

Blödningssyndrom hos kalv – vad var det som hände?

Karin Persson Waller

Leg veterinär, docent, statsveterinär
Enheten för djurhälsa och antibiotikafrågor
Statens Veterinärmedicinska Anstalt
Uppsala

Adjungerad professor
Institutionen för kliniska vetenskaper
Sveriges Lantbruksuniversitet
Uppsala

Inledning

För cirka 7 år sedan upptäcktes för första gången en ny kalvsjukdom med hög dödlighet i Tyskland. Sjukdomen yttrade sig som diffusa blödningar hos kalvar yngre än 3–4 veckor. Under följande år diagnosticerades sjukdomen även i flera andra europeiska länder, dock inte i de nordiska länderna, och senare även i Nya Zeeland. Sjukdomen fick så småningom namnet bovin neonatal pancytopeni (BNP). Orsaken till sjukdomen var till att börja med okänd men så småningom stod det klart att det fanns ett samband med användning av ett specifikt inaktiverat vaccin mot bovin virusdiarré (BVD) och att sjukdomen orsakades av upptag av alloantikroppar mot blod- och benmärgsceller via kolostrum.

Litteraturoversikt

Förekomst

Sjukdomen BNP (även kallad bleeding calf syndrome/disease, neonatal haemorrhagic diathesis m.m.) har rapporterats från över 10 länder i Europa, dock inte de nordiska länderna, och från Nya Zeeland. De första fallen rapporterades i Tyskland 2006 medan de första fallen i Storbritannien och Nya Zeeland diagnosticerades 2009 respektive 2011. Totalt hade i februari 2011 mer än 4500 kliniska fall rapporterats inom EU varav mer än 3000 i Tyskland. Drabbade kalvar har oftast varit yngre än 3–4 veckor och av varierande raser och korsningar. Både kalvar från förstakalvare och äldre kor har drabbats. Om en ko fått en BNP-kalv har det varit ganska hög sannolikhet att även kons följande kalvar blivit sjuka om dessa fått råmjölk från kon. Oftast har enstaka kalvar drabbats i en besättning men i en del besättningar har anhopningar av fall med en dödlighet på 3–5% (i enstaka fall ännu högre) av alla födda kalvar rapporterats.

Klinik

Vanliga kliniska fynd är spontana blödningar från näsa, munhåla och hud liksom blödningar efter injektioner, sår och öronmärkning. Hudblödningar, subkutana hematom och blodig avföring är också vanliga fynd liksom punktformiga blödningar i munslemhinna och konjunktiva. I vissa fall har allvarliga sekundärinfektioner som diarré och pneumoni observerats. Dödligheten hos djur med symtom är hög (uppskattad till över 80 procent) och de

flesta sjuka kalvar dör inom några timmar till dagar efter första symtom. Kalvar har också dött plötsligt utan att visa kliniska symtom. I dessa fall har man funnit omfattande inre blödningar vid obduktion.

Vid laboratorieanalys av blodbildens ses allvarlig trombocytopeni och leukopeni samt anemi av varierande grad. Vid obduktion är omfattande blödningar till exempel subkutant, i kroppshålor och i gastrointestinkanalen vanliga fynd. Benmärgen har geléliknande konsistens och mikroskopiskt ses allvarlig benmärgshypoplasi eller -aplasi.

Undersökningar har också visat att det kan finnas kalvar med lindrig benmärgshypoplasi i drabbade besättningar eftersom även kalvar utan symtom har haft förändrad blodbild med lågt antal trombocyter och leukocyter. Vissa av dessa kalvar hade trombocytopeni redan vid födseln. Av dessa utvecklade en del klinisk sjukdom medan andra inte visade några symtom och gradvis normaliserad blodbild. Tecken på immunosuppression i form av förekomst av atypiska infektiösa sjukdomar (i kombination med trombocytopeni och leukopeni) hos unga kalvar har också observerats i vissa drabbade besättningar.

