

M.H. Erhard
U. Lösch
M. Stangassinger

Untersuchungen zur intestinalen Absorption von homologem und heterologem Immunglobulin G bei neugeborenen Kälbern

Studies of intestinal absorption of homogeneous and heterogeneous immunoglobulin G in newborn calves

Zusammenfassung Im Rahmen einer Untersuchung zur prophylaktischen Wirksamkeit von spezifischen Dotterantikörpern bei erregurbedingten Kälberdurchfällen wurde auch die Absorption der unspezifischen heterologen aviären Dotterantikörper (cIgG) und deren Wirkung auf die Aufnahme von maternalen bovinen Kolostrumantikörpern (bIgG) überprüft. Zwei Gruppen von neugeborenen Kälbern wurde sprühgetrocknetes Volleipulver ab der ersten Tränke in einer Dosierung entweder von 16 g oder von 8 g pro Tag während der ersten 10 Lebenstage verabreicht. Eine dritte Gruppe diente als Kontrolle und erhielt kein Eipulver. Von insgesamt 123 Kälbern (5 bis 10 Kälber pro Entnahmezeitpunkt) wurden 6, 12, 24, 48, 72 bzw. 96 Stunden post

natum Blutproben genommen. Bei beiden Eipulverdosierungen wurden die höchsten Hühner-IgG-Konzentrationen (3,1 µg bzw. 1,2 µg pro ml Serum) jeweils 12 Stunden post natum ermittelt. Diese cIgG-Konzentrationen nahmen danach kontinuierlich auf Konzentrationen von 1,1 µg bzw. 0,2 µg pro ml Serum zum Zeitpunkt 96 Stunden post natum ab. Bezogen auf die mit der ersten Tränke verabreichte bIgG- bzw. cIgG-Menge wurde überschlagsweise zum Zeitpunkt 6te Lebensstunde eine Anflutung im Blut von 23 % (bIgG) bzw. von 7 % und 6 % (cIgG) errechnet. Der zeitliche Verlauf (6te bis 96te Stunde) der Konzentration des bovinen IgGs in den Blutproben war vergleichsweise stabil und lag durchschnittlich bei 5,9 mg pro ml Serum, wobei das Plateau bereits nach 6 Stunden erreicht war. Signifikante Unterschiede zwischen den bIgG-Werten der Kälber, die Dotterantikörper bekamen (6,2 bzw. 6,1 mg pro ml Serum), und denen der Kontrollgruppe (5,4 mg pro ml Serum) waren nicht zu beobachten. Eipulver kann somit offensichtlich zur Prophylaxe bei neugeborenen Kälbern ohne Beeinträchtigung der Absorption der kolostralen Antikörper verabreicht werden. Allerdings muß bei einer Eipulververgabe mit der ersten Tränke auch mit einer Absorption von aviären Dotterantikörpern gerechnet werden.

Summary Studying the prophylactic effects of specific yolk antibodies against diarrhea in newborn calves, also the intestinal absorption of unspecific heterogeneous avian antibodies as well as their effects on the uptake of maternal bovine colostral antibodies (bIgG) was investigated. Two groups of newborn calves received egg powder (16 g or 8 g per day) for the first 10 days of their life beginning with the first meal. A third group was kept as a control without any egg powder in their diet. Blood samples (5 to 10 calves per sampling time) were taken from 123 calves at 6, 12, 24, 48, or 96 h postnatally. With both doses the highest chicken IgG (cIgG) levels (3.1 µg resp. 1.2 µg per ml serum) have been measured 12 h after birth. These concentrations decreased continuously to the levels of 1.1 µg resp. 0.2 µg cIgG per ml serum at 96 h postnatally. The uptake into blood at 6 h postnatally has roughly been estimated as approximately 23 % (bIgG) and 7 % resp. 6 % (cIgG) of the IgG dosages given with the first meal. The time-course (6 to 96 h) of the bIgG level in blood was quite stable, plateauing already after 6 h at a mean of 5.9 mg per ml serum. Significant differences between the bIgG levels of calves with yolk antibodies in their diet (6.2 resp. 6.1 mg bIgG per ml serum) and those of the control group (5.4 mg

