

Behandlung von Rindern mit Bösartigem Katarrhalfieber mit Interleukin-2

U. Braun¹, M. Hässig¹, M. Previtali¹, M. Franchini², A. Vögtlin², A. K. Storset³, M. Ackermann²

¹Departement für Nutztiere und ²Institut für Virologie, Universität Zürich, ³Department of Food Safety and Infection Biology, Norwegen, School of Veterinary Science, Oslo

Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, an Bösartigem Katarrhalfieber (BKF) erkrankte Rinder mit IL-2 zu behandeln und den Krankheitsverlauf zu beschreiben. Die Untersuchung umfasste 10 gesunde Rinder (gesunde Kontrollen) und 22 Rinder mit BKF. Die 10 gesunden Kontrolltiere und 19 der Rinder mit BKF wurden mit 2 verschiedenen Dosen (2'500 U bzw. 25'000 U) Interleukin-2 (IL-2) behandelt. Drei Rinder mit BKF erhielten kein IL-2 (BKF-Kontrolltiere). Alle Tiere mit BKF erhielten zusätzlich Danofloxacin, Flunixin meglumin und Dauertropfinfusionen. Während 6 Tagen wurden täglich Blutproben für die hämatologische und blutchemische Untersuchung entnommen. Von den 19 mit IL-2 behandelten Tieren mussten infolge Verschlechterung des Zustands 13 euthanasiert werden. Von den ohne IL-2 behandelten Tieren überlebte keines. Bei 6 Rindern der Gruppe 2'500 U IL-2 kam es zu einer allmählichen Besserung. Die überlebenden Tiere wiesen von Beginn weg signifikant höhere Gesamtleukozytenzahlen auf als die nicht überlebenden. Der hauptsächliche Grund für die Leukopenie bei den nicht überlebenden Rindern war eine persistierende Lymphopenie. Da die IL-2-Therapie in ihrer tiefen Dosierung bei einigen Tieren mit BKF zur Heilung führte, kann diese Therapie bei wertvollen Tieren in Betracht gezogen werden, sofern zu Beginn eine genügend hohe Lymphozytenzahl vorliegt.

Schlüsselwörter: Rind, Bösartiges Katarrhalfieber, Interleukin-2, Leukopenie, Lymphopenie

Interleukin-2 for the treatment of cows with malignant catarrhal fever

The goal of this study was to investigate whether administration of interleukin-2 (IL-2) would improve the outcome of cows with malignant catarrhal fever (MCF). The study population consisted of ten healthy control cows and 22 cows with MCF. Nineteen cows with MCF and all of the controls were treated with either 2'500 U IL-2 or 25'000 U IL-2, administered intravenously. Three cows with MCF were not treated with IL-2 (MCF controls). All of the cows with MCF received danofloxacin, flunixin meglumine and intravenous fluid therapy. Blood samples for haematological and biochemical evaluation were collected once daily for six days in all cows. Of the 19 cows treated with IL-2, 13 were euthanized because of deterioration. All cows with MCF that did not receive IL-2 died. The clinical condition of six cows treated with 2'500 U IL-2 gradually improved. Surviving cows had significantly higher total leukocyte counts than cows that died or were euthanized. The main reason for leukopenia in non-surviving vs. surviving cows was persistent lymphopenia. Use of the lower IL-2 dose was associated with clinical recovery in some cows and this treatment might therefore be considered in valuable cows, provided that the lymphocyte count is within the reference interval.

Keywords: cattle, malignant catarrhal fever, interleukin-2, leukopenia, lymphopenia

DOI 10.17236/sat00002

Eingereicht: 04.02.2014
Angenommen: 19.03.2014

Einleitung

Das Schaf-assoziierte Bösartige Katarrhalfieber (BKF) wird durch das ovine Herpesvirus-2 (OvHV-2) verursacht (Russell et al., 2009). Beim Rind ist BKF meist durch einen hochfieberhaften und tödlichen Verlauf charakterisiert (Stöber, 2002; Radostits et al., 2007). Bei der Kopf- und Augenform des BKF fallen als spezielle Befunde mukopurulenter Nasenausfluss, erosive Verän-

derungen an Flotzmaul und Nase sowie in der Maulhöhle, Keratokonjunktivitis, Hornhauttrübung, Blepharospasmus und Stertor auf. Gelegentlich treten auch zentralnervöse Symptome (Mitchell und Scholes, 2009), Lymphadenopathie und Hautveränderungen (Munday et al., 2008) auf. Am lebenden Tier stützt sich die Diagnose auf die klinischen Befunde und den Nachweis viraler DNA von OvHV-2 mittels PCR im Blut (Müller-Doblies et al., 1998; Hüsey et al., 2001; Hüsey et al.,