Etiologi och patogenes

Benmärgsaplasi kan orsakas av många faktorer (t.ex. infektiösa, toxiska, genetiska, idiopatiska) men orsaken till BNP kunde inte härledas till infektion, toxiner eller genetiska faktorer. Epidemiologiska studier visade istället på ett starkt samband mellan BNP och vaccination med ett specifikt inaktiverat vaccin mot BVD (PregSure® BVD, Pfizer), hädanefter kallat BNP-vaccinet. Vaccinet hade introducerats i Europa 2004 och i Nya Zeeland 2008. Vaccinet drogs tillbaks från den europeiska marknaden 2010 och från Nya Zeeland 2011. Sjukdomen har inte rapporterats från länder som inte vaccinerar med det BNP-vaccinet. Orsaken till BNP visade sig vara att kalven via kolostrum fick i sig maternala alloantikroppar som band till antigen på leukocyter och trombocyter i perifert blod och till progenitorceller i benmärgen vilket ledde till att cellerna förstördes. Allvarligheten av symtomen påverkas av mängden alloantikroppar som kalven tagit upp via kolostrum och av antikropparnas aviditet till målcellerna. Bindningen av antikroppar till målcellerna varierar stort mellan kalvar vilket visar på en avsevärd heterogenitet bland antikropparna.

Senare studier visade att vissa kor efter vaccination med BNP-vaccinet bildade alloantikroppar (IgG1) mot cellkomponenter som fanns i vaccinet som en konsekvens av att bovina celler (Madin-Darby bovine kidney (MDBK) celler) användes vid vaccinproduktionen och att reningen av vaccinprodukten troligen inte var tillräcklig. Att detta vaccin innehöll ett mycket potent adjuvans (Procision ATM vilket innehåller saponin, kolesterol, fosfolipider och paraffinolja) anses även ha haft betydelse eftersom detta innebar att BNP-vaccinet inducerade en klart högre antikroppsproduktion än BVD-vaccin med annat adjuvans (aluminiumhydroxid).

I en annan studie jämfördes proteomet i BNP-vaccinet, proteomet i ett annat BVD-vaccin och proteomet i cellytan på MDBK-celler. Man fann att BNP-vaccinet innehöll mycket fler proteiner och molekyler än det andra vaccinet och att ett stort antal av dessa även fanns i MDBK-celler. Flera av dessa ämnen var koagulationsrelaterade och immunmodulerande proteiner eller cellulära och serumderivade molekyler. Dessa fynd konfirmerar att BNP-vaccinet innehåller många molekyler från vaccinproduktionen och att reningsproceduren av antigenet inte varit tillräcklig.

Det är ännu inte helt klarlagt vilket/vilka antigen som antikropparna riktats mot men det bör röra sig om antigen som uttrycks av alla myeloida celler. Studier har dock identifierat antikroppar mot major histocompatibility complex klass I (MHCI) hos BNP-vaccinerade djur varför MHCI anses vara en potentiell BNP-alloantigen. MHCI har även detekterats på MDBK-celler. Det är dock möjligt att även andra antigen är inblandade i sjukdomens utveckling.

Bovina MHCI-gener är mycket polymorfa och uttrycket av dessa gener som cellyteproteiner kan variera kraftigt. En modell för händelseförloppet som leder fram till BNP-sjukdom har presenterats. Enligt denna hypotes bildar kor som vaccinerats med BNP-vaccinet antikroppar mot för kon främmande MHC-varianter som finns i vaccinet. Om en kalv har arvt samma MHCI-varianter från tjuren förstör alloantikropparna i råmjölken kalvens trombocyter, leukocyter och hematologiska progenitorceller i benmärgen. Den höga graden av variabilitet av MHCI förklarar varför kliniska BNP-fall uppträder ganska sällan.

