte darstellen können (siehe unter 2.1.8.1).

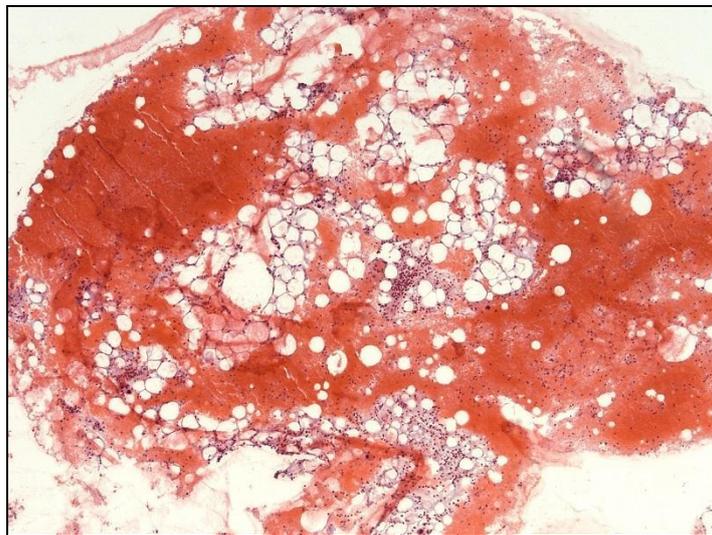


Abbildung 6: Knochenmarkbiopsat, welches überwiegend aus Blut und Fettgewebe besteht. Es sind lediglich vereinzelt Knochenmarkzellen vorhanden, jedoch nicht in einem größeren Verbund. Folglich Ausschluss der Probe von der Bewertung. K2, HOPE[®]-Fixierung, Biopsie aus dem Os femoris, 13. Tag, Obj. x 4, HE

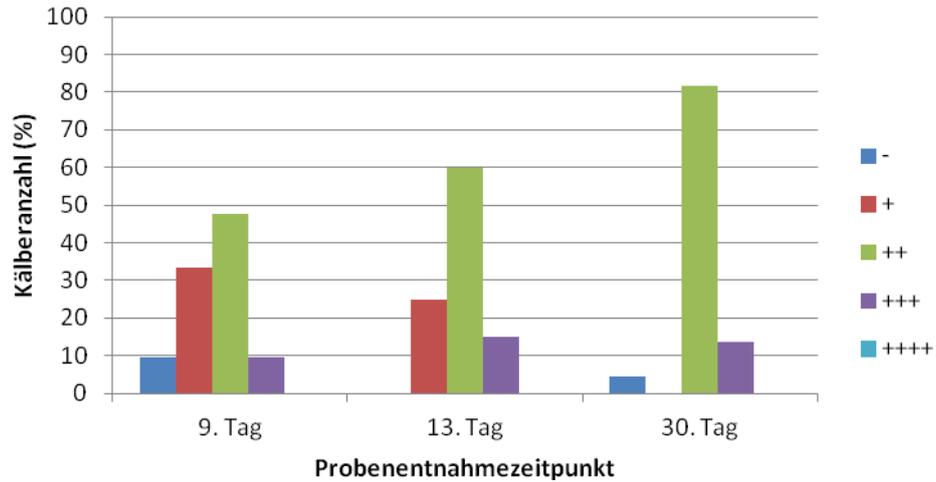
4.2.1 Anzahl der Fettzellen im Röhrenknochenmark

Das Fett im Zytoplasma der Adipozyten wurde durch den Einsatz von organischen Lösungsmitteln bei der Prozessierung des Gewebes herausgelöst, so dass sich eine Fettzelle mikroskopisch typisch leer und einem Siegelring ähnlich darstellte. Es wurden lediglich solche Fettzellen beurteilt, welche direkt mit hämatopoetischem Gewebe in Verbindung standen. Dies sollte eine fehlerhafte Einbeziehung von akzidentell bei der Entnahme aspiriertem subkutanem Fettgewebe in die Auswertung vermeiden.

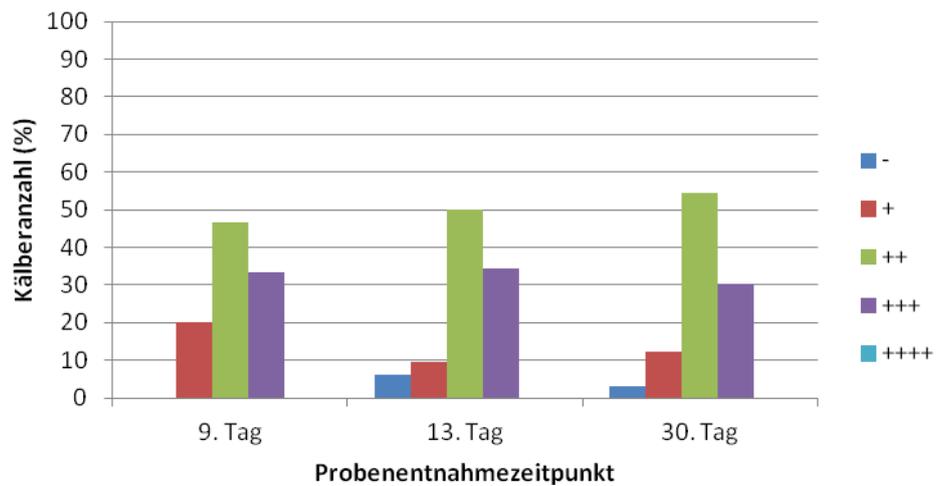
Bereits bei der Betrachtung der Gewebeschnitte des ersten Biopsie-Entnahme-Zeitpunktes (9. Tag), an dem alle Kälber sowohl gleich alt als auch noch unbehandelt waren und dementsprechend von gleichen Vorbedingungen ausgegangen werden konnte, war in der histologischen Untersuchung die Anzahl an schon vorhandenen Adipozyten im Knochenmarkgewebe sehr unterschiedlich. Im Verlauf der später entnommenen Gewebsbiopsien betrachtet (13. Tag, 30. Tag), war in der Kontrollgruppe eine stetige Zunahme der Fettzellanzahl zu erkennen. In der Kälbergruppe, welche BNP-Serum übertragen bekommen hatte, stagnierte im Vergleich der Wert zwischen Lebenstag 13. und 30. nahezu, häufig war hier sogar eine Verminderung des Fettgehalts zu sehen. So zeigt die Tabelle 10, dass 13 von 28 ausgewerteten Kälbern (46 %) der BNP-Serumgruppe am 30. Lebenstag weniger Fettzellen als noch am 13. Lebenstag aufwiesen (siehe auch Abb. 12). Im Vergleich dazu zeigten in der Kontrollgruppe lediglich 2 der 20 Kälber (10 %) zum 30. Tag eine Verringerung der Fettzellanzahl (siehe auch Tabelle 10 und Abb. 11).

Die Auswertung der statistischen Analysen ergab eine signifikante Korrelation ($p = 0,04$) bei der Gegenüberstellung der Anzahl der Fettzellen am 9. Tag zur Serumgruppe. Demzufolge wiesen BNP-Kälber mehr Fettzellen am 9. Tag im Knochenmark auf als Tiere der Kontrollgruppe. Des Weiteren ergab die durchgeführte Kovarianzanalyse eine signifikante Abhängigkeit der Fettzellenanzahl von der erhaltenen Serumdosis ($p = 0,01$). Die Tiere, welche mehr Serum übertragen bekommen hatten, besaßen mehr Fettzellen im Röhrenknochenmark.

Ergebnisse



(a) Semiquantitative Auswertung des Anteils an Fettzellen der Kälber, welche am 10. Lebenstag Kontrollserum infundiert bekamen. -, +, ++, +++ und ++++ siehe unter 3.7, Tabelle 9



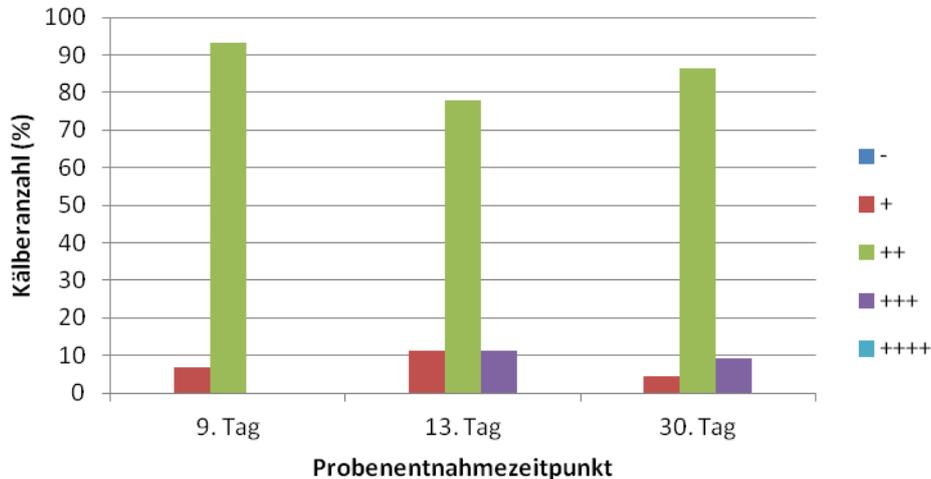
(b) Semiquantitative Auswertung des Anteils an Fettzellen der Kälber, welche am 10. Lebenstag Bluterserum infundiert bekamen. -, +, ++, +++ und ++++ siehe unter 3.7, Tabelle 9

Abbildung 7: Semiquantitative Auswertung der Erythropoese der Kontrollgruppe (a) und der BNP-Serumgruppe (b)

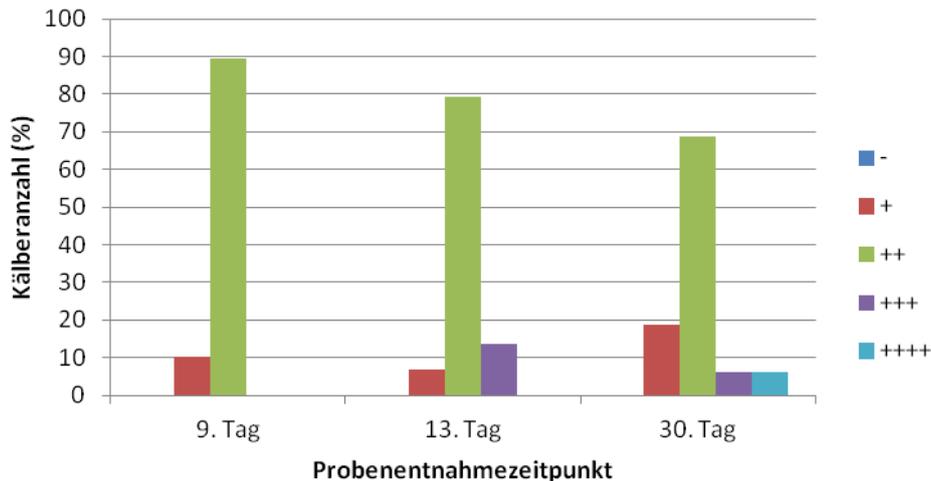
4.2.2 Erythropoese im Röhrenknochenmark

Erythroische Vorläuferzellen waren im Mikroskop als kleine, runde Zellen sichtbar, welche einen basophilen Zellkern aufwiesen und sich in kleinen Inseln zusammenlagerten. Innerhalb der Kontrollgruppe schwankte bei sehr wenigen Kälbern die Anzahl der erythropoetischen Zellen nach der Serumübertragung, wobei sowohl leichte Abweichungen nach unten als auch oben feststellbar waren. Bei der überwiegenden Zahl der Tiere zeigten sich jedoch im Verlauf des Tierversuchs hinsichtlich der Erythropoese keine Veränderungen.

Eine ähnliche Entwicklung ließ sich ebenfalls in der BNP-Serumgruppe beobachten. Hier war am 13. Tag bei einigen Tieren eher eine vermehrte Erythropoese erkennbar, während am 30. Tag wieder geringfügige Abweichungen in beide Richtungen zu erkennen waren. Insgesamt betrachtet blieb die Erythropoese der meisten Kälber in dieser Gruppe jedoch ebenfalls konstant. Mittels statistischer Analysen (siehe dazu unter 3.8) konnten keine Zusammenhänge beziehungsweise Veränderungen im Hinblick auf die Anzahl erythropoetischer Zellen im Röhrenknochenmark dargestellt werden.



- (a) Semiquantitative Auswertung der Erythropoese der Kälber, welche am 10. Lebenstag Kontrollserum infundiert bekamen. -, +, ++, +++ und ++++ siehe unter 3.7, Tabelle 9



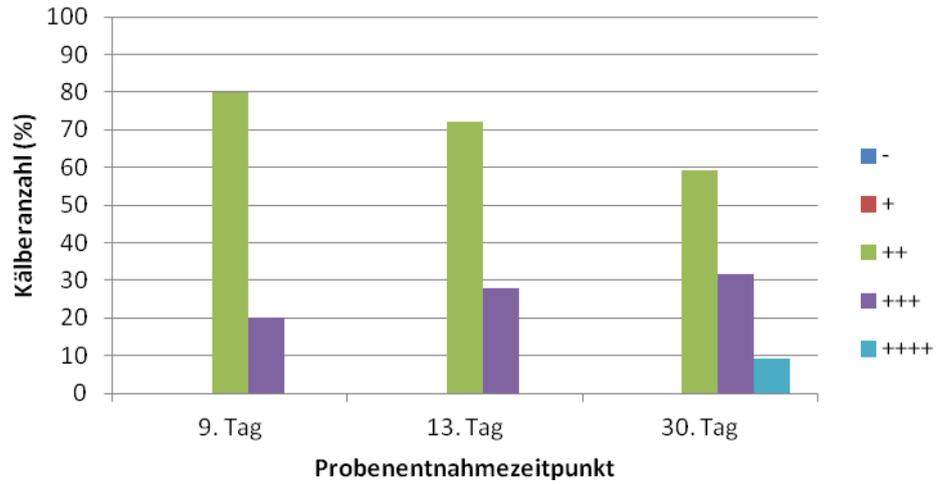
(b) Semiquantitative Auswertung der Erythropoese der Kälber, welche am 10. Lebenstag Bluterserum infundiert bekamen. -, +, ++, +++ und ++++ siehe unter 3.7, Tabelle 9

Abbildung 8: Semiquantitative Auswertung der Erythropoese der Kontrollgruppe (a) und der BNP-Serumgruppe (b)

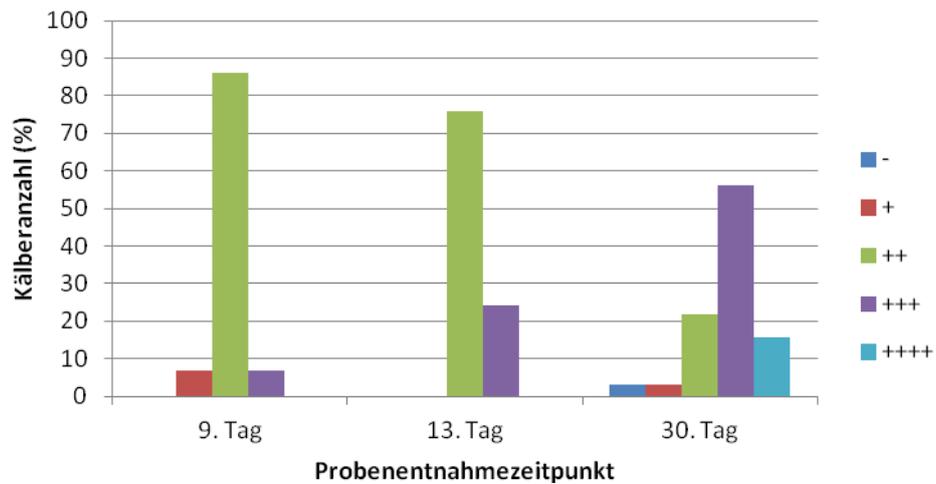
4.2.3 Leukopoese im Röhrenknochenmark

Zellen der Leukopoese waren im Vergleich zu den erythropoetischen Vorläuferzellen deutlich größer und besaßen ein hell basophiles, teils schaumiges Zytoplasma. Darüber hinaus waren die Zellkerne zumeist eher bohnenförmig oder segmentiert und deutlich größer. Im Verlauf der Serumübertragungsstudie zeichnete sich in der Kontrollgruppe eine stetige, jedoch geringfügige, Zunahme der leukopoetischen Zellen zum 30. Lebenstag hin ab. Analog hierzu war in der BNP-Serumgruppe eine vergleichbare Entwicklung zu beobachten, wenngleich die gesteigerte Leukopoese, vor allem am 30. Tag, auffällig stärker ausgeprägt war (siehe im Vergleich Abb. 11 und 12). Diese deutliche Zunahme konnte in der Statistik dargestellt werden. Eine Betrachtung der Zellzahlen über die Zeit zeigte hier eine klare Signifikanz mit einem p-Wert $< 0,0001$ sowohl für den Friedman-Test, welcher die Serumgruppe außer Acht lässt, als auch für die Kovarianzanalyse, welche die Serumgruppe der Kälber mit in die Analyse einbezieht.

Ergebnisse



(a) Semiquantitative Auswertung der Leukopoese der Kälber, welche am 10. Lebenstag Kontrollserum infundiert bekamen. -, +, ++, +++ und ++++ siehe unter 3.7, Tabelle 9



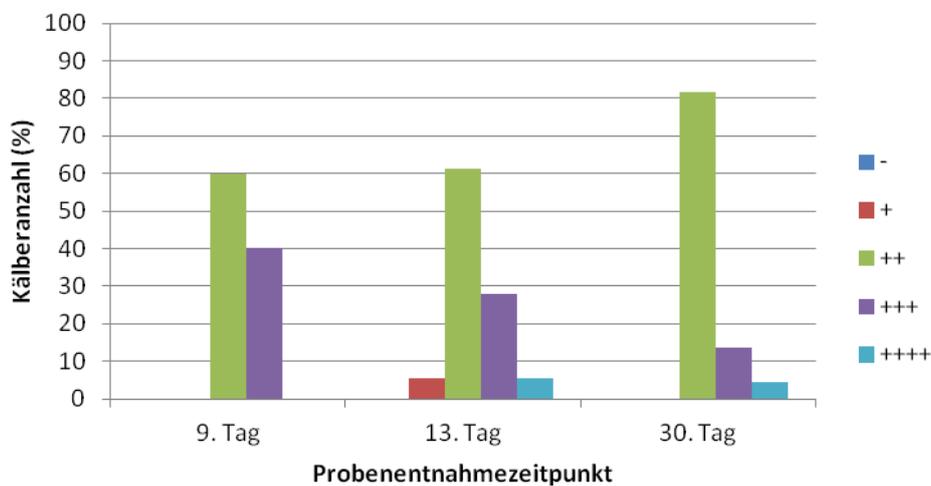
(b) Semiquantitative Auswertung der Leukopoese der Kälber, welche am 10. Lebenstag Bluterserum infundiert bekamen. -, +, ++, +++ und ++++ siehe unter 3.7, Tabelle 9

Abbildung 9: Semiquantitative Auswertung der Leukopoese der Kontrollgruppe (a) und der BNP-Serumgruppe (b)

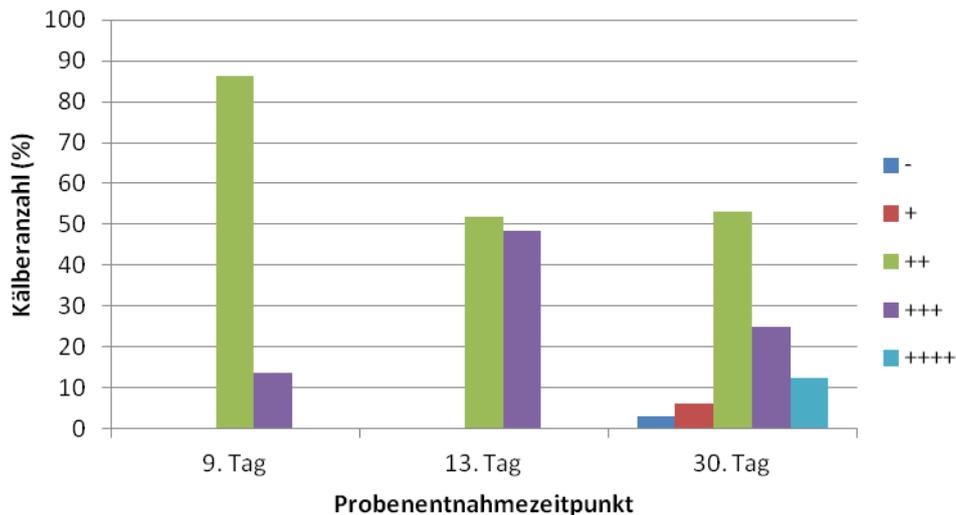
4.2.4 Thrombopoese im Röhrenknochenmark

Megakaryozyten, welche die Vorläuferzellen für die Thrombopoese darstellen, waren deutlich größer als alle übrigen Zellen und wiesen als unverwechselbares Charakteristikum mehr als einen Zellkern im Zytoplasma auf. Eine Übersicht über die Veränderungen innerhalb der Kontrollgruppe zeigte eine verschwindend geringe Abnahme der Megakaryozyten im Verlauf des ersten Lebensmonates. Im Gegensatz dazu war innerhalb der BNP-Serumgruppe bei 10 Tieren (37 %) nach der Serumübertragung an Tag 13 eine deutliche Zunahme der Anzahl der Megakaryozyten zu erkennen, was ein Hinweis auf eine gesteigerte Thrombopoese und demgemäß eventuell auf einen vermehrten Bedarf in der Peripherie sein könnte (siehe dazu Tabelle 10 B und Abb. 12). Am Sektionstag (30. Tag) waren bei einigen Kälbern die Werte für die Thrombopoese im Vergleich zu Tag 9 weiterhin erhöht, zum Teil sogar noch angestiegen. Divergierend dazu konnte allerdings bei wenigen Kälbern eine Verringerung der Megakaryozytenanzahl verzeichnet werden.

Die durchgeführten statistischen Analysen ergaben keine signifikanten Zusammenhänge beziehungsweise Veränderungen im Hinblick auf die Anzahl thrombopoetischer Zellen im Röhrenknochenmark.



- (a) Semiquantitative Auswertung der Thrombopoese der Kälber, welche am 10. Lebens- tag Kontrollserum infundiert bekamen. -, +, ++, +++ und ++++ siehe unter 3.7, Tabel- le 9



(b) Semiquantitative Auswertung der Thrombopoese der Kälber, welche am 10. Lebenstag Bluterserum infundiert bekamen. -, +, ++, +++ und ++++ siehe unter 3.7, Tabelle 9

Abbildung 10: Semiquantitative Auswertung der Thrombopoese der Kontrollgruppe (a) und der BNP-Serumgruppe (b)

4.2.5 Veränderung der Zellzahlen bei den Einzeltieren

Zur Veranschaulichung der Veränderungen von Zellzahlen einzelner Kälber wurde eine Trend-Tabelle erstellt (siehe Tabelle 10). In dieser Tabelle sind jeweils die Veränderungen in Bezug auf den ersten Biopsie-Tag (9. Tag) dargestellt, wobei eine rote Färbung des Tabellenfeldes beziehungsweise der Zahl eine Abnahme und eine grüne Färbung eine Zunahme der Zellzahl signalisiert. Die eingetragenen Zahlen beziehen sich dabei auf die Anzahl an abgewichenen Schritten (= +-Zeichen). Für die Erstellung dazugehöriger Graphen wurde die Tabelle umstrukturiert, die Grundlage für die bildliche Darstellung findet sich demzufolge zusätzlich im Anhang unter 8.1.8.

Aus Tabelle 10 wird deutlich, dass es im Röhrenknochenmark bezüglich der Zellularität unterschiedlicher Zellreihen wesentlich mehr Veränderungen bei den Tieren der BNP-Serumgruppe gab, als bei Tieren der Kontrollgruppe. Besonders offensichtlich wird dies bei einem Vergleich vom 13. Lebenstag mit dem 30. Lebenstag. Dort zeigen lediglich 3 der 18 asuwertbaren Kontrolltiere (17 %; K2, K16, K34) eine Zellveränderung von mehr als einer der drei hämatopoetischen Zellreihen und das maximal um eine Bewertungsstufe. Im Ver-

Ergebnisse

gleich dazu sind es in der BNP-Serumgruppe 16 Tiere (57 %; n = 28), wobei hier insbesondere eine gesteigerte Leukopoese auffiel.