Behandlung von Rindern mit Bösartigem Katarrhaleber mit Interleukin-2

U. Braun et al.

2002). Histopathologisch ist BKF charakterisiert durch Infiltration und Akkumulation von CD8-positiven Lymphozyten in verschiedenen Organen, was zu einer nicht-eitrigen Vaskulitis sowie zu Gewebenekrosen führt (Müller-Doblies et al., 2001b; Taus et al., 2006). BKF endet beim Rind fast immer tödlich (Müller-Doblies et al., 2001a; Stöber, 2002; Radostits et al., 2007). Eine wirksame, auf die Aetiologie gerichtete Therapie ist nicht bekannt (Russell et al., 2009). Empfohlen werden neben der Verabreichung von Breitband-Antibiotika und nicht-steroidalen Entzündungshemmern intravenöse Infusionen und Spülungen von Nase und Maulhöhle mit desinfizierenden Lösungen (Stöber, 2002). Nach Radostits et al. (2007) ist es allerdings unwahrscheinlich, dass eine Behandlung den Krankheitsverlauf beeinflusst. Grosse Hoffnung besteht in der Entwicklung von Vakzinen zur Kontrolle von BKF (Russell et al., 2009). Neuere Untersuchungen liessen die Hoffnung aufkommen, dass BKF evtl. mit Interleukin-2 (IL-2) erfolgreich behandelt werden kann (Meier-Trummer et al., 2009). Bei Rindern mit BKF wurde nämlich eine vorwiegend latente Infektion festgestellt, wobei genetische Loci des viralen Genoms transkriptionell aktiv blieben, welche nicht für Strukturproteine des Virus kodieren (Meier-Trummer et al., 2009; Palmeira et al., 2013). Gemäss des Wirts-Microarrays war bei der OvHV-2-Infektion das Interleukin-2-Gen signifikant unterdrückt. Interessanterweise führt eine IL-2-Defizienz beim Menschen, insbesondere was das histologische Bild betrifft, zu phänotypisch ähnlichen Krankheiten wie BKF (Sharpe et al., 1997). IL-2 ist ein Wachstumsfaktor für Lymphozyten, der die Bildung von sogenannten regulatorischen T-Zellen (Treg) fördert. Diese wiederum beenden eine bestehende Immunreaktion, sodass der Körper nicht unnötigerweise mit aktivierten Lymphozyten belastet wird. Ohne IL-2 fällt dieser Schutzmechanismus weg, und die aktivierten Zellen können sich unkontrolliert vermehren. Dies entspricht auch dem histopathologischen Bild von BKF und demjenigen von Mäusen mit gestörter IL-2-Regulation. Die Befunde lassen vermuten, dass eine Substitution von IL-2 den Krankheitsverlauf günstig beeinflussen kann. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, an BKF erkrankte Rinder mit IL-2 zu behandeln und den Krankheitsverlauf zu beschreiben.

Tiere, Material und Methoden

Tiere

Die vorliegende Untersuchung umfasste 10 gesunde Rinder (gesunde Kontrollen) und 22 Rinder, welche an der Kopf- und Augenform von BKF erkrankt waren.

Gesunde Kontrollrinder

Zehn gesunde Kühe dienten als Kontrolltiere, um abzuklären, ob IL-2 zu Komplikationen führt. Je 5 davon

wurden intravenös (i. v.) mit 2'500 U bzw. 25'000 U IL-2 behandelt.

An BKF erkrankte Rinder ohne IL-2-Behandlung (BKF-Kontrolltiere)

Drei an BKF erkrankte Rinder dienten als BKF-Kontrollen. Sie wurden ausser mit IL-2 gleich wie die übrigen an BKF erkrankten Rinder behandelt (s. unten).

An BKF erkrankte Rinder mit IL-2-Behandlung

19 an BKF erkrankte Rinder wurden zusätzlich mit IL-2 behandelt. Die intravenös verabreichte Dosis betrug 2'500 U (n = 13) bzw. 25'000 U IL-2 (n = 6).

Klinische Untersuchung und Diagnose

Alle Tiere wurden initial und danach täglich klinisch untersucht. Zudem wurde eine Harnprobe mittels Teststreifens (Combur9-Test, Roche, Basel) untersucht. Die klinischen Befunde wurden in der Dissertation von Previtali (2013) im Detail beschrieben. Die Diagnose BKF wurde gestellt, wenn die für BKF typischen Symptome (Stöber, 2002; Radostits et al., 2007) vorhanden waren und in der Blutprobe OvHV-2-DNA nachgewiesen werden konnte.

Laboruntersuchungen

Bei jedem Tier wurden vom Tag 1 bis zum Tag 6 Blutproben (EDTA und heparinisiertes Blut) für hämatologische und blutchemische Untersuchungen entnommen. Die hämatologische Untersuchung umfasste die Bestimmung von Hämatokrit, Leukozytenzahl, Gesamtprotein und Fibrinogen im EDTA-Blut. Im Weiteren wurde ein Differentialblutbild angefertigt. Die blutchemischen Untersuchungen beinhalteten die Bestimmung von Bilirubin, Harnstoff, Kalzium, anorganischem Phosphor, Magnesium, Natrium, Chlorid und Kalium. Zudem wurden die Aktivitäten der Enzyme γ -Glutamyltransferase (γ -GT), Aspartat-Aminotransferase (ASAT) und Creatin-Kinase (CK) bestimmt, und es wurde eine venöse Blutgasanalyse durchgeführt. Vor Beginn der experimentellen Untersuchungen wurde von jedem Tier eine Blutprobe mittels real-time PCR auf virale DNA des OvHV-2 getestet (Hüssi et al., 2001). Diese musste positiv sein, damit das Tier in die Untersuchungen aufgenommen wurde.

Therapie

Alle an BKF erkrankten Tiere wurden während 6 Tagen über einen Jugularvenenkatheter mit täglich 10 l NaCl-Glukose-Lösung (50 g Glukose und 9 g Natriumchlorid/l) im Dauertropf behandelt. Zur Vermeidung von Thrombophlebitis wurde der Katheter nach 72 Stunden gewechselt. Vom Tag 1 bis zum Tag 5 wurden die Tiere täglich mit Danofloxacin (Advocid® 2.5%, Zoetis, Zürich), 1.25 mg/kg KGW, i. v. behandelt. Bei

14 davon erfolgte die Danofloxacinbehandlung wegen anhaltenden Fiebers über 6 bis 11 Tage. Darüber hinaus wurde von Tag 1 bis 3 täglich Flunixin meglumin (Flunixin[®], Gräub, Bern), 2.2 mg/kg KGW, i. v. verabreicht. Die Serumelektrolyte wurden täglich kontrolliert und gezielt supplementiert (Details siehe Previtali, 2013). Rinder mit Augensymptomen wurden täglich mit einer Oxytetracyclin-haltigen Salbe (Oxytetracyclin-Augensalbe Jenapharm[®], Mibe GmbH Arzneimittel, Brehna) und Prednisolon-haltigen Augentropfen (Pred Forte[®], Allergan AG, Pfäffikon) behandelt.