Eingegangen: 14. Oktober 1994
Akzeptiert: 15. Februar 1995

Dr. M.H. Erhard (✉) · U. Lösch
M. Stangassinger
Institut für Physiologie
Physiologische Chemie und Tierernährung
der Ludwig-Maximilians-Universität
München
Veterinärstraße 13
80539 München

per ml serum) could not be observed. Obviously, the prophylactic use of egg powder in newborn calves has no negative effect on the absorption of colostral antibodies. However, with the feeding of chicken egg yolk antibodies already with the first meal also the absorption of avian antibodies has to be taken into consideration.

Schlüsselwörter Immunglobulin G – Dotterantikörper – Intestinale Absorption – Kalb

Key words Immunoglobulin G – yolk antibodies – intestinal absorption – calf

Abkürzungen

Bovines Immunglobulin G (bIgG),
Hühner Immunglobulin G (cIgG),
Immunglobulin G (IgG),
Körpergewicht (KG), Stunde (h)

Einleitung

Zur Therapie und Prophylaxe der Neugeborenenendiarrhoe des Kalbes werden in letzter Zeit auch Eipulver mit spezifischen Antikörpern gegen verschiedenste Erreger eingesetzt (3, 5). Während für das Auftreten von infektionsbedingten Durchfällen die lokale intestinale Verfügbarkeit von spezifischen Antikörpern entscheidend ist, wird ein Schutz vor neonatalen Allgemeininfektionen bei Ungulaten vorwiegend über die kolostrale Zufuhr von maternalen Antikörpern, insbesondere von bovinem Immunglobulin G (bIgG), erzielt.

Orientiert man sich am bisherigen prophylaktischen Einsatz von Eipulver bei Durchfallerkrankungen, so können bis zu 250 mg aviäres IgG (cIgG) pro Hühnerei (7) dem Kalb zusätzlich zum homologen kolostralen IgG zugeführt werden. Nachdem Michanek et al. (8) die Resorption von heterologen Makromolekülen beim Kalb an einigen Beispielen unter Laborbedingungen zeigen konnten, sollte ausgehend vom praktischen Einsatz von Eipulver bei der Neugeborenenendiarrhoe im Rahmen dieser Studie geklärt werden, in welchem Umfang cIgG vom Kalb absorbiert wird, und ob dabei möglicherweise die Absorption des homologen kolostralen IgGs beeinflusst wird.

Material und Methoden

Für die Untersuchungen standen 123 Kälber aus 20 landwirtschaftlichen Betrieben zur Verfügung. Die Kälber wurden auf 3 Gruppen verteilt, wobei den Kälbern von 2 Gruppen bereits mit der ersten Kolostrumaufnahme, die innerhalb der ersten 3 Lebensstunden erfolgte, Volleipulver in Dosierungen von 16 g bzw. 8 g pro Kalb und Tag verabreicht wurden. Das Eipulver wurde täglich morgens und abends in die Tränke eingemischt und den Kälbern in den ersten 10 Lebenstagen angeboten. Eine Gruppe erhielt kein Eipulver und diente somit als Kontrollgruppe. Blutproben wurden Kälbern zu den Zeiten 6, 12, 24, 48, 72 bzw. 96 Stunden nach der Geburt und zwar von jeweils 5 bis 10 Kälbern pro Entnahmezeitpunkt gewonnen. Jedes der 123 Kälber lieferte dabei nur eine Blut-

probe. In einer zusätzlichen Gruppe mit 6 Kälbern wurde das Eipulver (8 g pro Tag) erst ab der 12. Lebensstunde über die Tränke verabreicht. Die Blutproben wurden 12 Stunden später entnommen.

Die cIgG-Konzentrationen im Eipulver und in den Kälberseren wurden mittels ELISA bestimmt (3). Die Seren wurden dazu 1:20 vorverdünnt (in PBS, pH 7,8) und in einer log₂-Verdünnung eingesetzt.