Tabelle 10: Trend-Tabelle basierend auf den semiquantitativen Auswertungen der Zellveränderungen der Studienkälber über die Zeit

(A: Kontrollgruppe; B: BNP-Serumgruppe)

A

| Kontr.Gr. | Fettzellanzahl | | Erythropoese | | Leukopoese | | Thrombopoese | |
|-----------|----------------|-----------|--------------|-----------|------------|-----------|--------------|-----------|
| | T9-T13 | T13 - T30 | T9-T13 | T13 - T30 | T9-T13 | T13 - T30 | T9-T13 | T13 - T30 |
| K2 K | 2 | 2 | n.d. | 2 | n.d. | 1 | n.d. | -1 |
| K7 K | n.d. | 1 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| K10 K | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| K16 K | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | -1 | 0 |
| K17 K | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| K21 K | 0 | 0 | 0 | 0 | -1 | -1 | 1 | 0 |
| K22 K | 0 | 1 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| K23 K | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | -1 | -1 |
| K24 K | 2 | 2 | n.d. | 0 | n.d. | 0 | n.d. | 0 |
| K25 K | 0 | -1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| K34 K | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | -1 |
| K35 K | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| K37 K | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| K38 K | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| K39 K | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| K41 K | -1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| K46 K | 0 | 1 | n.d. | 0 | n.d. | 1 | n.d. | 0 |
| K49 K | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| K50 K | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| K54 K | 1 | 1 | n.d. | 0 | n.d. | -1 | n.d. | 0 |
| K55 K | 2 | 1 | n.d. | 0 | n.d. | 0 | n.d. | 0 |
| K56 K | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Fortsetzung siehe nächste Seite

Ergebnisse

Fortsetzung der Tabelle 10

B

| BNP-Gr.: | Fettzellanzahl | | Erythropoese | | Leukopoese | | Thrombopoese | |
|----------|----------------|-----------|--------------|-----------|------------|-----------|--------------|-----------|
| | T9-T13 | T13 - T30 | T9-T13 | T13 - T30 | T9-T13 | T13 - T30 | T9-T13 | T13 - T30 |
| K1 B | -1 | 1 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| K3 B | 0 | -1 | 0 | 0 | 1 | 2 | 0 | 1 |
| K5 B | -1 | -2 | 1 | 3 | 1 | 2 | 0 | 1 |
| K6 B | 0 | 2 | 1 | 1 | 1 | 2 | 0 | 0 |
| K8 B | n.d. | -1 | n.d. | -1 | n.d. | 0 | n.d. | -1 |
| K9 B | 0 | 0 | 0 | n.d. | 1 | n.d. | 0 | n.d. |
| K11 B | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | -1 | -1 |
| K12 B | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | -1 |
| K13 B | 1 | 2 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| K14 B | 0 | -1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| K15 B | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 | 1 |
| K18 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| K19 B | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| K20 B | 1 | -2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 |
| K26 B | 2 | 1 | 0 | -1 | 0 | 2 | -1 | -1 |
| K27 B | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| K28 B | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| K29 B | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | -1 |
| K30 B | 0 | -1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | -1 |
| K31 B | 0 | 0 | 0 | -1 | 1 | 2 | 1 | 2 |
| K32 B | -1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| K33 B | 0 | 0 | 0 | -1 | 0 | 2 | 1 | 0 |
| K36 B | 0 | 1 | 0 | -1 | 0 | -2 | 1 | -2 |
| K40 B | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| K42 B | 0 | -1 | -1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| K43 B | 0 | -1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| K44 B | 0 | 1 | 0 | -1 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| K45 B | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 2 |
| K47 B | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| K48 B | 0 | 0 | n.d. | 0 | n.d. | 0 | n.d. | -1 |
| K51 B | n.d. | 1 | n.d. | 0 | n.d. | 1 | n.d. | 1 |
| K52 B | 0 | -1 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| K53 B | -3 | -1 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |

0 = keine Veränderung; 1 = Veränderung der Zellzahl um eine Stufe; 2 = Veränderung der Zellzahl um 2 Stufen; 3 = Veränderung der Zellzahl um 3 Stufen

■ Erniedrigung der Zellzahl (Zahl zusätzlich mit einem "-" gekennzeichnet)

■ Erhöhung der Zellzahl

n.d.: keine Angaben vorhanden

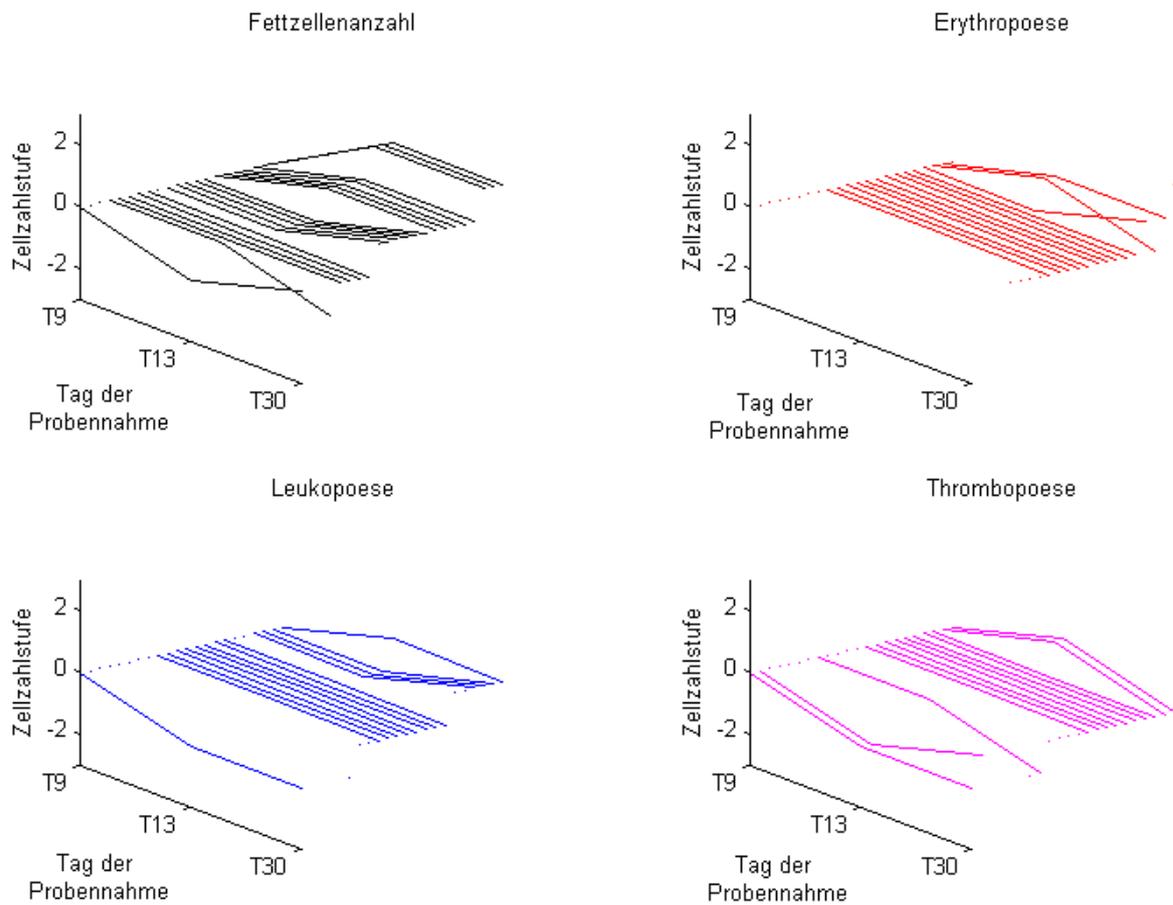


Abbildung 11: Graphen zur Zellzahlveränderungen von Einzeltieren der Kontrollgruppe basierend auf Tabelle 8.1.7 im Anhang

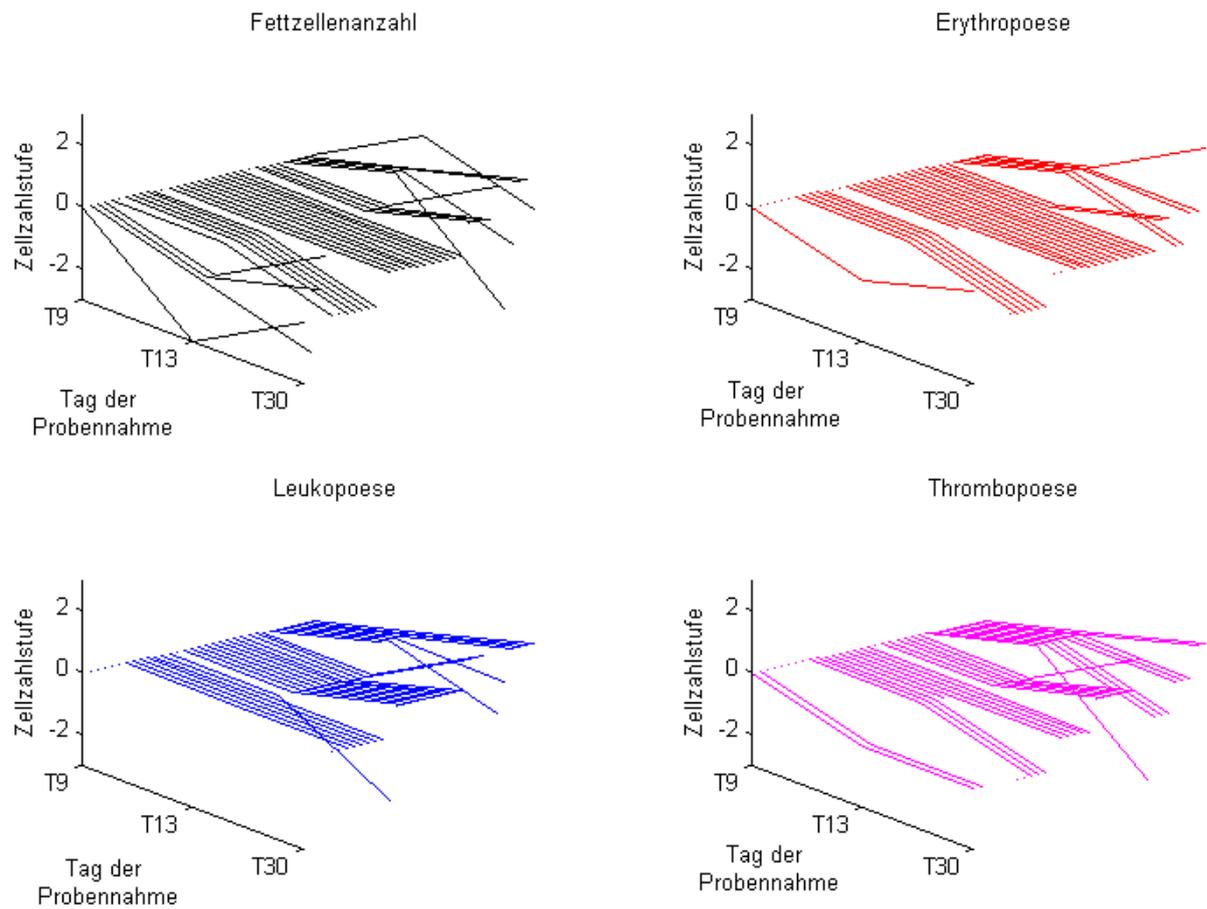


Abbildung 12: Graphen zur Zellzahlveränderungen von Einzeltieren der BNP-Serumgruppe basierend auf Tabelle 8.1.7 im Anhang

4.2.6 Vergleich von Röhrenknochenmark mit spongiösem Mark

Stichprobenartig ($n = 27$) wurde Knochenmark aus der Metaphyse des Os femoris mit spongiösem Knochenmark aus dem Sternum histologisch hinsichtlich der Zellularität der einzelnen Zellreihen und der Anzahl an Fettzellen verglichen. Beide Proben wurden zeitgleich am 30. Lebenstag bei der Sektion der Versuchstiere entnommen.

Sowohl in der BNP-Serumgruppe als auch in der Kontrollgruppe waren im Sternalmark gegenüber dem Röhrenmark wenige bis keine Fettzellen anzutreffen. Folglich war das spongiöse Sternalmark bei den meisten Tieren nahezu vollständig mit hämatopoetischen Zellen besiedelt. Dieser Unterschied im Fettgehalt ließ sich ebenfalls statistisch nachvollziehen, indem der Korrelationskoeffizient nach Spearman (r_s) auf keinen signifikanten Zusammenhang der Fettzellanzahlen im Vergleich von Röhrenmark und Sternalmark hindeutete ($p = 0,11$). Gleichzeitig zeigte der durchgeführte McNemar-Test eine statistische Signifikanz ($p = 0,002$) auf, demzufolge die Nullhypothese (1:1) bei einem Signifikanzniveau von 5 % verworfen wird. Folglich wiesen die Fettzellanzahlen im Sternal- und Röhrenknochenmark statistisch nicht nur keinen Zusammenhang auf, sondern waren sogar klar ungleich.

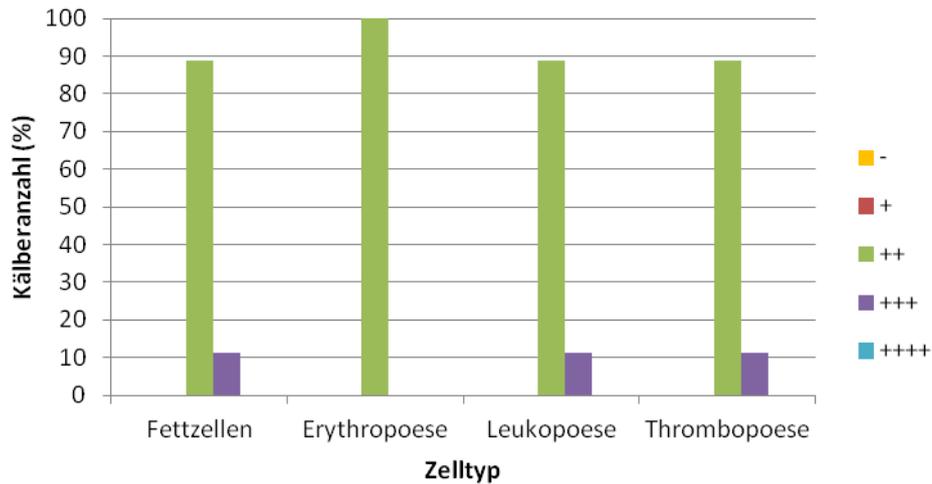
Bei der Anzahl der erythropoetischen Zellen fiel im Vergleich zur Kontrollgruppe lediglich im Röhrenmark der BNP-Serumgruppe eine etwas breitere Streuung der Ergebnisse nach oben und unten auf. Die statistische Analyse ergab in dieser Hinsicht einen Korrelationskoeffizienten (r_s) von $p = 0,044$ und wies somit auf einen signifikanten Zusammenhang hin. Sternal- und Röhrenmark unterschieden sich dementsprechend bezüglich der Anzahl der erythropoetischen Zellen statistisch nicht bzw. wenig.

Bei der Leukopoese fiel insbesondere das Röhrenknochenmark einiger Kälber der BNP-Serumgruppe auf, welches im Überblick erkennbar höhere Anzahlen von leukopoetischen Zellen im Vergleich zum dazugehörigen Sternalmark aufwies. Solch ein deutlicher Unterschied war in der Kontrollgruppe nicht festzustellen, wobei hier insgesamt die Anzahlen der leukopoetischen Zellen im Vergleich zur BNP-Serumgruppe deutlich niedriger lagen. Die Diskrepanzen zwischen dem Röhrenmark und dem Sternalmark der Kälber reichten jedoch aus, dass die statistische Analyse in diesem Fall keine signifikante Korrelation ($p = 0,46$) ergab und sich demzufolge die Anzahlen der leukopoetischen Zellen beider Lokalisationen statistisch merkbar unterschieden.

Bezüglich der thrombopoetischen Zellreihe waren die Ergebnisse der semiquantitativen Auswertung zwischen dem Sternalmark und dem Röhrenmark der BNP-Serumgruppe nahezu gleich. Zwar wies das Sternalmark von wenigen Tieren der Kontrollgruppe im Vergleich zum korrelierenden Röhrenmark eine geringfügig höhere Anzahl an Megakaryozyten auf, statis-

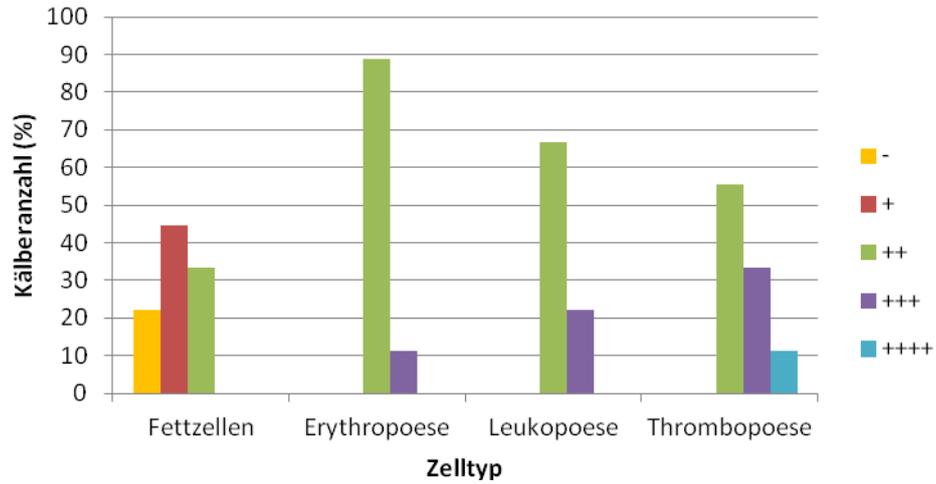
Ergebnisse

tisch besaß diese geringe Abweichung jedoch keinen belegbaren Einfluss. Der Koeffizient ($p = 0,021$) zeigte eine deutliche Korrelation der Vergleichsparameter und machte so deutlich, dass statistisch in Bezug auf die Anzahl der thrombopoetischen Zellen kein Unterschied zwischen Röhren- und Sternalmark bestand.

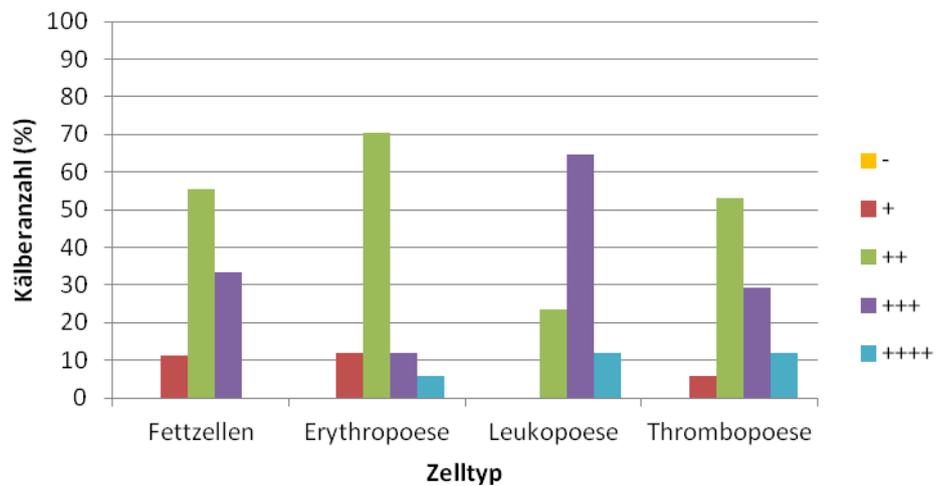


- (a) Semiquantitative Auswertung der verschiedenen Zelltypen im Röhrenknochenmark der Kälber, welche am 10. Lebenstag Kontrollserum infundiert bekamen. -, +, ++, +++ und +++++ siehe unter 3.7, Tabelle 9

Ergebnisse

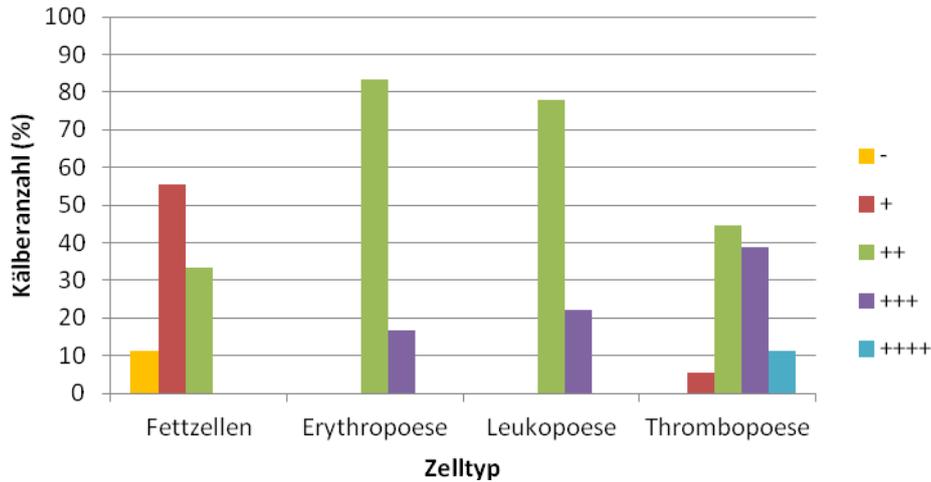


(b) Semiquantitative Auswertung der verschiedenen Zelltypen im Sternalmark der Kälber, welche am 10. Lebenstag Kontrollserum infundiert bekamen. -, +, ++, +++ und ++++ siehe unter 3.7, Tabelle 9



(c) Semiquantitative Auswertung der verschiedenen Zelltypen im Röhrenknochenmark der Kälber, welche am 10. Lebenstag Bluterserum infundiert bekamen. -, +, ++, +++ und ++++ siehe unter 3.7, Tabelle 9

Ergebnisse



(d) Semiquantitative Auswertung der verschiedenen Zelltypen im Sternalmark der Kälber, welche am 10. Lebenstag Bluterserum infundiert bekamen. -, +, ++, +++ und ++++ siehe unter 3.7, Tabelle 9

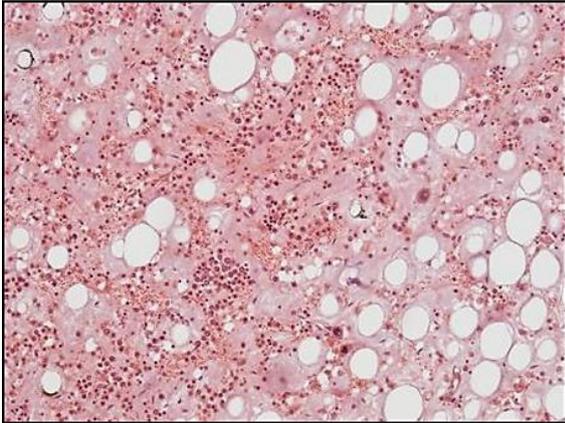
Abbildung 13: Semiquantitative Auswertung der Fettzellen und der verschiedenen, hämatopoetischen Zellreihen der Kontrollgruppe (a, b) und der BNP-Serumgruppe (c, d) im Röhren- und Sternalmark

4.2.7 Besonderheiten bei der Untersuchung von HE-gefärbten Knochenmarkschnitten

Bei insgesamt 7 Kälbern (K27, K30, K33, K43, K45, K46, K51) fand sich in den Proben des Röhrenknochenmarks, welche am Sektionstag (30. Tag) entnommen wurden, eine herdförmige Ansammlung von Fibrozyten innerhalb des Knochenmarkgewebes. Zwischen den Bindegewebszellen waren häufig Akkumulationen kleiner, basophiler, runder Zellen sichtbar, deren Erscheinungsbild am ehesten Inseln erythropoetischer Vorläuferzellen entsprach. Um den Herd herum konnte zudem eine gesteigerte Leukopoese beobachtet werden.

Andere Knochenmarkschnitte fielen durch fokal zellärmere und aufgelockerte Areale auf. Im Hintergrund war vermehrt eosinophile Grundsubstanz zu erkennen. Dabei war hinsichtlich des Auftretens kein spezifisches Muster zu erkennen, weder waren solche Bereiche zu einem bestimmten Entnahmezeitpunkt noch in einer expliziten Serumgruppe auffindbar.

a



b

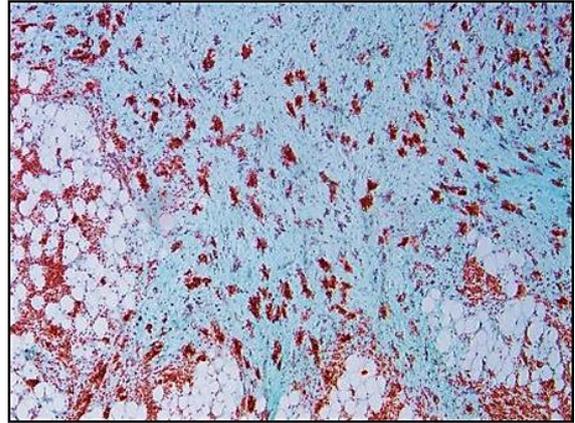


Abbildung 14: a: Fokales, zellärmeres Areal neben Fettgewebe im Röhrenknochenmark, der Hintergrund besteht hauptsächlich aus eosinophiler Grundsubstanz. K54, Kontrollserumgruppe, Sektionstag (30. Tag), Formalin-Fixierung, Obj. x 10, HE

b: Herdförmige Fibrose mit eingestreuten, vermutlich erythropoetischen Vorläuferzellakkumulationen im Röhrenknochenmark. K21, Kontrollserumgruppe, Sektionstag (30. Tag), Formalin-Fixierung, Obj. x 4, Goldner-Färbung (zum Nachweis von Bindegewebe)

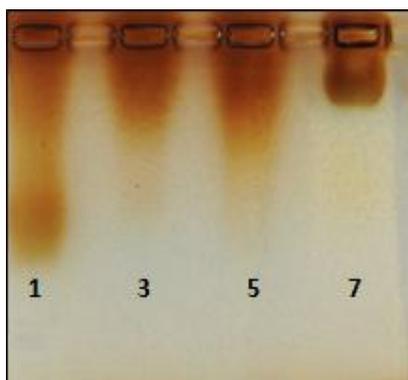
4.3 Etablierung der Methode einer immunhistologischen Untersuchung

4.3.1 Messergebnisse zur Proteinkonzentrationsbestimmung mittels der Photometrie

Mit Hilfe der unter 3.4.1.3 angegebenen Regressionsformel wurden die photometrischen Werte der Proteinkonzentrationen der Seren bestimmt. Diese Werte dienten als Berechnungsgrundlage für die nachfolgende Kopplung an Meerrettich-Peroxidase und lagen im Durchschnitt umgerechnet jeweils etwa bei 9 mg/ml IgG in PBS (pH 7,4; siehe unter 8.2.1 im Anhang).

4.3.2 Nachweis der Kopplung von Peroxidase an die IgG-Antikörper mittels Gelelektrophorese

Ein Nachweis der Peroxidase basierte auf dem Zusatz des Chromogens Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB). Bei der Reaktion wird Wasserstoffperoxid von dem Enzym umgesetzt, woraufhin es zu einer Ausfällung und Braunfärbung infolge Oxidation des DABs kommt. Im Hinblick auf die Laufrichtung und die Laufgeschwindigkeit der untersuchten Verbindungen muss berücksichtigt werden, dass diese Parameter sowohl von der Masse als auch von der Ladung der Moleküle beeinflusst werden. Die Gesamtladungen der eingesetzten Moleküle waren in diesem Falle unbekannt. Demzufolge ließ der direkte Vergleich der Laufstrecken lediglich die Aussage zu, dass sich in den aufgetragenen Probenlösungen unterschiedliche Moleküle befanden. In Abbildung 3 ist die deutlich längere Laufstrecke der freien, aktivierten Peroxidase (Spur 1) gegenüber den Laufstrecken der an Antikörper gekoppelten Peroxidase (Spuren 3 und 5) zu erkennen. Betrachtet man die enorme Differenz der Molekülmassen zwischen der freien Peroxidase (44.000 Da) und dem Kopplungsprodukt mit den Antikörpern (≥ 200.000 Da), so ist eine wesentlich langsamere Wanderungsgeschwindigkeit des Kopplungsprodukts durch das Gel aufgrund der höheren Masse zu erwarten. Ebenfalls zeigten sich die Ansätze beider gekoppelten Antikörperseren (Spuren 3 und 5) in etwa auf gleicher Höhe, was ein Hinweis auf eine annähernd gleiche Molekülmasse der Kopplungsprodukte darstellt. Diese Ergebnisse sprachen alle für eine erfolgreiche Kopplung der Peroxidase an die IgG-Antikörper.



Spur 1: aktivierte Peroxidase
Spur 3: gekoppelte Antikörper aus Negativserum (≥ 200.000 Da)
Spur 5: gekoppelte Antikörper aus Mischkolostrum (≥ 200.000 Da)
Spur 7: aktivierte Peroxidase, 30 min vor dem Ende des Laufs aufgetragen (Kontrolle)

Abbildung 15: Gelelektrophorese zur Überprüfung einer erfolgreichen Kopplung der Antikörper an Peroxidase; Nachweis basierend auf dem Zusatz von DAB

4.3.3 Auswahlkriterien bezüglich der HOPE[®]-Methode

Bei den immunhistologischen Untersuchungen an einigen Formalin-fixierten Gewebeschnitten konnten trotz unterschiedlicher Maßnahmen zur Demaskierung der Antigene und dem Einsatz sehr hoher Konzentrationen der Antikörperlösungen keinerlei Bindungen von markierten Antikörpern an Gewebe dargestellt werden. Daher entfiel die Nutzung von Organmaterialien, welche zuvor zur Fixierung mit Formalin behandelt worden waren, für die Immunhistologie. Ein positiver Nachweis gebundener Antikörper an Knochenmarkzellen gelang nur auf Gefrierschnitten. Aufgrund des enormen Arbeitsaufwandes und der letztlich sehr schlechten Morphologie der Gewebeschnitte, welche kaum noch einen zusammenhängenden Zellverband erahnen ließen und von deutlichen Artefakten wie braunen, ausgefallenen Zelldebris-Akkumulaten oder Rissen im Gewebe geprägt waren, wurde die Gefrierschnitttechnik aber nach wenigen Probeschnitten verworfen. Alternativ wurden die Peroxidase-markierten Antikörper daraufhin in den folgenden Versuchen auf HOPE[®]-fixierten Knochenmarkgeweben inkubiert, auf denen deutlich positive Zellen erkennbar waren. Die Antikörperbindungen waren an vielen Zellen anhand einer typischen, Membran-assoziierten Braunfärbung sichtbar. Teils stellte sich die Färbung auch eher diffus zytoplasmatisch als membranös dar, insbesondere jedoch auf solchen Schnitten, welche auch in den dazugehörigen HE-Schnitten mit einer relativ schlechten morphologischen Detailerkennbarkeit gekennzeichnet waren. Trotz der daraus resultierenden, erschwerten Interpretation ergab die HOPE[®]-Methode insgesamt die besten Resultate, so dass das immunhistologische Protokoll auf der Basis dieser Fixierung erstellt wurde.

4.3.4 Ermittlung der Gebrauchsverdünnung der Peroxidase-gekoppelten Antikörperlösungen

Eine optimale Verdünnung der Antikörperlösung wurde in Vorversuchen anhand einer Verdünnungsreihe ermittelt. Dabei wurde insbesondere darauf geachtet, dass sich die Negativ-Kontrolle bei gleicher Verdünnungsstufe weitestgehend sowohl frei von brauner Hintergrundfärbung als auch von unerwünschten, zellassozierten, positiven Reaktionen darstellte. Dies war insbesondere bei niedrigen Verdünnungen ein Problem, da in diesen Fällen auch das Kontrollserum deutliche, zellassozierte, positive Reaktionen verursachte, die zwar makroskopisch wesentlich schwächer als die Reaktionen mit BNP-Serum waren, histologisch jedoch nicht mehr eindeutig von ebensolchen zu unterscheiden waren.

Deswegen wurde eine Verdünnungsreihe mit den Antikörperlösungen in PBS (pH 7,4; siehe

unter 8.2.1 im Anhang) mit den Stufen 1:50, 1:100, 1:200 und 1:400 erstellt und die Intensivität der positiven Reaktionen, bzw. das Ausbleiben dieser, miteinander verglichen. Parallel dazu erfolgte ebenfalls eine Adsorptionsreihe mit unterschiedlichen Mengen an Blutpulver (20 mg, 40 mg, 80 mg, 160 mg), um die optimale Adsorptionsleistung in Bezug auf 500 µl verdünnte Antikörperlösung zu ermitteln.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen ergaben für einen Einsatz auf Gewebeschnitten eine optimale Verdünnung der Antikörperlösungen von 1:400 und einer Blutpulvermenge zur Adsorption unerwünschter Alloantikörper von 160 mg.

