



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Bovin neonatal pancytopeni, vad ligger bakom sjukdomen?

Karolina Sjöberg



Självständigt arbete i veterinärmedicin, 15 hp

Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2012: 16

Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Uppsala 2012



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Bovin neonatal pancytopeni, vad ligger bakom sjukdomen?

Bovine neonatal pancytopenia, what is behind the disease?

Karolina Sjöberg

Handledare:

Caroline Fossum, SLU, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Magnus Åbrink, SLU, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Examinator:

Mona Fredriksson, SLU, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Omfattning: 15 hp

Kurstitel: Självständigt arbete i veterinärmedicin

Kurskod: EX0700

Program: Veterinärprogrammet

Nivå: Grund, G2E

Utgivningsort: SLU Uppsala

Utgivningsår: 2012

Omslagsbild: ©Jenny Svénnås-Gillner, SLU

Serienamn, delnr: Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2012: 16
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, SLU

On-line publicering: <http://epsilon.slu.se>

Nyckelord: Bovin neonatal pancytopeni, trombocytopeni, benmärgsaplasi, vaccin, MHC klass I

Key words: Bovine neonatal pancytopenia, trombocytopenia, bone marrow aplasia, vaccine, MHC class I

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning	1
Summary	2
Inledning	3
Material och metoder	3
Litteraturoversikt	4
Sjukdomsbild.....	4
Symptom	4
Patologi.....	4
Histologi och blodbild.....	4
Etiologi	5
Möjlig genetisk bakgrund.....	6
Råmjölkens roll	6
Identifiering av MHC klass I som målet för alloantikroppar	7
Vaccinets roll.....	8
PregSure [®] BVD.....	8
Diskussion	10
Litteraturförteckning	13

SAMMANFATTNING

Bovin neonatal pancytopeni (BNP) är en ny sjukdom som rapporterades första gången 2007. Sjukdomen yttrar sig som en kraftigt ökad blödningstendens hos kalvar yngre än en månad och leder oftast till döden hos de drabbade djuren. Karaktäristiskt för sjukdomen är perifer trombocytopeni och leukocytopeni tillsammans med benmärgsaplasi. Bakgrunden till sjukdomen tros vara vaccination av modern med ett speciellt inaktiverat vaccin mot bovin virusdiarré virus. Restantigen från vaccinproduktionen inducerar antikropps bildning hos kon och dessa antikroppar förs senare över till kalven via råmjölken och orsakar immunmedierad destruktion av olika celler i blodet och benmärgen. De immunmedierade mekanismerna bakom denna destruktion är till stor del okända men Fc-receptormedierad fagocytos tycks vara ett troligt alternativ. Andra mekanismer kan dock inte uteslutas.

Även om bakgrunden till sjukdomen är känd finns det fortfarande mycket oklarheter kring de specifika mekanismerna och mer forskning behövs för att få en komplett bild av denna allvarliga sjukdom.

SUMMARY

Bovine neonatal pancytopenia (BNP) is an emerging disease first reported in 2007. The illness is marked by severe bleeding in calves younger than one month of age and in most cases leads to the death of the animal. The major pathological findings is marked thrombocytopenia and leucocytopenia in the blood and bone marrow aplasia. The etiology of the disease is believed to be vaccination of the dam with a certain inactivated viral vaccine against bovine viral diarrhea virus. Residual antigen, originating from the production of the vaccine, induces antibody formation in the blood of the dams which later passes to the calf by colostrum ingestion and cause destruction of cells in the blood and bone marrow. The immunological mechanisms behind this destruction is largely unknown but Fc-receptor mediated phagocytosis seems to be a likely candidate. Even so, other mechanisms cannot be excluded at this point.

Even though the background of this illness is known much remains to be discovered about the exact mechanisms behind this severe and lethal disease.

INLEDNING

Ökad blödningstendens är ett ovanligt fenomen bland nötkreatur. När det förekommer är det oftast sporadiska fall orsakade av infektioner eller intoxicationer och hos vissa raser förekommer även ärftliga genetiska mutationer som ger störd hemostas (Bell, 2011). Under 2007 började dock rapporter komma in, först i Tyskland, men senare också från andra europeiska länder, om kalvar som föddes tillsynes normala men efter några dagar började visa tecken på allvarlig sjukdom med ökad blödningstendens (Kappe et al., 2010; Bastian et al., 2011). Speciellt anmärkningsvärt var att sjukdomen uppstod samtidigt hos flera raser och att det rörde sig om relativt få fall i varje besättning. Sjukdomen kallades först idiopatisk hemorragisk diates eller blödande kalv syndromet (bleeding calf syndrome) men fick till slut namnet bovin neonatal pancytopeni (BNP) på grund av den karakteristiska blodbilden, kraftig minskning av alla celltyper, och de patologiska fynden med en aplastisk benmärg (Ballingall et al., 2011; Bridger et al., 2011).