Für die Behandlung mit IL-2 wurde ein bovines rekombinantes IL-2 verwendet (von A. K. Storset hergestellt). Das IL-2 war in Dosen von 2'500 U und 25'000 U tiefgefroren und wurde unmittelbar vor der Verwendung aufgetaut. Die zu behandelnden Kühe wurden während 5 Tagen einmal täglich mit 2'500 U (n = 13) bzw. 25'000 U IL-2 (n = 6) i. v. behandelt. Nach der IL-2-Verabreichung wurden die Tiere während 15 Minuten überwacht, um allfällige Nebenwirkungen wie Urtikaria, Tachykardie, Tachypnoe u. a. zu erkennen.

Vergleich der überlebenden und nicht überlebenden Rinder

Die klinischen Befunde und die Blutbefunde der überlebenden und nicht überlebenden Tiere wurden miteinander verglichen.

Statistik

Die statistische Auswertung wurde mit dem Programm Stata (Stata Corp., Stata Statistical Software: Release 11; College Station, Texas, USA) durchgeführt. Die Überprüfung auf Normalverteilung erfolgte mit dem Shapiro-Wilk-W-Test. Bei Normalverteilung wurden die Ergebnisse als Mittelwerte \pm Standardabweichungen, bei nicht normalverteilten Werten als Medianwerte, 10- und 90% Perzentilen angegeben. Unterschiede zwischen den überlebenden und nicht überlebenden Tieren wurden bei normalverteilten Werten mittels ANOVA, bei nicht normalverteilten Werten mittels Mann-Whitney-Test auf Signifikanz geprüft. Im Weiteren wurde ein generalisiertes lineares Modell (general linear model, GLM) angewendet, um die Variablen auf signifikante Veränderungen im Verlauf der Untersuchung zu prüfen. Das zugrundeliegende Stata Modell lautete <xtmixed Variable Tiergruppe Zeit || Zeit:, covariance(independent)> oder nur für einzelne Tiergruppen <xtmixed Variable Tiergruppe Zeit if Tiergruppe == x | Tiergruppe == y, || Zeit:, covariance(independent)>. Kaplan-Meier-Überlebensanalysen wurden mit dem Cox Proportional Hazards Regression Model ausgewertet (<stcox Tiergruppe>). Zusätzlich wurde, mittels einer logistischen Regression, die Odds Ratio berechnet (<logistic Censor Variable>). P-Werte von ≤ 0.05 wurden als signifikant angesehen.

Ethik und Tierversuche

Für die Untersuchungen lag eine Tierversuchsbewilligung des kantonalen Veterinäramts Zürich vor. Aus ethischen Gründen wurde darauf verzichtet, eine Gruppe BKF-kranker Rinder nicht mit Flunixin meglumin zu behandeln.

Ergebnisse

Gesunde Kontrolltiere

Das Allgemeinbefinden dieser Tiere war während der gesamten Untersuchungsdauer ungestört und ihre Vitalparameter waren im Normalbereich (Details siehe Previtali, 2013).

An BKF erkrankte Rinder ohne IL-2-Behandlung (BKF-Kontrolltiere) (n = 3)

Die 3 BKF-Rinder ohne IL-2-Behandlung mussten infolge Verschlechterung des Zustands alle euthanasiert werden.

An BKF erkrankte Rinder mit IL-2-Behandlung (n = 19)

Das Allgemeinbefinden war bei allen 19 Tieren gestört. Die rektale Temperatur betrug 39.3 ± 0.8 °C, die Herzfrequenz 79.3 ± 10.9 Schläge/Min. und die Atemfrequenz 26.4 ± 6.3 Atemzüge/Min. Die Pansenmotorik war bei 7 Tieren aufgehoben. Drei Tiere wiesen Durchfall auf. Im Weiteren wurden die folgenden Befunde beobachtet: Schleimiger bis eitriger Nasenausfluss (n = 16), Speicheln und Augenausfluss (n = 13), beidseitige Korneatrübung (n = 14), Erosionen an Gingiva (n = 12) und Nasenschleimhaut (n = 6), Ataxie (n = 1), Nystagmus (n = 1), Hämaturie (n = 17), Proteinurie (n = 18).

Im Verlauf der 6-tägigen Behandlung verminderte sich die Zahl der Kühe mit aufgehobener Fresslust bei den mit 2'500 U IL-2 behandelten Tieren vom Tag 1 bis zum Tag 6 von 8 auf 4, während sie bei den mit 25'000 U behandelten Tieren am Tag 6 mit 5 Tieren unverändert war. In Bezug auf die Pansenatonie zeigte sich bei den Kühen der Gruppe 2'500 U IL-2 kaum eine Besserung (Tag 1: 5 Kühe; Tag 6: 4 Kühe), während sich die Zahl der Kühe mit Pansenatonie bei der Gruppe 25'000 U sogar verdoppelte (von 2 auf 4). Das Vorhandensein von eitrigem Nasenausfluss nahm von 8 auf 9 zu. Bei der Gruppe 2'500 U IL-2 nahm die Zahl der Tiere mit Speichelfluss innerhalb der 6 Tage ab (von 7 auf 3), während sie bei der Gruppe 25'000 U leicht anstieg (von 3 auf 4). Die Zahl der Tiere mit Tränenfluss nahm in beiden Gruppen ab (von 11 auf 8), während sich diejenige mit Korneatrübung nicht änderte. Bei der Gruppe 2'500 U IL-2 nahm der Anteil der von Erosionen an Flotzmaul und Gingiva betroffenen Tiere ab (von 7 auf 3), bei der Gruppe 25'000 U nahm er zu (von 4 auf 5). Bei den 2 Tieren, die schon

Behandlung von Rindern mit Bösartigem Katarrhfieber mit Interleukin-2

U. Braun et al.

Behandlung von Rindern mit Bösartigem Katarrhal-fieber mit Interleukin-2

U. Braun et al.

bei der Einlieferung neurologische Symptome aufwiesen, wurden diese im Verlauf der Behandlung stärker. Zudem kam es im Verlauf der Behandlung bei weiteren 4 Tieren jeder Gruppe zu neurologischen Symptomen.