4.4 Immunhistologische Untersuchungen

4.4.1 Untersuchungen zur Bindung der Alloantikörper an MDBK-Zellen

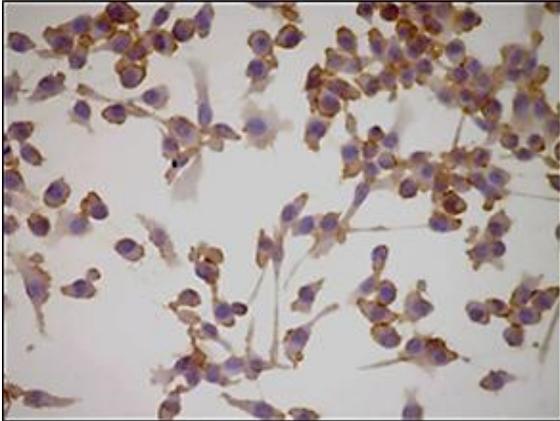
4.4.1.1 Indirekter Nachweis der Bindung von Alloantikörpern an MDBK-Zellen

Sämtliche MDBK-Zellen, welche zuvor mit einer aus Mischblutercolostrum oder Mischbluterserum isolierten IgG-Antikörperlösung inkubiert worden waren, zeigten nach Zugabe des Sekundärantikörpers und anschließender Farbreaktion eine deutliche, braune Anfärbung der äußeren Zellmembran. Die Zellen der Negativkontrolle hingegen stellten sich parallel dazu alle hellblau dar, was auf die zum Ende hin erfolgte Gegenfärbung mit Papanicolaous-Lösung zurückzuführen war. Somit konnte nachgewiesen werden, dass sowohl Serum als auch Colostrum von Blutmutterkühen Antikörper enthielten, welche gegen Oberflächenantigene der MDBK-Zellen gerichtet waren. Colostrum und Serum von BVD-ungeimpften und negativ auf Alloantikörper getesteten Tieren hingegen wiesen keine IgG-Antikörper gegen zelluläre Bestandteile von MDBK-Zellen auf.

4.4.1.2 Direkter Nachweis der Bindung von Alloantikörpern an MDBK-Zellen

Analog zum indirekten Nachweis wiesen MDBK-Zellen, welche mit Peroxidase-gekoppelten Antikörperlösungen inkubiert wurden, im Falle von IgG aus Mischblutercolostrum oder Mischbluterserum eine Braunfärbung der äußeren Zellmembran der Zellen nach der Farbreaktion mit DAB auf. Hier blieben die Inkubationen mit den Kontrollseren ebenfalls negativ.

a



b



Abbildung 16: a: Nachweis einer Bindung von Antikörpern aus Mischblutercolostrum (unadsorbiert) an MDBK-Zellen gekennzeichnet durch eine Braunfärbung der äußeren Zellmembran.

b: Negativkontrolle. HRP-gekoppelte AK aus dem Colostrum eines Kontrolltieres (VT682); a und b: Methanol-Fixierung, Obj. x 40, HRP-gekoppelte AK, direkte IHC, Papanicolaous-Hämatoxylin-Gegenfärbung

Sowohl die ursprüngliche HRP-Antikörperlösung aus Mischblutercolostrum als auch die durch Adsorption an Blutpulver anschließend aufgearbeitete HRP-Antikörperlösung führten bei den vital inkubierten MDBK-Zellen zu einer positiven Reaktion. Alle Zellen zeigten eine zellassoziierte Braunfärbung der äußeren Zellmembran auf (+).

Bei den parallel mitgeführten Negativkontrollen waren keine Anfärbungen von Zellstrukturen zu beobachten (-). Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 11: Nachweis der Bindung von HRP-gekoppelten AK (Verdünnung 1:50) an MDBK-Zellen

| | Antikörper-Lsg., unadsorbiert | Antikörper-Lsg., an Blutpulver adsorbiert |
|---------------------------------|--|--|
| HRP-AK aus Mischbluterserum | + | + |
| HRP-AK aus Mischblutercolostrum | + | + |
| HRP-AK aus Negativserum | - | - |
| HRP-AK aus Negativcolostrum | - | - |

+: Antikörperbindung an MDBK-Zellen (membranöse Braunfärbung)

- : keine Antikörperbindung

4.4.2 Immunhistologische Untersuchungen zur Bindung der Alloantikörper an Gewebeschnitten und Leukozyten

Aufgrund der unter 4.3.3 geschilderten Umstände, dass trotz zusätzlichem Einsatz verschiedener *Antigen Retrieval*-Methoden keine Antigen-Antikörperbindungen auf Formalinfixierten Gewebeschnitten nachgewiesen werden konnten, wurden sämtliche folgenden immunhistologischen Untersuchungen auf der Grundlage von HOPE[®]-fixiertem Material durchgeführt.

4.4.2.1 Untersuchungen zur Bindung der Alloantikörper an Knochenmarkgewebe

4.4.2.1.1 Untersuchungen zur Bindung der Alloantikörper an Knochenmarkgewebe der Studienkälber

Die dargestellten Resultate beruhen auf den Untersuchungen von Röhrenknochenmark des Sektionstages (30. Tag), weitere immunhistologische Untersuchungen zu anderen Zeitpunkten konnten aufgrund eines Reaktivitätsverlustes des mengenbegrenzten Antikörpers nicht mehr durchgeführt werden. Die Ergebnisse von 52 Kälbern der Versuchsstudie sind in Tabelle 8.1.1 im Anhang und der Abbildung 18 dargestellt. Demnach konnte lediglich bei einem Knochenmark (K7) keinerlei positive Reaktion beobachtet werden. Alle anderen Proben der Versuchstiere zeigten eine positive Reaktion, welche einen Nachweis für eine Bindung der HRP-gekoppelten Alloantikörper an Knochenmarkzellen darstellt. Selbst die Proben, welche wesentlich länger als 64 Stunden in der HOPE[®]-Lösung fixiert wurden (K47-K49), konnten

eindeutig als positiv identifiziert werden. Hierbei ist jedoch explizit zu erwähnen, dass die antigenträgenden, positiven Zellen sich quantitativ unverkennbar individuell je nach Kalb voneinander unterscheiden. Aus diesem Grund war bezüglich der Auswertung semiquantitativ eine Einteilung in schwach positiv (+) bis stark positiv (+++) notwendig. Eine statistisch signifikante Korrelation der immunhistologischen Ergebnisse mit einem der zuvor an Lebenstag 9 durchgeführten Empfänglichkeitstests (Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere der Justus-Liebig-Universität Gießen; Institut für Virologie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen) war nicht vorhanden. Auch die Tests der beiden Institute zeigten untereinander (siehe dazu Tabelle 8.1.1) statistisch keine signifikante Korrelation bei dem angelegten Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$.

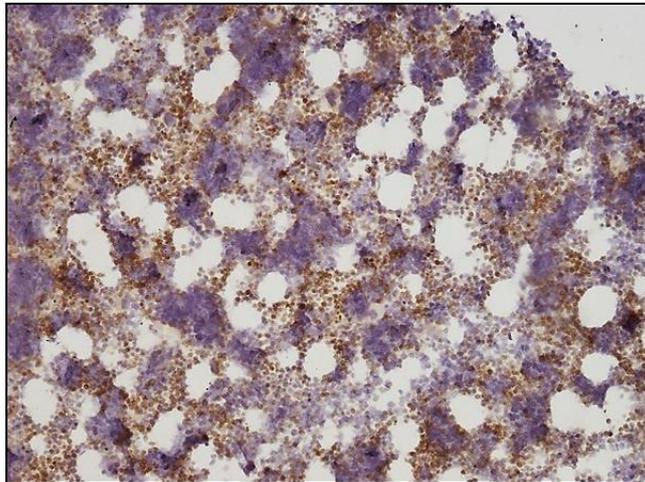
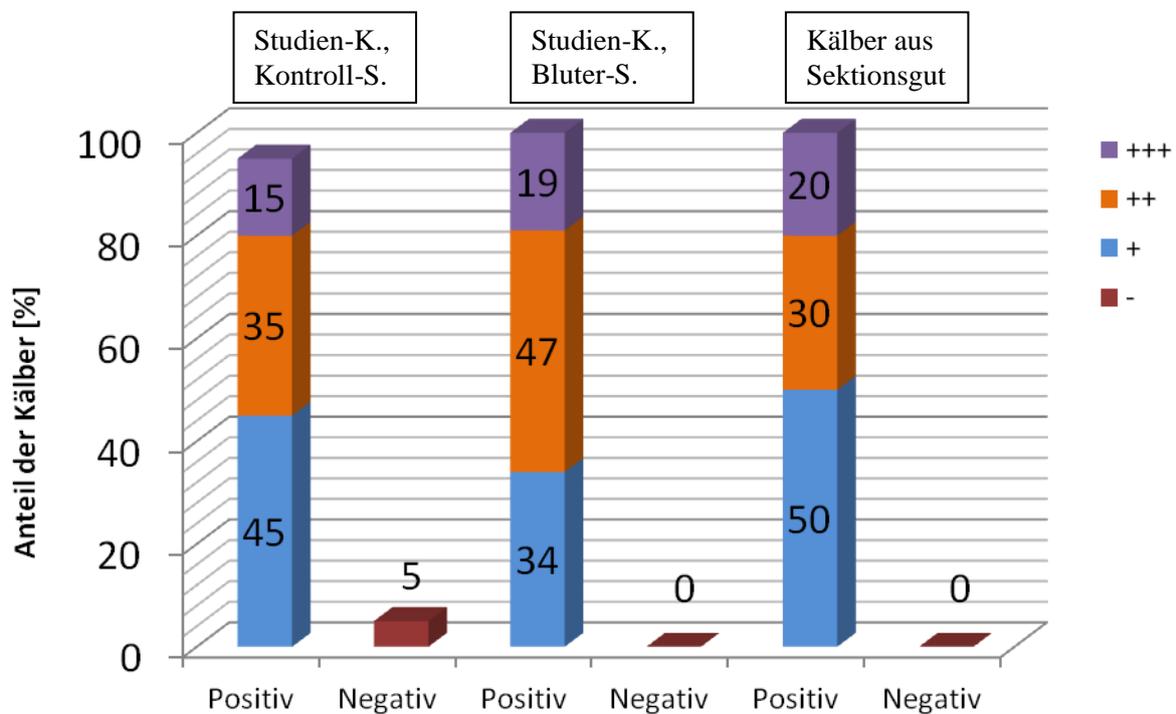


Abbildung 17: Starker immunhistologischer Nachweis positiver Zellen, welche sich vor allem an den Rändern der Sinus befinden, im Röhrenknochenmark. K25, HOPE[®]-Fixierung, Obj. x 10, HRP-gekoppelte AK aus Mischbluterserum, direkte IHC, Papanicolaous-Hämatoxylin-Gegenfärbung

4.4.2.1.2 Untersuchungen zur Bindung der Alloantikörper an Knochenmarkgewebe von 10 Kälbern aus dem Sektionsgut

Bei allen 10 beprobten Kälbern aus dem Sektionsgut des Instituts für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen, welche aufgrund anderer Ursachen als einer BNP-Erkrankung gestorben bzw. euthanasiert wurden, konnte immunhistologisch im Knochenmarkgewebeschnitt eine positive Anfärbung von Vorläuferzellen beobachtet werden. Hier erfolgte ebenfalls eine semiquantitative Einteilung in die Gruppen schwach positiv (+) bis stark positiv (+++). Die Ergebnisse sind in Tabelle 8.1.2 im Anhang und in Abbildung 18 dargestellt.



Immunhistologische Ergebnisse, 30. Tag bzw. Sektionstag

Abbildung 18: Semiquantitative Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchungen am Röhrenknochenmark der Studienkälber (Kontroll-S. = Kontrollserum: n = 20; Bluter-S. = Bluterserumgruppe: n = 32) und der Kälber aus dem Sektionsgut (n = 10) in Prozent; HRP-gekoppelte adsorbierte AK aus Blutermischserum; -, +, ++, +++ und +++++ siehe unter 3.6.1.2.1, Tabelle 8

4.4.2.1.3 Untersuchungen zur Bindung der Alloantikörper an Knochenmarkgewebe von Kälbern mit spontaner BNP

Entsprechend der BNP-typischen Veränderungen im Knochenmark wiesen alle untersuchten Kälber lediglich sehr vereinzelt hämatopoetische Zellen im Gewebeschnitt auf. Trotz der Anwendung einer äußerst niedrigen Verdünnung der Antikörperlösung (1:50) bei der Inkubation der Knochenmarkgewebeschnitte konnte an keiner verbliebenen Zelle eines BNP-Kalbes eine Bindung von Alloantikörpern dargestellt werden. Sämtliche Untersuchungen verliefen mit einem negativen Ergebnis.

4.4.2.2 Untersuchungen zur Bindung der Alloantikörper an Thymus-, Milz-, Leber- und Nierengewebe von Studienkälbern

Bis auf sehr wenige Einzelzellen und kleine Zellgruppen, vor allem in den Zentren von Thymusläppchen, waren die unterschiedlichen Gewebe der untersuchten Kälber (n = 10) immunhistologisch negativ. Die Mehrheit der ortsansässigen Lymphozyten bzw. Parenchymzellen der peripheren Gewebe hatten demzufolge keine Alloantikörper gebunden, was den Schluss zulässt, dass sie kein Zielantigen exprimierten (siehe dazu Tabelle 8.1.6).

Dennoch ist zu erwähnen, dass sich in manchen Milzgewebeschnitten einige makrophagenartige Zellen nach einer Inkubation mit der Antikörperlösung deutlich sichtbar dunkelbraun gefärbt darstellten. Deren Anfärbung unterschied sich jedoch durch das granulär dunkelbraune Färbemuster des Zytoplasmas prägnant von der im Knochenmark beobachteten membranösen Reaktivität, so dass eine klare Abgrenzung der reaktiven Zellen mikroskopisch problemlos möglich war. Dieses Phänomen war selbst in den mit Negativserum inkubierten Schnitten sichtbar und stellte sich nach zusätzlichen Versuchen (siehe dazu unter 3.5.4) als von den Antikörperlösungen abhängig heraus. Wurde die Antikörperlösung durch TBS ersetzt, waren keine Reaktivitäten im Gewebeschnitt zu beobachten.

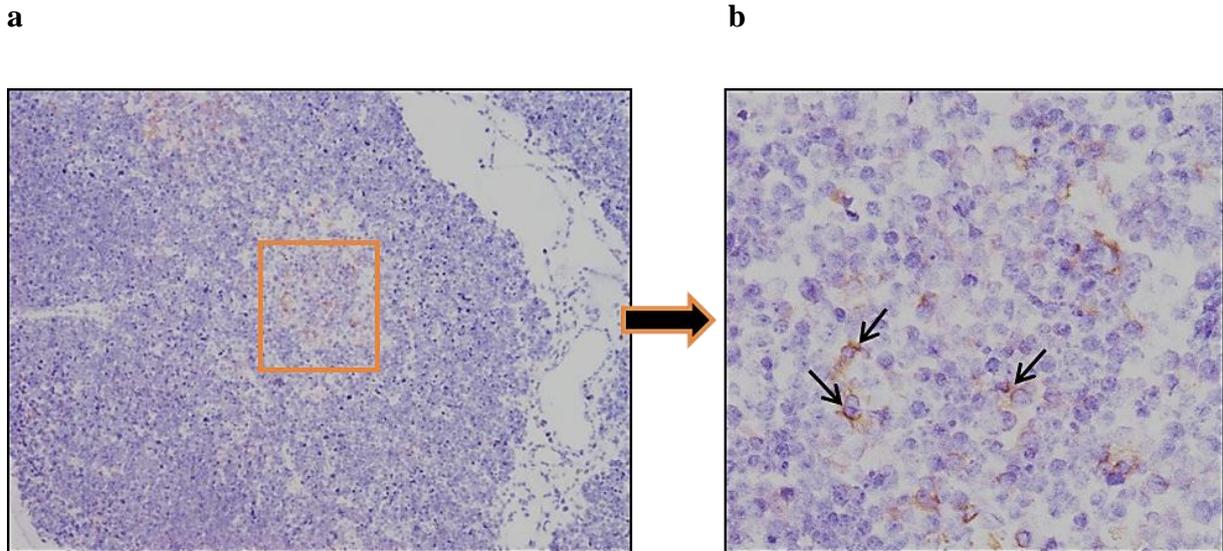


Abbildung 19: a: Immunhistologischer Nachweis einzelner positiver Zellen im Mark des Thymus. b: Ausschnitt aus a: K56, HOPE[®]-Fixierung, Obj. x 10 (a) bzw. x 20 (b), adsorbierte HRP-gekoppelte AK aus Mischblutserum, direkte IHC, Papanicolaous-Hämatoxylin-Gegenfärbung

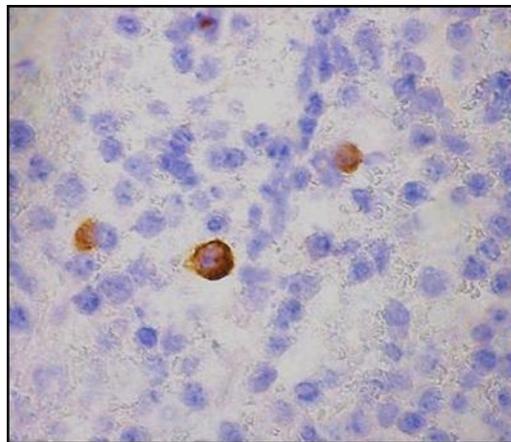


Abbildung 20: Vereinzelt positive Zellen, welche im Gegensatz zu den positiven Zellen im Knochenmark ein granuläres, braunes Zytoplasma aufweisen, in der Milz. K53, HOPE[®]-Fixierung, Obj. x 100 (Öl), adsorbierte HRP-gekoppelte AK aus Mischblutserum, direkte IHC, Papanicolaous-Hämatoxylin-Gegenfärbung

4.4.2.3 Untersuchungen zur Bindung der Alloantikörper an aus dem Blut isolierte Leukozyten

An vielen Zellen aller drei untersuchten Zellpellets (K35, K38, K39) konnten positive Reaktionen beobachtet werden. Aufgrund der mäßigen morphologischen Erhaltung der Zellen und Überlagerungen derselben war eine weitere Differenzierung der markierten Leukozyten nicht möglich.

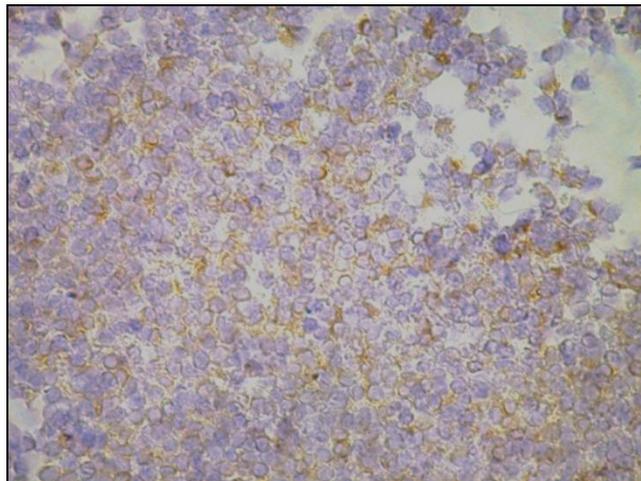


Abbildung 21: Immunhistologischer Nachweis positiver Leukozyten im Zellpellet. K38, HOPE[®]-Fixierung, Obj. x 40, adsorbierte HRP-gekoppelte AK aus Mischblutserum, direkte IHC, Papanicolaous-Hämatoxylin-Gegenfärbung

4.4.3 Merkmale der immunhistologisch positiven Zellen und weitere Beobachtungen

Aufgrund der ausgeprägten Beeinträchtigung der morphologischen Detailerkennbarkeit des Knochenmarkgewebes und der Zellen im Zellpellet nach der durchgeführten Immunhistologie war es nicht mehr möglich, die positiven Zellen im fertigen Schnitt einem bestimmten Zelltyp eindeutig zuzuordnen. Zwar waren im Knochenmark Megakaryozyten anhand ihres spezifischen Erscheinungsbildes noch von den anderen Knochenmarkvorläuferzellen abzugrenzen, insgesamt zeigten alle Zellen jedoch eine so ausgeprägte Zellschwellung, dass eine Unterscheidung selbst in die Zellreihen der Erythropoese und Leukopoese nicht mehr sicher zu treffen war. Zusätzlich waren auch viele der Kerne wie aufgeblasen und konnten teilweise nur noch unscharf in der Zelle abgegrenzt werden.

Ergebnisse

Hervorzuheben ist das Knochenmark des Kalbes S260/12 aus dem Sektionsgut, an dem als einziges neben anderen Vorläuferzellen eine deutliche, membranöse Braunfärbung und somit positive Reaktion an Megakaryozyten darstellbar war. Auffällig hierbei war jedoch, dass nur ein Teil der Megakaryozyten Alloantikörper gebunden hatten.

Zudem konnte in mehreren Knochenmarksschnitten nachgewiesen werden, dass positive Zellen sich gehäuft an den Sinusrändern und zahlreich um die Gefäße herum befanden, wodurch im Schnitt in einigen Lokalisationen ein nahezu straßenartiges Muster aus braunen Zellen entstand.

Die größtenteils positiven Leukozyten im Zellpellet lassen die Aussage zu, dass ein überwiegender Teil der Leukozyten im Blut das/die spezifischen Antigen(e) auch noch als reife, aus dem Knochenmark freigesetzte, weiße Blutzellen exprimieren. Im Gegensatz dazu waren Lymphozyten in peripheren Geweben negativ; hier waren bis auf eine verschwindend geringe Anzahl an Einzelzellen keine Bindungsreaktionen zu beobachten.

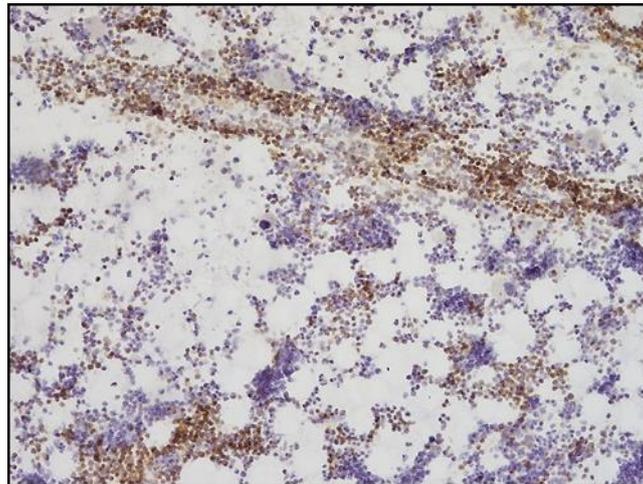


Abbildung 22: Immunhistologischer Nachweis positiver Zellen im Röhrenknochenmark.

Um das angeschnittene Gefäß herum ist deutlich eine Akkumulation der Zellen, welche Alloantikörper gebunden haben, zu beobachten. K24, HOPE[®]-Fixierung, Obj. x 10, adsorbierte HRP-gekoppelte AK aus Mischbluterserum, direkte IHC, Papanicolaous-Hämatoxylin-Gegenfärbung

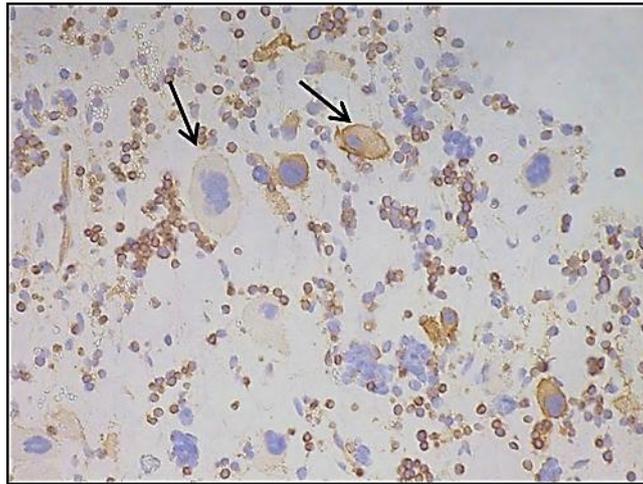


Abbildung 23: Immunhistologischer Nachweis positiver Zellen im Röhrenknochenmark.

Pfeile: ein deutlich positiver Megakaryozyt mit membranöser Braunfärbung nahezu direkt neben einem negativen Megakaryozyten. S260/12, HOPE[®]-Fixierung, Obj. x 40, adsorbierte HRP-gekoppelte AK aus Mischblutserum, direkte IHC, Papanicolaous-Hämatoxylin-Gegenfärbung

4.4.4 Negativkontrollen der immunhistologischen Untersuchungen

In allen untersuchten Geweben wiesen die Negativkontrollen abgesehen von einer leichten bräunlichen Hintergrundfärbung keine deutliche zellassoziierte Braunfärbung auf.

Eine Ausnahme in Hinsicht auf die Negativkontrollen stellte die Knochenmarkprobe des Kalbes K14 dar. Nach einer Inkubation mit dem Kontrollserum in der verwendeten Verdünnung von 1:400 waren an vielen Zellen positive Reaktionen zu beobachten, so dass sich dieser Schnitt erst bei einer höheren Antikörper-Verdünnung von 1:800 weitestgehend negativ darstellte. Glücklicherweise zeigte die verwendete HRP-Antikörperlösung aus Mischblutserum in dieser Verdünnung noch eine eindeutige, positive Reaktion an den Zellen, so dass der Schnitt und somit die Probe des Tieres interpretiert und ausgewertet werden konnte.

5 Diskussion

5.1 Sektionsbefunde der Studienkälber

Bei einem Großteil der seziierten Studienkälber konnten makroskopisch und histologisch Entzündungen in unterschiedlichen Organen festgestellt werden. Abgesehen von den katarrhalschen Enteritiden waren diese vornehmlich von eitriger Qualität, was in erster Linie auf eine Infektion mit bakteriellen Erregern hinweist. Unterschiedliche Faktoren können solch ein Infektionsgeschehen begünstigt haben. Zum einen wurden die Kälber noch auf ihrem Herkunftsbetrieb geboren und waren daher dort während ihrer ersten Lebensstage mit der bestehenden Keimflora in Berührung gekommen. Dadurch könnten die Tiere womöglich bereits in dieser Zeit einem hohen Infektionsdruck an pathogenen Keimen ausgesetzt gewesen sein. Zum anderen kamen sie im Alter von etwa einer Woche mit der neuen Keimflora der Klinik für Wiederkäuer der Justus-Liebig-Universität Gießen in Kontakt, wobei allein die Umstallung der Tiere an sich als ein weiterer Stressfaktor gelten dürfte, welcher eine zusätzlich immunsuppressive Wirkung auf das Abwehrsystem der Kälber gehabt haben könnte. Drei Tage nach der Einstellung in die Wiederkäuerklinik wurde mit der Serumtransfusion über 24 Stunden begonnen. Bereits im Vorfeld erfolgte eine Beprobung der Versuchstiere; sowohl Blut- als auch Knochenmarkproben wurden bereits vor der Serumübertragung genommen. Aufgrund dieses eng gesetzten Zeitrahmens, der mehrfachen, z.T. invasiven Beprobung und einer eventuell zuvor bestandenen Keimbelastung sind Befunde von Entzündungsprozessen bei einigen Tieren als nicht ungewöhnlich anzusehen. Unerwartet und damit besonders auffällig war jedoch neben der hohen Anzahl an schwereren Entzündungsgeschehen die Menge an hochgradigen, thrombotischen Endokarditiden, welche sich ausnahmslos im rechten Herzen manifestiert hatten. Dieser außergewöhnliche Befund schien in Zusammenhang mit der Versuchsdurchführung zu stehen und ist vermutlich auf die angewandte Methode der Serumübertragung mittels Katheter, beziehungsweise wahrscheinlich direkt auf das spezifisch eingesetzte Katheter-Modell, zurückzuführen. Bereits der Eintrag weniger Bakterien über den Katheter in die Vena jugularis führte vermutlich zu einer Anheftung derselben am Endokard des rechten Herzens, welches sich dem Blutstrom folgend in unmittelbarer Nachbarschaft zur Katheterspitze befand. In diesem Zusammenhang ist zudem von einer gleichzeitigen bzw. anschließenden, hämatogenen Streuung der Erreger in andere Organsysteme auszugehen, welche durchaus eine wesentliche Rolle bei vielen der in der Sektion beobachteten Entzündungen gespielt haben kann.