Det finns experimentella bevis på att risken för BNP är större och att fallen är allvarigare om kalven fått kolostrum från en BNP-ko som inte är kalvens mor än om kalven får råmjölk från sin egen mor även om hon tidigare fått en BNP-kalv. Risken för BNP är dessutom ännu större om kalven får kolostrum som blandats från flera BNP-kor.

Skillnader i BNP-incidens mellan regioner och besättningar har observerats. Detta kan troligen delvis förklaras av genetiska faktorer men främst av användning av olika vaccinationsprotokoll. Besättningar som använt BNP-vaccinet ofta och under längre period löper större risk att drabbas än andra besättningar.

Diskussion

Endast en mycket låg andel kor som vaccinerats med BNP-vaccinet har fått en BNP-kalv. Den totala incidensen kli-

nisk BNP inom EU mellan 2004–2009 beräknades vara 0,016 procent baserat på användning av en enkeldos av BNP-vaccin. Det finns dock risk att incidensen drabbade kalvar egentligen var avsevärt högre eftersom incidensen subkliniska fall inte är känd. Sedan BNP-vaccinet drogs tillbaka från marknaden har antalet kliniska fall minskat betydligt men fortfarande uppträder en del fall i besättningar där kor som vaccinerats med BNP-vaccinet finns kvar. Det är dock troligt att sjukdomen kommer att försvinna med tiden allteftersom antalet vaccinerade kor minskar i antal.

I drabbade besättningar bör kalvar från kor som tidigare fått en BNP-kalv ges råmjölk från kor utan eller med låg risk för BNP (dvs. ej BNP-vaccinerade, unga kor, kor som inte fått BNP-kalv). För att undvika att den nyfödda kalven diar sin mamma rekommenderas att kons juver skyddas med juverhållare. Vidare avrådes från att poola råmjölk i dessa besättningar.

Även om orsaken till BNP (dvs. alloantikroppar som överförts till kalven via råmjölk) har fastställts finns det fortfarande ett antal punkter som behöver klargöras så att liknande problem med framtida vacciner undviks. Till exempel är det inte helt klart om andra antigen än MHCI har betydelse och hur stor betydelse faktorer hos kalven har.

Mycket talar dock för att det var en kombination av ett högt innehåll av orenheter från vaccintillverkningen och ett mycket potent adjuvanssystem i BNP-vaccinet som ledde till uppkomsten av BNP. Detta visar att man behöver ta hänsyn till dessa faktorer vid bedömning av den immunologiska säkerheten hos ett vaccin.

Som en följd av uppkomsten av BNP har användning av homologa cellinjer vid vaccintillverkning ifrågasatts. Huruvida sådan användning vid produktion av andra vacciner kan innebära ett problem diskuterades på EU-nivå 2012 (Immunologicals Working Party, Committee for Medicinal Products for Veterinary Use, European Medicines Agency). Konsensus blev dock att, baserat på tillgänglig information, det inte var möjligt att ge några rekommendationer rörande detta men att det var möjligt att denna ståndpunkt kan revideras i framtiden om ny information kommer fram.

Summary

Bovine neonatal pancytopenia (BNP) has since 2006 been diagnosed in several European countries, but not in the Nordic countries, and also in New Zealand. Common BNP signs are diffuse bleedings in calves younger than 3–4 weeks, but subclinical cases also occur. The mortality is high among calves with clinical signs. Investigations have revealed a significant association between a specific inactivated vaccine against bovine viral diarrhoea virus and BNP. The disease is caused by transfer of alloantibodies against peripheral thrombocytes and leukocytes, and bone marrow precursor cells, from the dam to the calf via colostrum. Details regarding the etiology and pathogenesis of the disease, and implications for future vaccine production are discussed.