Von den 19 mit IL-2 behandelten Tieren mussten infolge weiterer Verschlechterung des Zustands 13 euthanasiert werden, davon 7 von 13 aus der Gruppe 2'500 U IL-2 und alle 6 der Gruppe 25'000 U IL-2. Die Euthanasie erfolgte 5 bis 15 Tage nach Behandlungsbeginn. Die Euthanasiehäufigkeit unterschied sich zwischen den beiden Gruppen signifikant ($P < 0.05$).

Bei 6 Rindern der Gruppe 2'500 U IL-2 kam es zu einer allmählichen Besserung des Zustands. Die rektale Temperatur sank innerhalb von 10 Tagen in den Normalbereich. Alle nahmen ab dem dritten Tag wieder Futter

auf und die Erosionen heilten langsam ab. Zwei von diesen Tieren hatten nie Korneatrübung gezeigt, 2 Tiere zeigten eine Heilung der Augenveränderungen 3 bzw. 6 Tage nach Behandlungsbeginn und 2 Tiere wurden ohne eine komplette Heilung der Augensymptome entlassen und durch den Besitzer bis zur Heilung weiterbehandelt. Die Entlassung der 6 Tiere erfolgte nach 7 bis 17 Tagen. Während 5 Tiere gesund blieben, erkrankte eine Kuh im folgenden Jahr erneut und wurde dann euthanasiert.

Hämatologische und biochemische Blutbefunde bei den Kühen mit BKF

Die Blutuntersuchungen ergaben als relevante Befunde bei 10 von 22 untersuchten BKF-Tieren eine Leukopenie und bei je 18 Kühen Hypokalzämie, Hypomagnesiämie und Hypokaliämie (Tab. 1).

Tabelle 1: Hämatologische und blutchemische Befunde und Blutgasanalysen bei 22 Kühen mit Bösartigem Katarrhal-fieber am Tag der Erstuntersuchung.

Parameter (Mittelwert ± Standardabweichung)	Befunde	Anzahl Kühe
Hämatologische Parameter		
Hämatokrit (n = 22) (Median = 31.5%)	Normal (30–35%) Erniedrigt (23–29%) Erhöht (36–47%)	10 7 5
Leukozytenzahl (n = 22) (5454 ± 2968/μl)	Normal (5000–10'000/μl) Erniedrigt (1600–3900/μl) Erhöht (10'100–11'500/μl)	10 10 2
Gesamtprotein (n = 22) (67.3 ± 4.72 g/l)	Normal (60–80 g/l)	22
Fibrinogen (n = 22) (6.77 ± 2.09 g/l)	Normal (4–7 g/l) Erniedrigt (2 g/l) Erhöht (8–12 g/l)	13 1 8
Blutchemische Parameter		
Bilirubin (n = 21) (Median = 7.8 μmol/l)	Normal (1.5–6.5 μmol/l) Erniedrigt (0.6–1.3 μmol/l) Erhöht (6.7–40.0 μmol/l)	6 3 12
Harnstoff (n = 21) (Median = 4.6 mmol/l)	Normal (2.4–6.5 mmol/l) Erniedrigt (1.8) Erhöht (7.8–12.8 mmol/l)	15 1 5
Kalzium (n = 21) (2.17 ± 0.13 mmol/l)	Normal (2.3–2.6 mmol/l) Erniedrigt (1.8–2.2 mmol/l)	3 18
Anorganischer Phosphor (n = 21) (1.60 ± 0.53 mmol/l)	Normal (1.3–2.4 mmol/l) Erniedrigt (0.5–1.2 mmol/l)	16 5
Magnesium (n = 21) (0.71 ± 0.09 mmol/l)	Normal (0.8–1.0 mmol/l) Erniedrigt (0.5–0.78)	3 18
Natrium (n = 21) (143.57 ± 3.78 mmol/l)	Normal (145–155 mmol/l) Erniedrigt (136–144 mmol/l)	11 10
Chlorid (n = 21) (99.10 ± 7.27 mmol/l)	Normal (96–105 mmol/l) Erniedrigt (82–95 mmol/l) Erhöht (106–108 mmol/l)	12 5 4
Kalium (n = 21) (3.5 ± 0.55 mmol/l)	Normal (4.0–5.0 mmol/l) Erniedrigt (2.4–3.9 mmol/l)	3 18
γ-GT (n = 21) (Median = 18 U/l)	Normal (9–30 U/l) Erhöht (87 U/l)	20 1
ASAT (n = 21) (Median = 102 U/l)	Normal (20–103 U/l) Erhöht 113–1466 U/l)	11 1
Venöse Blutgasanalyse pH (n = 21) (7.45 ± 0.04)	Normal (7.41–7.45) Erniedrigt (7.34–7.40) Erhöht (7.46–7.50)	5 5 11
Basenabweichung (n = 21) (6.55 ± 4.63 mmol/l)	Normal (–2 to +2) Erhöht (3.4 to 17.4)	4 17

Vergleich der Befunde bei den überlebenden und nicht überlebenden Tieren

Die rektale Temperatur der 6 überlebenden Tiere war am Tag 1 signifikant niedriger als diejenige der 16 nicht überlebenden (39.0 ± 0.42 vs. 39.5 ± 0.92 °C; $P < 0.01$). Ebenso unterschieden sich die überlebenden und nicht überlebenden Tiere am Tag 1 in Bezug auf die Fresslust (aufgehobene Fresslust bei 33 vs. 88%) und die Pansenmotorik (Pansenatonie bei 0 bzw. 50%) signifikant ($P < 0.05$). Bei allen anderen Befunden waren die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen nicht signifikant.