Die statistische Analyse erbrachte einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Auftre-

ten einer Endokarditis und der Serumgruppenzugehörigkeit. Zwar wiesen ebenfalls viele Kälber der Kontrollgruppe eine Endokarditis auf, deutlich häufiger wurde diese Entzündungsform jedoch bei Tieren beobachtet, welche BNP-Serum transfundiert bekommen hatten. Eine direkte Kontamination des BNP-Serums wurde mittels einer mikrobiologischen Untersuchung ausgeschlossen, so dass resultierend vor allem eine beeinflussende, immunsuppressive Wirkung des spezifischen, applizierten Serums anzunehmen ist. Eine weitere signifikante Korrelation zur Serumgruppenzugehörigkeit zeigte sich bei den diagnostizierten Pneumonien. In diesem Fall wurden jedoch prozentual betrachtet vermehrt Pneumonien bei Kontrolltieren beobachtet. Das Kontrollserum war analog dem BNP-Serum mikrobiologisch auf seine Keimfreiheit getestet worden. Hier sprach ebenfalls ein negatives Ergebnis gegen eine bakterielle Kontamination desselben. Auffällig war bei den Pneumonien jedoch vor allem, dass 9 der 11 betroffenen Tiere der Kontrollgruppe vom selben Betrieb stammten (Betrieb B; Herkunft der Tiere in Tabelle 8.1.1 im Anhang dargestellt). Daher könnte die hohe Prävalenz der Pneumonien bei Kontrollkälbern möglicherweise mit der Herkunft der Tiere und einer vorherigen Erregerbelastung in Zusammenhang stehen. In wie weit eventuell bereits Vorschädigungen vorlagen oder sich die Pneumonien erst durch auslösende Faktoren, insbesondere Stress, entwickelt haben, ist nicht nachvollziehbar.

Eingeleitete bakteriologische Untersuchungen ermittelten häufig eine hohe Anzahl an *Trueperella pyogenes* in den eingeschickten Organproben, in den meisten Fällen konnten jedoch lediglich unspezifische Keime nachgewiesen werden. Angesichts der bei einem Großteil der Tiere zuvor durchgeführten Antibiotika-Therapie besteht zweifellos die Möglichkeit, dass neben dem Erreger *Trueperella pyogenes* noch andere spezifische, pathogene Keime eine Rolle spielten, welche jedoch als Folge der medikamentösen Vorbehandlung nicht mehr nachgewiesen werden konnten.

Es ist explizit darauf hinzuweisen, dass solche entzündlichen und insbesondere septischen Prozesse zu sekundären Veränderungen im hämatopoetischen Knochenmark führen können und eine Beurteilung desselben dementsprechend in solchen Fällen mit Bedacht durchgeführt werden sollte (Reagan et al., 2011; Wienbeck, 1938). In diesem Zusammenhang sind auch die eventuell während der Studie applizierten Medikamente, hier vor allem die verabreichten Antibiotika, kritisch zu sehen, welche möglicherweise ebenfalls eine Wirkung auf das hämatopoetische Mark ausgeübt haben könnten (Ammann et al., 1996; Jorna and Postema, 1986).

5.2 Ergebnisse der Untersuchungen an Gewebe

5.2.1 Ergebnisse der HE-gefärbten Knochenmarkschnitte der Studienkälber

5.2.1.1 Semiquantitative Auswertung der HE-gefärbten Knochenmarkschnitte

Die semiquantitative Beurteilung der Knochenmarkschnitte erfolgte aufgrund unterschiedlicher Faktoren sowie einer geringen Probengröße und –qualität nach einem individuell angepassten Auswertungsschema (siehe unter 3.7, Tabelle 9). Abgesehen von der Fettzellanzahl an Tag 9 (siehe dazu unter 4.2.1) ergaben sich bei den statistischen Analysen der Anzahlen einzelner Zellreihen im Knochenmark der Studienkälber keine konkreten Anhaltspunkte über einen signifikanten Unterschied zwischen beiden Serumübertragungsgruppen. Dabei zeigte keine der untersuchten Knochenmarkgewebeproben das Bild einer Panmyelophthase, in allen bewerteten Proben war zumindest herdförmig hämatopoetisches, dicht besiedeltes Mark erkennbar. Zwar zeigten die Studienkälber, welche BNP-Serum übertragen bekommen hatten, mehrheitlich hämatologisch eine charakteristische Thrombozytopenie, die fehlenden makroskopischen Veränderungen und das unveränderte Knochenmark lassen im Hinblick auf eine Induktion der BNP jedoch allenfalls den Verdacht einer subklinischen Ausprägung zu. Diese Resultate sind demnach konträr zu den Ergebnissen früherer Kolostrum-Übertragungsstudien, bei denen den Autoren zufolge bis zu 100 % der Tiere einer Versuchsgruppe nach der Gabe von Mischbluterkolostrum innerhalb der ersten Lebensstunden nicht nur hämatologisch, sondern auch klinisch und histologisch Symptome einer BNP entwickelten (Friedrich et al., 2011; Henniger et al., 2014; Schröter et al., 2011). Abgesehen davon fiel bei den Kolostrum-Studien auf, dass das eingesetzte BNP-Kolostrum nicht ausnahmslos für alle Kälber pathogen war und die Reaktionen auf die Verabreichung eines solchen vermutlich mit einer individuellen Disposition zusammenhing (Friedrich et al., 2011; Henniger et al., 2014). Die Hauptunterschiede zu der hier besprochenen Serumstudie waren der wesentlich frühere Übertragungszeitpunkt (die Kälber waren erst wenige Stunden alt), die Art und Weise der Übertragung der Alloantikörper (alimentär über Kolostrum) und die Tatsache, dass das in dieser Arbeit verwendete Mischbluterserum von anderen Tieren stammte, als beispielsweise das von Friedrich et al. (2011) verwendete Mischkolostrum. Aufgrund welchen Einflusses es trotz der Übertragung hoher Serumdosen bei keinem der Versuchstiere zur deutlicheren BNP-Symptomatik kam, konnte nicht spezifisch dargestellt werden, vermutlich spielten jedoch quantitative Aspekte hinsichtlich der übertragenen IgG-Menge eine Rolle.

Im Gegensatz zum Röhrenknochenmark wies das Sternalmark (30. Tag) bei der stichpunktartigen Betrachtung keine besonderen Auffälligkeiten auf. Abgesehen von einer deutlich gerin-

geren Anzahl an Fettzellen und einer nicht so deutlich ausgeprägt erhöhten Leukopoese bei der BNP-Serumgruppe waren keine weiteren histologischen Abweichungen festzustellen. Die geringere Anzahl an Fettzellen und der weniger deutliche Anstieg der Leukopoese wurden durch die statistische Analyse bestätigt, indem nicht-signifikante Werte für die Korrelationskoeffizienten nach Spearman (r_s) ermittelt wurden. Eine gleichartige Veränderung von Sternalmark und Röhrenknochenmark war somit eher unwahrscheinlich. Ein durchgeführter McNemar-Test auf Symmetrie erbrachte explizit einen statistischen Unterschied bei der Anzahl der Fettzellen, wobei die bekannte, schnelle Verfettung des Röhrenknochenmarks bei Kälbern diesen quantitativen Unterschied erwarten ließ (Varicak, 1938). Abweichend dazu waren die Ergebnisse sowohl der Erythropoese als auch der Thrombopoese. Dort konnten signifikante Korrelationen dargestellt werden, welche eine überwiegende Übereinstimmung der Zellzahlen dieser Zellreihen im Sternal- und Röhrenknochenmark verdeutlichten.

Die im Verlauf des Versuchs merklich gesteigerte Leukopoese, welche bei Tieren beider Serumgruppen beobachtet wurde, konnte statistisch sowohl durch einen Friedman-Test als auch im Rahmen der Kovarianzanalyse bestätigt werden. Beide Analysen ergaben signifikante Ergebnisse, wobei der Friedman-Test eine Steigerung der Leukopoese über die Zeit und das Resultat der Kovarianzanalyse den stärkeren Anstieg in der BNP-Serumgruppe verdeutlichte. Demnach schien es einen Zusammenhang zwischen der Applikation des BNP-Serums und einer vergleichsweise heftigeren Reaktion der leukopoetischen Zellen zu geben. Die Reaktion an sich war vermutlich auf die bestehenden, zahlreichen Entzündungsprozesse zurückzuführen. So erfolgt gerade bei vorliegenden Infektionen eine quantitative Steigerung der Granulopoese im Knochenmark, wobei in der Regel gleichzeitig eine verminderte Erythropoese zu beobachten ist (Wienbeck, 1938). Dass sich die gesteigerte Leukopoese vor allem im Röhrenknochenmark bemerkbar machte, während das Sternalmark in dieser Hinsicht keine so deutliche Verschiebung im Zellbild zeigte, könnte ein Hinweis dafür sein, dass sich reaktive Veränderungen bei Neonaten zuerst im noch hämatopoetisch aktiven Röhrenmark ausprägen, bevor im weiteren Krankheitsverlauf das spongiöse Mark mit in den Prozess einbezogen wird, um beispielsweise einen erhöhten Bedarf an Granulozyten auszubalancieren. Es müsste jedoch eine höhere Probenanzahl an Sternalknochenmark entsprechend untersucht werden, um eine eindeutigere Aussage in diesem Punkt treffen zu können.

Bei allen Kälbern fanden sich bereits in den Knochenmarkbiopsien des 9. Lebenstages eine deutliche Anzahl an Fettzellen im Röhrenmark des Os femoris, was für einen sehr frühzeitig einsetzenden Verfettungsprozess spricht und die Beurteilung der nachfolgenden Knochenmarkproben zu späteren Zeitpunkten im Hinblick auf die Zellularität erschwerte beziehungs-

weise einschränkte. Prinzipiell ist bekannt, dass die Verfettung unregelmäßig erfolgt und abgesehen vom Alter und der Tierspezies sogar der Ernährungszustand eine Rolle zu spielen scheint, wenn auch beim Kalb keine große (Travlos, 2006a; Varicak, 1938). Valli und Jacobs gaben zwar bei Kälbern ein Grenzalter von 2 Monaten an, bis zu dem das Röhrenknochenmark trotz der fortgeschrittenen Verfettung noch auswertbar sei, jedoch bezieht sich dieser Altersrahmen höchstwahrscheinlich auf die Voraussetzung, dass der ganze Knochen als Probenmaterial zur Verfügung steht oder es sich zumindest um eine größere Probe und nicht um eine wie in diesem Fall kleine Biopsie handelt (Valli, 2000). Die durchgeführte statistische Analyse hatte einen signifikanten Zusammenhang zwischen der verabreichten Serumdosis und der Anzahl der Fettzellen ermittelt. Demnach fanden sich bei den Tieren, welche erst im späteren Verlauf der Studie mit höheren Dosen an Serum behandelt wurden, prinzipiell mehr Fettzellen im Röhrenknochenmark als bei Tieren, welche niedrigere Serumdosen erhalten hatten. Da mehr Fettzellen mit weniger Vorläuferzellen gleichzusetzen sind, erzeugten höhere Serumdosen demzufolge einen stärkeren Schwund an hämatopoetischen Vorläuferzellen im Röhrenmark als niedrige Serumdosen.

Des Weiteren resultierte aus den statistischen Berechnungen eine Korrelation zwischen der Fettzellanzahl am 9. Lebenstag und der Serumgruppenzugehörigkeit; Kälber der BNP-Serumgruppe wiesen zu diesem Probenzeitpunkt vermehrt hohe Fettzellanzahlen auf. Da jedoch am 9. Lebenstag noch kein Serum übertragen worden war und vor allem Kälber, welche zu einem späteren Zeitpunkt der Studie biopsiert wurden, bereits anfangs solche hohen Anzahlen an Fettzellen zeigten, sind die statistischen Ergebnisse möglicherweise durch einen Doktorandenwechsel in der Klinik für Wiederkäuer und Schweine der Justus-Liebig-Universität Gießen im April 2012 begründet. So kam es eventuell zu einer abweichenden Biopsie-Entnahme bei den zum Ende der Studie hin höher dosierten Tieren und somit veränderten Ausgangswerten. Passend dazu wurden in der späteren Studienphase auch quantitativ betrachtet verhältnismäßig vielen Kälbern BNP-Serum transfundiert, so dass ebenfalls die Korrelation zur Serumgruppe in diesem Zusammenhang erklärt werden kann.

Große Schwankungen sind jedoch nicht nur hinsichtlich des Verfettungsprozesses bekannt, ebenso initial ermittelte absolute und relative Zellzahlen einzelner hämatopoetischer Linien und analysierte hämatologische Werte sind bei neonatalen und jungen Kälbern sehr individuell ausgeprägt (Hoffmann-Fezer et al., 1974; Penny et al., 2009). Übereinstimmend dazu fielen bei einigen Studienkälbern bereits vor der Serumübertragung (9. Tag) Abweichungen nicht nur im Fettgehalt, sondern ebenfalls im Zellbild unterschiedlicher Zellreihen auf, so dass der durchschnittliche, semiquantitativ ermittelte Maßstab innerhalb einer Zellreihe lediglich als

grober, versuchsbezogener Richtwert betrachtet werden sollte. So weisen in diesem Zusammenhang auch Penny et al. (2009) darauf hin, dass einige Kälber bei ihren Studien hämatologisch bereits vor der ersten Kolostrumaufnahme abnormal niedrige Thrombozyten- und auch Neutrophilenanzahlen zeigten und bei anderen Tieren vor Versuchsbeginn sogar eine temporäre oder milde Knochenmarksuppression beobachtet werden konnte. Die semiquantitativen Werte der Knochenmarkzellen und die hämatologische Auswertung müssen dementsprechend mit einem gewissen Vorbehalt betrachtet werden. Dennoch waren nach der Serumübertragung die hämatologischen Werte der Thrombozytenanzahlen nahezu bei sämtlichen Studienkälbern, welche BNP-Serum bekommen hatten, im Gegensatz zu den Werten der Kontrollkälber, deutlich niedriger als die erhobenen Referenzwerte, so dass bei diesen Tieren folglich eine Thrombozytopenie diagnostiziert werden konnte. Diese Feststellung ist analog zu den Ergebnissen von Friedrich et al. (2011), welche bereits wenige Stunden nach einer Aufnahme von Blutmutterkuh-Kolostrum ebenfalls eine Thrombozytopenie bei den Versuchskälbern beobachten konnten. Aufgrund des rapiden Abfalls der Zellzahl innerhalb kürzester Zeit ist eine direkte Bindung von Alloantikörpern an Thrombozyten und deren darauffolgende Zerstörung in Form einer Zelllyse oder gezielten Phagozytose als wahrscheinlichste Ursache anzunehmen. Unterstützt wird diese These durch das Fehlen von Hinweisen auf eine intravasale Gerinnung und somit Verbrauchskoagulopathie in den parenchymatösen Organen. In keinem Gewebe konnten entzündungsunabhängige Fibrinthromben oder Fibrinausfällungen nachgewiesen werden. Deutskens et al. (2011) vermuten ebenfalls eine Komplement-abhängige Lyse oder Zytophagozytose der mit Alloantikörper beladenen Zielzellen. Bei anderen Erkrankungen ist bereits eine vergleichbare Pathogenese bekannt, wobei vermutet wird, dass Antikörper-tragende Zellen durch nahegelegene, aktivierte Makrophagen phagozytiert und abgebaut werden, auch wenn es sich beispielsweise um Vorläuferzellen im Knochenmark handelt (Anosa et al., 1992). Eine Lyse der Blut- und Knochenmarkzellen auf diesem Wege scheint demnach eine plausible Erklärung zu sein, die Zellen innerhalb weniger Stunden derartig stark zu dezimieren. Im Einklang mit dieser These beschrieben Bastian et al. (2011) bei In vitro-Versuchen eine um 20-30 % erhöhte Phagozytose-Rate nach einer Inkubation mit BNP-Serum. In anderen Studien wurden diesbezüglich aktivierte Makrophagen und Haemophagozytose in Knochenmark-Aspiraten beobachtet (Bridger et al., 2011; Pardon et al., 2010). Solche Beobachtungen ließen sich in den vorliegenden histologischen Untersuchungen am Knochenmark der Studienkälber dieser Dissertation jedoch nicht wiederfinden; dort waren keine Anzeichen von vermehrten Phagozytose-Vorgängen oder Zelllysen auffällig. Dies kann damit zusammenhängen, dass die gewählten Untersuchungszeitpunkte nach der Serumüber-

tragung (13. und 30. Tag) zu spät und akute Zellyse-Vorgänge somit schon beendet waren.

Stattdessen konnte jedoch ein Trend zu einer gesteigerten Thrombopoese und Leukopoese vom 9. bis zum 13. Lebenstag bei den Kälbern der BNP-Serumgruppe festgestellt werden. Besonders deutlich war in dieser Gruppe des Weiteren der Trend zu einer Verringerung des Fettgehalts bzw. Erhöhung der Zelldichte hämatopoetischer Zellen trotz fortschreitenden Alters im Gegensatz zur Kontrollgruppe (13. bis 30. Tag). Diese Verschiebungen weisen alle auf eine reaktive Hyperplasie der beiden oben genannten Zellreihen hin und sprechen demnach für einen gesteigerten Bedarf an Leukozyten und Thrombozyten in der Peripherie. Dies wiederum harmoniert mit der hämatologisch diagnostizierten Thrombozytopenie, so dass eine Wirkung des BNP-Serums sehr wahrscheinlich ist, obwohl letztendlich keine klinische BNP induziert werden konnte. Den Studienergebnissen zufolge erfolgte diese Wirkung jedoch lediglich beziehungsweise hauptsächlich auf die Zellen des strömenden Blutes, Knochenmarkzellen hingegen scheinen den Erwartungen entgegen verschont geblieben zu sein. Das Knochenmark zeigte sich teilweise sogar hämatopoetisch aktiver.

5.2.1.2 Zusätzliche Ergebnisse der HE-gefärbten Knochenmarkschnitte

Bei der Betrachtung der histologischen HE-Schnitte des Knochenmarks fielen gelegentlich Veränderungen im Gewebe auf. So waren unabhängig der Serumgruppenzugehörigkeit unregelmäßig in Knochenmarkproben am 30. Tag (Sektionstag) multifokal Areale mit nur wenigen, vereinzelt liegenden Knochenmarkzellen und sehr viel Fettgewebe vor einem Hintergrund eosinophiler, proteinhaltiger Flüssigkeit zu sehen. Mikroskopisch war das Bild dem einer BNP äußerst ähnlich. Für sich allein betrachtet hätte eine derartige Lokalisation des Öfteren als Zellschwund diagnostiziert werden können. In unmittelbarer Nähe besagter Stellen fand sich jedoch immer mindestens eine deutliche hämatopoetische Insel, welche sämtliche Zellen eines hämatopoetisch aktiven Markes in hoher Dichte aufwies. Demzufolge spiegelte die vermeintliche Hypozellularität in diesen Fällen vermutlich eher ein fortgeschrittenes Stadium des Umbaus von hämatopoetischem Mark zu Fettmark wieder, als dass es sich um eine pathologische Läsion handelte. Insofern ist an dieser Stelle noch einmal darauf hinzuweisen, dass das Röhrenknochenmark eines 1 Monat alten Kalbes lediglich unter Vorbehalt beziehungsweise nur großflächig bezüglich einer hämatopoetischen Aktivität beurteilt werden sollte, um solche Trugschlüsse, wie beispielsweise eine irrtümlich diagnostizierte Hypozellularität, zu vermeiden. Gleichzeitig kann ein Zellschwund und eventuell sogar eine

Panmyelophthase nicht völlig ausgeschlossen werden, gerade im Hinblick auf die im Rahmen einer BNP-Erkrankung teils fokal auftretenden Veränderungen im Knochenmark (Bell et al., 2013). Abgesehen von der Vermutung eines physiologischen, strukturellen Umbaus des Knochenmarks in diesem Alter könnte des Weiteren eine Beteiligung entzündlicher Prozesse eine Rolle bei der Entstehung der auffälligen, zellärmeren Areale gespielt haben. In diesem Zusammenhang wären die beobachteten Veränderungen möglicherweise ein Resultat einer systemischen Reaktion auf größere Entzündungsgeschehen in peripheren Organen und/oder stellen die Folge einer Erregerstreuung in diese Bereiche dar. Als weitere Besonderheit fielen bei der Untersuchung der Knochenmarkproben mehrfach herdförmige Proliferationen an Bindegewebe auf. Da diese ausschließlich in Proben des 30. Tages (Sektionstag) ersichtlich waren, sind die Veränderungen höchstwahrscheinlich auf eine narbige Reparatur des Gewebes infolge vorangegangener Biopsieentnahmen an dieser Stelle zurückzuführen. Bei den im Bindegewebe eingestreuten Ansammlungen von kleinen Zellen mit stark basophilem Kern handelt es sich mutmaßlich um Zellen der Erythropoese, da ähnlich aussehende, lymphozytäre Vorläuferzellen in dem Maße und der charakteristischen, inselförmigen Anordnung physiologisch im Allgemeinen im Knochenmark nicht vorkommen. Welche Bedeutung den erythropoetischen Zellen jedoch zukommt, ist derzeit nicht belegt. Im Gegensatz dazu ist die in den Randbereichen der Bindegewebeherde beobachtete, vermehrte Leukopoese vermutlich als zusätzliches Zeichen einer lokalen Reaktion auf die vorherige Gewebemanipulation zu deuten.

Abgesehen von diesen vereinzelt vorkommenden Besonderheiten konnten keine weiteren Anzeichen, insbesondere für eine zytotoxische Wirkung, in den histologischen Untersuchungen beobachtet werden.

5.2.2 Immunhistologie

Im Allgemeinen dient die Immunhistologie dazu, zelluläre Strukturen mit Hilfe von markierten Antikörpern im Gewebeschnitt darzustellen. Ziel dieser Arbeit war es, die Bindung spezifischer BNP-Alloantikörper an Zielzellen basierend auf dieser Methode nachzuweisen. Nach einer erfolgreichen Gewinnung von IgG-Antikörpern aus Seren und deren Kopplung an den Marker Meerrettich-Peroxidase konnte letztendlich nach der Erprobung unterschiedlicher Techniken eine Bindung von solchen Alloantikörpern sowohl an MDBK-Zellen als auch an Zellen des Knochenmarks und des strömenden Blutes immunhistologisch nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse sprechen für eine alloimmunvermittelte Pathogenese der BNP.

5.2.2.1 Nachweis von "BNP-Antigen" an MDBK-Zellen

Die verwendeten MDBK-Zellen stammen ursprünglich aus renalem Gewebe eines adulten Stiers und wurden seither häufig als Grundlage für eine Virusproduktion zur Vakzine-Herstellung, insbesondere für BVD-Impfstoffe, genutzt (Madin and Darby, 1958; Noe et al., 1994). Entsprechend waren auch für die Produktion des Impfstoffes PregSure® BVD MDBK-Zellen als Basis zur Virusvermehrung verwendet worden (Bastian et al., 2011). Verschiedene Autoren zeigten, dass nach einer Applikation der Vakzine PregSure® BVD neben einer erwünschten, starken Immunantwort mit hohen Antikörpertitern gegen das BVDV in gleicher Weise ebenfalls eine Bildung alloreaktiver Antikörper durch den Impfstoff induziert wurde (Bastian et al., 2011; Salt, 2004). Beruhend auf der Messung mittels einer Durchflusszytometrie reagierten diese Alloantikörper im Versuch sowohl mit Oberflächenantigenen der MDBK-Zellen als auch mit isolierten Kälberleukozyten (Bastian et al., 2011). Analog zu den Ergebnissen konnte in dieser Arbeit die Bindungsreaktion der Alloantikörper mittels der Technik der Immunhistologie dargestellt werden, wobei sowohl mittels einer indirekten als auch einer direkten Methode an der Zelloberfläche gebundene Antikörper an kultivierten MDBK-Zellen dargestellt wurden. Demzufolge konnte bestätigt werden, dass die Seren, welche ursprünglich aus den Blutermutterkühen stammten, im Gegensatz zu den ungeimpften Kontrolltieren, Antikörper gegen Zelloberflächenantigene der MDBK-Zellen enthielten.

Weiterführende massenspektrometrische Analysen der PregSure® BVD-Vakzine ergaben überdies einen 3,5-fach höheren Proteingehalt im Vergleich zu anderen BVD-Vakzinen, der im Wesentlichen auf dem vermehrten Vorhandensein von Bestandteilen der MDBK-Zellen beruhte (Euler et al., 2013). Dem Anschein nach ist der hohe „Verunreinigungsgrad“ der PregSure® BVD-Vakzine mit antigenetisch wirksamem MDBK-Zellprotein somit letztendlich für die fatale Entstehung der alloreaktiven Antikörper verantwortlich.

5.2.2.2 Nachweis von "BNP-Antigen" in Knochenmarkschnitten und an isolierten Leukozyten aus dem Blut

Analog zur Bindung von Antikörpern an MDBK-Zelloberflächenantigene konnten auch an Zellen des Knochenmarks und isolierten Leukozyten aus dem Blut mittels der Immunhistologie Bindungen alloreaktiver Antikörper nachgewiesen werden. Abgesehen von einem einzelnen Knochenmark des Studienkalbes K7 verliefen sämtliche immunhistologische Analysen an

Knochenmarkschnitten der Studienkälber und auch der weiteren 10 beprobten Kälber aus dem Sektionsgut mit einem positiven Ergebnis. Daraus ergibt sich für dieses Untersuchungsverfahren eine Empfänglichkeit der Kälber von nahezu 100 %, ein Wert, der im Vergleich zu den Ergebnissen sowohl des Institutes für Virologie des Fachbereichs Veterinärmedizin (73,5 %) als auch des Institutes für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere (76 %) der Justus-Liebig-Universität Gießen wesentlich höher liegt. Mittels statistischer Analysen konnten keine Korrelationen und somit keine Zusammenhänge zwischen den immunhistologischen Ergebnissen der Studienkälber und den Resultaten der beiden anderen Empfänglichkeitstests nachgewiesen werden. Beide Institute hatten auf der Basis von Vorversuchen für ihre jeweiligen Testverfahren Schwellenwerte für die Eingruppierung der Tiere festgelegt, da eine gewisse Reaktivität der Kälberzellen bzw. mit Muttertier-Seren immer vorhanden war. Tiere, welche immunhistologisch eine schwache Empfänglichkeit aufwiesen, befanden sich möglicherweise bei dem Institut für Virologie des Fachbereichs Veterinärmedizin und auch bei dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere hinsichtlich der Gruppen-Einteilung noch unterhalb des Schwellenwertes und wurden daher als negativ eingestuft. Des Weiteren kann ein Teil der immunhistologisch positiven Zellen trotz der Adsorption der Antikörperlösungen an Blutpulver auf eine Restaktivität anderer Alloantikörper zurückzuführen sein. Für die statistische Berechnung wurde der Aspekt der unterschiedlichen Messzeitpunkte für die Empfänglichkeit (zuvor genannte Institute: 9. Tag, Immunhistologie: 30. Tag) nicht miteinbezogen. Eine altersabhängige physiologische Veränderung der Antigenexpression an Zelloberflächen ist allerdings grundsätzlich als beeinflussender Faktor vorstellbar und so sollte der Unterschied der Messzeitpunkte nicht völlig außer Acht gelassen werden. Weiterhin wurden die Testverfahren an unterschiedlichen Zellen und mit verschiedenen BNP-Seren durchgeführt. So prüfte man im Falle der Institute für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere und für Virologie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen die Reaktionen von Seren an isolierten Leukozyten aus dem Kälberblut, während der immunhistologische Nachweis auf einer Darstellung der Bindung von Alloantikörpern an Knochenmarkszellen beruhte. Vermutlich war sogar ein Zusammenspiel der zuvor genannten Faktoren ursächlich für das Fehlen eines statistischen Zusammenhanges zwischen den Testverfahren verantwortlich.