I den här uppsatsen vill jag ge en bild av sjukdomen bovin neonatal pancytopeni, vad man vet om orsaken och den möjliga kopplingen till vaccination mot bovin virusdiarré virus (BVDV) med det inaktiverade vaccinet PregSure[®] BVD. För att göra detta hade jag följande frågeställningar:

- Vad är BNP?
- Vad är orsaken till BNP?
- Vilken roll spelar vaccination med PregSure[®] BVD i sjukdomsutvecklingen?

MATERIAL OCH METODER

När jag har sökt litteratur har jag använt mig av databaserna Web of Knowledge och PubMed. Sökorden jag har använt mig av är bovine neonatal pancytopenia, bleeding calf syndrome, haemorrhagic diathesis och MHC class I i olika former och kombinationer. Flera källor har jag hittat genom referenser och jag har även använt mig av läroböcker för att skaffa grundläggande bakgrundsinformation.

LITTERATURÖVERSIKT

Sjukdomsbild

Symptom

De första sjukdomstecknen ses inom en månad efter födseln och yttrar sig oftast som en onormal blödning vid enkla rutiningrepp såsom injektioner och öronmärkning. Detta följs av blödningar från huden, petekiella blödningar i slemhinnor, nosblod, blod i avföringen och hematom (Figur 1). Allt eftersom sjukdomen fortskrider blir blödningarna kraftigare och leder till slut till döden. Fataliteten är hög, 90%, och döden sker inom 15 dagar efter sjukdomens utbrott (Pardon et al., 2010). Feber har rapporterats i vissa fall men man är osäker på om detta är ett symptom på sjukdomen eller om det beror på något annat eftersom det inte förekommer i alla fall (Pardon et al., 2010; Friedrich et al., 2011).



*Figur 1. Blödningar från huden.
Från: <http://vla.defra.gov.uk>*



*Figur 2. Utbredda blödningar i mag-tarmkanalen.
Från: <http://www.sac.ac.uk>*

Patologi

Vid obduktion ses akuta, utbredda blödningar i större delen av kroppen bland annat subkutant, i slemhinnor och i mag-tarmkanalen (Figur 2) (Kappe et al., 2010; Pardon et al., 2010). Lymfadenopati (Pardon et al., 2010) och bakteriella infektioner (Kappe et al., 2010; Friedrich et al., 2011) har också rapporterats.

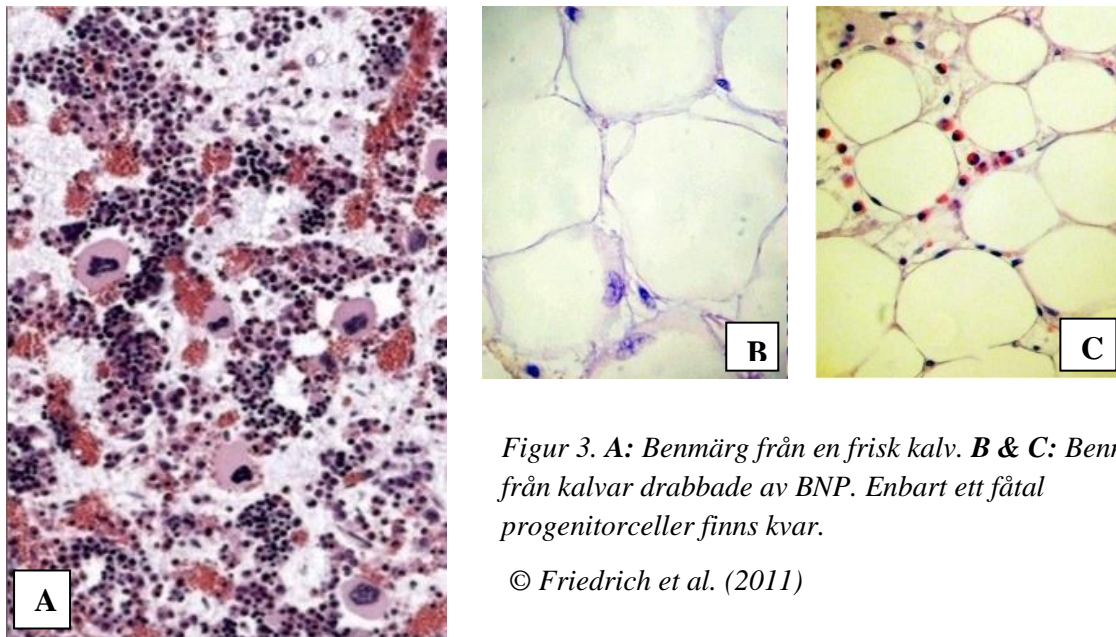
Histologi och blodbild

Histologiskt har inga förändringar på kärl setts som kan förklara blödningarna däremot är benmärgen hos drabbade djur kraftigt utarmad (Figur 3) (Kappe et al., 2010; Pardon et al., 2010). Dessa författare rapporterar att antalet stamceller och progenitorceller för alla de hematopoetiska cellinjerna är kraftigt minskat, eller saknas helt, hos alla sjuka kalvar. Pardon et al. (2010) observerade även aktiverade makrofager i anslutning till lymfocyter och hemofagocytos i benmärgen hos svårt sjuka kalvar. Direkt efter födseln är benmärgen normal (Bridger et al., 2011).