Die folgenden Blutparameter (Mittelwerte) unterschieden sich bei den 6 überlebenden und den 16 nicht überlebenden Rindern am Tag 1 signifikant: Gesamtleukozyten (7.6 vs. $4.8 \times 10^3/\mu\text{l}$, $P < 0.01$, Tab. 2, Abb. 1), Lymphozyten (3.5 vs. $1.9 \times 10^3/\mu\text{l}$, Abb. 2), segmentkernige Leukozyten (3.4 vs. $2.4 \times 10^3/\mu\text{l}$). Von den überlebenden Rindern wies kein Tier und von den nicht überlebenden Rindern wiesen 10 Tiere (69%) eine Leukopenie (< 4000 Leukozyten/ μl) auf. Weder bei den überlebenden noch bei den nicht überlebenden Tieren kam es im Verlauf der 6-tägigen Beprobung zu einer signifikanten Veränderung der Gesamtleukozytenzahl (Abb. 1). Als hauptsächliche Gründe für die Leukopenie bei den nicht überlebenden Tieren wurden signifikant ($P < 0.01$) tiefere Zahlen der Lymphozyten und der segmentkernigen Granulozyten festgestellt. Alle nicht überlebenden Tiere wiesen eine Lymphozytenzahl zwischen 0.2 und 3.0, alle überlebenden eine solche zwischen 3.1 und $5.0 \times 10^3/\mu\text{l}$ Blut auf (Abb. 2). Bei den segmentkernigen Granulozyten war die Trennung zwischen überlebenden und nicht überlebenden Tieren weniger scharf (Abb. 3). Im Gegensatz zu den segmentkernigen Granulozyten war die Zahl der stabkernigen Granulozyten bei den nicht überlebenden Tieren signifikant höher ($P < 0.01$) als bei den überlebenden (0.02 vs. $0 \times 10^2/\mu\text{l}$ Blut, Medianwert). Weder bei den überlebenden noch bei den nicht überlebenden Tieren kam es im Verlauf der 6-tägigen Beprobung zu einer signifikanten Veränderung der Lymphozyten- und segmentkernigen Granulozytenzahlen (Tab. 2). Die meisten übrigen Blutparameter waren während der 6-tägigen Untersuchung bei beiden Gruppen im Normalbereich (Harnstoff, Kalium,

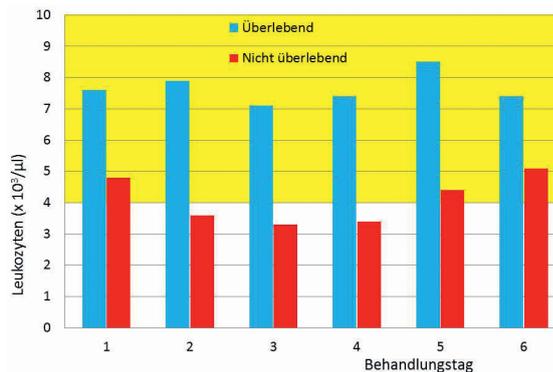


Abbildung 1: Verlauf der Gesamtleukozytenzahlen bei den 6 überlebenden und 16 nicht überlebenden, an BKF erkrankten Rindern an den Tagen 1 bis 6 (Mittelwerte). Die gelb markierte Fläche stellt den Normalbereich der Leukozyten (Weiser, 2006) zwischen 4 und $10 \times 10^3/\mu\text{l}$ Blut dar.

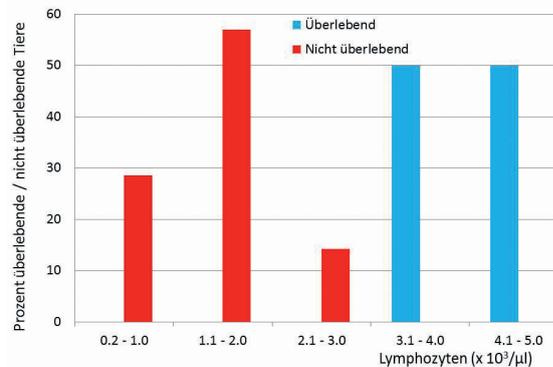


Abbildung 2: Häufigkeitsverteilung der Lymphozyten bei 6 überlebenden und 16 nicht überlebenden, an BKF erkrankten Rindern am Tag 1.

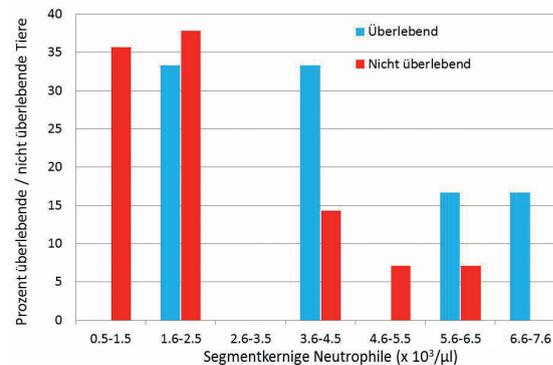


Abbildung 3: Häufigkeitsverteilung der segmentkernigen Granulozyten bei 6 überlebenden und 16 nicht überlebenden, an BKF erkrankten Rindern am Tag 1.

