

Mastitt hos storfe: genrespons hos immunceller (makrofager) fra NRF okser når de blir utsatt for *Staphylococcus aureus* bakterier.

ANNA LEWANDOWSKA-SABAT¹, ANNE STORSET², BJØRG HERINGSTAD^{3,4}, INGRID OLSAKER¹

¹Institutt for basalfag og akvamedisin, NVH, ²Institutt for mattrygghet og infeksjonsbiologi, NVH, ³Geno SA, ⁴IHA, UMB

Bakgrunn

Mastitt er den vanligst forekommende sykdommen hos melkeku og kan gi store økonomiske tap for den enkelte gårdbruker. Bedre kontroll med denne sykdommen har betydning både for økonomien i melkeproduksjonen, for reduksjon av antibiotikabruk og for bedre dyrevelferd. Mastitt er en infeksjonssykdom i juret. Mange forhold som f. eks. forekomst av bakterier, hygiene i fjøset og kuas motstandskraft påvirker sykdomsutviklingen. Hos storfe er de vanligste mastittbakteriene *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* og *Escherichia coli* (Günther *et al.* 2009). I Norge står *Staph. aureus* for ca 55% av tilfellene av kliniske og subkliniske jurinfeksjoner (Østerås *et al.* 2006). Monocytt og makrofager er kritiske effektorer og regulatorer av betennelse og fungerer som førstelinje i medfødt forsvar mot invaderende patogener (Serbina *et al.* 2008). I melkekjertler hos storfe er lokal rekruttering og aktivitet av makrofager en viktig komponent i jur stroma, en essensiell immunologisk forsvarsmekanisme mot infeksjon. Ved å utskille CXC kjemokiner tiltrekker makrofagene polymorfonukleære leukocytter (PMNs), som f. eks. nøytrofile celler. Disse har en sentral funksjon i motstand mot infeksjonssykdommer. Det har blitt vist at rask rekruttering av PMNs fra blodbanen til stedet med infeksjon er viktig for forløpet og utfallet av smittsomme sykdommer, inkludert mastitt (Burvenich *et al.* 1994, Seiler *et al.* 2000). CXC kjemokiner er ansvarlig for rekruttering av nøytrofiler til vev ved betennelse og infeksjon (Kobayashi 2006). I tillegg er det vist at vitamin D-avhengige antimikrobielle responser i humane monocytt er påvirket av varianter av *GC* genet (Chun *et al.* 2010). *CYP27B1* (cytokrom P450, familie 27, underfamilie B polypeptid 1; 1 α -OHase) er et enzym som omdanner vitamin D og det er nylig vist at mengden av *CYP27B1* blir oppregulert i storfemakrofager som respons på *S. uberis* infeksjon *in vivo* (Nelson *et al.* 2010).

Målet med denne studien var å teste om makrofagers respons på levende *S. aureus* i et *in vitro* system har noen sammenheng med avlsverdier for mastitt hos NRF-okser. Oksene ble plukket ut basert på avlsverdi for klinisk mastitt (CM). Disse avlsverdiene er beregnet basert på fenotypiske registreringer av veterinærbehandlet klinisk mastitt hos oksens døtre. Makrofager fra totalt 22 okser med lav og høy avlsverdi ble testet for uttrykk av genene *IL-8* (interleukin-8), *CXCL1* (chemokine C-X-C motif ligand 1), *CXCL2*, *CXCL3*, *CXCL6*, *IGJ* (immunoglobulin J), *GC* (vitamin D binding protein) og *CYP27B1*.