Perifert ses trombocytopeni, leukocytopeni och lymfocytos (Kappe et al., 2010; Pardon et al., 2010). I det tidiga skedet av sjukdomen ses främst trombocytopeni och granulocytopeni följt

av lymfocytopeni i de senare stadierna (Witt et al., 2011). Även erythrocyterna minskar i antal mot slutet av sjukdomen och i en del fall förekommer anemi (Kappe et al., 2010; Pardon et al., 2010; Witt et al., 2011). I de fall anemi kunde ses var den non-regenerativ, normocytisk och normokrom och inga tecken på hemolys fanns (Kappe et al., 2010; Pardon et al., 2010).

Witt et al. (2011) gjorde den intressanta observationen att 10 av deras 61 försöksdjur visade förändringar i två cellinjer eller mer men inte hade några kliniska symptom. Dessa fall var samlade till veckor då det föddes en eller flera kalvar som senare utvecklade BNP. Andra observationer har gjorts av liknande subkliniska fall (Pardon et al., 2010; Friedrich et al., 2011).



Figur 3. A: Benmärg från en frisk kalv. B & C: Benmärg från kalvar drabbade av BNP. Enbart ett fåtal progenitorceller finns kvar.

© Friedrich et al. (2011)

Etiologi

Ökad blödningstendens kan ha två orsaker, störd primär hemostas (trombocyter) eller störd sekundär hemostas (koagulationsfaktorer) (Bell, 2011). I fallet BNP är det trombocytopenin, det vill säga störd primär hemostas, som är orsaken till blödningarna (Kappe et al., 2010). Rubbad sekundär hemostas har kunnat uteslutas dels genom normal protrombin tid (PT) och aktiverad partiell tromboplastin tid (APTT) och normala fibrinogen värden (Pardon et al., 2010) dels genom att inga kända orsaker till störningar i sekundär hemostas har funnits hos fallen. Genom att mäta PT och APTT kan man se om mängden koagulationsfaktorer är minskad och på så sätt detektera störningar i den sekundära hemostasen (Bell, 2011). Pardon et al. (2010) kunde i och för sig detektera en viss förlängning av PT hos alla sina försöksdjur och en förlängning av APTT hos 25% men förklarar detta med att blödningarna förbrukar koagulationsfaktorer och att de två djur som hade förlängt APTT också var septikemiska. Även fibrinogenvärdena var höjda i vissa fall men detta berodde på inflammation.

Vad är då orsaken till trombocytopenin? Infektion med icke cytopatogena stammar av bovin virusdiarré virus (BVDV) kan orsaka sjukdom med trombocytopeni hos kalvar (Corapi et al., 1989) men BVDV har inte kunnat detekteras i något fall av BNP. Även andra kända orsaker

till trombocytopeni, som infektion med blåtungevirus och förgiftning med örnbräken, har kunnat uteslutas (Kappe et al., 2010; Pardon et al., 2010; Friedrich et al., 2011). Kappe et al. (2010) hittade ett circovirus, genomiskt mycket likt porcint circovirus typ 2 hos fem av sina tjugofem försöksdjur med BNP och en av sina åtta kontroller. Ingen annan har dock kunnat återfinna detta virus i andra fall av BNP (Willoughby et al., 2010).

Möjlig genetisk bakgrund

Hos flera raser av nötkreatur finns ärftliga genetiska mutationer som ger störd hemostas till exempel ärftlig bovin trombopati hos Simmental och faktor XI brist hos Holstein (Bell, 2011). Eftersom BNP uppstod i flera länder och hos flera raser samtidigt är en genetisk mutation dock inte en trolig etiologi till sjukdomen. Krappmann et al. (2011) gjorde dessutom ett försök där man kunde visa att blödningarna hos BNP-drabbade kalvar inte berodde på en mutation i faktor XI. Även om en ärftlig genetisk mutation inte föreligger tycks det ändå finnas någon form av genetisk bakgrund till sjukdomen. Både Kappe et al. (2010) och Krappmann et al. (2011) observerade i sina försök att fall av BNP kunde spåras tillbaks till enstaka fäder inom de drabbade besättningarna. Kappe et al. (2010) konstaterade att man i den undersökningen de gjorde hade ett för litet djurmaterial för att kunna dra några säkra slutsatser men Krappmann et al. (2011) kunde visa på en statistiskt signifikant samling av fall bland avkommor till en specifik tjur.

Råmjölkens roll

Intag av råmjölk har visats ha en avgörande roll i utvecklingen av BNP. Friedrich et al. (2011) gjorde ett försök där man undersökte om råmjölk från kor som tidigare hade fött kalvar med BNP (BNP-kor) kunde inducera BNP hos nyfödda kalvar från besättningar utan BNP-historik. Inom tre timmar efter intag av råmjölk från BNP-kor föll trombocyt- och leukocytvärdena för fem av de sex försökskalvarna.