Referenser:

- Anonym. Veterinary pharmacovigilance 2012. Public bulletin. European Medicines Agency, 2013, http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Other/2013/02/WC500139403.pdf
- Assad A, Amann B, Friedrich A & Deeg CA. Immunophenotyping and characterization of BNP colostrum revealed pathogenic alloantibodies of IgG1 subclass with specificity to platelets, granulocytes and monocytes of all maturation stages. *Vet Immunol Immunopathol*, 2012, 147, 25-34.
- Bastian M, Holsteg G, Hanke-Robinson H, Duchow K & Cussler K. Bovine neonatal pancytopenia: is this alloimmune syndrome caused by vaccine-induced alloreactive antibodies? *Vaccine*, 2011, 29, 5267-5275.
- Bell CR, Rocchi MS, Dagleish MP, Melzi E, Ballingall KT, Connelly M, Kerr MG, Scholes SF & Willoughby K. Reproduction of bovine neonatal pancytopenia (BNP) by feeding pooled colostrums reveals variable alloantigen damage to different haematopoietic lineages. *Vet Immunol Immunopathol*, 2013, 151(3-4), 303-314.
- Bridger PS, Bauerfeind R, Wenzel L, Bauer N, Menge C, Thiel HJ, Reinacher M & Doll K. Detection of colostrums-derived alloantibodies in calves with bovine neonatal pancytopenia. *Vet Immunol Immunopathol*, 2011, 141, 1-10.
- Deutskens F, Lamp B, Riedel CM, Wentz E, Lochnit G, Doll K, Thiel H-J & Rümnapf T. Vaccine-induced antibodies linked to bovine neonatal pancytopenia (BNP) recognize cattle major histocompatibility complex class I (MHC I). *Vet Res*, 2011, 42:97.
- Euler KN, Hauck SM, Ueffing M & Deeg CA. Bovine neonatal pancytopenia – Comparative proteomic characterization of two BVD vaccines and the producer cell surface proteome (MDBK). *BMC Veterinary Research* 2013, 9:18.
- Foucras G, Corbière F, Tasca C, Pichereaux C, Caubet C, Trumel C, Lacroux C, Franchi C, Burlet-Schiltz O & Schelcher F. Alloantibodies against MHC class I: a novel mechanism of neonatal pancytopenia linked to vaccination. *J Immunol*, 2011, 187, 6564-6570.
- Friedrich A, Büttner M, Rademacher G, Klee W, Weber BK, Müller M, Carlin A, Assad A, Hafner-Marx A & Sauter-Louis CM. Ingestion of colostrums from specific cows induces bovine neonatal pancytopenia (BNP) in some calves. *BMC Vet Res*, 2011, 7:10.
- Lambton SL, Colloff AD, Smith RP, Caldow GL, Scholes SFE, Willoughby K, Howie F, Ellis-Iversen J, David G, Cook AJC & Holliman A. Factors associated with bovine neonatal pancytopenia (BNP) in calves: A case-control study. *PLoS ONE*, 2012, 7(5): e34183.
- Laming E, Melzi E, Scholes SFE, Connelly M, Bell CR, Ballingall KT, Dagleish MP, Rocchi MS & Willoughby K. Demonstration of early functional compromise of bone marrow derived haematopoietic progenitor cells during bovine neonatal pancytopenia through in vitro culture of bone marrow biopsies. *BMC Res Notes* 2012, 5:599.
- Pardon BG, Stuekers L, Dierick J, Ducatelle R, Saey V, Maes S, Vercauteren G, De Clercq K, Callens J, De Bleecker K & Deprez P. Haemorrhagic diathesis in neonatal calves: An emerging syndrome in Europe. *Transbound Emerg Dis*, 2010, 57, 135-146.
- Penny CD, Bell C, Morrison L, Howie F & Willoughby K. Pancytopenia and haemorrhage in young beef calves. *Vet Rec*, 2009, 164, 762.
- Sauter-Louis C, Carlin A, Friedrich A, Assad A, Reichmann F, Rademacher G, Heuer C & Klee W. Case control study to investigate risk factors for bovine neonatal pancytopenia (BNP) in young calves in southern Germany. *Prev Vet Med*, 2012, 105, 49-58.