Bovines IgG (bIgG) wurde mittels des nachfolgend beschriebenen Sandwich ELISA gemessen: ELISA-Platten (Maxisorb, Nunc^R, Wiesbaden) wurden mit Kaninchen-anti-Rind-IgG (Sigma, Deisenhofen) in einer Konzentration von 5 µg pro ml Carbonatpuffer (pH 9,6) beschichtet (100 µl/Kavität) und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach der Blockierung mit 0,5 % Gelatine (in PBS pH 7,2; 200 µl/Kavität; 1 h bei 37 °C; Serva, Heidelberg) wurden die Serumproben 1:1 000 vorverdünnt (in PBS-T, pH 7,2) aufgetragen (50 µl/Kavität; 1 h bei 37 °C). Als Standard diente Rinder IgG (Sigma, Deisenhofen) log₂-verdünnt ab 1 µg pro ml. In einem weiteren Inkubationsschritt (1 h bei 37 °C) wurde als Konjugat an Peroxidase gekoppeltes Kaninchen-anti-Rind-IgG (1:50 000; 50 µl/Kavität; Sigma, Deisenhofen) eingesetzt. Als Substrat diente Tetramethylbenzidin (0,2 mg/ml 0,1 molaren Acetat-Citrat-Puffer, pH 5, mit 0,0005 % H₂O₂; 100 µl/Kavität). Nach 10 Minuten wurde die Enzymreaktion mit 1 molarer H₂SO₄ abgestoppt (50 µl/Kavität) und die Konzentrationen über die Extinktionen bei 450 nm mittels ELISA-Reader (EAR 400 AT, SLT-Labinstruments, Overath) ausgewertet.

Ergebnisse

Die 123 Seren der auf 3 Gruppen aufgeteilten Kälber wiesen einen relativ stabilen bIgG-Gehalt auf (5,9 mg/ml Serum), wobei in den Gruppen ein Wert von 5,7, 4,5 und 6,4 mg bIgG pro ml Serum bereits 6 Stunden post natum erreicht wurde. Die Mittelwerte in den einzelnen Gruppen lagen unabhängig von den Entnahmezeitpunkten bei Konzentrationen zwischen 3,5 und 7,4 mg bIgG pro ml Serum. Signifikante Unterschiede im bIgG-Gehalt der Seren

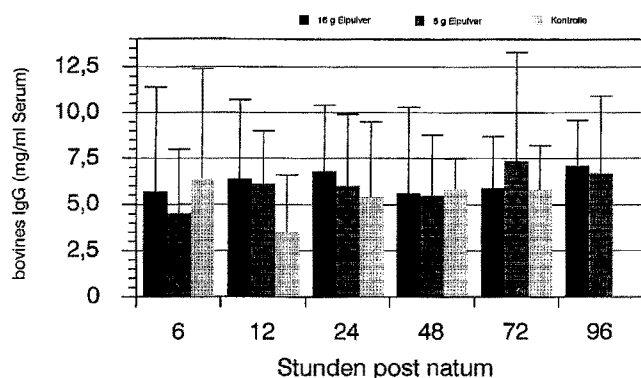


Abb. 1 Bovine IgG-Konzentrationen ($\bar{x} \pm SD$) in den Seren der 123 Kälber ($n = 5-10$ pro Zeitpunkt und Gruppe) 6, 12, 24, 48, 72 und 96 Stunden post natum. Die Kälber erhielten zusätzlich zum Kolostrum 16 g bzw. 8 g Eipulver pro Tag. Eine Gruppe (Kontrolle) blieb unbehandelt. Von jedem Kalb wurde nur *eine* Blutprobe genommen. Bei der Kontrollgruppe wurde 96 Stunden post natum keine Probe getestet.