Tabelle 2: Verlauf der Gesamtleukozyten, der Segmentkernigen Neutrophilen und der Lymphozyten bei 6 überlebenden und 16 nicht überlebenden Rindern mit BKF vom Tag 1 bis zum Tag 6 (Mittelwerte \pm Standardabweichungen)

Parameter	Überleben/ Nicht überleben	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6
Leukozyten ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	Überleben	7.6 ± 2.3	7.9 ± 3.1	7.1 ± 2.7	7.4 ± 2.3	8.5 ± 1.8	7.4 ± 2.6
	Nicht überleben	4.8 ± 2.6	3.6 ± 1.8	3.3 ± 1.2	3.4 ± 1.2	4.4 ± 1.5	5.1 ± 2.7
Segmentkernige Neutrophile ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	Überleben	3.4 ± 1.7	3.2 ± 2.2	2.7 ± 1.8	2.7 ± 1.6	3.6 ± 1.8	3.2 ± 2.1
	Nicht überleben	2.4 ± 1.9	1.3 ± 1.1	1.2 ± 0.7	1.5 ± 0.9	2.0 ± 1.2	2.8 ± 1.9
Lymphozyten ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	Überleben	3.5 ± 0.8	4.0 ± 0.9	3.6 ± 1.5	3.7 ± 0.8	4.0 ± 1.3	3.5 ± 0.9
	Nicht überleben	1.9 ± 1.4	1.8 ± 1.1	1.8 ± 0.8	1.7 ± 0.8	2.0 ± 1.1	1.9 ± 0.9

Behandlung von Rindern mit Bösartigem Katarrhalfieber mit Interleukin-2

U. Braun et al.

GLDH, SDH). Bei den nicht überlebenden Tieren waren die Kalzium- und Magnesiumkonzentrationen minimal erniedrigt und die Bilirubinkonzentrationen minimal erhöht. Die Aktivität des Muskelenzyms CK war dagegen bei beiden Gruppen erhöht, wobei die nicht überlebenden Tiere eine signifikant höhere CK als die überlebenden aufwiesen.

Diskussion

Die Versuchsanordnung in der vorliegenden Arbeit erlaubt drei Angriffspunkte. Erstens war die BKF-Kontrollgruppe (keine IL-2-Behandlung) mit 3 Tieren relativ klein. Zweitens waren die mit den 2 verschiedenen Dosen IL-2 behandelten Gruppen unterschiedlich gross (13 vs. 6 Tiere). Drittens wurden aus ethischen Gründen alle Tiere mit BKF zusätzlich mit schmerzlindernden, entzündungshemmenden Medikamenten behandelt (Flunixin), sodass nicht ausgeschlossen werden kann, dass ein günstiger Verlauf zumindest zum Teil auch der Kombination von IL-2 und Flunixin zugeschrieben werden kann. Die Begründung für die kleine BKF-Kontrollgruppe liegt darin, dass die Tiere aus ethischen Gründen möglichst optimal behandelt werden sollten. Ausserdem war aus der Literatur (Stöber, 2002; Radostits et al., 2007; Russell et al., 2009) und aus eigenen Untersuchungen (Egli, 2000; Müller-Doblies et al., 2001a) bereits bekannt, dass die Überlebensrate von Rindern mit BKF sehr klein ist und zwischen 5% (Müller-Doblies et al., 2001a) und 9.5% (Egli, 2000) liegt. Die Begründung für die ungleich grossen IL-2-Behandlungsgruppen liegt darin, dass bei der höheren Dosierung mit zunehmender Pansenatonie und steigender Zahl von Schleimhauterosionen das Gegenteil des erhofften Effekts eintrat und zweitens der verfügbare Vorrat an IL-2 limitiert war. Von 22 insgesamt mit IL-2 behandelten Tieren überlebten 6 Tiere (27.3%), die alle mit der niedrigeren Dosis behandelt worden waren. Diese immer noch schlechte Erfolgsrate ist bei einer Krankheit mit fast immer tödlichem Verlauf sehr beachtenswert. Berücksichtigt man nur die günstige Behandlungsdosis, dann steigt der Prozentsatz der erfolgreich behandelten Tiere sogar auf nahezu 50% (6 von 13). Der Erfolg der IL-2-Therapie liegt möglicherweise darin, dass bei denjenigen Tieren mit einer relativ hohen Lymphozytenzahl zu Behandlungsbeginn immer noch genügend Zielzellen, insbesondere aktivierbare Treg, vorhanden waren und dass IL-2 bei diesen Tieren die noch vorhandenen Treg dazu anregen konnte, die überschüssige Immunreaktion abzdämpfen und damit die Heilung einzuleiten. Ähnliche Beobachtungen wurden bei Mäusen mit IL-2-Defizienz erhoben (Almeida et al., 2002). Interessant war, dass von den mit der hohen IL-2-Dosis (25'000 U) behandelten Rindern kein Tier überlebte, während bei der 10-fach geringeren Dosis fast 50% gerettet werden konn-

ten. Leider existieren in der Literatur keine klaren Hinweise auf die therapeutische Bandbreite von IL-2 bei Rindern. IL-2 findet beim Menschen insbesondere bei der Behandlung verschiedener Tumoren Gebrauch, wobei unterschiedliche Dosierungen kontrovers diskutiert werden (Dougan und Dranoff, 2009). Bei einer hohen Dosierung mit bis zu 20×10^6 U pro Tag wurde vorübergehend ein starkes Absinken der Lymphozyten im Blut festgestellt. Nach dem Absetzen der Therapie stiegen die Lymphozytenzahlen allerdings über das normale Mass hinaus an. Diese Kompensation fand aber sehr langsam, über mehrere Wochen hinweg statt. Die bei Tumoren günstige Wirkung der hochdosierten IL-2-Therapie erfolgte also erst im Laufe von Wochen. Erklärt wurde dieser Verlauf durch ein Abtöten der (überstimulierten) Treg als Folge einer zu hohen IL-2-Gabe, sodass die unerwünschte Wirkung der Treg bei der Tumorbekämpfung wegfiel. In Analogie dazu könnte die relativ hohe IL-2-Gabe bei den BKF-Rindern die letzten noch verfügbaren Treg überstrapaziert haben, sodass diese abgetötet wurden und sich der Krankheitsverlauf nicht zum Besseren wenden konnte. Bei der niedrigen Dosierung (Bruchteil der hohen Dosierung) beim Menschen wurde eine viel mildere Wirkung erzielt, wobei aber insbesondere natürliche Killerzellen mitstimuliert wurden, welche die anti-Tumor-Wirkung günstig beeinflussten. In Analogie wird für BKF vermutet, dass die IL-2-Dosis ebenfalls eine wichtige Rolle spielt. Gemäss den vorliegenden Ergebnissen existiert eine therapeutische Bandbreite, innerhalb welcher IL-2 unter gewissen, noch nicht völlig verstandenen Voraussetzungen, zu einem günstigen Krankheitsverlauf führt.