Eftersom nötkreatur har en epiteliokorial placenta sker ingen passage av antikroppar från moder till foster under dräktigheten. Kalven får istället sina första livsviktiga antikroppar via råmjölken som innehåller höga koncentrationer IgG och även IgA och IgM i mindre mängder. När det gäller råmjölk överförs hela mängden IgG från blodet till mjölken till skillnad från vanlig mjölk där större delen produceras lokalt i juvret. Detta gör att även eventuella alloantikroppar, antikroppar bildade mot ett antigen från en annan individ av samma art, som finns i moderns blod hamnar i råmjölken och till sist hos kalven.

Foucras et al. (2011) visade att IgG framrenat ur blod från kor med BNP-historik kunde inducera sjukdom hos obesläktade kalvar från besättningar utan BNP-historik. Kalvarna, som inte fick råmjölk från sina egna mödrar, injicerades med IgG från BNP-korna och efter två dagar hade två av de sex dött. Hos de andra fyra minskade trombocyt- och leukocytvärdena signifikant och de uppvisade symptom överrensstämmande med BNP. Man gick vidare med försöken och kunde påvisa antikroppar bundna till granulocyter, monocyter, lymfocyter och trombocyter i kalvars blod efter injektion med IgG eller intag av råmjölk från BNP-kor. Dessa antikroppar band inte till celler i blod från andra BNP-kor

Även Bridger et al. (2011) kunde visa att det finns antikroppar i blodet hos kor med BNP-historik som kan binda lymfocyter, monocyter och granulocyter från kalvar. Bindningen var starkast till lymfocyter och monocyter och inte lika stark till granulocyter. Man kunde också se att leukocyter från olika kalvar band olika starkt till antikroppar från olika kor och att olika kor hade olika mängder IgG i blodet. Bridger et al. (2011) mätte även andelen leukocyter med IgG bundet till sig före och efter intag av råmjölk. Det rörde sig då om BNP-kor och deras egna kalvar och man såg att andelen IgG-positiva celler ökade betydligt några timmar efter intag av råmjölk. Man såg även att andelen IgG-positiva celler var relaterad till sjukdomens svårighet.

Undersökningar av Bastian et al., (2011) visade också att antikroppar från BNP-kor binder till extracellulära antigen på bovina leukocyter och även de noterade att bindningen tycktes vara starkast hos lymfocyter och monocyter och inte lika stark hos granulocyter. Man kunde också se att bindandet av antikroppar till målcellerna, in vitro, ökade den makrofagmedierade fagocytosen av cellerna med 20-30%.

Identifiering av MHC klass I som målet för alloantikroppar

Efter att ha funnit att antikroppar i serum och råmjölk från kor med BNP-historik kan binda till neonatala leukocyter och trombocyter gick man vidare med att identifiera det antigen som antikropparna band till. Foucras et al. (2011) lyckades isolera ett protein på 40-45 kDa som målmolekylen för antikropparna och detta protein visade sig vara bovint leukocytantigen (BoLA) MHC klass I.

Histokompatibilitetsmolekyler är glykoproteiner, receptorer, som kodas av gener inom ett genkluster som kallas major histocompatibility complex (MHC). Detta gör att även receptorn brukar kallas MHC. Varje genkluster (MHC) har loci som delas in i tre klasser. Klass I, klass II och klass III. Det är de MHC-molekyler som kodas av klass I loci som är målet för antikropparna hos BNP-kor (Fourcas et al., 2011). Proteinerna som bildas av generna i MHC har det gemensamma namnet bovint leukocytantigen (BoLA) hos nötkreatur. Andra arter har egna namn på dessa proteiner till exempel humant leukocytantigen (HLA).

MHC klass I kan i sin tur delas in i två undergrupper, klass Ia gener och klass Ib gener. MHC klass Ia molekyler kallas klassiska klass I molekyler. De uttrycks på ytan av de flesta kärnförande cellerna hos de flesta ryggradsdjur och deras främsta kända funktion är antigenpresentation för CD8⁺-T-lymfocyter. De är mycket polymorfa och kan därför binda ett stort antal antigen (Shawar et al., 1994; Hofstetter et al., 2011). Klass Ib molekyler däremot kallas icke-klassiska och uttrycks i mycket lägre grad än klass Ia. Deras funktion är inte helt känd men de verkar ha en rad olika funktioner kopplade till immunsystemet, däribland antigenpresentation. Dock kan de enbart binda ett fåtal olika antigen och har mycket låg polymorfism (Shawar et al., 1994; Hofstetter et al., 2011). Klass Ia och Ib molekyler är uppbyggda på samma sätt med en tung α -kedja (ca 45kDa) med antigenbindande domän och en lätt kedja, β -2-microglobulin (12kDa), som krävs för att MHC-molekylen skall kunna presenteras på cellytan (Shawar et al., 1994; Hofstetter et al., 2011). MHC molekyler är individspecifika och kodas av olika alleler hos olika individer. Detta gör att MHC från en

individ kan kännas igen som främmande av immunsystemet hos en annan individ av samma art om de har olika alleler. Klass Ia generna har många alleler medan det finns färre klass Ib alleler (Shawar et al., 1994).