Des Weiteren ergaben sich keine Hinweise darauf, dass unterschiedliche Mengen an verabreichtem BNP-Serum pro Kilogramm Körpergewicht, welche die Studienkälber erhielten, die immunhistologischen Ergebnisse beeinflussten. Dabei ist zu berücksichtigen, dass der Untersuchungszeitpunkt am 30. Lebenstag ca. drei Wochen nach der Serumübertragung liegt und

das Knochenmark sich eventuell in der Zwischenzeit von vorherigen, akuten Veränderungen regenerieren konnte. Eine Abhängigkeit zur Menge des übertragenen Serums ist demnach nicht völlig auszuschließen. Vergleichbare Beobachtungen zur Unabhängigkeit der Serummenge machten auch Schröter et al. (2011) bei einer Kolostrum-Übertragungsstudie. In dieser Studie konnten sie keinen signifikanten Einfluss der verabreichten Kolostrummenge auf den Verlauf der BNP feststellen. Die Variation in der Pathogenität scheint demnach unabhängig von den Serum-IgG-Spiegeln zu sein, was für die These spricht, dass es auf bestimmte Alloantikörper und nicht in erster Linie auf die IgG-Menge an sich ankommt (Bell et al., 2013).

Darüber hinaus machten Pardon et al. (2011) in ihren Studien die Beobachtung, dass Seren von BNP-Muttertieren sich deutlich in ihrer Reaktivität mit Kälberleukozyten unterschieden. Resultierend postulierten sie, dass das Ergebnis solch einer durchgeführten Inkubation letzten Endes kombinationsabhängig und damit individuell sei. Diese individuellen Reaktionen spiegeln sich vermutlich in dieser Arbeit gleichermaßen in den beobachteten graduellen Unterschieden bezüglich der immunhistologisch positiven Zellen im Knochenmark wieder. Insbesondere subklinische BNP-Fälle, welche des Öfteren beschrieben wurden, könnten mit der Theorie einer graduierten, individuellen Empfänglichkeit in Bezug auf die Alloantikörper begründet werden (Henniger et al., 2014; Pardon et al., 2010; Witt et al., 2011). Demnach wäre bei subklinisch erkrankten Tieren von einer geringgradigen Empfänglichkeit auszugehen, bei der die alloreaktiven Prozesse nicht in der Lage sind, eine klinische Ausprägung der BNP hervorzurufen.

Anhand des Befundes des Kalbes S260/12, bei dem neben den vermutlich leukopoetischen Vorläuferzellen auch eine gewisse Anzahl der Megakaryozyten eine Alloantikörperbindung aufwiesen, wird deutlich, dass nicht nur eine einzige Zellpopulation das Zielantigen auf der Zelloberfläche trägt. Gleichzeitig sollte in diesem Zusammenhang am Beispiel der Megakaryozyten des Kalbes S260/12 hervorgehoben werden, dass nicht sämtliche Zellen der gleichen Population das Zielantigen auf der Zelloberfläche tragen bzw. in demselben Maße zu exprimieren scheinen. Schlussfolgernd daraus lassen das breite Spektrum der Zielzellen und das unterschiedliche, geradezu individuelle Expressionsmuster die Möglichkeit zu, dass es mehr als ein Zielantigen gibt, an dem die Alloantikörper der BNP-Mutterkühe bei neonatalen Kälberzellen binden können. Dahingehend besäßen die geringgradig positiv getesteten Tiere eventuell nur ein einzelnes, passendes Antigen im Vergleich zu den hochgradig positiv getesteten Tieren, welche mehr als ein Zielantigen auf Knochenmarkzelloberflächen exprimierten. Da auch immer reaktionslose Zellen in allen Knochenmarkschnitten zu beobachten waren,

muss andererseits eine graduelle Abweichung der Empfänglichkeit aufgrund eines quantitativen Unterschiedes bezüglich hämatopoetischer Vorläuferzellen im Knochenmark der Kälber gleichermaßen in Betracht gezogen werden. In diesem Fall würde sich das untersuchte Knochenmark geringgradig positiver Kälber überwiegend aus solchen Vorläuferzellen zusammensetzen, welche kein Zielantigen besitzen.

Bis auf die Megakaryozyten des Kalbes S260/12, welche teilweise immunhistologisch deutlich positiv waren (siehe dazu Abb. 23), zeigten Megakaryozyten aller anderen untersuchten Kälber keine Braunfärbung der Zellmembran, sie hatten demzufolge keine Antikörper gebunden. Diese Feststellung ist ebenfalls vergleichbar mit den Resultaten von Pardon et al. (2011), welche keine Bindung von Alloantikörpern an Megakaryozyten sondern lediglich an leukozytäre Vorläuferzellen eines rekonvaleszierten BNP-Kalbes ausmachen konnten. Dennoch war es eher ungewöhnlich, dass gerade die Megakaryozyten, deren vollständiges Fehlen im Knochenmark von BNP-Kälbern häufig beschrieben wurde (Friedrich et al., 2009c; Krappmann et al., 2011), nur bei diesem einen Tier zum Teil immunhistologisch positiv waren. Neben der Möglichkeit des oben beschriebenen Vorkommens mehrerer Zielantigene kann diese Beobachtung darüber hinaus mit einer noch zu geringen Sensitivität der immunhistologischen Untersuchung erklärbar sein. Dann würden lediglich die Zellen im Gewebeschnitt als positiv erkannt, welche eine relativ hohe Konzentration an Zielantigen aufweisen. Megakaryozyten dagegen exprimieren möglicherweise eher nur sehr wenig davon auf ihrer Zelloberfläche und würden dementsprechend mikroskopisch nicht als positiv erfasst. Auch besteht die Möglichkeit, dass positive Megakaryozyten durch das übertragene Antiserum bereits eliminiert wurden und daher zum späteren Zeitpunkt der immunhistologischen Untersuchung nicht mehr im Knochenmark vorhanden waren.

Bei der Betrachtung der immunhistologischen Schnitte war zusätzlich aufgefallen, dass sich positive Zellen vermehrt an den Rändern zum Sinus hin und um die Gefäße herum befanden. Aufgrund der histologisch- und fixierungsbedingt eingeschränkten morphologischen Detailerkennbarkeit kann nur vermutet werden, dass diese Akkumulationen aufgrund eines unterschiedlichen Reifegrades der hämatopoetischen Vorläuferzellen zustande kommen. Bezüglich des Reifegrades der Zielzellen im Knochenmark sind sich Bell et al. (2013) und Laming et al. (2012) einig, dass es sich eher um die primitiven Vorläuferstufen bzw. die pluripotenten hämatopoetischen Vorläuferzellen handelt und weniger um die reiferen, differenzierteren Zellen. Andererseits wäre denkbar, dass es sich bei den Zellen direkt am Sinus mehrheitlich um reifere Zellen handelt, welche kurz davor stehen ins Kapillarsystem entlassen zu werden. Dies widerspräche zwar den Beobachtungen von Bell et al. (2013) und Laming et al. (2012), würde

jedoch in Übereinstimmung dazu stehen, dass immunhistologisch in dieser Doktorarbeit auch eine Bindung der Alloantikörper an reife, freigesetzte Leukozyten aus dem peripheren Blut-system dargestellt werden konnte. Demnach tragen zumindest ein Teil der reifen Leukozyten selbst im Gefäßsystem noch die entsprechenden Zielantigene auf ihrer Zelloberfläche und des Weiteren kann rückschließend vermutet werden, dass zumindest einige der positiven Zellen im Knochenmark leukozytären Ursprungs sind. Da nach der Geburt nur noch wenige lymphozytäre Zellen im Knochenmark zu finden sind, ist daher in dieser Hinsicht bei den zahlreich positiv markierten Zellen im Knochenmark hauptsächlich von Zellen der granulopoetischen Linie auszugehen (Reagan et al., 2011). Diese Theorie, dass überwiegend granulozytäre Zellen das Ziel für die Alloantikörper darstellen und weniger Lymphozyten, belegen zudem die Studienergebnisse von Penny et al. (2009) und Assad et al. (2012), welche in erster Linie eine Neutropenie bei BNP-erkrankten Kälbern im Leukogramm beobachteten. Analog zur verzeichneten, erhöhten Thrombopoese im Knochenmark muss also bei der festgestellten, vermehrten Leukopoese an eine reaktive Hyperplasie infolge eines erhöhten Bedarfs in der Peripherie gedacht werden. Da jedoch auch Kontrollkälber die gesteigerte Leukopoese in gewissem Maße zeigten, wird vermutlich zumindest ein Anteil derselben entzündlich bedingt sein. Nebst neutrophilen Granulozyten war in anderen Studien eine Bindung von Alloantikörpern an Subpopulationen von Lymphozyten und Thrombozyten nachzuweisen, die Gruppe an Zielzellen stellt sich demzufolge als sehr heterogen dar (Assad et al., 2012; Bastian et al., 2011; Pardon et al., 2010).

Die Knochenmarkszellen des einzigen negativen Studienkalbes K7 exprimierten im Gegensatz zu den übrigen, empfänglichen Kälbern kein Antigen, an welches die Alloantikörper binden konnten. Demzufolge war dieses Tier, unter Vernachlässigung des männlichen Geschlechts, mit den Erbanlagen einer zukünftigen Blutmutterkuh ausgestattet. Bei einer Impfung des Tieres mit der Vakzine PregSure[®] BVD wären die enthaltenen Antigene der MDBK-Zellen als fremd erkannt worden und es wäre daraufhin zu einer Bildung von Antikörpern gegen diese BNP-Zielantigene gekommen. Im Gegensatz dazu würden die anderen, immunhistologisch positiven Tiere zumindest einen Teil der BNP-auslösenden Antigene der MDBK-Zellen als eigene erkennen, folglich bliebe eine Alloantikörperbildung aus beziehungsweise es würden lediglich geringe Mengen an Alloantikörpern gebildet. Die Tatsache, dass es sich bei dem Tier K7 um einen Einzelfall unter mehr als 60 beprobten Tieren handelt, harmoniert mit der zuvor beobachteten niedrigen Prävalenz des Vorkommens von Blutmutterkühen.

Weitere Ausnahmen bei den immunhistologischen Ergebnissen stellten die nachgewiesenen BNP-Kälber dar. Trotz der sehr geringen Probenanzahl von 4 Kälbern und der Tatsache, dass

nur noch wenige Zellen im Knochenmark verblieben waren, war es im Vergleich zu den Resultaten der Studienkälber doch auffällig, dass sämtliche Untersuchungen mit einem negativen Ergebnis verliefen. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre einerseits, dass im Zuge der Erkrankung entweder die spezifischen, antigenträgenden Zellen zerstört wurden und/oder andererseits, dass die Bindungsstellen durch zuvor aufgenommene, kolostrale Antikörper besetzt waren.

5.2.2.3 Ergebnisse in anderen Gewebeschnitten

Im Gegensatz zu den teils positiven Leukozyten im Blut konnte lediglich an wenigen leukozytären Einzelzellen und kleineren Zellgruppen peripherer Organe, vornehmlich im Thymus, immunhistologisch eine Bindung von Alloantikörpern dargestellt werden. Resultierend daraus kann darauf geschlossen werden, dass nahezu alle in immunologischen Organen ansässigen Leukozyten, demzufolge hauptsächlich Lymphozyten, kein BNP-spezifisches Zielantigen auf ihren Zelloberflächen tragen. Insbesondere im Hinblick auf die zweifellose Bindung von Alloantikörpern an Lymphozytensubtypen im Kälberblut spiegelt diese Erkenntnis abermals die komplexe Expression des Zielantigens wider (Assad et al., 2012; Bastian et al., 2011). In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass sich fast alle Studienkälber, welche im Verlaufe des Versuchs BNP-Serum transfundiert bekommen hatten, nach der Übertragung hämatologisch lymphopenisch zeigten. Diese Lymphopenien können Ausdruck einer Reaktion applizierter, BNP-spezifischer Alloantikörper mit im Blut zirkulierenden Lymphozyten sein.

Die beobachteten, positiven Einzelzellen in lymphatischen Organen müssten der Theorie zufolge analog zu den Blutzellen das spezifische Zielantigen auf der Zelloberfläche exprimieren. Im Thymus könnte die bevorzugte Lokalisation positiver Zellen im Mark dafür sprechen, dass das Zielantigen erst auf ausgereiften Lymphozyten vorzufinden ist. So befinden sich im Mark neben Makrophagen und Epithelzellen gemäß dem Vorgang der T-Zellreifung überwiegend die reifen T-Zell-Stadien, wogegen sich die aus dem Blut ankommenden, unreifen Zellen aus dem Knochenmark zunächst in der Rindenzone ansiedeln (Valli, 2000). Jedoch lässt die schlechte morphologische Detailerkennbarkeit der markierten Einzelzellen auch hier letzten Endes keinen definitiven Schluss auf den Zelltyp zu, eine genauere Charakterisierung der Zellen mit immunhistologischer Reaktivität ist infolgedessen nicht möglich. Trotz der vereinzelt positiven Zellen ist eine mit BNP-assoziierte Lymphadenopathie, wie sie Pardon et al. (2010) beschrieben haben, sowohl aufgrund einer histologisch fehlenden, leukozytären

Depletion als auch anlässlich der überwiegend negativen immunhistologischen Resultate bei den Studienkälbern eher auszuschließen. Im Umkehrschluss folgt, dass den von anderen Forschern (Bell et al., 2013; Pardon et al., 2010) im Rahmen einer BNP-Erkrankung beobachteten Veränderungen lymphatischer Organe ein anderer Pathomechanismus zugrunde liegen muss und nicht allereaktiv bedingt sind. Eine naheliegende Begründung wäre in diesem Punkt eine immunologische Reaktion des lymphatischen Gewebes auf Sekundärinfektionen, welche oft bei BNP-Kälbern beobachtet wurden (Friedrich et al., 2009c; Pardon et al., 2010).

Die in manchen Schnitten der Milz auffälligen makrophagenartigen Zellen waren durch das andersartige Färbemuster deutlich von den positiven Zellen im Knochenmark abzugrenzen. Das granulär bräunliche Zytoplasma spricht für eine intrazelluläre Bindung von Antikörpern. Dabei spielte es keine Rolle, ob es sich um eine Inkubation mit gekoppelten IgG-Antikörpern aus BNP-Serum oder dem Negativ-Kontrollserum handelte, bei beiden Seren war das Phänomen in gleichem Maße zu beobachten. Hier kann nur spekuliert werden, dass diese Reaktionen möglicherweise auf Fc-Rezeptor-abhängigen Bindungen der markierten Antikörper beruhen. So weisen beim Rind beispielsweise einige Makrophagen einen spezifischen Rezeptor für Fc-Fragmente des spezieseigenen IgG₁ auf, um mit Antikörpern opsonierte Zellen oder Erreger über einen Phagozytose-Prozess aufnehmen zu können (Adler et al., 1994). Eine Bindung der verwendeten, Peroxidase-gekoppelten IgG-Antikörper an solche Rezeptoren wäre dementsprechend denkbar. Andererseits muss berücksichtigt werden, dass bei histologischen Untersuchungen zu Artefakten anderer Fixantien außer Formalin bisher wenige Erfahrungen vorhanden sind und es daher möglich sein kann, dass die beobachteten Reaktionen artifizielle Erscheinungen durch das Fixieren des Gewebes mit HOPE[®] sind (Titford and Horenstein, 2005). Eine definitive Erklärung für die Beobachtung dieser braun-grulär gefärbten Zellen kann an diesem Punkt nicht gegeben werden.

5.3 Eignung der angewandten Methode

5.3.1 Probenmaterial

Das verwendete Knochenmark für die immunhistologischen Untersuchungen stammte überwiegend von Versuchskälbern, welche mit einem Lebensalter von 30 Tagen gerade noch im zeitlichen Rahmen der natürlich vorkommenden BNP lagen. Zwei der Kälber aus dem Sektionsgut (S1048/12, S1133/12), an denen ebenfalls eine Bindung von Alloantikörpern nachgewiesen werden konnte, waren mit 2 Monaten deutlich älter. Demzufolge ist eine grundsätzliche Empfänglichkeit von Kälbern über den ersten Lebensmonat hinaus gegeben und das

Auftreten einer BNP bei Tieren unter einem Monat eher in einer Abhängigkeit zur frühzeitigen Kolostrumaufnahme begründet. Analog dazu stellten auch Pardon et al. (2011) fest, dass eine Bindung von Alloantikörpern nicht zeitlich auf die neonatale Phase begrenzt und gleichermaßen auch an Zellen älterer Tiere zu reproduzieren ist.

In Bezug auf die Herkunft der Proben wurde aufgrund der zuvor festgelegten Versuchsplannung und der für die immunhistologischen Untersuchungen notwendigen Freiheit der Biopsien von knöchernen Bestandteilen in dieser Doktorarbeit vornehmlich Knochenmarkproben aus den Oberschenkelknochen miteinander verglichen und beurteilt. Im direkten Vergleich wäre eine Beurteilung der Zellularität an Sternalmark einer Auswertung von Röhrenknochenmark vorzuziehen gewesen, da sich im Nachhinein bei anderen Studien Proben aus dem Sternalmark von erst wenige Tage alten Kälbern in Bezug auf die hämatopoetische Aktivität als glaubwürdiger erwiesen haben (Laming et al., 2012; Wienbeck, 1938).

Die Biopsieentnahme aus dem Os femoris könnte somit eine Erklärung für die diskrepanten Ergebnisse zu anderen Forschungsarbeiten sein, in denen, im Gegensatz zur hiesigen Studie, BNP-charakteristische Knochenmarkveränderungen beobachtet wurden. So zeigten beispielsweise Biopate, welche 6 Tage nach der Übertragung von BNP-Kolostrum aus dem kranialen Bereich des Kälbersternums entnommen wurden, eine deutliche Verringerung der Dichte aller hämatopoetischer Zelllinien und kultiviertes Sternalmark war nicht in der Lage, *in vitro* erythroische Kolonien zu bilden (Bell et al., 2013; Laming et al., 2012). Einschränkend ist jedoch zu erwähnen, dass die typischen Veränderungen teilweise nur in vereinzelt Lokalisationen des Sternalmarks beobachtet wurden (Bell et al., 2013). Ein weiterer Vergleich im Hinblick auf die Entnahmezeitpunkte der Knochenmarkbiopsien, welche von Laming et al. (2012) mit 6 Tagen post Kolostrumaufnahme angegeben werden, zeigt demzufolge eine Differenz von nur 3 Tagen zur Probengewinnung der durchgeführten Serumübertragungsstudie (3. Tag post transfusionem). Somit ist es wahrscheinlicher, dass die Abwesenheit einer Panmyelophthise bzw. das Fehlen von Veränderungen der Zelldichte im Röhrenknochenmark eher auf die Entnahmestelle bezogen oder ein Resultat des Serumübertragungsversuchs ist, als eine Folge eines zu frühen Entnahmezeitpunktes.

Im Hinblick auf die Auswertung der Knochenmarkbiopsien der Studienkälber ist des Weiteren die zum Teil sehr geringe Probengröße als kritisch anzusehen, welche eine Analyse von zusammenhängendem Knochenmarkgewebe in den meisten Fällen lediglich auf der Basis eines einzigen Sichtfeldes in der 400-fachen Vergrößerung zuließ. In Anbetracht dessen, dass ein histologischer Schnitt lediglich eine Momentaufnahme eines kleinen Areals darstellt und die im Knochenmark lokalisierten Zellen einem ständigen Einfluss durch verschiedenste Pa-

parameter, wie beispielsweise die Bildung erforderlicher Blutzellen, Mediatoren oder Reaktionen auf Entzündungsgeschehen, unterliegen, ist neben der Probengröße zum anderen auch die Qualität der entnommenen Proben ein maßgeblicher Faktor für eine nachfolgende Interpretation (Hoffmann-Fezer et al., 1974; Wienbeck, 1938). Die bei der Beurteilung der erhaltenen Knochenmarkbiopsien häufiger angetroffenen Qualitätsminderungen in Form von zusätzlich aspiriertem Blut und subkutanem Fettgewebe erschwerten eine semiquantitative Auswertung. Zudem waren diese möglicherweise an unerwünschten Nebeneffekten bei der Fixierung beteiligt und hatten eventuell einen negativen Einfluss auf weitere Parameter, beispielsweise auf die morphologische Detaillierbarkeit.

Ein weiterer Diskussionspunkt dieser Studie ist die Nutzung von Mischseren als Ausgangsmaterial, da die verwendeten Antikörper für den Nachweis alloreaktiver Bindungen aus einem Serumpool unterschiedlicher Blutermutterkühe stammten. Zum einen könnte das in Anbetracht der These einer bedeutsamen, genetischen Komponente die nahezu ausnahmslose Anzahl an positiv reaktiven Tieren erklären, denn die Anzahl der möglichen genetischen Konstellationen und somit die Wahrscheinlichkeit einer passenden Kombination ist bei einer Verwendung von Mischseren wesentlich höher als bei einer Nutzung eines einzelnen Serums. Diese Theorie vertraten zuvor bereits Bell et al. (2013), die bei ihren Beobachtungen feststellten, dass das Poolen von Kolostrum mehrerer Kühe das Auftreten von Variationen bezüglich einer individuellen Reaktion der Versuchskälber verminderte und gleichzeitig die Wahrscheinlichkeit insgesamt höher war, dass sich ein Kalb empfänglich für die Alloantikörper zeigte. In diesem Zusammenhang wurde zudem auch nachgewiesen, dass es beim Einsatz von gemischtem Blutermutterkuh-Kolostrum bei Kälbern zu einer höheren Letalität im Tierversuch kam, als bei der Verabreichung von Kolostrum einer einzigen BNP-Mutterkuh (Schröter et al., 2011).

Zum anderen lässt ein Mischserum natürlich keinen Rückschluss auf Bindungsreaktivitäten von Antikörpern einzelner BNP-Seren zu, die Resultate der Reaktionen der Kälber in den immunhistologischen Untersuchungen können dementsprechend lediglich in Abhängigkeit zum gesamten IgG-Pool des originären, eingesetzten Mischserums betrachtet werden. Bezüglich der verwendeten Seren war ein weiteres Phänomen zu beobachten: ohne eine Adsorption der Antikörper an Blutpulver und anschließenden Verwendung einer höheren Verdünnungsstufe der Antikörperlösungen konnte immer ein merklicher Anteil an positiven Reaktionen bei Kontrollseren beobachtet werden. Demgemäß waren Bindungsreaktionen in geringem Maße in der Negativkontrolle nachzuweisen. Erst durch den zusätzlichen Arbeitsschritt der Adsorption an Blutpulver, welcher auf eine größtmögliche Entfernung dieser unerwünschten,

alloreaktiven Antikörper durch Adsorption an Antigene der Blutbestandteile abzielte, und eine höhere Verdünnung der Antikörperlösungen war es schließlich möglich, dass die Negativkontrolle tatsächlich frei von unerwünschten Reaktionen blieb. Vermutlich ist die zuvor beobachtete, unerwünschte Reaktivität auf das Vorhandensein natürlicher und alloimmuner Antikörper in den ursprünglichen Seren zurückzuführen, die beispielsweise im Laufe einer Trächtigkeit, durch andere Impfungen oder womöglich durch Infektionen mit Mikroorganismen gebildet wurden (Archer, 1981; Bastian et al., 2011; Raybourne et al., 1988). Mutmaßlich enthielt demzufolge auch das Serum des Kontrolltieres verschiedene, alloimmune IgG-Antikörper, welche während der Herstellung der Antikörperlösung ebenfalls mit der Meerrettich-Peroxidase markiert wurden und schließlich für die unerwünschte Braunfärbung einiger Zellen des Negativkontrollgewebes verantwortlich waren. Für diese Annahme sprechen auch die Untersuchungsergebnisse des Institutes für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere und des Institutes für Virologie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, welche in allen analysierten Serumproben der Tiere jeweils mindestens eine geringe Anzahl an Alloantikörpern detektieren konnten. Spezifisch im Hinblick auf die Bildung von Alloantikörpern bedingt durch die PregSure[®] BVD-Vakzine konnten Bastian et al. (2011) zeigen, dass auch andere inaktivierte BVD-Impfstoffe im Versuch eine gewisse Anzahl an alloreaktiven Antikörpern erzeugten und es diesbezüglich dementsprechend keinen absoluten Nullwert an Alloantikörpern gibt.

5.3.2 Fixierung

Formalin ist das meistgenutzte Fixanz für die histologische Routinediagnostik (Mulisch et al., 2010a; Titford and Horenstein, 2005). Es ist jedoch insbesondere für immunhistologische Untersuchungen nicht immer die beste Wahl und kann, wie in diesem Fall, bei Inkubationen mit einigen Antikörpern durch mangelnde Epitopreaktivität aufgrund von Proteinstrukturveränderungen zu falsch negativen Ergebnissen führen (Daneshtalab et al., 2010; Marwitz et al., 2011; Shi et al., 1991; Uhlig et al., 2002). Aufgrund der Unkenntnis über den genauen Wirkmechanismus bei der Formalin-Fixierung kommen für ein fehlerhaftes, negatives Resultat verschiedene Möglichkeiten in Betracht. So kann nur vermutet werden, dass es sich eventuell um eine Blockierung von Bindungsstellen handelt oder beispielsweise die Quervernetzung von Proteinen eine Penetration der Antikörper ins Gewebe vermindert oder sogar unmöglich macht (Grizzle, 2009). Der HOPE[®]-Fixiermethode wurde im Vergleich zu Formalin-fixiertem Material ein hervorragender Erhalt der Antigene nachgewiesen, so dass sogar der Einsatz von

Antikörpern, welche eigentlich nur für die Verwendung auf Gefriermaterial vorgesehen sind, möglich sei (Kahler et al., 2009; Olert et al., 2001). Aufgrund dieser beschriebenen Vorteile und der Tatsache, dass das Fixanz bereits bei zahlreichen Tierspezies und immunhistologischen Studien an verschiedenem Gewebe erfolgreich eingesetzt werden konnte (Anderle et al., 2008; Braun et al., 2011; Droemann et al., 2007; Grzmil et al., 2006; Hornickel et al., 2011a, 2011b), wurden die immunhistologischen Untersuchungen nach einem kurzen Vorversuch auf HOPE[®]-fixiertem Material durchgeführt. In der Tat war die Bindung von Alloantikörpern immunhistologisch an HOPE[®]-fixierten Gewebeschnitten des Knochenmarks darstellbar, der Morphologieerhalt war jedoch deutlich schlechter als bei Formalin-fixiertem, Paraffin-eingebettetem Material. Dies könnte einerseits daran liegen, dass die HOPE[®]-Lösung das Knochenmark aufgrund des vielen anhängenden Blutes und des hohen Fettgewebeanteils möglicherweise nicht so schnell penetrieren konnte, oder andererseits daran, dass die HOPE[®]-Lösung bei der langwierigen Probenentnahme zuletzt nicht mehr die vom Hersteller angegebene Kühlschrantemperatur von 4 °C aufwies. So scheint die HOPE[®]-Fixiermethode für immunhistologische Zwecke zwar sensitiver, jedoch auch empfindlicher gegenüber Abweichungen des vorgegebenen Herstellerprotokolls zu sein. In vielen Publikationen lassen sich Anhaltspunkte für eine notwendige, vorschriftsmäßige Einhaltung des Protokolls zur Erzielung guter Resultate finden und oftmals konnten andere Autoren ebenfalls eine mangelnde, morphologische Detailerkennbarkeit bei der Verwendung von HOPE[®]-fixiertem Gewebe feststellen (Hornickel et al., 2011a; Kothmaier et al., 2011; Nietner et al., 2012). Koch et al. (2012) erzielten beispielsweise ähnliche Ergebnisse in Bezug auf die Zellmorphologie analog zu dieser Arbeit: die Gewebeproben wiesen bereits im HE-gefärbten Schnitt eine desorganisierte Struktur auf und die Zellen zeigten ein geschwollenes Erscheinungsbild, wobei der immunhistologische Nachweis, in ihrem Fall von Typ III Kollagen und Elastin an Muskelgewebe, ordentliche Resultate lieferte. Trotz der geschilderten Nachteile ist die HOPE[®]-Methode für eine Bearbeitung einzelner Proben, insbesondere für die Immunhistologie, durchaus anwendbar. Ein Einsatz von HOPE[®] in der Routinediagnostik ist jedoch im Hinblick auf das zeitraubende, aufwendige Protokoll und die schlechte Automatisierbarkeit fraglich.