Interessant war der Vergleich der verschiedenen Parameter bei den überlebenden und nicht überlebenden Tieren. Bei den initialen klinischen Symptomen waren es die höhere rektale Temperatur, die häufigere komplett aufgehobene Fresslust und die häufigere Pansenatonie bei den nicht überlebenden Tieren. Die höhere Aktivität des Muskelenzyms CK bei den nicht überlebenden Tieren kann mit dem häufigen Liegen dieser Tiergruppe infolge stark gestörten Allgemeinbefindens erklärt werden. Bei den Blutbefunden stellte sich jedoch als wichtigster Unterschied zwischen den überlebenden und nicht überlebenden Rindern die Leukopenie heraus. Von den 6 überlebenden Rindern wies kein einziges eine Leukopenie auf, während dies bei 10 von 16 nicht überlebenden Rindern der Fall war. Die Leukopenie wurde hauptsächlich durch eine Lymphopenie und im Weiteren durch eine Granulozytopenie der Segmentkernigen verursacht. Eine über Tage anhaltende Leukopenie mit gleichzeitiger Linksverschiebung, wie sie bei den nicht überlebenden Rindern vorherrschte, ist prognostisch immer vorsichtig zu beurteilen. Der Grad der Lymphopenie zu Behandlungsbeginn trennte klar zwischen den nicht überlebenden und den überlebenden Tieren. Tie-

re mit weniger als 2.5×10^3 Lymphozyten/ μl Blut überlebten in keinem Fall, während solche mit über 3.0×10^3 / μl Blut immer überlebten. Diese Beobachtung unterstützt die aufgrund der vorliegenden Untersuchungen neu formulierte Hypothese, dass für eine erfolgreiche IL-2-Behandlung bei BKF eine genügende Anzahl von Zielzellen (Treg) verfügbar sein muss. Es wird vermutet, dass die Lymphopenie das direkte Ergebnis der viralen Infektion war, da akute virale Infektionen zu Lymphopenie führen (Weiser, 2006). Bei Rindern mit BKF dürfte der Mechanismus der viralen Infektion darin liegen, dass es in einer Reihe von Geweben zur Akkumulation von Lymphozyten kommt (Russell et al., 2009) und diese deshalb im Blut fehlen. Ebenfalls denkbar ist es, dass die Lymphopenie eine Folge der Zerstörung des lymphoiden Gewebes durch dysregulierte zy-

totoxische Lymphozyten darstellt (Russell et al., 2009). Letzteres könnte auch der Grund dafür sein, dass die Lymphopenie bei den betroffenen Rindern über die ganze Untersuchungszeit anhielt.

Behandlung von Rindern mit Bösartigem Katarrhal-fieber mit Interleukin-2

U. Braun et al.

Schlussfolgerung

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass eine niedrig dosierte IL-2-Therapie bei 6 Tieren mit BKF mit einer Heilungstendenz verbunden war. Bei wertvollen Tieren kann deshalb eine IL-2-Therapie in Betracht gezogen werden, sofern sie keine Leukopenie aufweisen. Vermutlich liegt der Schlüssel für das Überleben sowohl bei der Leukozytenzahl zu Behandlungsbeginn als auch bei der Höhe der IL-2-Dosierung.

Traitement de la fièvre catarrhale maligne des bovins avec l'interleucine-2

Le but du présent travail était de traiter des bovins atteints de fièvre catarrhale maligne avec de l'interleucine-2 (IL-2) et de décrire le cours de la maladie. L'étude englobait 10 bovins en bonne santé (contrôles sains) et 22 bovins atteints de fièvre catarrhale maligne. Les 10 animaux de contrôle et 19 bovins atteints ont été traités avec deux doses différentes d'IL-2 (2'500 U respectivement 25'000 U). Trois animaux atteints n'ont pas reçu d'IL-2 (animaux de contrôle atteints). Tous les animaux atteints de fièvre catarrhale maligne ont reçu en outre de la danofloxacin, de la flunixinine méglumine et des perfusions. Durant 6 jours, des prises de sang journalières pour analyses hématologiques et chimiques ont été effectuées. Treize des dix-neuf animaux traités à l'IL-2 durent être euthanasiés au vu de la dégradation de leur état. Aucun des animaux traités sans IL-2 n'a survécu. Chez 6 animaux du groupe traité avec 2'500 U IL-2 une amélioration progressive s'est produite. Les animaux survivants montraient dès le début un nombre total de leucocytes significativement plus élevé que ceux qui n'ont pas survécu. La raison principale de la leucopénie chez les animaux qui n'ont pas survécu était une lymphopénie persistante. Dans la mesure où un traitement à l'IL-2 à basse dose a conduit à la guérison chez quelques animaux atteints de fièvre catarrhale maligne, on peut considérer cette thérapie pour des animaux de valeur, pour autant que le nombre de lymphocytes soit suffisamment élevé au départ.

Terapia del bestiame affetto da febbre catarrale maligna con interleuchina 2

Lo scopo di questo studio è di trattare la febbre catarrale maligna (BKF) nei bovini malati con IL-2 e di descrivere il decorso della malattia. Lo studio comprendeva 10 bovini sani (controllo sani) e 22 bovini affetti da BKF. Ai 10 bovini del gruppo di controllo e ai 19 con BKF sono state somministrate 2 dosi differenti (2'500 U risp. 25'000 U) di interleuchina 2 (IL-2). Tre bovini affetti da BKF non hanno ricevuto IL-2 (animali di controllo BKF). A tutti gli animali affetti da BKF sono state inoltre somministrate infusioni per via endovenosa di danofloxacin, flunixinina meglumina. Durante 6 giorni sono stati prelevati campioni di sangue per l'esame ematologico e chimico. Dei 19 animali trattati con IL-2, 13 sono stati eutanasiati a causa del deterioramento dello stato di salute. Tra quelli non trattati con IL-2 nessuno è sopravvissuto. In 6 animali del gruppo 2'500 U IL-2, c'è stato un graduale miglioramento. Gli animali sopravvissuti mostravano dall'inizio un numero totale di leucociti significativamente più elevato di quelli non sopravvissuti. La ragione principale per la leucopenia nei bovini non sopravvissuti era una linfopenia persistente. Poiché la terapia con IL-2 nel dosaggio inferiore ha condotto alla guarigione di alcuni animali affetti da BKF, questa terapia può venire considerata per animali pregiati, a condizione che all'inizio della terapia ci sia un sufficientemente elevato numero di linfociti.