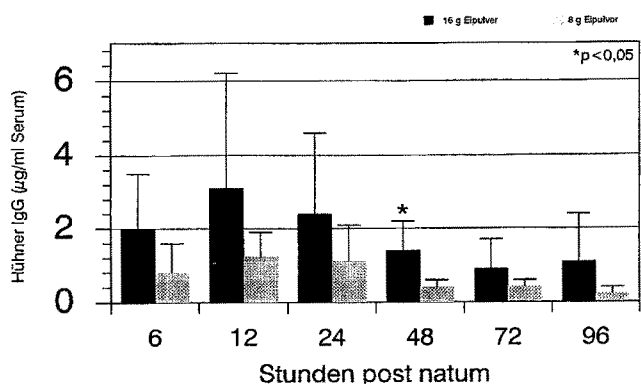


Abb. 2 Hühner IgG-Konzentrationen ($\bar{x} \pm SD$) in den Seren der 87 Kälber ($n = 5-10$ pro Zeitpunkt und Gruppe) zu den Zeitpunkten 6, 12, 24, 48, 72 und 96 Stunden post natum. Die Kälber erhielten zusätzlich zum Kolostrum 16 g bzw. 8 g Eipulver pro Tag. Von jedem Kalb wurde nur *eine* Blutprobe genommen (* $p < 0,05$ (bezogen auf die Dosierungen); *t*-Test).

von Kälbern, die 16 g Eipulver (durchschnittlich 6,2 mg bIgG/ml) bzw. 8 g Eipulver (6,1 mg bIgG/ml) bekamen, und in den Seren der Kontrollkälbern, (durchschnittlich 5,4 mg bIgG/ml) ergaben sich nicht. Die bIgG-Konzentrationen wiesen im gesamten Untersuchungszeitraum keine signifikanten Abweichungen auf (Abbildung 1).

In den Seren der behandelten Kälber konnte bereits 6 Stunden post natum Hühner IgG (cIgG) nachgewiesen werden. Die höchsten cIgG-Konzentrationen im Serum (3,1 μ /ml bei der 16-g-Dosis pro Tag und 1,1 μ /ml bei der 8-g-Dosis pro Tag) traten zum Zeitpunkt 12 Stunden post natum auf. Danach nahmen die cIgG-Konzentrationen auf Werte von 1,1 μ g bzw. 0,2 μ g/ml bis zum Zeitpunkt 96 Stunden nach der Geburt ab (Abbildung 2).

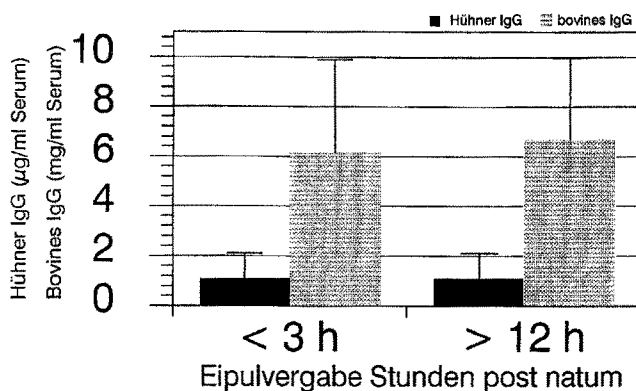


Abb. 3 Vergleich der Hühner IgG-Konzentrationen und der Konzentrationen an bovinem IgG in den Kälberseren ($\bar{x} \pm SD$). Die Kälber erhielten in unterschiedlichen Gruppen 8 g Eipulver pro Tag beginnend mit der erstmaligen Verabreichung in den ersten 3 Lebensstunden ($n = 7$) bzw. erst ab der 12ten Lebensstunde ($n = 6$). Die Blutproben wurden jeweils 24 h post natum entnommen.

Ein Vergleich der Kälber, die Eipulver (8 g pro Kalb und Tag) beginnend mit der ersten Mahlzeit in den ersten 3 Lebensstunden fortlaufend erhielten, mit denen, die das Eipulver erst ab der 12ten Lebensstunde zu sich nahmen, zeigte bezüglich der cIgG- und bIgG-Konzentrationen im Serum zum Zeitpunkt 24 Stunden post natum keine signifikanten Unterschiede. So lag in beiden Gruppen die cIgG-Konzentration jeweils bei einem Wert von 1,1 μ g pro ml Serum. Die bIgG-Konzentrationen betrugen 6,0 und 6,6 mg pro ml Serum (Abbildung 3).