Vaccinets roll

Epidemiologiska studier på EU-nivå har kopplat samman användningen av ett speciellt inaktiverat vaccin mot BVDV, PregSure[®] BVD, med uppkomsten av BNP. De flesta besättningar som drabbats av BNP har använt PregSure[®] BVD och sjukdomen förekommer dessutom inte i länder som inte använder vaccin mot BVDV (Bastian et al., 2011). Med detta i åtanke har flera studier gjorts för att se om antigenet som antikropparna hos BNP-kor binder till finns i vaccinet eller på något annat sätt kan sättas i samband med det.

Foucras et al. (2011), som identifierade MHC klass I som målet för antikropparna, kunde i samma försök visa att dessa antikroppar från BNP-kor vaccinerade med PregSure[®] BVD också band MHC klass 1 på Madin-Darby bovine kidney cells (MDBK-celler), en cellinje som används vid tillverkningen av vaccinet. Dessutom kunde man detektera samma antigen, MHC klass I, i vaccinet genom att isolera dess antigena fraktion.

Att antikroppar i sera från PregSure-vaccinerade BNP-kor binder till MDBK-celler och att samma antigen även finns i vaccinet kunde Deutszens et al. (2011) också bevisa. Genom att isolera antigenet i cellkulturen fick de fram två proteiner på 44 och 12kDa, motsvarande MHC klass I och β -2-microglobulin. Deutszens et al. (2011) gjorde dessutom försök med sera från ovaccinerade kor och kor som vaccinerats med PregSure[®] BVD men som ännu inte fött någon kalv med BNP. Sera från ovaccinerade kor visade ingen affinitet för MDBK-celler men av de vaccinerade korna utan BNP-avkomma var det två av fyra som hade antikroppar i blodet som band till MDBK-cellerna.

Bastian et al. (2011) rapporterade också att vaccinerade kor som inte fött sjuka kalvar hade antikroppar med förmåga att binda till MHC klass I. Man såg dock att vaccinerade kor med BNP-historik hade mer antikroppar, som band i högre grad till antigenet, än de som inte hade fött BNP-kalvar.

PregSure[®] BVD

PregSure[®] BVD är ett inaktiverat virusvaccin. Det innehåller BVDV typ 1 av den cytopatogena stammen 5960, odlade på ett derivat av MDBK-celler, och ett adjuvans som heter Procision-A (Veterinary medicines directorate, 2009; Deutszens et al., 2011). Pregsure är till för att användas på kor och kvigor i fertil ålder för att förebygga transplacental infektion med BVDV och födsel av persistent infekterade kalvar. Vaccinet är riktat mot BVDV 1 och har ingen bevisad verkan mot BVDV 2 (Veterinary medicines directorate, 2009). Det som gör PregSure speciellt är adjuvanset som ger ett mycket starkare immunsvaret och större mängd neutraliserade antikroppar än andra vacciner mot BVDV (Bastian et al., 2011)

Adjuvanset, Procision-A, är en emulsion, olja i vatten, som innehåller Quil A, kolesterol, amphigen base (parafinolja och soja lektin) och Drakeol 5 (parafinolja) (Veterinary medicines directorate, 2009; Bastian et al., 2011; Deutskens et al., 2011). Funktionen hos olika adjuvans är dåligt utforskad, speciellt när det gäller våra sällskaps- och produktionsdjur. Oljebaserade adjuvans, emulsioner, har man sett fungera främst som en depå på injektionsplatsen genom att ge en lokal inflammation med granulom som skyddar antigenet från allt för snabb nedbrytning och stimulerar immunsystemet (Aguilar & Rodríguez, 2007; Heegaard et al., 2011). Det finns tre olika typer av emulsioner, vatten i olja, vatten i olja i vatten och olja i vatten. Olja i vatten ger mindre lokal irritation än vatten i olja och har en mer immunstimulerande än depå effekt. Olja i vatten ger en stark korttids immunitet och stimulerar främst antikroppsbildning men kan också inducera en viss cellmedierad immunitet (Heegaard et al., 2011).

Quil A är ett extrakt av barken från trädet *Quilaja saponaria* som innehåller en blandning av mer än 23 olika saponiner. Saponiner är mycket adjuvanta och kan inducera ett starkt cellmedierat immunsvaret men kan också vara mycket toxiska genom sin lytiska effekt. De kan, förutom att ge en lokal irritation, ge upphov till bland annat hemolys (Aguilar & Rodríguez, 2007). Quil A förekommer ofta som tillsats i andra adjuvans (Aguilar & Rodríguez, 2007; Heegaard et al., 2011).

