

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

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

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

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 spongiösem 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

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