Diskussion

Für die Ausprägung einer passiven Immunität bei neugeborenen Kälbern ist die Absorption kolostraler maternalen Antikörper von entscheidender Bedeutung. In der vorliegenden Arbeit wurde die Absorption von kolostralen sowie aviären Antikörpern nach prophylaktischer Gabe von Volleipulver untersucht.

Die durchschnittliche bIgG-Konzentration im bovinen Kolostrum wurde mit rund 57 g/l angegeben (10). Nach 6 Lebensstunden dürfte ein Kalb in der Regel einen Liter Kolostrum aufgenommen haben, so daß von dem darin zur Verfügung gestellten kolostralen bIgG unter Einbeziehung der vorliegenden Serumwerte überschlagsweise eine Gesamtmenge von 13 g IgG im Blut wiederzufinden wäre (angenommen wurde dabei ein Körpergewicht (KG) von 45 kg, ein Blutanteil von 8 % des KGs, ein Hämatokrit von 40 und ein bIgG-Gehalt von 6 mg/ml Serum). Ergänzend zu diesen homologen maternalen Antikörpern wurden den behandelten Kälbern mit der ersten Tränke auch 60 mg heterologes aviäres IgG (bei 8 g Eipulver pro Tränke) bzw. 30 mg cIgG (bei 4 g Eipulver pro Tränke) verabreicht. Das entspricht bei einer cIgG-Konzentration von 2,0 μ g cIgG/ml Serum (8 g Eipulver/Trän-

ke) bzw. 0,8 µg cIgG/ml Serum (4 g Eipulver/Tränke) zum Zeitpunkt 6 Stunden post natum und nach analoger Überschlagsrechnung (s.o.) einem Gesamtgehalt von 4,4 mg cIgG bzw. 1,8 mg cIgG im Blut der Tiere. Bei der Gegenüberstellung der relativen Wiederfindungsraten des zugeführten bovinen und aviären IgG im Blut zum Zeitpunkt 6 Stunden post natum konnte für das homologe bIgG ein deutlich höherer Wert (23 %) als für das heterologe cIgG (7 % bzw. 6 %) ermittelt werden. Berücksichtigt man, daß nach Sasaki et al. (9) der intravasale und der extravasale IgG-Pool in etwa die gleiche Größenordnung einnehmen, so entspricht die daraus resultierende relative endogene Gesamtverfügbarkeit des bIgGs von 46 % durchaus den Werten von Boyd and Boyd (1), die für die „scheinbare“ Absorptionsrate ebenfalls einen Wert von 46 % mit gepoolten Kolostrum experimentell ermittelten. Die Ermittlung des tatsächlich absorbierten bIgGs setzt voraus, daß der Anteil der endogenen Proteolyse und des renalen Proteinverlustes bekannt ist.

Das Fehlen eines signifikanten Unterschiedes in den Anflutungskonzentrationen des homologen und heterologen IgGs in den Seren der Kälber (siehe Abbildung 1 und 2) läßt vermuten, daß speziesgleiches IgG nicht wesentlich schneller absorbiert werden kann als beispielsweise Hühner IgG. Klobasa et al. (6) ermittelten bei neugeborenen Ferkeln deutlichere Unterschiede in der Absorption von heterologem und homologem IgG.