För att förstå hur MHC klass I antigenet har kommit med i vaccinet följer här en kort, översiktlig beskrivning av antigenproduktion på cellkultur till inaktiverade virusvaccin. Först infekteras celler med vald virusstam och viruset odlas under lämpliga förhållanden. Viruset får växa till önskad mängd i cellkulturen och separeras sen från cellerna genom lys. För att rensa bort celler och cellfragment finns det flera steg och metoder ex. filtrering och centrifugering. När vaccinantigenet är framrenat blandas rätt mängd antigen med önskat adjuvans och andra eventuella tillsatser som konserveringsmedel. Innehåller vaccinet hela virus avdödas dessa ofta med olika kemiska behandlingar innan vaccinet blandas (Kamstrup et al., 1999; Onions et al., 2011)

DISKUSSION

Att sjukdomen är kopplad till allogena antikroppar hos kor, bildade mot MHC klass I molekyler i vaccin, och att antikropparna överförs via råmjölken till avkomman har blivit grundligt bevisat. Kappe et al. (2010) kunde ju i och för sig hitta ett circovirus hos flera av sina fall men säger själva att detta kan bero på att det nedsatta immunförsvaret, orsakat av leukocytopeni, har möjliggjort infektion. Nedsatt immunförsvaret förklarar dock inte förekomsten av virus hos kontrollen. Dessutom kunde ett annat laboratorium som de skickade sina prover till inte detektera något virus med en vanlig PCR. Detta förklarar Kappe et al. (2010) med att labbets metod inte hade lika hög känslighet som deras egen men jag tycker ändå att circovirus teorin är motbevisad dels genom att ingen annan kunnat påvisa detta virus (Willoughby et al., 2010) och dels genom att även en av deras kontroller bar på viruset. Bakteriella infektioner har också påträffats (Kappe et al., 2010; Friedrich et al., 2011) men även dessa förklarar författarna med det nedsatta immunsvaret och inga bakterier har visats signifikant kopplade till sjukdomen.

Även om bakgrunden till sjukdomen har kartlagts finns det fortfarande flera frågetecken som behöver rätas ut. Ett av dessa är varför inte fler kalvar blir sjuka med tanke på i vilken stor utsträckning PregSure[®] BVD har använts. En teori som har framlagts är att det skulle kunna finnas en genetisk bakgrund kopplad till MHC klass I diversitet (Ballingall et al., 2011; Deutskens et al., 2011; Krappmann et al., 2011). Deutskens et al. (2011) lägger fram en teori om att om kalven drabbas eller inte beror på den paternella allelen. Teorin går ut på att om modern till kalven uttrycker en annan typ av allel än den som finns i cellkulturen och som kontaminant i vaccinet, kommer hennes immunsystem att känna igen detta som främmande och ett immunsvaret kommer att induceras med antikropsbildning mot främmande MHC klass I som resultat. Dessa antikroppar kommer nu att finnas i moderns blod. Om hon sedan föder en kalv som av sin far får samma allel som finns i vaccinet kommer antikropparna som kalven får från modern via råmjölken att binda till MHC klass I molekyler hos kalven. Får kalven däremot en annan allel från pappan kommer ingenting att hända eftersom antikropparna inte kan binda till de MHC molekylerna.

Paternella MHC gener är alltså en trolig förklaring till varför inte alla kalvar till PregSure[®] BVD vaccinerade kor blir sjuka. En annan fråga är varför just PregSure[®] BVD och inte andra BVDV vacciner inducerar dessa allogena antikroppar. De flesta inaktiverade BVDV vacciner produceras på samma sätt och använder sig av homologa produktionssystem det vill säga man odlar virus till bovina vacciner på bovina cellkulturer. När man använder sig av homologa produktionssystem finns alltid risken för kontamination av vaccinet med alloantigen och därför borde det inte vara bara PregSure[®] BVD som kan orsaka BNP men så tycks onekligen vara fallet (Bastian et al., 2011; Deutskens et al., 2011). Pardon et al. (2010) observerade i och för sig i sin undersökning att BNP förekom på en gård som inte vaccinerade mot BVDV alls. Dock var det också den enda gården i försöket som inte använde egen råmjölk utan använde ersättning och andra försök har tydligt visat att mjölk från BNP-kor kan inducera BNP även hos icke besläktade kalvar (Foucras et al., 2011; Friedrich et al., 2011). I dag är den enda teorin man har att det är det starka adjuvanset som är skyldigt (Bastian et al., 2011; Deutskens et al., 2011). Inga försök har, vad jag vet, publicerats som kan bekräfta misstanken, men

teorin är att antigenet i fråga har svag immunogenicitet och därför inte kan inducera ett starkt nog immunsvar på egen hand, alternativt att oljan i vatten hjälper till att stabilisera antigenet (Bastian et al., 2011). Mer forskning skulle dock behövas på det här området för att kunna säga säkert om det är en trolig teori eller inte.

Hur det allogena antigenet har hamnat i vaccinet är en annan intressant fråga. Vi kan anta att PregSure[®] BVD innehåller hela, inaktiverade virus eftersom inget annat anges i produktbeskrivningen eller den litteratur jag har läst. Jag har inte kunnat hitta någon information om hur just detta vaccin har producerats så jag utgår ifrån, med ledning av det Bastian et al. (2011) skriver i sin artikel, att det sker på samma sätt som annan produktion av inaktiverade virusvaccin odlade på cellkultur. Kanske är det så att det alltid finns med lite allogena molekyler när man odlar virus på cellkultur men att det inte varit ett problem tidigare. Innan har man inte haft lika kraftfulla adjuvans som det finns i dag och den lilla mängd allogen som normalt finns i vaccin, om den nu finns, kanske inte har varit tillräckligt för att ge likande symptom. BNP uppstår som sagt inte hos kor vaccinerade med andra likande vacciner med svagare adjuvans.