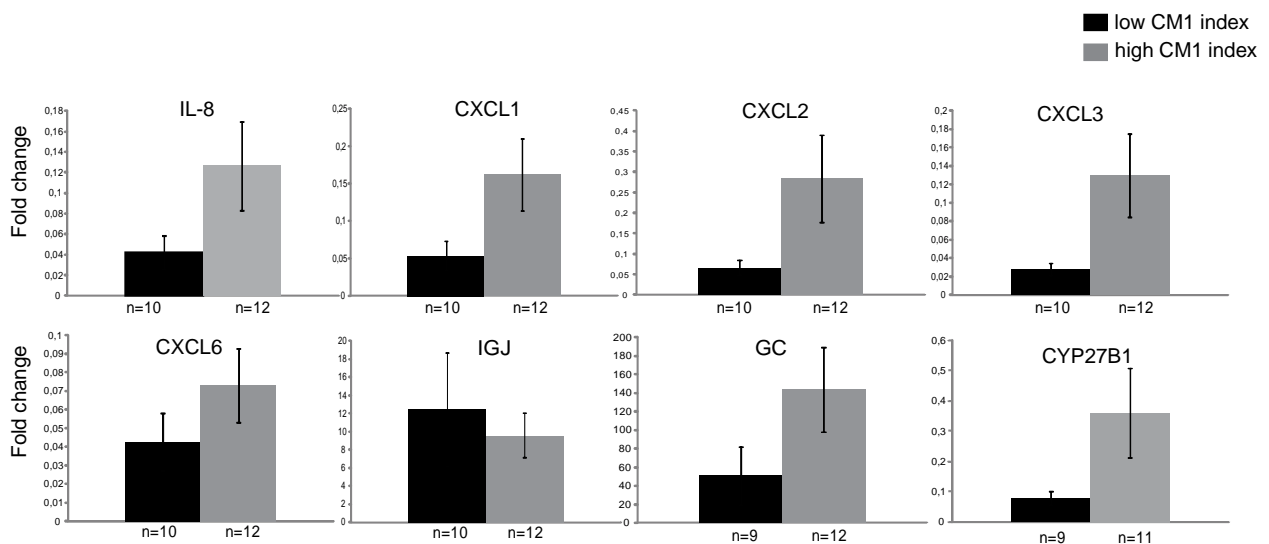
Resultater og foreløpige konklusjoner

Vi fant signifikant forskjell i genuttrykk for *IL-8*, *CXCL1*, *CXCL2*, *CXCL3* og *CYP27B1* (one-way ANOVA; $p \leq 0,1$) hos makrofager fra okser med høy i forhold til okser med lav CM avlsverdi. Oksene med høy avlsverdi for klinisk mastitt hadde signifikant høyere genuttrykk enn oksene med lav avlsverdi, i respons til *S. aureus* infeksjon (Figur 1). Dette kan tyde på at kyr med større motstandskraft mot mastitt svarer raskere på en *S. aureus* infeksjon med økt uttrykk av cytokiner enn midtre motstandsdyktige kyr.

Det har blitt vist at *S. aureus* lipoteichonsyre (LTA), som er et av de viktigste patogen-assosierte molekylene hos Gram-positive bakterier, induserer utskillelse av cytokiner som *IL-8*, *CXCL1*, *CXCL2* og *CXCL3* i melkekjertler hos storfe (Rainard *et al.* 2008). Disse cytokinene påvirker nøytrofile granulocytter. Infusjon av melkekjertler med LTA var tilstrekkelig til å forårsake massiv tilstrømning av nøytrofile celler i melk. Formålet med tilstrømningen av nøytrofile celler basert på kjemotaksi er å bekjempe betennelser, men denne immunresponsen kan også føre til skader i melkekjertelen (Zhao og Lacasse, 2008). I tillegg er det påvist signifikant sammenheng mellom varianter av reseptoren for IL-8 (*CXCR1*), forekomst av subklinisk mastitt og funksjonell aktivitet av nøytrofile celler hos Holsteinkyr (Youngerman *et al.* 2004; Rambeaud og Pighetti 2005, Rambeaud *et al.* 2006). Alt dette peker på at rekruttering av nøytrofiler er viktig i forbindelse med mastittinfeksjon. Det er sannsynlig at responsen på *S. aureus* infeksjon hos NRF dyr med økt motstand mot mastitt er forbundet med høyere rate av tiltrekningsmidler (cytokiner) utskilt fra makrofager og dermed høyere rekruttering av nøytrofile celler til infeksjonsstedet. Denne hypotesen må imidlertid testes med studier av cellefunksjon.

Nylige rapporter viser at vitamin D signalveien kan medvirke til å øke kuas forsvar mot bakteriell infeksjon (Nelson *et al.* 2010, Lippolis *et al.* 2011). Vi har funnet økt *CYP27B1* uttrykk hos okser med høy avlsverdi i forhold til okser med lav avlsverdi for mastitt, noe som bekrefter betydningen av *CYP27B1* i vitamin D mediert respons på *S. aureus* i forbindelse med mastitt. Muligens kan forhøyet uttrykk av *CYP27B1*, som funnet hos okser med høye avlsverdier for CM, bety økt vitamin D mediert immunrespons mot bakteriell infeksjon i forbindelse med mastitt, styrt av *GC* varianter. Men denne hypotesen må verifiseres eksperimentelt.