Behandlung von Rindern mit Bösartigem Katarrhalfeieber mit Interleukin-2

U. Braun et al.

Literatur

- Almeida A. R., Legrand N., Papiernik M., Freitas A. A.:* Homeostasis of peripheral CD4+ T cells: IL-2R alpha and IL-2 shape a population of regulatory cells that controls CD4+ T cell numbers. *J. Immunol.* 2002, 169: 4850–4860.
- Dougan M., Dranoff G.:* Immune Therapy for Cancer. *Annu. Rev. Immunol.* 2009, 27: 83–117.
- Egli J.:* Analyse der Leukozytenpopulationen im Blut von Rindern mit Bösartigem Katarrhalfeieber mit Hilfe von hämatologischen und durchflusszytometrischen Untersuchungen. Dissertation, Universität Zürich, 2000.
- Hüssy D., Stäuber N., Leutenegger C. M., Rieder S., Ackermann M.:* Quantitative fluorogenic PCR assay for measuring ovine herpesvirus 2 replication in sheep. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2001, 8: 123–128.
- Hüssy D., Janett F., Albini S., Stäuber N., Thun, R., Ackermann M.:* Analysis of the pathogenetic basis for shedding and transmission of ovine gamma herpesvirus 2. *J. Clin. Microbiol.* 2002, 40: 4700–4704.
- Meier-Trummer C. S., Rehrauer H., Franchini M., Patrignani A., Wagner U., Ackermann M.:* Malignant catarrhal fever of cattle is associated with low abundance of IL-2 transcript and a predominantly latent profile of ovine herpesvirus 2 gene expression. *PLoS One* 2009, 4: e6265.
- Mitchell E. S., Scholes S. F.:* Unusual presentation of malignant catarrhal fever involving neurological disease in young calves. *Vet. Rec.* 2009, 164: 240–242.
- Müller-Doblies U. U., Li H., Hauser B., Adler H., Ackermann M.:* Field validation of laboratory tests for clinical diagnosis of sheep-associated malignant catarrhal fever. *J. Clin. Microbiol.* 1998, 36: 2970–2972.
- Müller-Doblies U. U., Egli J., Li H., Braun U., Ackermann M.:* Bösartiges Katarrhalfeieber in der Schweiz: 1. Teil: Epidemiologie. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 2001a, 143: 173–183.
- Müller-Doblies U. U., Egli J., Hauser B., Li H., Strasser M., Ehrensperger F., Braun U., Ackermann M.:* Bösartiges Katarrhalfeieber in der Schweiz: 2. Teil: Evaluation der Diagnostik. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 2001b, 143: 581–591.
- Munday J. S., French A. F., Smith A., Wang J., Squires R. A.:* Probable malignant catarrhal fever presented as transient generalised crusting dermatitis in a cow. *N. Z. Vet. J.* 2008, 56: 89–93.
- Palmeira L., Sorel O., Van Campe W., Boudry C., Roels S., Myster F., Reschner A., Coulie P. G., Kerkhofs P., Vanderplaschen A., Dewals B. G.:* An essential role for γ -herpesvirus latency-associated nuclear antigen homolog in an acute lymphoproliferative disease of cattle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2013, 110: E1933–1942.
- Previtali M.:* Behandlung von Kühen mit Bösartigem Katarrhalfeieber mit Interleukin-2. Dissertation, Universität Zürich, 2013.
- Radostits O. M., Gay C. C., Hinchcliff K. W., Constable P. D.:* Malignant catarrhal fever (bovine malignant catarrh, malignant head catarrh). In: *Veterinary Medicine. A Textbook of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs, and Goats.* Saunders Elsevier, Philadelphia, 2007, 1245–1248.
- Russell G. C., Stewart J. P., Haig D. M.:* Malignant catarrhal fever: a review. *Vet. J.* 2009, 179: 324–335.
- Sharfe N., Dadi H. K., Shahar M., Roifman C. M.:* Human immune disorder arising from mutation of the alpha chain of the interleukin-2 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997, 94: 3168–3171.

Stöber M.: Bösartiges Katarrhalfeieber. In: *Innere Medizin und Chirurgie des Rindes.* Hrsg. G. Dirksen, H.-D. Gründer, M. Stöber. Parey Buchverlag, Berlin, 2002, 1217–1221.

Taus N. S., Oaks J. L., Gailbreath K., Traul D. L., O'Toole D., Li, H.: Experimental aerosol infection of cattle (*Bos taurus*) with ovine herpesvirus 2 using nasal secretions from infected sheep. *Vet. Microbiol.* 2006, 116: 29–36.

Weiser G.: Interpretation of leucocyte responses in disease. In: *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry.* Eds. M. A. Thrall, D. C. Baker, T. W. Campbell, D. DeNicola, M. J. Fettman, E. D. Lassen, A. Rebar, G. Weiser. Blackwell Publishing, Ames, Iowa, 2006, 135–148.

Korrespondenz

Ueli Braun
 Departement für Nutztiere
 Winterthurerstrasse 260
 8057 Zürich
 Fax: +41 (0)44 635 89 04
 E-Mail: ubraun@vetclinics.uzh.ch