En sak som inte tas upp i de artiklar jag har läst är vilken typ av MHC klass 1 som är mål för antikropparna. Som jag har nämnt tidigare är det enbart vissa celltyper som drabbas, de hematopoetiska, och även inom den gruppen tycks det finnas grader av antikroppsbindning. Hur skall man förklara detta? MHC finns ju på i princip alla celler i kroppen? Deutskens et al. (2011) och Foucras et al. (2011) spekulerar om att det skulle kunna ha med täthet av MHC molekyler på cellerna att göra. Eftersom Ia och Ib skiljer sig väsentligt åt i sitt uttryck och i sin täthet skulle jag tycka att det vore mycket intressant att veta vilken typ av MHC klass 1 antikropparna riktar sig mot. Det skulle kunna vara en möjlig förklaring till varför det är enbart en typ av celler som drabbas. Det skulle också kunna förklara varför inte alla leukocyter tycks binda antikropparna i samma grad. En annan förklaring till att olika celler påverkas i olika grad skulle kunna vara att de har varierande känslighet för de immunologiska mekanismerna som ligger bakom destruktionsen.

Förekomsten av subkliniska fall är också intressant. En teori som lagts fram är att mängden antikroppar i råmjölken spelar roll (Deutskens et al., 2011; Foucras et al., 2011) och att det skulle vara relaterat till sjukdomens svårighetsgrad något som Bridger et al. (2011) kunde visa i sitt försök. Vad som sen skulle påverka mängden antikroppar hos kon finns det också teorier om, bland annat när under dräktigheten vaccinet ges och hur många boosterinjektioner hon har fått (Deutskens et al., 2011). Andra sätt råmjölksintaget skulle kunna påverka är via hur mycket kalven får i sig och i vilken grad antikropparna absorberas från magtarmkanalen (Deutskens et al., 2011; Foucras et al., 2011). Polning av mjölk skulle också kunna vara en möjlighet till uppkomsten av subkliniska fall (Bastian et al., 2011; Witt et al., 2011). Om man ger den första givan från kalvens egen mor och sedan ger en blandning från flera kor finns möjligheten att kalvar från mödrar som inte bildar antikroppar ändå kommer att få i sig antikroppar som binder till leukocyter och ger en ändrad blodbild. I och med att den första givan var fri från antikroppar och de påföljande var en blandning kommer mängden antikroppar kalven får i sig vara betydligt mindre än den hos en kalv som får en första

koncentrerad dos med antikroppar från sin egen mor och den kommer därför inte att få symptom. Detta skulle kunna förklara observationen av Witt et al. (2011) att subkliniska fall var samlade till veckor då kalvar som utvecklade BNP föddes (Witt et al., 2011).

Men vilka immunmedierade mekanismer är det som ger benmärgsaplasin och det perifera fallet i leukocyter, erythrocyter och trombocyter? Att det är någon form av antikroppsmedierad mekanism råder det väl ingen tvekan om och i benmärgen har observationer av aktiverade makrofager i närhet till lymfocyter och hemofagocytos gjorts (Pardon et al., 2010) vilket gör att Fc-receptormedierad fagocytos är den mest troliga orsaken till aplasin (Bastian et al., 2011). Den snabba perifera minskningen i vissa celltyper kan dock inte förklaras enbart av den centrala destruktionsen så någon form av perifer destruktions av celler måste också förekomma. Om stam- och progenitorceller i benmärgen förstörs kommer det perifera fallet motsvara de olika cellernas livslängd, till exempel har trombocyter hos kor en livslängd på 5-9 dagar vilket motsvarar ett utbyte av celler på 10-20% per dag (Kappe et al., 2010; Friedrich et al., 2011). Det snabba fallet i perifera trombocyter som har observerats vid BNP (Friedrich et al., 2011) gör att man måste misstänka att någon form av perifer destruktions också förekommer. Även leukocyterna uppvisar en pendlande halt som inte kan förklaras enbart med central destruktions (Friedrich et al., 2011). Friedrich et al. (2011) spekulerar om att de pendlande värden kan spegla en initial perifer destruktions med påföljande migration, rekrytering och tillslut uttömning på grund av central destruktions. Man har, så vitt jag vet, hittills inte lyckats identifiera den immunmedierade mekanismen som står för denna perifera destruktions. Det skulle kunna vara fagocytos av makrofager, precis som i benmärgen, men lika gärna antikroppsmedierad cellulär cytotox eller komplementmedierad destruktions (Bastian et al., 2011). Förekomsten av cellbundna antikroppar i perifert blod visar i alla fall att perifer destruktions är en klar möjlighet till en snabb sänkning i cellantal för vissa cellinjer.