5.4 Bedeutung der Erkenntnisse für die Pathogenese der BNP

Bei der Spezies Rind existieren einzelne Fallberichte, welche von einer immunvermittelten Thrombozytopenie bzw. Anämie des Kalbes nach Kolostrumaufnahme berichten und deren Ursache primär auf eine zuvor applizierten Impfung des Muttertieres zurückzuführen war

(Sipos et al., 2002; Yeruham et al., 2003). Ein wesentlicher Unterschied zur BNP stellte bei diesen Erkrankungen eine deutlich ausgeprägte Anämie dar. Sipos et al. (2002) konnten des Weiteren veränderte Leberwerte assoziiert mit resultierendem Ikterus infolge der Hämolyse im fortgeschrittenen Stadium neben einer Thrombozytopenie bei betroffenen Tieren beobachten. Bei einem dieser Fälle erfolgte sogar eine histologische Untersuchung an gewonnenen Knochenmarkbiopsaten eines erkrankten Tieres. Die Analyse war insofern jedoch nicht aussagekräftig, da anstelle von hämatopoetisch aktivem Gewebe lediglich Fettmark dargestellt werden konnte (Yeruham et al., 2003). Eine eventuell zusätzlich bestehende Veränderung im hämatopoetisch aktiven Knochenmark war demnach nicht nachzuweisen, so dass die Pathogenese der BNP folglich zunächst unabhängig zu den bisherig bekannten, immunvermittelten Thrombozytopenien betrachtet werden muss.

Viele Studien beschäftigten sich seit dem Bekanntwerden der BNP mit der Identifikation des zu den Alloantikörpern passenden, vermuteten Zielantigens auf Leukozyten, Thrombozyten und Knochenmarkvorläuferzellen (Assad et al., 2012; Deutskens et al., 2011; Euler et al., 2013). Nachdem festgestellt wurde, dass Leukozyten von Kontrollkälbern in zahlreichen Fällen ebenso wie Leukozyten von BNP-Kälbern mit Antikörpern der BNP-Seren reagierten, war offensichtlich, dass das spezifische Antigen bei einer überwiegenden Anzahl Kälber auf den Zelloberflächen vorhanden sein musste (Bastian et al., 2011). Diese Tatsache konnte in dieser Arbeit bestätigt werden, eine Bindung von Alloantikörpern war sowohl an Knochenmarkszellen als auch teilweise an Zellen aus dem peripheren Blut bei fast allen Studientieren und den beprobten Kälbern aus dem Sektionsgut immunhistologisch darstellbar. Die Ergebnisse entsprechen den Beobachtungen von Pardon et al. (2011), welche solche Bindungen mittels fluoreszierender Antikörper an Knochenmarkausstrichen und isolierten Zellen aus dem peripheren Blut ebenfalls nachweisen konnten. Beide Studienresultate unterstützen demnach die These der antikörpervermittelten Pathogenese der BNP und sprechen für die weite Verbreitung des Zielantigens.

Deutskens et al. (2011) untersuchten die gebundenen Zelloberflächenproteine intensiver mittels Massenspektrometrie und konnten herausfinden, dass die Alloantikörper Proteine der Größe 44 kDa und 12 kDa erkannten. Sie identifizierten diese Proteine schließlich mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers IL-A88 als MHC I und β -2-Mikroglobulin und wiesen sowohl in der Vakzine PregSure[®] BVD als auch auf MDBK-Zellen MHC I als antigene Komponente nach. MHC I befindet sich als membranöses Protein auf der Oberfläche aller kernhaltigen Zellen, wobei beim Menschen durchaus Mengenunterschiede von exprimiertem MHC I bei

verschiedenen Zelltypen bekannt sind (Agrawal and Kishore, 2000). Die Ergebnisse der immunhistologischen Studien zeigen, dass nicht alle kernhaltigen Zellen das Antigen exprimieren und es offensichtlich selbst innerhalb eines Zelltyps kein konstantes Expressionsmuster des BNP-Zielantigens gibt. Vermutlich besitzen daher noch weitere, zurzeit unbekannte Faktoren neben dem aktuell vermuteten Zielantigen des MHC I auf die Entstehung der Erkrankung einen Einfluss. In diesem Zusammenhang weisen weitere Studien darauf hin, dass die bisher ermittelten Expressions- und Bindungsmuster der spezifischen Zielantigene bzw. Alloantikörper nicht mit der Theorie des alleinigen MHC I-Zielantigens in Einklang stehen (Assad et al., 2012; Demasius et al., 2014; Euler et al., 2013). Dass nicht alle kernhaltigen Zellen bzw. hämatopoetische Vorläuferzellen gleichermaßen betroffen sind, wird von einigen Autoren damit begründet, dass es vermutlich quantitative Unterschiede bei der Expression des Antigens oder möglicherweise auch bei der Konformation des Antigens auf den Zielzellen gibt (Bell et al., 2013; Deutskens et al., 2011).

Zusammenfassend konnten mit Hilfe der immunhistologischen Methode bisherige Erkenntnisse hinsichtlich der Pathogenese der BNP bestätigt und Teilbereiche, wie das Expressionsmuster von Zielantigenen, genauer beleuchtet werden. Für die Erforschung der einzelnen pathogenetischen Mechanismen bedarf es jedoch weiterer Studien, da sich der volle Zusammenhang der Reaktionen zwischen den Alloantikörpern und den noch näher zu charakterisierenden Zielzellen der Kälber als sehr komplex herausstellte und Teilaspekte trotz intensiver Forschungen nicht geklärt werden konnten.

6 Zusammenfassung / Summary

6.1 Zusammenfassung

1. Ziel dieser Arbeit war es, eine immunhistologische Methode zu etablieren, welche eine visuelle Darstellung der Bindungen BNP-spezifischer Alloantikörper an Zielzellen, insbesondere im Knochenmark, ermöglicht, um die alloreaktive Pathogenese einer BNP-Erkrankung zu bestätigen und womöglich weitere Erkenntnisse, wie beispielsweise Hinweise auf das Zielantigen, zu erhalten. Weiterhin wurden Kälber einer Serumübertragungsstudie, welchen zuvor Knochenmarkbiopsien entnommen wurden, sezirt und pathohistologisch auf Veränderungen untersucht. Alle gewonnenen Knochenmarkbiopsien wurden im Hinblick auf BNP-typische Veränderungen und morphologische Auffälligkeiten beurteilt.
2. Die Literaturübersicht gibt zunächst einen Überblick über den derzeitigen Wissensstand der Erkrankung der Bovinen Neonatalen Panzytopenie (BNP). Im Folgenden wird explizit das Knochenmark als Organ und Probenmaterial kurz näher erläutert, da es sich hierbei um ein quantitativ eher seltener untersuchtes Gewebe handelt, welches jedoch Hauptuntersuchungsmaterial dieser Arbeit darstellte. Schließlich wird im Anschluss daran die verwendete Methode unter besonderer Berücksichtigung des Fixierungsverfahrens und der Antikörpergewinnung vorgestellt.
3. Die Untersuchungen erfolgten hauptsächlich an Proben von 55 Studienkälbern eines Serumübertragungsversuchs, 14 Röhrenknochenmarkproben aus dem Sektionsgut des Instituts für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen und an kultivierten MDBK-Zellen. Der immunhistologische Nachweis der Bindungen von Alloantikörpern an Zielzellen im Gewebe und isolierten Leukozyten aus dem Blut basierte auf einer Fixierung des Probenmaterials mit HOPE[®]-Fixanz und einer späteren Inkubation mit einer selbst hergestellten, Peroxidase-gekoppelten Antikörperlösung. Zudem wurden die Knochenmarkbiopsien der Studienkälber am HE-Schnitt sowohl hinsichtlich unterschiedlicher Zelltypen semiquantitativ ausgewertet als auch morphologisch beurteilt.

4. Bei 54 der 55 Studienkälber und bei den 10 Kälbern aus dem Sektionsgut konnten in unterschiedlichem Maße immunhistologisch eine Bindung von Alloantikörpern an Knochenmarkzellen nachgewiesen werden. Dieser Nachweis gelang ebenso an isolierten Leukozyten aus dem Blut wie an MDBK-Zellen. Lediglich bei einem einzigen Kalb aus dem Sektionsgut konnte eine positive Markierung an Megakaryozyten beobachtet werden. Die immunhistologischen Untersuchungen an 4 Knochenmarkproben von BNP-Kälbern verliefen analog der Untersuchungen des Knochenmarkes des Kalbes K7 mit negativen Ergebnissen, es konnte kein positives Signal dargestellt werden. Entsprechend dazu zeigten nur wenige Einzelzellen in peripheren Organen eine positive Markierung. Kein Studienkalb zeigte eine BNP-typische Panmyelophthise, wohingegen eine vermehrte Leukopoese verzeichnet werden konnte. Makroskopisch waren zudem keine charakteristischen Blutungen erkennbar, welche auf das Vorliegen einer BNP-Erkrankung hätten hindeuten können. Häufig konnten bei den Tieren jedoch makroskopisch und/oder histologisch Entzündungen in unterschiedlichen Organsystemen festgestellt werden, wobei sich in erster Linie das Auftreten von Endokarditiden auffällig zeigte.
5. Der immunhistologische Nachweis von gebundenen Alloantikörpern an Knochenmarkzellen fast aller untersuchten Kälber spiegelt den hohen Anteil an BNP-empfindlichen Tieren wider. Aufgrund einer eingeschränkten morphologischen Detailerkennbarkeit waren die positiv markierten Vorläuferzellen, abgesehen von den Megakaryozyten, histologisch jedoch nicht näher zu typisieren. Die größtenteils markierten Leukozyten aus dem Blut sprechen für ein Vorkommen des Antigens auf Zellen der Leukopoese und zeigen, dass das Zielantigen noch auf Blutzellen exprimiert wird, obwohl eine Expression nicht mehr auf Leukozyten in den peripheren lymphatischen Organen erfolgt. Der gleichzeitige Bindungsnachweis an MDBK-Zellen unterstützt die These, dass der Ursprung der BNP-Alloantikörper bei einer Kontamination mit antigenen Proteinen dieser Zellen im Impfstoff PregSure® BVD begründet ist. Die Übertragung von BNP-Serum konnte bei keinem Studienkalb eine Panmyelophthise oder eine klinische BNP erzeugen.
6. Eine Methode zum immunhistologischen Nachweis der Bindung BNP-spezifischer Alloantikörper an Zielzellen konnte etabliert werden. Sowohl an MDBK-Zellen als auch an Gewebeschnitten waren positive Markierungen nachzuweisen.

Zusammengefasst sprechen die Ergebnisse für eine durch PregSure[®] BVD induzierte, alloimmune Pathogenese der BNP und spiegeln ebenso die Komplexität der krankheitserzeugenden Vorgänge wider.

6.2 Summary

1. The aim of the study was to establish an immunohistological method to demonstrate the binding of BNP-specific alloantibodies to target cells, especially to cells within bone marrow. This proof should underline the alloreactive pathogenesis of BNP-disease and help to get new knowledge about the involved factors, for example about the target antigen. Furthermore, necropsies and histopathologic examinations were carried out on calves of a serum transfusion study. Bone marrow biopsies were taken before and after serum transfusion. All collected bone marrow specimens were examined in view of BNP-specific lesions and morphological anomalies by light microscopy.
2. First, the literature review gives an overview on the current state of knowledge concerning bovine neonatal pancytopenia (BNP) disease. Furthermore, bone marrow as the specific target organ in this disease is briefly outlined, since it is a rather uncommonly investigated tissue. Finally, the immunohistological method used is introduced highlighting the fixation process as well as the recovery of antibodies.
3. Investigations were performed mostly on specimens from 55 experimental calves, 14 bone marrow biopsies taken from the os femoris of calves from the routine diagnostic material of the Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Giessen, Giessen, Germany, and cultured MDBK cells. The immunohistologic detection of binding alloantibodies on target cells within the tissue as well as on isolated leukocytes from peripheral blood after fixation with HOPE[®] and subsequent incubation with a polyclonal peroxidase-conjugated antibody produced in our laboratory. In addition, bone marrow biopsies of the experimental calves were examined on HE-stained sections by analyzing the different cell types semi-quantitatively and monitoring morphologic anomalies.
4. Bone marrow specimens from 54 of the 55 experimental calves as well as all specimens of 10 calves from the routine diagnostic material showed different grades of binding of alloantibodies. Also a positive staining on leukocytes from peripheral blood and MDBK cells was present. Bone marrow of only one calf from the routine diagnostic material showed positive megakaryocytes. The immunohistologic examination of

bone marrow specimens from 4 calves with spontaneous BNP as well as from the experimental calf K7 resulted in a negative outcome, no positive signals could be demonstrated. Only a few positive solitary cells in peripheral organs could be observed in few cases of experimental calves. None of them displayed a panmyelophthisis. On the contrary, an increased leukopoiesis was obvious.

No hemorrhages were evident macroscopically, but frequently the animals were diagnosed with inflammatory processes in different tissues by macroscopic or histologic examinations. In this regard, the occurrence of endocarditis was dominating.

5. The immunohistologic demonstration of a binding of alloreactive antibodies on bone marrow cells from almost all examined calves reflects the high proportion of animals susceptible for BNP. However, due to limited morphologic detail recognition in histology it was not possible to further characterize the positively stained cells, except for megakaryocytes. But the positively stained leukocytes from peripheral blood may be indicative that the target antigen is located on precursors of the leukocytic series in the bone marrow. Additionally, this detection points to a continued expression of the specific antigen after mature blood cells were released from the bone marrow. In contrast, almost all leukocytes in peripheral organs were negative. The demonstration of binding of the conjugated alloantibodies on MDBK cells supports the thesis that the generation of BNP-specific alloantibodies can be caused by a contamination of the PregSure[®] BVD vaccine with proteins from MDBK cells. The transfusion of BNP serum could not induce panmyelophthisis or any clinical symptoms of BNP in the experimental calves.

6. An immunohistologic method for the demonstration of the binding of BNP-specific antibodies to target cells could be established. On MDBK cells as well as on target cells in tissue sections of bone marrow positive staining by binding of BNP-specific antibodies was observed. Experimental serum transfusion failed to cause characteristic clinical symptoms of BNP.

Summarized, the results point to a PregSure[®] BVD-induced alloimmune pathogenesis of BNP and they reflect the complexity of the pathogenic processes.

7 Literaturverzeichnis

- Adler, H., Peterhans, E., Jungi, T.W., 1994. Generation and functional characterization of bovine bone marrow-derived macrophages. *Vet Immunol Immunopathol* 41, 211-227.
- Agrawal, S., Kishore, M.C., 2000. MHC class I gene expression and regulation. *J Hematother Stem Cell Res* 9, 795-812.
- Akerstrom, B., Bjorck, L., 1986. A physicochemical study of protein G, a molecule with unique immunoglobulin G-binding properties. *J Biol Chem* 261, 10240-10247.
- Ammann, V.J., Fecteau, G., Helie, P., Desnoyer, M., Hebert, P., Babkine, M., 1996. Pancytopenia associated with bone marrow aplasia in a Holstein heifer. *Can Vet J* 37, 493-495.
- Anderle, C., Hammer, A., Polgár, B., Hartmann, M., Wintersteiger, R., Blaschitz, A., Dohr, G., Desoye, G., Szekeres-Barthó, J., Sedlmayr, P., 2008. Human trophoblast cells express the immunomodulator progesterone-induced blocking factor. *Journal of Reproductive Immunology* 79, 26-36.
- Anonymus, 2011. Shedding light on bleeding calf syndrome. *Vet Rec* 168, 628.
- Anosa, V.O., Logan-Henfrey, L.L., Shaw, M.K., 1992. A Light and Electron Microscopic Study of Changes in Blood and Bone Marrow in Acute Hemorrhagic Trypanosoma vivax Infection in Calves. *Veterinary Pathology* 29, 33-45.
- Aramaki, Y., Suda, H., Tsuchiya, S., 1995. Interferon-gamma inductive effect of liposomes as an immunoadjuvant. *Vaccine* 13, 1809-1814.
- Archer, J.R., 1981. Search for cross-reactivity between HLA B27 and Klebsiella pneumoniae. *Ann Rheum Dis* 40, 400-403.
- Assad, A., Amann, B., Friedrich, A., Deeg, C.A., 2012. Immunophenotyping and characterization of BNP colostrum revealed pathogenic alloantibodies of IgG1 subclass with specificity to platelets, granulocytes and monocytes of all maturation stages. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 147, 25-34.
- Avrameas, S., Uriel, J., 1966. [Method of antigen and antibody labelling with enzymes and its immunodiffusion application]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 262, 2543-2545.
- Aybay, C., Imir, T., 2000. Development of a rapid, single-step procedure using protein G affinity chromatography to deplete fetal calf serum of its IgG and to isolate murine IgG1 monoclonal antibodies from supernatants of hybridoma cells. *J Immunol Methods* 233, 77-81.
- Ballingall, K.T., 2011. Genes and the development of bovine neonatal pancytopenia. *Vet J* 190, 187-188.
- Bastian, M., Holsteg, M., Hanke-Robinson, H., Duchow, K., Cussler, K., 2011. Bovine Neonatal Pancytopenia: Is this alloimmune syndrome caused by vaccine-induced alloreactive antibodies? *Vaccine* 29, 5267-5275.
- Bastida-Corcuera, F.D., Nielsen, K.H., Corbeil, L.B., 1999. Binding of bovine IgG2a and IgG2b allotypes to protein A, protein G, and Haemophilus somnus IgBPs. *Vet Immunol Immunopathol* 71, 143-149.

- Becher, P., Thiel, H.J., Collins, M., Brownlie, J., Orlich, M., 2002. Cellular sequences in pestivirus genomes encoding gamma-aminobutyric acid (A) receptor-associated protein and Golgi-associated ATPase enhancer of 16 kilodaltons. *J Virol* 76, 13069-13076.
- Bell, C.R., Rocchi, M.S., Dagleish, M.P., Melzi, E., Ballingall, K.T., Connelly, M., Kerr, M.G., Scholes, S.F.E., Willoughby, K., 2013. Reproduction of bovine neonatal pancytopenia (BNP) by feeding pooled colostrum reveals variable alloantibody damage to different haematopoietic lineages. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 151, 303-314.
- Bell, C.R., Scott, P.R., Kerr, M.G., Willoughby, K., 2010a. Possible preventive strategy for bovine neonatal pancytopenia. *Veterinary Record* 167, 758-758.
- Bell, C.R., Scott, P.R., Sargison, N.D., Wilson, D.J., Morrison, L., Howie, F., Willoughby, K., Penny, C.D., 2010b. Idiopathic bovine neonatal pancytopenia in a Scottish beef herd. *Vet Rec* 167, 938-940.
- Berghaus, L.J., Corbeil, L.B., Berghaus, R.D., Kalina, W.V., Kimball, R.A., Gershwin, L.J., 2006. Effects of dual vaccination for bovine respiratory syncytial virus and *Haemophilus somnus* on immune responses. *Vaccine* 24, 6018-6027.
- Bjorck, L., Kronvall, G., 1984. Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgG-binding reagent. *J Immunol* 133, 969-974.
- Blaschitz, A., Gauster, M., Dohr, G., 2008. Application of cryo-compatible antibodies to human placenta paraffin sections. *Histochemistry and Cell Biology* 130, 595-599.
- Bloom, J.C., Lewis, H.B., 1990. Bone marrow as a target organ: an integrated approach to investigative hematopathology in toxicologic evaluations, Society of Toxicologic Pathologists Great Lakes Region Discussion Group: Bone Marrow Toxicity. *Toxicologic Pathology* 18.
- Braun, M., Menon, R., Nikolov, P., Kirsten, R., Petersen, K., Schilling, D., Schott, C., Gündisch, S., Fend, F., Becker, K.-F., Perner, S., 2011. The HOPE fixation technique - a promising alternative to common prostate cancer biobanking approaches. *BMC Cancer* 11, 511.
- Bridger, P.S., Bauerfeind, R., Wenzel, L., Bauer, N., Menge, C., Thiel, H.-J., Reinacher, M., Doll, K., 2011. Detection of colostrum-derived alloantibodies in calves with bovine neonatal pancytopenia. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 141, 1-10.
- Brush, P.J., Anderson, P.H., Gunning, R.F., 1987. Identification of factor XI deficiency in Holstein-Friesian cattle in Britain. *Vet Rec* 121, 14-17.
- Buechner-Maxwell, V., Scott, M.A., Godber, L., Kristensen, A., 1997. Neonatal alloimmune thrombocytopenia in a quarter horse foal. *J Vet Intern Med* 11, 304-308.
- Buesa, R.J., 2008. Histology without formalin? *Ann Diagn Pathol* 12, 387-396.
- Butler, J.E., 1969. Bovine Immunoglobulins: A Review. *Journal of Dairy Science* 52, 1895-1909.
- Butler, J.E., 1983. Bovine immunoglobulins: an augmented review. *Vet Immunol Immunopathol* 4, 43-152.
- Copestake, D.E., Indyk, H.E., Otter, D.E., 2006. Affinity liquid chromatography method for the quantification of immunoglobulin G in bovine colostrum powders. *J AOAC Int* 89, 1249-1256.

- Corapi, W.V., French, T.W., Dubovi, E.J., 1989. Severe thrombocytopenia in young calves experimentally infected with noncytopathic bovine viral diarrhea virus. *J Virol* 63, 3934-3943.
- Corbeil, L.B., 2002. Antibodies as effectors. *Vet Immunol Immunopathol* 87, 169-175.
- Cytel Studio StatXact Vers. 9.0.0, 2010. Statistical Software for Exact Non-parametric Inference, User Manual. CYTEL Inc., Cambridge, MA 02139, U.S.A.
- Daneshtalab, N., Dore, J.J., Smeda, J.S., 2010. Troubleshooting tissue specificity and antibody selection: Procedures in immunohistochemical studies. *J Pharmacol Toxicol Methods* 61, 127-135.
- Dapson, R.W., 1993. Fixation for the 1990's: a review of needs and accomplishments. *Biotech Histochem* 68, 75-82.
- Demasius, W., Weikard, R., Kromik, A., Wolf, C., Muller, K., Kuhn, C., 2014. Bovine neonatal pancytopenia (BNP): novel insights into the incidence, vaccination-associated epidemiological factors and a potential genetic predisposition for clinical and subclinical cases. *Res Vet Sci* 96, 537-542.
- Deutskens, F., Lamp, B., Riedel, C.M., Wentz, E., Lochnit, G., Doll, K., Thiel, H.-J., Rümenapf, T., 2011. Vaccine-induced antibodies linked to bovine neonatal pancytopenia (BNP) recognize cattle major histocompatibility complex class I (MHC I). *Veterinary Research* 42, 97.
- Dixon, W.J., 1993. BMDP Statistical Software Manual, Volume 1 and 2. University of California Press, Berkeley, Los Angeles, London.
- Droemann, D., Rupp, J., Goldmann, T., Uhlig, U., Branscheid, D., Vollmer, E., Kujath, P., Zabel, P., Dalhoff, K., 2007. Disparate Innate Immune Responses to Persistent and Acute Chlamydia pneumoniae Infection in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 175, 791-797.
- Elmore, S.A., 2006. Enhanced histopathology of the bone marrow. *Toxicol Pathol* 34, 666-686.
- Euler, K.N., Hauck, S.M., Ueffing, M., Deeg, C.A., 2013. Bovine neonatal pancytopenia--comparative proteomic characterization of two BVD vaccines and the producer cell surface proteome (MDBK). *BMC Vet Res* 9, 18.
- Forsgren, A., Sjoquist, J., 1966. "Protein A" from *S. aureus*. I. Pseudo-immune reaction with human gamma-globulin. *J Immunol* 97, 822-827.
- Forster, L.M., 2007. Neonatal alloimmune thrombocytopenia, purpura, and anemia in 6 neonatal piglets. *Can Vet J* 48, 855-857.
- Fox, C.H., Johnson, F.B., Whiting, J., Roller, P.P., 1985. Formaldehyde fixation. *J Histochem Cytochem* 33, 845-853.
- Friedrich, A., Aryan, A., Carlin, A., Sauter-Louis, C., Rademacher, G., Klee, W., 2009a. Disorder of differential diagnostic interest., In: Klee, W.T.S.F.d., 20., B. (Eds.) In Proceedings of the Satellite Symposium "Haemorrhagic Diathesis in Calves"; 2 Dec 2009. Marseille.
- Friedrich, A., Büttner, M., Rademacher, G., Klee, W., Weber, B.K., Müller, M., Carlin, A., Assad, A., Hafner-Marx, A., Sauter-Louis, C.M., 2011. Ingestion of colostrum from specific cows induces Bovine Neonatal Pancytopenia (BNP) in some calves. *BMC Veterinary Research* 7, 10.

- Friedrich, A., Rademacher, G., Weber, B., Kappe, E., Carlin, A., Assad, A., Sauter-Louis, C., Hafner-Marx, A., Büttner, M., Böttcher, J., Klee, W., 2009c. Gehäuftes Auftreten von hämorrhagischer Diathese infolge Knochenmarkschädigung bei jungen Kälbern. *Tierärztl Umsch* 64, 423–431.
- Furuichi, K., Koyama, J., 1976. The effect of antigen dose of the amounts and affinities of guinea pig IgG1 and IgG2 anti-hapten antibodies. *Immunochemistry* 13, 807-812.
- Gasper, P.W., 2000. *The Hemopoietic System* Vol 5th edition. Lippincott, Williams und Wilkins, Philadelphia, 63-68.
- Grizzle, W.E., 2009. Special symposium: fixation and tissue processing models. *Biotech Histochem* 84, 185-193.
- Grzmiel, M., Kaulfuss, S., Thelen, P., Hemmerlein, B., Schweyer, S., Obenauer, S., Won Kang, T., Burfeind, P., 2006. Expression and functional analysis of Bax inhibitor-1 in human breast cancer cells. *The Journal of Pathology* 208, 340-349.
- Hamers, C., Couvreur, B., Dehan, P., Letellier, C., Lewalle, P., Pastoret, P.P., Kerkhofs, P., 2000. Differences in experimental virulence of bovine viral diarrhoea viral strains isolated from haemorrhagic syndromes. *Vet J* 160, 250-258.
- Henniger, P., Henniger, T., Seehusen, F., Distl, O., Ganter, M., 2014. Causes of death in calves with experimentally induced bovine neonatal pancytopenia (BNP). *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 127, 61-69.
- Heriazon, A., Hamilton, K., Huffman, J., Wilkie, B.N., Sears, W., Quinton, M., Mallard, B.A., 2011. Immunoglobulin isotypes of lactating Holstein cows classified as high, average, and low type-1 or -2 immune responders. *Vet Immunol Immunopathol* 144, 259-269.
- Hoffmann-Fezer, G., Hoffmann, R., Hofmann, W., 1974. Chronic furazolidone poisoning in the calf. 2. Studies on the bone marrow. *DTW. Deutsche tierärztliche Wochenschrift* 81, 59-63.
- Hofmann, W., Hoffmann, R., Hoffmann-Fezer, G., 1974. Chronic furazolidone poisoning in calves. I. Clinical, hematological and morphological studies. *DTW. Deutsche tierärztliche Wochenschrift* 81, 53-58.
- Hornickel, I.N., Kacza, J., Schnapper, A., Beyerbach, M., Schoennagel, B., Seeger, J., Meyer, W., 2011a. Demonstration of substances of innate immunity in the esophageal epithelium of domesticated mammals. Part I – Methods and evaluation of comparative fixation. *Acta Histochemica* 113, 163-174.
- Hornickel, I.N., Kacza, J., Schnapper, A., Beyerbach, M., Schoennagel, B., Seeger, J., Meyer, W., 2011b. Demonstration of substances of innate immunity in the esophageal epithelium of domesticated mammals: Part II – Defence mechanisms, including species comparison. *Acta Histochemica* 113, 175-188.
- Husband, A.J., Brandon, M.R., Lascelles, A.K., 1972. Absorption and endogenous production of immunoglobulins in calves. *Aust J Exp Biol Med Sci* 50, 491-498.
- Johannsen, U., Koch, F., Mehlhorn, G., Panndorf, H., Neumeister, K., 1978. Pathomorphology and pathogenesis of radiation sickness in calves and young cattle following whole body roentgen irradiation. *Arch Exp Veterinarmed* 32, 623-654.