Vi har identifisert gener som kan være viktig for å kontrollere motstandsevne mot mastitt. Dette kan potensielt brukes i avlsarbeidet for å velge okser som gir døtre med bedre motstandsevne mot klinisk mastitt forårsaket av *S. aureus*.



Figur 1. Forskjeller i genuttrykk hos makrofager fra okser med lav og høy avlsverdi for mastitt. Verdiene er gitt som graden av endring hos makrofager utsatt for *S. aureus* i forhold til ustimulerte kontrollceller. CM1 - klinisk mastitt i første laktasjon (fra 15 dager før til 30 dager etter kalving). *IL-8* (interleukin-8), *CXCL1* (chemokine CXC motiv ligand 1), *CXCL2*, *CXCL3*, *CXCL6*, *IGJ* (immunglobulin J), *GC* (vitamin D-bindende protein) og *CYP27B1* (cytokrom P450, familie 27, underfamilie B, polypeptid 1). Feilfelt representerer SE, n - antall okser inkludert i analysene.

Referanser

Burvenich, C., Paape, M.J., Hill, A.W., Guidry, A.J., Miller, R.H., Heyneman R., Kremer, W.D. og Brand A., 1994. Role of the neutrophil leukocyte in the local and systemic reactions during experimentally induced *E. coli* mastitis in cows immediately after calving. *Veterinary Quarterly* 16, 45–50.

Chun, R.F., Lauridsen, A.L., Suon, L., Zella, L.A., Pike, J.W., Modlin, R.L., Martineau, A.R., Wilkinson, R.J., Adams, J. og Hewison, M., 2010. Vitamin D-binding protein directs monocyte responses to 25-hydroxy- and 1,25-dihydroxyvitamin D. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 95, 3368–3376.

Günther, J., Koczan, D., Yang, W., Nürnberg, G., Reipsilber, D., Schuberth, H.J., Park, Z., Maqbool, N., Molenaar, A. og Seyfert H.M., 2009. Assessment of the immune capacity of mammary epithelial cells: comparison with mammary tissue after challenge with *Escherichia coli*. *Veterinary Research* 40, 31.

Kobayashi, Y., 2006. Neutrophil infiltration and chemokines. *Critical Reviews in Immunology* 26, 307–316.

Lippolis, J.D., Reinhardt, T.A., Sacco, R.A., Nonnecke, B.J. og Nelson, C.D., 2011. Treatment of an intramammary bacterial infection with 25-hydroxyvitamin D(3). *PLoS One* 6:e25479.

Nelson, C.D., Reinhardt, T.A., Beitz, D.C. og Lippolis, J.D., 2010. In vivo activation of the intracrine vitamin D pathway in innate immune cells and mammary tissue during a bacterial infection. *PLoS One* 5, e15469.

Rainard, P., Fromageau, A., Cunha, P. og Gilbert, F.B., 2008. *Staphylococcus aureus* lipoteichoic acid triggers inflammation in the lactating bovine mammary gland. *Veterinary Research* 39, 52.

Rambeaud, M., Clift, R. og Pighetti, G.M., 2006. Association of a bovine CXCR2 gene polymorphism with neutrophil survival and killing ability. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 15, 231–238.

Rambeaud, M. og Pighetti, G.M., 2005. Impaired neutrophil migration associated with specific bovine CXCR2 genotypes. *Infection and Immunity* 73, 4955–4959.

Seiler, P., Aichele, P., Raupach, B., Odermatt, B., Steinhoff, U. og Kaufmann, H.E., 2000. Rapid neutrophil response controls fast-replicating intracellular bacteria but not slow-replicating *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Infectious Diseases* 181, 671–680.

Serbina, N.V., Jia, T., Hohl, T.M., og Pamer, E.G., 2008. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annual Reviews of Immunology* 26, 421–452.

Youngerman, S.M., Saxton, A.M., Oliver, S.P. og Pighetti, G.M., 2004. Association of CXCR2 polymorphisms with subclinical and clinical mastitis in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 87, 2442–2448.

Zhao, X. og Lacasse, P., 2008. Mammary damage during mastitis: causes and control. *Journal of Animal Science* 86, 57–68.

Østerås, O., Kruse, H., Sølverød, L., Gjestvang, J. og Mørk, T., 2006. Nordic view concerning mastitis pathogen resistance. *Proceedings NMC 45th Annual Meeting, Tampa, Florida*.