Sammanfattningsvis kan man säga att BNP mest troligt är en alloimmun sjukdom orsakad av ett inaktiverat BVDV vaccin. Även om sjukdomens etiologi i stora drag är kartlagd behövs fortfarande mer forskning om de bakomliggande immunologiska mekanismerna och den genetiska variationens roll i sjukdomsutvecklingen. Fast distributionen av PregSure[®] BVD har stoppats och andra steg har tagits för att förhindra fler sjukdomsfall, det vill säga kassera råmjölk från BNP-kor, ger uppkomsten av en sjukdom som den här grund för att titta djupare på riskerna med homologa produktionssystem av vaccin och kontrollen av det antigena innehållet i vacciner.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Aguilar, J.C., Rodriguez, E.G. (2007). Vaccine adjuvants revisited. *Vaccine*, 25, 3752–3762.
- Ballingall, K.T., Nath, M., Holliman, A., Laming, E., Steele, P., Willoughby, K. (2011). Lack of evidence for an association between MHC diversity and the development of bovine neonatal pancytopenia in Holstein dairy cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 141, 128–132.
- 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.
- Bell, C. (2011). Bleeding disorders in cattle. *In Practice*, 33, 106–115.
- 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.
- Corapi, W., French, T., Dubovi, E. (1989). Severe thrombocytopenia in young calves experimentally infected with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus. *Journal of Virology*, 63, 3934–3943.
- Deutskens, F., Lamp, B., Riedel, C.M., Wentz, E., Lochnit, G., Doll, K., Thiel, H.-J., Ruemenapf, T. (2011). Vaccine-induced antibodies linked to bovine neonatal pancytopenia (BNP) recognize cattle major histocompatibility complex class I (MHC I). *Veterinary Research*, 42, doi: 10.1186/1297-9716-42-97.
- Foucras, G., Corbiere, F., Tasca, C., Pichereaux, C., Caubet, C., Trumel, C., Lacroux, C., Franchi, C., Burlet-Schiltz, O., Schelcher, F. (2011). Alloantibodies against MHC Class I: A Novel Mechanism of Neonatal Pancytopenia Linked to Vaccination. *Journal of Immunology*, 187, 6564–6570.
- Friedrich, A., Buettner, M., Rademacher, G., Klee, W., Weber, B.K., Mueller, 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, doi: 10.1186/1746-6148-7-10.
- Heegaard, P.M.H., Dedieu, L., Johnson, N., Le Potier, M.-F., Mockey, M., Mutinelli, F., Vahlenkamp, T., Vascellari, M., Sorensen, N.S. (2011). Adjuvants and delivery systems in veterinary vaccinology: current state and future developments. *Archives of Virology*, 156, 183–202.
- Hofstetter, A.R., Sullivan, L.C., Lukacher, A.E., Brooks, A.G. (2011). Diverse roles of non-diverse molecules: MHC class Ib molecules in host defense and control of autoimmunity. *Current Opinion in Immunology*, 23, 104–110.
- Kamstrup, S., Roensholt, L., Jensen, M., Dalsgaard, K. (1999). Production of a highly immunogenic subunit ISCOM vaccine against Bovine Viral Diarrhoea Virus. *Vaccine*, 17, 1057–1064.
- 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., Boettcher, J., Mueller, H. (2010). Bone marrow depletion with haemorrhagic diathesis in calves in Germany: Characterization of the disease and preliminary investigations on its aetiology. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, 123, 31–41.
- Krappmann, K., Weikard, R., Gerst, S., Wolf, C., Kuehn, C. (2011). A genetic predisposition for bovine neonatal pancytopenia is not due to mutations in coagulation factor XI. *Veterinary Journal*, 190, 225–229.

- Onions, D., Egan, W., Jarrett, R., Novicki, D., Gregersen, J.-P. (2010). Validation of the safety of MDCK cells as a substrate for the production of a cell-derived influenza vaccine. *Biologicals: Journal of the International Association of Biological Standardization*, 38, 544–551.
- 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.
- Shawar, S.M., Vyas, J.M., Rodgers, J.R., Rich, R.R. (1994). Antigen presentation by major histocompatibility complex class I-b molecules. *Annual Review of Immunology*, 12, 839–880.
- Veterinary medicines directorate. Product information database. [online] (2009-11-04). Tillgänglig: <http://www.vmd.defra.gov.uk/Productinformationdatabase/>. [2012-03-03]
- Willoughby, K., Gilray, J., Maley, M., Dastjerdi, A., Steinbach, F., Banks, M., Scholes, S., Howie, F., Holliman, A., Baird, P., McKillen, J. (2010). Lack of evidence for circovirus involvement in bovine neonatal pancytopenia. *Veterinary Record*, 166, 436–437.
- Witt, K., Weber, C.N., Meyer, J., Buchheit-Renko, S., Mueller, K.E. (2011). Haematological analysis of calves with bovine neonatal pancytopenia. *Veterinary Record*, 169, 228–U1503.