- Jones, B.A., Sauter-Louis, C., Henning, J., Stoll, A., Nielen, M., Van Schaik, G., Smolenaars, A., Schouten, M., den Uijl, I., Fourichon, C., Guatteo, R., Madouasse, A., Nusinovici, S., Deprez, P., De Vliegher, S., Laureyns, J., Booth, R., Cardwell, J.M., Pfeiffer, D.U., 2013. Calf-level factors associated with bovine neonatal pancytopenia--a multi-country case-control study. *PLoS One* 8, e80619.
- Jorna, I.P., Postema, H.J., 1986. [Chloramphenicol at a veal-calf stock farm]. *Tijdschr Diergeneeskd* 111, 471-475.
- Kahler, D., Alexander, C., Schultz, H., Abdullah, M., Branscheid, D., Lindner, B., Zabel, P., Vollmer, E., Goldmann, T., 2009. Proteomics Out of the Archive: Two-dimensional Electrophoresis and Mass Spectrometry Using HOPE-fixed, Paraffin-embedded Tissues. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 58, 221-228.
- Kappe, E.C., Halami, M.Y., Schade, B., Alex, M., Hoffmann, D., Gangl, A., Meyer, K., Dekant, W., Schwarz, B.A., Johne, R., Buitkamp, J., Bottcher, J., Muller, H., 2010. Bone marrow depletion with haemorrhagic diathesis in calves in Germany: characterization of the disease and preliminary investigations on its aetiology. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 123, 31-41.
- Kaske, M., Kellers, C., Jacobsen, B., 2009. Haemorrhagic diathesis in a BVD-negative calf from Northern Germany, In: 19, K.W.T.S.F.d.B. (Ed.) *Proceedings of the Satellite Symposium "Haemorrhagic Diathesis in Calves"*.Marseille.
- Kasonta, R., Sauter-Louis, C., Holsteg, M., Duchow, K., Cussler, K., Bastian, M., 2012. Effect of the vaccination scheme on PregSure®BVD induced alloreactivity and the incidence of Bovine Neonatal Pancytopenia. *Vaccine* 30, 6649-6655.
- Koch, S., Stappenbeck, N., Cornelissen, C.G., Flanagan, T.C., Mela, P., Sachweh, J., Hermanns-Sachweh, B., Jockenhoevel, S., 2012. Tissue Engineering: Selecting the Optimal Fixative for Immunohistochemistry. *Tissue Engineering Part C: Methods* 18, 976-983.
- Kothmaier, H., Rohrer, D., Stacher, E., Quehenberger, F., Becker, K.F., Popper, H.H., 2011. Comparison of formalin-free tissue fixatives: a proteomic study testing their application for routine pathology and research. *Arch Pathol Lab Med* 135, 744-752.
- Krappmann, K., Weikard, R., Gerst, S., Wolf, C., Kühn, C., 2011. A genetic predisposition for bovine neonatal pancytopenia is not due to mutations in coagulation factor XI. *The Veterinary Journal* 190, 225-229.
- Kronvall, G., 1973. A surface component in group A, C, and G streptococci with non-immune reactivity for immunoglobulin G. *J Immunol* 111, 1401-1406.
- Kruse, P.E., 1983. The importance of colostral immunoglobulins and their absorption from the intestine of the newborn animals. *Ann Rech Vet* 14, 349-353.
- Lambton, S.L., Colloff, A.D., Smith, R.P., Caldow, G.L., Scholes, S.F., Willoughby, K., Howie, F., Ellis-Iversen, J., David, G., Cook, A.J., Holliman, A., 2012. Factors associated with bovine neonatal pancytopenia (BNP) in calves: a case-control study. *PLoS One* 7, e34183.
- Laming, E., Melzi, E., Scholes, S.F.E., Connelly, M., Bell, C.R., Ballingall, K.T., Dagleish, M.P., Rocchi, M.S., Willoughby, K., 2012. Demonstration of early functional compromise of bone marrow derived hematopoietic progenitor cells during bovine neonatal pancytopenia through in vitro culture of bone marrow biopsies. *BMC Research Notes* 5, 599.

- Lendemans, D.G., Myschik, J., Hook, S., Rades, T., 2005. Cationic cage-like complexes formed by DC-cholesterol, Quil-A, and phospholipid. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 94, 1794-1807.
- Lock, E.A., Sani, Y., Moore, R.B., Finkelstein, M.B., Anders, M.W., Seawright, A.A., 1996. Bone marrow and renal injury associated with haloalkene cysteine conjugates in calves. *Arch Toxicol* 70, 607-619.
- Lohrmann, H.P., 1984. The problem of permanent bone marrow damage after cytotoxic drug treatment. *Oncology* 41, 180-184.
- MacKenzie, W.F., 1990. Interpretation of paraffin sections of bone marrow, Society of Toxicologic Pathologists Great Lakes Region Discussion Group: Bone Marrow Toxicity. *Toxicologic Pathology* 18, 707.
- Madin, S.H., Darby, N.B., Jr., 1958. Established kidney cell lines of normal adult bovine and ovine origin. *Proc Soc Exp Biol Med* 98, 574-576.
- Marwitz, S., Abdullah, M., Vock, C., Fine, J.S., Visvanathan, S., Gaede, K.I., Hauber, H.P., Zabel, P., Goldmann, T., 2011. HOPE-BAL: Improved Molecular Diagnostics by Application of a Novel Technique for Fixation and Paraffin Embedding. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 59, 601-614.
- Meyer, W., Hornickel, I.N., 2010. Tissue Fixation-the most underestimated methodical feature of immunohistochemistry., In: Méndez-Vilas, D., J. (Ed.) In: *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education (Microscopy Series N^o 4)*. Formatex, Badajoz, pp. 953-959.
- Moingeon, P., Haensler, J., Lindberg, A., 2001. Towards the rational design of Th1 adjuvants. *Vaccine* 19, 4363-4372.
- Mulisch, M., Welsch, U., (Hrsg.), 2010a. *Romeis Mikroskopische Technik Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg*, 87-104.
- Mulisch, M., Welsch, U., (Hrsg.), 2010b. *Romeis Mikroskopische Technik, 18 Edition. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg*, 393-396.
- Nakamura, T., Koyama, J., 1975. Variability among guinea pig antibody populations produced by varying the immunizing dose of *Bacillus subtilis* alpha-amylase. *Immunochemistry* 12, 931-934.
- Nakane, P.K., 1971. Peroxidase-labeled antibody method. *Adv Biol Skin* 11, 283-286.
- Newby, T.J., Bourne, J., 1977. The nature of the local immune system of the bovine mammary gland. *J Immunol* 118, 461-465.
- Nietner, T., Jarutat, T., Mertens, A., 2012. Systematic comparison of tissue fixation with alternative fixatives to conventional tissue fixation with buffered formalin in a xenograft-based model. *Virchows Archiv* 461, 259-269.
- Noe, W., Bux, R., Berthold, W., Werz, W., 1994. Optimization of vaccine production for animal health. *Cytotechnology* 15, 169-176.
- Olert, J., Wiedorn, K.-H., Goldmann, T., Kühn, H., Mehraein, Y., Scherthan, H., Niketeghad, F., Vollmer, E., Müller, A.M., Müller-Navia, J., 2001. HOPE Fixation: A Novel Fixing Method and Paraffin-embedding Technique for Human Soft Tissues. *Pathology - Research and Practice* 197, 823-826.

- Pardon, B., Steukers, L., Dierick, J., Ducatelle, R., Saey, V., Maes, S., Vercauteren, G., De Clercq, K., Callens, J., De Bleecker, K., Deprez, P., 2010. Haemorrhagic Diathesis in Neonatal Calves: An Emerging Syndrome in Europe. *Transboundary and Emerging Diseases* 57, 135-146.
- Pardon, B., Stuyven, E., Stuyvaert, S., Hostens, M., Dewulf, J., Goddeeris, B.M., Cox, E., Deprez, P., 2011. Sera from dams of calves with bovine neonatal pancytopenia contain alloimmune antibodies directed against calf leukocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 141, 293-300.
- Parent-Massin, D., 2004. Haematotoxicity of trichothecenes. *Toxicol Lett* 153, 75-81.
- Pellerin, C., van den Hurk, J., Lecomte, J., Tussen, P., 1994. Identification of a new group of bovine viral diarrhoea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *Virology* 203, 260-268.
- Penny, C.D., Bell, C., Morrison, L., Howie, F., Willoughby, K., 2009. Pancytopenia and haemorrhage in young beef calves. *Veterinary Record* 164, 762-762.
- Puchtler, H., Meloan, S.N., 1985. On the chemistry of formaldehyde fixation and its effects on immunohistochemical reactions. *Histochemistry* 82, 201-204.
- Ramos-Vara, J.A., Miller, M.A., 2014. When tissue antigens and antibodies get along: revisiting the technical aspects of immunohistochemistry--the red, brown, and blue technique. *Vet Pathol* 51, 42-87.
- Raue, R., Harmeyer, S.S., Nanjiani, I.A., 2011. Antibody responses to inactivated vaccines and natural infection in cattle using bovine viral diarrhoea virus ELISA kits: Assessment of potential to differentiate infected and vaccinated animals. *The Veterinary Journal* 187, 330-334.
- Raybourne, R.B., Bunning, V.K., Williams, K.M., 1988. Reaction of anti-HLA-B monoclonal antibodies with envelope proteins of Shigella species. Evidence for molecular mimicry in the spondyloarthropathies. *J Immunol* 140, 3489-3495.
- Reagan, W.J., Irizarry-Rovira, A., Poitout-Belissent, F., Bolliger, A.P., Ramaiah, S.K., Travlos, G., Walker, D., Bounous, D., Walter, G., 2011. Best practices for evaluation of bone marrow in nonclinical toxicity studies. *Toxicol Pathol* 39, 435-448.
- Rothel, J.S., Corner, L.A., Lightowers, M.W., Seow, H.F., McWaters, P., Entrican, G., Wood, P.R., 1998. Antibody and cytokine responses in efferent lymph following vaccination with different adjuvants. *Vet Immunol Immunopathol* 63, 167-183.
- Salt, J.S.A., A. F. G.; Peters, A. R.; Brune, A.; Jahnecke, S., Traeder, W.; Harmeyer, S. S., 2004. 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. *Tierärztliche Praxis Großtiere*, 191-195.
- Sauter-Louis, C., Carlin, A., Friedrich, A., Assad, A., Reichmann, F., Rademacher, G., Heuer, C., Klee, W., 2012. Case control study to investigate risk factors for bovine neonatal pancytopenia (BNP) in young calves in southern Germany. *Prev Vet Med* 105, 49-58.
- Schimadzu Corporation, 1990. Analytical instruments division. Bedienungsanleitung für das UV_1202 Spektrophotometer (P/N 489-04050-02), 3-4.

- Schröter, P., Kuiper, H., Holsteg, M., Puff, C., Haas, L., Baumgartner, W., Ganter, M., Distl, O., 2011. [Reproducibility of bovine neonatal pancytopenia (BNP) via the application of colostrum]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 124, 390-400.
- Shi, S.R., Key, M.E., Kalra, K.L., 1991. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem* 39, 741-748.
- Sipos, W., Schmoll, F., Bago, Z., Hobbiger, A., Wodak, E., 2002. [Isoimmune haemolytic icterus in neonatal calves as a consequence of vaccination against piroplasmiasis]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 115, 167-172.
- Sjolander, A., Cox, J.C., Barr, I.G., 1998. ISCOMs: an adjuvant with multiple functions. *J Leukoc Biol* 64, 713-723.
- Sjolander, A., van't Land, B., Lovgren Bengtsson, K., 1997. Iscoms containing purified Quillaja saponins upregulate both Th1-like and Th2-like immune responses. *Cell Immunol* 177, 69-76.
- Spagnuolo, M., Kennedy, S., Foster, J.C., Moffett, D.A., Adair, B.M., 1997. Bovine viral diarrhoea virus infection in bone marrow of experimentally infected calves. *J Comp Pathol* 116, 97-100.
- Stott, G.H., Marx, D.B., Menefee, B.E., Nightengale, G.T., 1979. Colostral immunoglobulin transfer in calves I. Period of absorption. *J Dairy Sci* 62, 1632-1638.
- Thulin, H., 1975. Immune response to primary immunization with brucella antigen in mycosis fungoides. *Arch Dermatol Forsch* 251, 311-315.
- Titford, M.E., Horenstein, M.G., 2005. Histomorphologic assessment of formalin substitute fixatives for diagnostic surgical pathology. *Arch Pathol Lab Med* 129, 502-506.
- Toussaint, J.F., Vandenbussche, F., Mast, J., De Meester, L., Goris, N., Van Dessel, W., Vanopdenbosche, E., Kerkhofs, P., De Clercq, K., Zientara, S., Sailleau, C., Czaplicki, G., Depoorter, G., Dochy, J.M., 2006. Bluetongue in northern Europe. *Vet Rec* 159, 327.
- Travlos, G.S., 2006a. Histopathology of bone marrow. *Toxicol Pathol* 34, 566-598.
- Travlos, G.S., 2006b. Normal structure, function, and histology of the bone marrow. *Toxicol Pathol* 34, 548-565.
- Uhlig, U., Haitzma, J.J., Goldmann, T., Poelma, D.L., Lachmann, B., Uhlig, S., 2002. Ventilation-induced activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. *European Respiratory Journal* 20, 946-956.
- Valli, V.E.u.J., R. M., 2000. Structure and Function of the Hemopoietic System, Vol 5th edition. Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia.
- Varicak, T.D., 1938. Mark der Rumpfknoten; klinische Auswertung an Pferd, Rind, Schwein, Hund und Katze. *Archiv für wissenschaftliche und praktische Tierheilkunde* 73, 461-473.
- Verdoliva, A., Pannone, F., Rossi, M., Catello, S., Manfredi, V., 2002. Affinity purification of polyclonal antibodies using a new all-D synthetic peptide ligand: comparison with protein A and protein G. *J Immunol Methods* 271, 77-88.
- Watson, A.D., Wilson, J.T., Turner, D.M., Culvenor, J.A., 1980. Phenylbutazone-induced blood dyscrasias suspected in three dogs. *Vet Rec* 107, 239-241.

Literaturverzeichnis

- Welsh, M.D., Cunningham, R.T., Corbett, D.M., Girvin, R.M., McNair, J., Skuce, R.A., Bryson, D.G., Pollock, J.M., 2005. Influence of pathological progression on the balance between cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. *Immunology* 114, 101-111.
- Wienbeck, 1938. Das Knochenmarksbild bei Myelophthisen. *Virchows Archiv für Pathologische Anatomie und Physiologie und für Klinische Medizin* 303, 60-80.
- Wilson, M.R., Duncan, J.R., Heistand, F., Brown, P., 1972. The influence of preparturient intramammary vaccination on immunoglobulin levels in bovine mammary secretions. *Immunology* 23, 313-320.
- Witt, K., Weber, C.N., Meyer, J., Buchheit-Renko, S., Muller, K.E., 2011. Haematological analysis of calves with bovine neonatal pancytopenia. *Veterinary Record* 169, 228-228.
- Wong, D.W., Camirand, W.M., Pavlath, A.E., 1996. Structures and functionalities of milk proteins. *Crit Rev Food Sci Nutr* 36, 807-844.
- Yeruham, I., Avidar, Y., Harrus, S., Fishman, L., Aroch, I., 2003. Immune-mediated thrombocytopenia and putative haemolytic anaemia associated with a polyvalent botulism vaccination in a cow. *Vet Rec* 153, 502-504.

8 Anhang

8.1 Tabellen

Tabelle 8.1.1 Angaben zu der Herkunft, der Serumgruppe, den Ergebnissen der Tests auf Empfänglichkeit für BNP-Alloantikörper und zu den hämatologischen Veränderungen der Studienkälber.

| Kalb-Nr. | Herkunft | Serum | E _{Virologie} | E _{IHT} | E _{IH} | Thr.-P. | Lym.-P. |
|----------|-----------|----------------|------------------------|------------------|-----------------|---------|---------|
| 1 | Betrieb C | BNP-S (92 ml) | 0 | 0 | 1 | - | + |
| 2 | Betrieb B | K-S (114 ml) | 2 | 2 | 3 | - | - |
| 3 | Betrieb B | BNP-S (97 ml) | 2 | 2 | 2 | + | + |
| 4 | Betrieb B | K-S (78 ml) | 0 | 0 | n.d. | n.d. | n.d. |
| 5 | Betrieb B | BNP-S (80 ml) | 2 | 2 | 2 | + | + |
| 6 | Betrieb C | BNP-S (168 ml) | 2 | 2 | 2 | + | + |
| 7 | Betrieb B | K-S (192 ml) | 2 | 2 | 0 | - | - |
| 8 | Betrieb C | BNP-S (180 ml) | 2 | 2 | 2 | + | - |
| 9 | Betrieb B | BNP-S (160 ml) | 1 | 2 | 1 | - | + |
| 10 | Betrieb E | K-S (324 ml) | 0 | 2 | 1 | - | - |
| 11 | Betrieb A | BNP-S (288 ml) | 1 | 2 | 1 | + | + |
| 12 | Betrieb B | BNP-S (238 ml) | 0 | 2 | 3 | + | + |
| 13 | Betrieb B | BNP-S (294 ml) | 0 | 2 | 1 | - | + |
| 14 | Betrieb E | BNP-S (264 ml) | 0 | 2 | 3 | + | + |
| 15 | Betrieb C | BNP-S (282 ml) | 2 | 2 | 2 | - | + |
| 16 | Betrieb B | K-S (180 ml) | 1 | 0 | 1 | - | + |
| 17 | Betrieb B | K-S (288 ml) | 1 | 1 | 2 | - | - |
| 18 | Betrieb C | BNP-S (282 ml) | 1 | 0 | 1 | n.d. | n.d. |
| 19 | Betrieb C | BNP-S (270 ml) | 0 | 1 | 1 | + | + |
| 20 | Betrieb C | BNP-S (276 ml) | 0 | 1 | 3 | + | + |
| 21 | Betrieb B | K-S (264 ml) | 1 | 2 | 1 | - | - |
| 22 | Betrieb E | K-S (288 ml) | 1 | 2 | 1 | - | - |
| 23 | Betrieb C | K-S (300 ml) | 1 | 2 | 1 | - | - |
| 24 | Betrieb B | K-S (350 ml) | 1 | 2 | 3 | - | - |
| 25 | Betrieb B | K-S (300 ml) | 2 | 1 | 3 | - | + |
| 26 | Betrieb C | BNP-S (288 ml) | 2 | 1 | 3 | + | + |
| 27 | Betrieb B | BNP-S (306 ml) | 2 | 2 | 2 | + | + |

Fortsetzung siehe nächste Seite

Anhang

Fortsetzung Tabelle 8.1.1

| Kalb-Nr. | Herkunft | Serum | E _{Virologie} | E _{IHT} | E _{IH} | Thr.-P. | Lym.-P. |
|----------|-----------|----------------|------------------------|------------------|-----------------|---------|---------|
| 28 | Betrieb B | BNP-S (312 ml) | 2 | 1 | 2 | - | + |
| 29 | Betrieb C | BNP-S (276 ml) | 0 | 0 | 2 | - | + |
| 30 | Betrieb C | BNP-S (330 ml) | 0 | 2 | 2 | - | + |
| 31 | Betrieb B | BNP-S (195 ml) | 2 | 2 | 3 | + | + |
| 32 | Betrieb E | BNP-S (306 ml) | 2 | 2 | 1 | - | + |
| 33 | Betrieb C | BNP-S (330 ml) | 2 | 2 | 3 | + | + |
| 34 | Betrieb C | K-S (282 ml) | 2 | 2 | 1 | - | - |
| 35 | Betrieb B | K-S (252 ml) | n.d. | 2 | 2 | - | - |
| 36 | Betrieb E | BNP-S (336 ml) | n.d. | 0 | 2 | - | + |
| 37 | Betrieb B | K-S (282 ml) | n.d. | 2 | 2 | n.d. | n.d. |
| 38 | Betrieb B | K-S (300 ml) | n.d. | 2 | 1 | - | - |
| 39 | Betrieb E | K-S (242 ml) | n.d. | 2 | 2 | - | - |
| 40 | Betrieb C | BNP-S (180 ml) | n.d. | 0 | 1 | - | - |
| 41 | Betrieb C | K-S (252 ml) | n.d. | 1 | 2 | - | - |
| 42 | Betrieb B | BNP-S (720 ml) | n.d. | 2 | 1 | + | + |
| 43 | Betrieb E | BNP-S (846 ml) | n.d. | 2 | 2 | + | + |
| 44 | Betrieb E | BNP-S (882 ml) | n.d. | 2 | 1 | + | + |
| 45 | Betrieb B | BNP-S (288 ml) | n.d. | 1 | 1 | - | - |
| 46 | Betrieb E | K-S (324 ml) | n.d. | 0 | 1 | - | + |
| 47 | Betrieb D | BNP-S (312 ml) | n.d. | 0 | 2 | - | + |
| 48 | Betrieb B | BNP-S (252 ml) | n.d. | 0 | 2 | + | + |
| 49 | Betrieb C | K-S (228 ml) | n.d. | 0 | 2 | - | - |
| 50 | Betrieb C | K-S (216 ml) | n.d. | 0 | 1 | n.d. | n.d. |
| 51 | Betrieb B | BNP-S (811 ml) | n.d. | n.d. | 2 | n.d. | n.d. |
| 52 | Betrieb E | BNP-S (711 ml) | n.d. | n.d. | 2 | n.d. | n.d. |
| 53 | Betrieb E | BNP-S (765 ml) | n.d. | n.d. | 2 | n.d. | n.d. |
| 54 | Betrieb B | K-S (810 ml) | n.d. | n.d. | 2 | n.d. | n.d. |
| 55 | Betrieb B | K-S (792 ml) | n.d. | n.d. | 1 | n.d. | n.d. |
| 56 | Betrieb B | K-S (675 ml) | n.d. | n.d. | 2 | n.d. | n.d. |

Thr.-P.: Thrombopenie ($< 200 \cdot 10^9/L$); **Lym.-P.:** Lymphopenie ($< 2,4 \cdot 10^9/L$):

+ = nach Serumübertragung vorhanden, - = nicht vorhanden

E = Empfänglichkeit: getestet vom Institut für Virologie (**E_{Virologie}**) des Fachbereichs Veterinärmedizin und dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere (**E_{IHT}**) vor der Serumübertragung (9. Tag), immunhistologisch (**E_{IH}**) am Tag der Euthanasie (30. Tag):

0 = -; negativ, **1** = +; schwach positiv, **2** = ++; positiv, **3** = +++; stark positiv

n.d.: keine Daten vorhanden

- Serumübertragungsmenge: 100 ml/50 kg Körpergewicht
- Serumübertragungsmenge: 200 ml/50 kg Körpergewicht
- Serumübertragungsmenge: 300 ml/50 kg Körpergewicht
- Serumübertragungsmenge: 900 ml/50 kg Körpergewicht

Anhang

Tabelle 8.1.2 Daten zu Tagebuchnummer, Alter, Geschlecht, Ohrmarkennummer der nicht-BNP-Kälber aus dem Sektionsgut sowie Ergebnisse der Antikörperbindung in immunhistologischen Untersuchungen

| Tgb.-Nr. | Alter | Ohrmarken-Nr. | Geschlecht | E _{IH} |
|----------|-----------|----------------|------------|-----------------|
| S3/12 | 11 d | DE 06xxxxxx350 | m | ++ |
| S260/12 | 16 d | DE 05xxxxxx023 | m | +++ |
| S1003/12 | 4 d | DE 06xxxxxx817 | m | + |
| S1033/12 | 1 d | keine | w | ++ |
| S1048/12 | 59 d | DE 06xxxxxx377 | m | + |
| S1063/12 | 1 d | keine | w | + |
| S1089/12 | 1 d | keine | w | + |
| S1119/12 | Totgeburt | keine | n.d. | ++ |
| S1121/12 | Totgeburt | keine | n.d. | +++ |
| S1133/12 | 62 d | DE 09xxxxxx351 | m | + |

E_{IH}: Ergebnisse der Immunhistologie; + = schwach positiv, ++ = positiv, +++ = stark positiv
n.d.: keine Daten vorhanden

Tabelle 8.1.3 Daten zu Tagebuchnummer, Alter, Geschlecht, Ohrmarkennummer der BNP-Kälber aus dem Sektionsgut sowie Ergebnisse der Antikörperbindung in immunhistologischen Untersuchungen

| Tgb.-Nr. | Alter | Ohrmarken-Nr. | Geschlecht | E _{IH} |
|----------|-------|----------------|------------|-----------------|
| S1786/11 | 13 d | DE 05xxxxxx262 | w | - |
| S1025/12 | 8 d | DE 06xxxxxx895 | w | - |
| S1144/12 | 21 d | DE 06xxxxxx730 | w | - |
| S1384/12 | 14 d | DE 06xxxxxx571 | w | - |

E_{IH}: Ergebnisse der Immunhistologie; - : negativ

Anhang

Tabelle 8.1.4 Daten zu verschiedenen Entzündungsgeschehen, welche bei der Sektion der Studienkälber (Tabelle a: Kontrollkälber; Tabelle b: BNP-Serumgruppe) diagnostiziert wurden

a) Kontrollkälber (n = 22)

| Kalb Nr. | Thrombophlebitis V. jugularis | Endokarditis | Pneumonie | Enteritis | Sonstige |
|----------|-------------------------------|--------------|-----------|-----------|--|
| 2 | X | - | X | - | |
| 7 | X | - | X | - | |
| 10 | X | - | X | - | Fokale Blutung (Blasenhals) |
| 16 | X | X | X | X | |
| 17 | X | - | X | X | Omphaloarteriophlebitis, Hepatitis, Abomasitis, Tarsitis |
| 21 | X | X | X | X | Polyarthritits, Omphaloarteritis |
| 22 | X | X | - | X | Tarsitis |
| 23 | X | X | X | - | |
| 24 | - | X | X | X | |
| 25 | - | X | - | X | |
| 34 | - | - | - | X | Stomatitis, Periphlebitis |
| 35 | X | - | X | X | Abomasitis |
| 37 | X | X | - | X | Peritonitis |
| 38 | - | X | X | X | |
| 39 | - | - | - | X | |
| 41 | - | X | - | - | Omphalophlebitis, Omphalitis |
| 46 | - | X | - | X | Stomatitis, Periphlebitis, Tarsitis |
| 49 | - | X | - | X | Stomatitis, Rhinitis |
| 50 | - | - | - | X | Tarsitis, Dystelektase |
| 54 | X | X | X | X | |
| 55 | - | - | - | X | Osteomyelitis |
| 56 | X | - | - | X | |

X: vorhanden

-: nicht vorhanden

Anhang

Fortsetzung der Tabelle 8.1.4

b) BNP-Serumgruppe (n = 33)

| Kalb Nr. | Thrombophlebitis V. jugularis | Endokarditis | Pneumonie | Enteritis | Sonstige |
|----------|-------------------------------|--------------|-----------|-----------|---|
| 1 | - | - | - | - | |
| 3 | X | - | - | - | Rhinitis |
| 5 | X | - | - | X | Pyelonephritis, Enzephalitis |
| 6 | - | - | X | - | Stomatitis |
| 8 | X | X | - | - | |
| 9 | X | X | - | - | |
| 11 | X | X | - | X | Nephritis |
| 12 | X | X | X | - | Polyarthrit |
| 13 | X | X | - | X | Polyarthrit |
| 14 | X | X | X | - | Polyarthrit |
| 15 | X | X | X | - | |
| 18 | - | X | - | - | Dystelektase |
| 19 | - | X | - | X | Bronchitis |
| 20 | - | X | X | X | Polyarthrit |
| 26 | X | X | X | - | Polyarthrit |
| 27 | X | X | X | X | |
| 28 | - | X | X | - | |
| 29 | X | X | - | - | |
| 30 | X | X | - | - | Polyarthrit, Stomatitis, Osteomyelitis |
| 31 | X | X | X | - | Polyarthrit, Osteomyelitis |
| 32 | X | X | X | - | Rhinitis |
| 33 | X | X | X | - | |
| 36 | - | X | - | - | |
| 40 | X | X | - | - | Omphalophlebitis, Dystelektase |
| 42 | X | - | - | - | |
| 43 | X | X | - | - | Polyarthrit, Dystelektase |
| 44 | - | X | - | X | Glossitis mit Blutungen |
| 45 | - | X | X | X | Tarsitis, Stomatitis, Abomasitis, Rhinitis |
| 47 | - | - | X | X | Hepatitis, Myokarditis, Stomatitis, Nephritis |
| 48 | - | X | X | X | |
| 51 | X | X | X | - | Stomatitis |
| 52 | X | - | - | X | |
| 53 | X | X | - | - | Stomatitis |