Desweiteren war in der vorliegenden Untersuchung festzustellen, daß die Konzentration des bIgG während der ersten Lebenstage auf relativ konstantem Niveau blieb. Michanek et al. (8) wiesen dagegen in den ersten 3 Lebenstagen einen geringgradigen Anstieg nach und zwar ausgehend von einem Basiswert nach 8 Lebensstunden von circa 6 mg IgG pro ml Kälberserum. Nach einer

Woche waren aber auch in dieser Studie die Basiswerte wieder erreicht. Demgegenüber ergab die vorliegende Untersuchung, daß die aviären IgG-Konzentrationen bereits ab der 12ten Lebensstunde wieder kontinuierlich abnahmen. Zunehmende spezifische Metabolisierungs- und Exkretionsvorgänge und/oder eine rascher abklingende Absorptionsrate für heterologe Antikörper (zumindest nach der 12ten Lebensstunde) könnten dafür ursächlich sein.

Wie bereits von Deutsch und Schmith (2) beschrieben, ist mit einer Absorption von Immunglobulinen bis zu 48 Stunden post natum grundsätzlich zu rechnen. Ausgehend von den in der vorliegenden Untersuchung identischen cIgG-Konzentrationen zum Zeitpunkt 24 Stunden post natum dürfte trotz zeitlich versetztem Applikationsbeginn (bis zur 3ten bzw. ab der 12ten Lebensstunde) die Absorptionskapazität zumindest während der ersten 24 Lebensstunden auch für heterologe Antikörper als stabil bezeichnet werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß heterologes aviäres IgG, das infolge einer oralen prophylaktischen Eipulvergabe in den ersten Lebensstunden verabreicht wird, von Kälbern in den ersten Lebensstunden absorbiert wird, und zwar in Abhängigkeit zur über die Tränke vorgelegten Menge an cIgG. Die Anflutung der maternalen bovinen Kolostrumantikörper im Blut der Kälber blieb davon unbeeinflusst.

Danksagung

Die Autoren danken Herrn Dr. Lothar Lux für die Entnahme der Blutproben und Frau Birgit Bartoldus für die technische Hilfe sehr herzlich.

Literatur

1. Boyd JW, Boyd AJ (1987) Computer model of the absorption and distribution of colostral immunoglobulins in newborn calf. *Res Vet Sci* 43:291–296
2. Deutsch HF, Smith VR (1957) Intestinal permeability to proteins in the newborn herbivore. *Am J Physiol* 191:271–276
3. Erhard MH, von Quistorp I, Schraner I, Jüngling A, Kaspers B, Schmidt P, Kühmann R (1992) Development of specific enzyme-linked immunosorbent antibody assay systems for the detection of chicken immunoglobulin G, M, and A using monoclonal antibodies. *Poultry Sci* 71:302–310
4. Erhard MH, Kellner J, Eichelberger J, Lösch U (1994) Neue Möglichkeiten in der oralen Immunprophylaxe der Neugeborenenendiarthrose des Kalbes – ein Feldversuch mit spezifischen Eiantikörpern. *Berl Münch Tierärztl Wschr* 106:383–387
5. Ikemori Y, Kuroki M, Peralta R, Yokoyama H, Kodama Y (1992) Protection of neonatal calves against fatal enteric colibacillosis by administration of egg powder from hens immunized with K99-piliated enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Am J Vet Res* 53:2005–2008
6. Klobasa F, Werhahn E, Habe F (1991) Untersuchungen über die Absorption der kolostralen Immunglobuline bei neugeborenen Ferkeln. III Mitteilung: Einfluß der Verabreichungsdauer der Kolostralmilch. *Berl Münch Tierärztl Wschr* 104:223–227
7. Lösch U, Schraner I, Wanke R, Jürgens L (1986) The chicken egg, an antibody source. *J Vet Med B* 33:609–619
8. Michanek P, Ventorp M, Weström B (1989) Intestinal transmission of macromolecules in newborn dairy calves of different ages at first feeding. *Res Vet Sci* 46:375–379
9. Sasaki M, Davis CL, Larson BL (1976) Production and turnover of IgG1 and IgG2 immunoglobulins in the bovine around parturition. *J Dairy Sci* 59:2046–2055
10. Tizard IR (1987) Immunity in the fetus and newborn. In: *Veterinary immunology*. Sanders Company, Philadelphia, pp 171–184