X: vorhanden

-: nicht vorhanden

Tabelle 8.1.5 Daten zu der semiquantitativen Auswertung der HE-gefärbten Knochenmarkproben, inklusive der Daten der Sternalmarkproben

| Kalb | Serum-Gr. | Tag 9, Röhrenmark | | | Tag 13, Röhrenmark | | | Tag 30, Röhrenmark | | | Tag 30, Sternalmark | | |
|------|-----------|-------------------|-------|-------|--------------------|-------|-------|--------------------|-------|-------|---------------------|-------|-------|
| | | Fett | Eryt. | Thro. | Fett | Eryt. | Thro. | Fett | Eryt. | Thro. | Fett | Eryt. | Thro. |
| 1 | B | + | ++ | ++ | n.d. | n.d. | n.d. | ++ | ++++ | ++ | n.d. | n.d. | n.d. |
| 2 | K | n.d. | n.d. | n.d. | +++ | +++ | +++ | ++ | ++++ | ++ | n.d. | n.d. | n.d. |
| 3 | B | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | + | ++++ | +++ | n.d. | n.d. | n.d. |
| 4 | K | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| 5 | B | +++ | + | ++ | ++ | ++ | ++ | + | ++++ | +++ | + | +++ | +++ |
| 6 | B | + | + | ++ | + | ++ | ++ | +++ | ++ | ++ | n.d. | n.d. | n.d. |
| 7 | K | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | ++ | ++ | ++ | + | +++ | +++ |
| 8 | B | n.d. | n.d. | n.d. | +++ | +++ | +++ | ++ | ++ | ++ | + | ++ | ++ |
| 9 | B | +++ | ++ | ++ | +++ | +++ | ++ | n.d. | n.d. | n.d. | ++ | ++ | ++ |
| 10 | K | + | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | n.d. | n.d. | n.d. |
| 11 | B | +++ | ++ | +++ | +++ | ++ | ++ | +++ | ++ | ++ | n.d. | n.d. | n.d. |
| 12 | B | + | ++ | +++ | + | ++ | +++ | + | ++ | ++ | n.d. | n.d. | n.d. |
| 13 | B | + | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | +++ | +++ | +++ | + | +++ | ++ |
| 14 | B | ++ | ++ | ++ | ++ | +++ | +++ | + | ++ | +++ | - | ++ | +++ |
| 15 | B | + | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | +++ | ++ | +++ | + | +++ | +++ |
| 16 | K | + | ++ | ++ | ++ | ++ | + | ++ | ++ | ++ | n.d. | n.d. | n.d. |
| 17 | K | + | ++ | +++ | + | +++ | +++ | ++ | +++ | +++ | n.d. | n.d. | n.d. |
| 18 | B | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| 19 | B | ++ | ++ | ++ | +++ | ++ | ++ | ++ | ++ | +++ | n.d. | n.d. | n.d. |
| 20 | B | ++ | ++ | ++ | +++ | +++ | +++ | - | ++ | +++ | n.d. | n.d. | n.d. |

Fortsetzung siehe nächste Seite

Fortsetzung der Tabelle 8.1.5

| Kalb | Serum-Gr. | Tag 9, Röhrenmark | | | | Tag 13, Röhrenmark | | | | Tag 30, Röhrenmark | | | | Tag 30, Sternalmark | | | |
|------|-----------|-------------------|-------|-------|-------|--------------------|-------|-------|-------|--------------------|-------|-------|-------|---------------------|-------|-------|-------|
| | | Fett | Eryt. | Leuk. | Thro. | Fett | Eryt. | Leuk. | Thro. | Fett | Eryt. | Leuk. | Thro. | Fett | Eryt. | Leuk. | Thro. |
| 21 | K | ++ | ++ | +++ | ++ | ++ | ++ | +++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | - | ++ | ++ | ++ |
| 22 | K | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | ++ | ++ | ++ | ++ | + | ++ | ++ | ++ |
| 23 | K | ++ | ++ | ++ | +++ | +++ | ++ | ++ | ++ | +++ | ++ | ++ | ++ | - | ++ | ++ | ++ |
| 24 | K | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | ++ | +++ | ++ | ++ | ++ | +++ | ++ | ++ | + | ++ | +++ | +++ |
| 25 | K | +++ | ++ | ++ | ++ | +++ | ++ | ++ | ++ | ++ | +++ | ++ | ++ | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| 26 | B | + | ++ | ++ | +++ | +++ | ++ | ++ | ++ | ++ | +++ | ++ | + | ++ | ++ | ++ | ++ |
| 27 | B | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | +++ | ++ | ++ | ++ | + | ++ | ++ | ++ | ++ |
| 28 | B | +++ | ++ | ++ | ++ | +++ | ++ | ++ | ++ | +++ | ++ | ++ | +++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| 29 | B | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | +++ | ++ | ++ | ++ | +++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | + |
| 30 | B | +++ | + | +++ | +++ | +++ | + | +++ | +++ | ++ | ++ | +++ | ++ | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| 31 | B | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | +++ | +++ | ++ | + | +++ | ++ | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| 32 | B | +++ | ++ | ++ | ++ | +++ | ++ | ++ | +++ | +++ | ++ | ++ | +++ | +++ | n.d. | n.d. | n.d. |
| 33 | B | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | +++ | ++ | + | +++ | ++ | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| 34 | K | ++ | + | +++ | +++ | +++ | + | +++ | +++ | +++ | + | +++ | +++ | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| 35 | K | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| 36 | B | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | +++ | +++ | + | +++ | +++ | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| 37 | K | +++ | ++ | +++ | ++ | +++ | ++ | +++ | n.d. | n.d. | + | +++ | +++ | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| 38 | K | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| 39 | K | + | ++ | ++ | +++ | ++ | ++ | +++ | ++ | ++ | ++ | +++ | ++ | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| 40 | B | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | +++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | + | ++ | ++ | +++ |

Fortsetzung siehe nächste Seite

Fortsetzung der Tabelle 8.1.5

| Kalb | Serum-Gr. | Tag 9, Röhrenmark | | | | Tag 13, Röhrenmark | | | | Tag 30, Röhrenmark | | | | Tag 30, Sternalmark | | | |
|------|-----------|-------------------|-------|-------|-------|--------------------|-------|-------|-------|--------------------|-------|-------|-------|---------------------|-------|-------|-------|
| | | Fett | Eryt. | Leuk. | Thro. | Fett | Eryt. | Leuk. | Thro. | Fett | Eryt. | Leuk. | Thro. | Fett | Eryt. | Leuk. | Thro. |
| 41 | K | ++ | ++ | ++ | +++ | + | ++ | ++ | +++ | ++ | ++ | ++ | +++ | + | ++ | ++ | ++ |
| 42 | B | +++ | ++ | ++ | ++ | +++ | + | +++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | + | +++ | +++ | +++ |
| 43 | B | +++ | ++ | ++ | ++ | +++ | ++ | ++ | ++ | ++ | +++ | +++ | ++ | + | ++ | ++ | ++++ |
| 44 | B | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | +++ | + | +++ | ++ | ++ | ++ | ++ | +++ |
| 45 | B | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | +++ | +++ | +++ | - | ++ | ++ | +++ |
| 46 | K | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | ++ | ++ | ++ | ++ | +++ | ++ | +++ | ++ | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| 47 | B | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | n.d. | n.d. | n.d. |
| 48 | B | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | ++ | ++ | ++ | +++ | ++ | ++ | ++ | +++ | ++ | n.d. | n.d. | n.d. |
| 49 | K | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | n.d. | n.d. | n.d. |
| 50 | K | ++ | ++ | ++ | +++ | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| 51 | B | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | + | ++ | ++ | +++ | ++ | ++ | +++ | +++ | + | ++ | ++ | +++ |
| 52 | B | +++ | ++ | ++ | ++ | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | ++ | ++ | +++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| 53 | B | +++ | ++ | ++ | ++ | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | ++ | ++ | +++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| 54 | K | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | ++ | ++ | +++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | +++ |
| 55 | K | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | +++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| 56 | K | + | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | +++ |

K: Kontrollserumgruppe; **B:** BNP-Serumgruppe

n.d.: Daten nicht vorhanden oder Biopsie aufgrund zu kleiner Anteile an Knochenmark nicht auswertbar

Eryt.: Erythropoese; **Leuk.:** Leukopoese; **Thro.:** Thrombopoese

Tabelle 8.1.6 Immunhistologische Ergebnisse an den Gewebeschnitten peripherer Organe

| Kalb, BNP-S. | Thymus | Milz | Leber | Niere |
|---------------------|---------------------------------|------------------------------------|--------------|---------------------------|
| K26 | EZ und ZG im Mark positiv | negativ | negativ | negativ |
| K29 | ZG im Mark positiv | negativ | negativ | negativ |
| K51 | negativ | negativ | negativ | negativ |
| K52 | EZ positiv | EZ im Follikel- zentrum positiv | negativ | negativ |
| K53 | negativ | negativ | negativ | EZ in einem Glomerulum |

| Kalb, K-S. | | | | |
|-------------------|-----------------------|----------------------------|---------|---------|
| K46 | ZG im Mark positiv | EZ im Follikel- zentrum | negativ | negativ |
| K49 | ZG im Mark positiv | EZ im Follikel- zentrum | negativ | negativ |
| K54 | negativ | negativ | negativ | negativ |
| K55 | negativ | negativ | negativ | negativ |
| K56 | ZG im Mark positiv | negativ | negativ | negativ |

EZ: Einzelzellen; **ZG:** Zellgruppen

BNP-S.: Kälber, welche BNP-Serum übertragen bekommen haben

K-S.: Kälber, welche Kontrollserum übertragen bekommen haben

Tabelle 8.1.7 Trend-Tabelle basierend auf den semiquantitativen Auswertungen der Zellveränderungen der Studienkälber über die Zeit. Spezifisch sortiert zur Erstellung der Abbildungen 11 und 12

a) Kontrollkälbergruppe

| | Fettzellanzahl | | | Erythropoese | | | Leukopoese | | | Thrombopoese | |
|-----|----------------|---------|-----|--------------|---------|-----|------------|---------|-----|--------------|---------|
| | T9-T13 | T13-T30 | | T9-T13 | T13-T30 | | T9-T13 | T13-T30 | | T9-T13 | T13-T30 |
| K41 | -1 | 0 | K7 | n.d. | n.d. | K21 | -1 | -1 | | -1 | -1 |
| K37 | n.d. | n.d. | K22 | n.d. | n.d. | K7 | n.d. | n.d. | K16 | -1 | 0 |
| K50 | n.d. | n.d. | K37 | n.d. | n.d. | K22 | n.d. | n.d. | K7 | n.d. | n.d. |
| K25 | 0 | -1 | K50 | n.d. | n.d. | K37 | n.d. | n.d. | K22 | n.d. | n.d. |
| K21 | 0 | 0 | K24 | n.d. | 0 | K50 | n.d. | n.d. | K37 | n.d. | n.d. |
| K35 | 0 | 0 | K46 | n.d. | 0 | K54 | n.d. | -1 | K50 | n.d. | n.d. |
| K38 | 0 | 0 | K54 | n.d. | 0 | K24 | n.d. | 0 | K2 | n.d. | -1 |
| K49 | 0 | 0 | K55 | n.d. | 0 | K55 | n.d. | 0 | K34 | 0 | -1 |
| K7 | n.d. | 1 | K10 | 0 | 0 | K10 | 0 | 0 | K24 | n.d. | 0 |
| K17 | 0 | 1 | K21 | 0 | 0 | K23 | 0 | 0 | K46 | n.d. | 0 |
| K22 | 0 | 1 | K23 | 0 | 0 | K34 | 0 | 0 | K54 | n.d. | 0 |
| K34 | 0 | 1 | K25 | 0 | 0 | K35 | 0 | 0 | K55 | n.d. | 0 |
| K39 | 0 | 1 | K35 | 0 | 0 | K38 | 0 | 0 | K10 | 0 | 0 |
| K46 | 0 | 1 | K38 | 0 | 0 | K39 | 0 | 0 | K17 | 0 | 0 |
| K10 | 1 | 1 | K39 | 0 | 0 | K41 | 0 | 0 | K25 | 0 | 0 |
| K16 | 1 | 1 | K41 | 0 | 0 | K56 | 0 | 0 | K35 | 0 | 0 |
| K23 | 1 | 1 | K49 | 0 | 0 | K2 | n.d. | 1 | K38 | 0 | 0 |
| K54 | 1 | 1 | K56 | 0 | 0 | K46 | n.d. | 1 | K41 | 0 | 0 |
| K56 | 1 | 1 | K34 | 0 | 1 | K16 | 0 | 1 | K49 | 0 | 0 |
| K2 | 2 | 2 | K16 | 1 | 0 | K25 | 0 | 1 | K56 | 0 | 0 |
| K24 | 2 | 2 | K17 | 1 | 1 | K49 | 0 | 1 | K21 | 1 | 0 |
| K55 | 2 | 2 | K2 | n.d. | 2 | K17 | 1 | 1 | K39 | 1 | 0 |

Fortsetzung siehe nächste Seite

Anhang

Fortsetzung der Tabelle 8.1.7

b) BNP-Serumgruppe

| | Fettzellanzahl | | | Erythropoese | | | Leukopoese | | | Thrombopoese | |
|-----|----------------|-------------|-----|--------------|-------------|-----|------------|-------------|-----|--------------|-------------|
| | T9- T13 | T13- T30 | | T9- T13 | T13- T30 | | T9- T13 | T13- T30 | | T9- T13 | T13- T30 |
| K53 | -3 | -1 | K42 | -1 | 0 | K1 | n.d. | n.d. | K11 | -1 | -1 |
| K5 | -1 | -2 | K1 | n.d. | n.d. | K18 | n.d. | n.d. | K26 | -1 | -1 |
| K32 | -1 | 0 | K18 | n.d. | n.d. | K52 | n.d. | n.d. | K1 | n.d. | n.d. |
| K1 | -1 | 1 | K52 | n.d. | n.d. | K53 | n.d. | n.d. | K18 | n.d. | n.d. |
| K3 | 0 | -1 | K53 | n.d. | n.d. | K8 | n.d. | 0 | K52 | n.d. | n.d. |
| K8 | n.d. | -1 | K8 | n.d. | -1 | K48 | n.d. | 0 | K53 | n.d. | n.d. |
| K14 | 0 | -1 | K26 | 0 | -1 | K12 | 0 | 0 | K8 | n.d. | -1 |
| K30 | 0 | -1 | K31 | 0 | -1 | K20 | 0 | 0 | K48 | n.d. | -1 |
| K42 | 0 | -1 | K33 | 0 | -1 | K28 | 0 | 0 | K12 | 0 | -1 |
| K43 | 0 | -1 | K36 | 0 | -1 | K30 | 0 | 0 | K29 | 0 | -1 |
| K52 | 0 | -1 | K44 | 0 | -1 | K40 | 0 | 0 | K30 | 0 | -1 |
| K18 | n.d. | n.d. | K48 | n.d. | 0 | K47 | 0 | 0 | K9 | 0 | n.d. |
| K9 | 0 | 0 | K51 | n.d. | 0 | K36 | 0 | -2 | K6 | 0 | 0 |
| K11 | 0 | 0 | K9 | 0 | n.d. | K51 | n.d. | 1 | K28 | 0 | 0 |
| K12 | 0 | 0 | K3 | 0 | 0 | K11 | 0 | 1 | K42 | 0 | 0 |
| K27 | 0 | 0 | K11 | 0 | 0 | K13 | 0 | 1 | K44 | 0 | 0 |
| K28 | 0 | 0 | K12 | 0 | 0 | K19 | 0 | 1 | K47 | 0 | 0 |
| K31 | 0 | 0 | K14 | 0 | 0 | K27 | 0 | 1 | K51 | n.d. | 1 |
| K33 | 0 | 0 | K15 | 0 | 0 | K29 | 0 | 1 | K3 | 0 | 1 |
| K40 | 0 | 0 | K19 | 0 | 0 | K32 | 0 | 1 | K5 | 0 | 1 |
| K45 | 0 | 0 | K20 | 0 | 0 | K43 | 0 | 1 | K13 | 0 | 1 |
| K47 | 0 | 0 | K27 | 0 | 0 | K44 | 0 | 1 | K19 | 0 | 1 |
| K48 | 0 | 0 | K28 | 0 | 0 | K45 | 0 | 1 | K43 | 0 | 1 |
| K51 | n.d. | 1 | K32 | 0 | 0 | K15 | 0 | 2 | K45 | 0 | 2 |
| K29 | 0 | 1 | K43 | 0 | 0 | K26 | 0 | 2 | K36 | 1 | -2 |
| K36 | 0 | 1 | K47 | 0 | 0 | K33 | 0 | 2 | K27 | 1 | 0 |
| K44 | 0 | 1 | K30 | 0 | 1 | K9 | 1 | n.d. | K33 | 1 | 0 |
| K6 | 0 | 2 | K45 | 0 | 1 | K42 | 1 | 0 | K40 | 1 | 0 |
| K20 | 1 | -2 | K29 | 1 | 0 | K14 | 1 | 1 | K14 | 1 | 1 |
| K19 | 1 | 0 | K40 | 1 | 0 | K3 | 1 | 2 | K15 | 1 | 1 |
| K13 | 1 | 2 | K6 | 1 | 1 | K5 | 1 | 2 | K32 | 1 | 1 |
| K15 | 1 | 2 | K13 | 1 | 1 | K6 | 1 | 2 | K20 | 1 | 2 |
| K26 | 2 | 1 | K5 | 1 | 3 | K31 | 1 | 2 | K31 | 1 | 2 |

0 = keine Veränderung; 1 = Veränderung der Zellzahl um eine Stufe; 2 = Veränderung der Zellzahl um 2 Stufen; 3 = Veränderung der Zellzahl um 3 Stufen

■ Erniedrigung der Zellzahl (Zahl zusätzlich mit einem "-" gekennzeichnet)

■ Erhöhung der Zellzahl

n.d.: keine Angaben vorhanden

8.2 Lösungen, Puffer, Bezugsquellen

8.2.1 Lösungen und Puffer

Phosphate-buffered-saline (PBS, pH 7,4)

Stammlösung (10 x, 100 mM):

42 g NaCl

9,26 g Na₂HPO₄ x 2H₂O

2,15 g KH₂PO₄

In 800 ml dH₂O, pH mit 5 M NaOH bzw. HCl auf pH 7,4 einstellen und bis 1000 ml auffüllen, autoklavieren.

Gebrauchslösung (10 mM):

100 ml Stammlösung mit 900 ml Aqua bidest. verdünnen. Der pH-Wert wurde mit 1 M HCl eingestellt.

Tris-buffered-saline (TBS, pH 7,6)

Stammlösung (10x):

60,57 g Tris (hydroxymethyl)-aminomethane

610 ml Aqua bidest.

390 ml 1 M HCl

Der pH-Wert wurde mit 1 M HCl eingestellt.

Gebrauchslösung:

100 ml Stammlösung

900 ml 0,8 % NaCl in Aqua bidest.

Die Gebrauchslösung hatte einen pH-Wert von 7,8.

Imidazol/HCl-Puffer 0,1 M (pH 7,1)

6,81 g Imidazol zunächst in 500 ml Aqua bidest. lösen, dann bis 1000 ml auffüllen.

Zugabe von 500 ml 0,1 M HCl. Der pH-Wert wurde mit 0,1 M HCl eingestellt.

3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid-Dihydrat-Lösung (DAB)

100 mg DAB

200 ml 0,1 M Imidazol/HCl-Puffer (pH 7,1)

Das DAB im Puffer lösen und mittels Magnetrührer mischen. Die Lösung dann filtrieren und unmittelbar vor dem Gebrauch 70 µl 30 % H₂O₂ dazugeben.

Papanicolauos Gebrauchslösung

Papanicolauos Hämatoxylin 1 b und Aqua dest. im Verhältnis 1:10 mischen und anschließend filtrieren.

Natriumphosphat-Puffer 20 mM (pH 7)

3,56 g Na₂HPO₄ x 2H₂O

2,76 g NaH₂PO₄ x H₂O

In 1000 ml Aqua dest. lösen. Der pH-Wert wurde mit 1 M HCl eingestellt.

Glycin-HCl-Puffer 0,1 M (pH 2,7)

7,5 g Glycin in etwa 500 ml Aqua dest. lösen. Dann den pH mit 1 M HCl einstellen und bis 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen.

Tris-HCl-Puffer 1M (pH 9)

103,72 g Tris base

22,72 g Tris-HCl

in 1000 ml Aqua dest. lösen. Der pH-Wert wurde mit 1 M HCl eingestellt.

Dinatrium-EDTA-Lösung (pH 7,4)

200 g Na₂EDTA mit 50 ml 4 M NaOH in etwa 500 ml Aqua dest. lösen und auf 1800 ml mit Aqua dest. auffüllen. Den pH mit 4 M NaOH auf 7,4 einstellen und die Lösung auf 2000 ml mit Aqua dest. auffüllen.

Bezugsquellen für Chemikalien und Geräte

Geräte:

- Handmühle (Krupps 75, Typ 203)
- Spektrophotometer (P/N 489-04050-02), Shimadzu Europa GmbH, UV_1202, Duisburg
- Stabmixer Phillips, 600 W, HR1365
- Tischzentrifuge, Hettich, Rotina 48 RC
- Vortexer, Heidolph, RE AX 1 DR

Cambrex Bio Science Rockland Inc., Rockland

Agarose Metaphor[®] (50180)

Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Aceton (9372.3)

Formaldehyd (P733.3)

Isopropanol (9866.4)

Kaliumchlorid (6781.1)

Methanol (5627.3)

Na₂EDTA (X986.3)

Rotilabo[®]-Spritzenfilter, 45 µm (KH55.1)

Roti[®]-Histol (6640.2)

Roti[®]-Plast (Schmelzpunkt 56-58 °C) (6642.6)

Tris-Hydrochlorid (9090.2)

DCS Innovative Diagnostik-Systeme Dr. Christian Sartori GmbH & Co. KG, Hamburg

HOPE[®] I (HL001R500)

HOPE[®] II (HL002C001)

Low Melting Paraffin (Schmelzpunkt 52-54 °C) (PL003S2K)

Fisher Scientific GmbH, Schwerte

ChamberSlides, Lab-Tek II (4-kammerig: 154526; 8-kammerig: 154534)

GE Healthcare Bio-Science AB, Uppsala

PD 10 Entsalzungssäulen (17085101)

HiTrap Protein G, 5 x 1 ml (17040401)

Keutz, Reiskirchen

Flachgel-Elektrophoresekammer, horizontal, Kat.-Nr.: 0030191-00

Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nußloch

Rotationsmikrotom RM 2255

Merck KGaA, Darmstadt

HCl Titrisol[®] (1099700001)

NaH₂PO₄ x H₂O (1063461000)

Na₂HPO₄ x 2 H₂O, p.a. (10658005000)

Natriumchlorid (1064005000)

NaOH Titrisol[®] (1099560001)

Papanicolaou's Lösung 1 b Hämatoxylinlösung S (1092542500)

Perhydrol[®] 30 % H₂O₂ p.a. (1072100250)

Novus Biologicals, Cambridge

Lightning-Link HRP Antibody Labeling Kit, 5 x 1 mg (701-0003)

PAA Laboratories GmbH, Cölbe

Penicillin/Streptomycin (100x) (P11-010)

RPMI 1640 (E15-840)

Trypsin-EDTA (1x) (L11-660)

R. Langenbrinck, Teningen

SuperFrost[®] Plus Objektträger (03-0060)

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Peroxidase (POD), aktiviert (11428861001)

Fetales Kälberserum (FCS) (A15-151)

Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen

TissueTek[®] O.C.T.[™] Einbettmedium (4583)

Tissue Tek[®] SCA[™] Eindeckfilm (4770)

Sarstedt, Newton

15 ml Röhrchen, 120 x 17 mm, PP (62.554.512)

Kulturflaschen, 25 cm² (83.1810.002)

SAV LP GmbH, Flintsbach am Inn

Ethanol 96 %, verg. mit 1 % Methylethylketon

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf

3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid-Dihydrat (DAB) (D-5637)

Glycine (G8898)

Imidazol (56750)

Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Trizma[®]base) (93352)

Fettfreie Trockenmilch vom Rind (M7409)

Thermo Scientific, Cheshire

Coverplates[™] (721100013)

Shandon Racks (73310017)

6 x Orange DNA Loading Dye Solution (ehemals MBI Fermentas, St. Leon-Rot) (#R0631)

9 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------|---|
| Abb. | Abbildung |
| AK | Antikörper |
| bidest. | bidestillata |
| BNP | Bovine Neonatale Panzytopenie |
| bp | Basenpaare |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| BTV | Bluetongue virus (Blauzungenvirus) |
| BVD | Bovine Virusdiarrhoe |
| BVDV | Bovines Virusdiarrhoe-Virus |
| d | Tag(e) |
| Da | Dalton |
| DAB | Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid |
| DNA | desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure) |
| dest. | destillata |
| et al. | et alii |
| evtl. | eventuell |
| Fc | Fragment crystallisable |
| FCS | fetales Kälberserum |
| F2-Kreuzungstiere | Kreuzungstiere der 2. Generation |
| h | Stunde(n) |
| HE | Hämatoxylin-Eosin |
| HOPE [®] | <u>H</u> epes glutamic acid buffer mediated <u>o</u> rganic solvent <u>p</u> rotection <u>e</u> ffect |
| HRP | Horseradish peroxidase (= Meerrettich-Peroxidase) |
| IHC | Immunhistochemie |
| IHT | Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig-Universität Gießen |
| Ig | Immunglobulin |
| JLU | Justus-Liebig-Universität |
| kDA | Kilodalton |
| Lsg | Lösung |
| M | Molar |
| MDBK | Madin Darby Bovine Kidney |
| mg | Milligramm |
| MHC | major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex) |
| min | Minute(n) |
| mM | Millimolar |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------|--|
| ml | Milliliter |
| mm | Millimeter |
| n | Anzahl |
| µl | Mikroliter |
| Obj. | Objektivvergrößerung |
| p.a. | per analysi |
| PBS | Phosphate-buffered saline |
| PCR | polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion) |
| PTT | partial thromboplastin time |
| RNA | ribonucleic acid (Ribonukleinsäure) |
| s | Sekunde(n) |
| TBS | Tris-buffered saline |
| Tgb.-Nr. | Tagebuch-Nummer(n) |
| TiHo | Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan |
| V | Volt |
| z.B. | zum Beispiel |
| °C | Grad Celsius |
| ® | registered trade mark |
| ™ | unregistered trade mark |

Mein Herzlicher Dank gilt

Herrn Prof. Dr. Manfred Reinacher, der mir die Gelegenheit gab, das Institut für Veterinär-Pathologie fachlich im Rahmen des Verbundprojektes zu vertreten. Dank auch für das stets offene Ohr und die freundliche Unterstützung bei der Anfertigung der Dissertationsschrift.

dem Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) für die Förderung des Verbundprojektes zu dem Thema der Bovinen Neonatalen Panzytopenie.

den Projektmitarbeitern für ihre Hilfe bei Versuchen, fachlichen Fragen und der Entnahme sowie Zusendung von Probenmaterial.

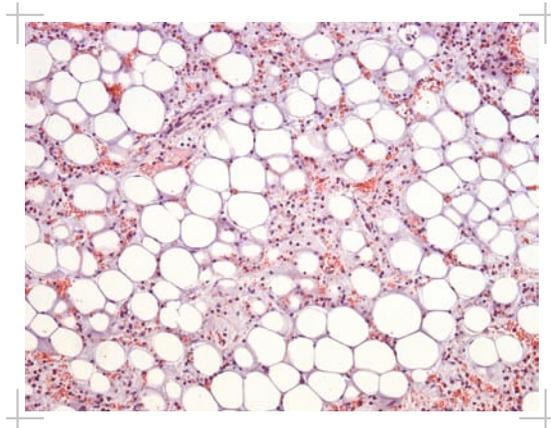
den Mitarbeitern des Instituts für Veterinär-Pathologie für ihre stete Unterstützung, sowohl bei seelischem Ungleichgewicht als auch fachlichen Hindernissen.

Sabrina Schröder, dem immer gut gelaunten, quirligen Sonnenschein, sie verwandelte das Büro bei Anwesenheit in eine richtige Wohlfühlzone.

meiner Familie für finanzielle Unterstützung, Geduld und bedingungslosen Rückhalt. Insbesondere Tata und Anna auch für ihre unermüdliche Hilfe bei PC- und Darstellungsschwierigkeiten, sowie Korrekturen - ohne euch hätte ich den Computer vermutlich vor der Fertigstellung der Arbeit aus Frustration „versehentlich“ zerstört.

Damian, der mich in der Endphase der Dissertation gefunden hat und meinem Leben außerhalb der Uni neue Perspektiven gab. Mit dir zusammen war sogar stundenlanges Formatieren am Samstag nur halb so schlimm.

Maike Huisinga für das Vertrauen in mich und die Begleitung bei den ersten Schritten im Leben meines Doktoranden-Daseins.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6324-5



9 78 17 83 83 51 96 32 45