

ZWISCHENBERICHT ZUM START-UP PROJEKT:**Immunological responses of the ovine immune system following experimental challenge with *Mycoplasma agalactiae***

Profillinie 2

Projekt Nr. 1668–B05

Genehmigt in der Sitzung vom 16. November 2006

Ziel dieses Projektes ist es, die Immunreaktionen von Schafen nach einer lokalen Infektion mit *M. agalactiae* zu dokumentieren.

Zur Abklärung dieser Fragestellungen haben wir uns an 2 experimentelle Studien an Schafen angeschlossen, die vom Institut für Bakteriologie im Rahmen des FWF Projektes P18668-B05 (Dr. W. Jechlinger, Dr. J. Spargser, O. Univ. Prof. Dr. Dr. habil. R. Rosengarten: Bedeutung der Vpma Oszillation unter in vivo Bedingungen im natürlichen Wirt und Regulation der xer1 Rekombinase) durchgeführt wurden. Die Tierversuche waren folgendermaßen aufgebaut:

Tierversuch 1

Gruppe	n	Inoculum	Dosierung	Applikation
Phase-locked Mutants	5	Gemisch von 3 phaseninvarianten Mutanten	$3,4 \times 10^8$ CFU jeder Mutante in 120 μ l PFS	intraoculär rechts
Positivkontrolle	5	<i>M. agalactiae</i> PG2	10^9 CFU in 120 μ l PFS	intraoculär rechts
Negativkontrolle	5	isotone Kochsalzlsg.	120 μ l PFS	intraoculär rechts

Tierversuch 2

Gruppe	n	Inoculum	Dosierung	Applikation
Phase-locked Mutants	5	Gemisch von 3 phaseninvarianten Mutanten	$3,4 \times 10^8$ CFU jeder Mutante in 120 μ l PFS	intramam. rechts
Positivkontrolle	5	<i>M. agalactiae</i> PG2	10^9 CFU in 120 μ l PFS	intramam. rechts
Negativkontrolle	5	isotone Kochsalzlsg.	120 μ l PFS	intramam. rechts

Die Durchführung des 1. Tierversuches (intraokunktivale Infektion) war für den Herbst 2006 geplant, der Folgeversuch (intramammäre Infektion) war für Juni 2007 vorgesehen. Allerdings konnten die Tierversuche erst vor genau einem Jahr (**1. Tierversuch: 25. Mai bis 22. Juni 2007**) bzw. Juli/August (**2. Tierversuch: 19. Juli bis 24. August 2007**) durchgeführt werden. Die für den 1. Tierversuch vorgesehenen Tiere hatten sich nämlich während der Alpung im Sommer 2006 mit *M. conjunctivae* infiziert. Durch die Beschaffung neuer Lämmer verzögerte sich die Durchführung des 1. Tierversuches um 7 Monate, der 2. Tierversuch wurde dann unmittelbar an den ersten anschließend durchgeführt.

1. Durchführung der Tierversuche

Beide Tierversuche verliefen nach Plan. Im 1. Tierversuch gab es, wie erwartet, mit Ausnahme der Ausbildung einer folliculären Konjunktivitis, kaum klinische Veränderungen. Während des Versuches erfolgte die Dokumentation des klinischen Verlaufes (inkl. IKT, Augenuntersuchung, Lungenuntersuchung etc), es wurde Tränenflüssigkeit für die Messung der Zytokine regelmäßig gewonnen und tiefgefroren. Ebenso wurde Serum für immunologische Untersuchungen konserviert, und es wurden mononukleäre Leukozyten aus dem Blut (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) isoliert und ebenfalls für immunologische Untersuchungen konserviert. Die immunologischen Analysen des Probenmaterials sind noch ausständig.

Im 2. Tierversuch erfolgte die intramammäre Infektion der Versuchstiere mit *M. agalactiae* bzw. den phaseninvarianten Mutanten von *M. agalactiae*. In beiden Versuchsgruppen konnten ausgeprägte klinische Veränderungen dokumentiert werden. Auch hier erfolgte während der Tierversuche die klinische Dokumentation und es wurden die Probenmaterialien für die Folgeuntersuchungen (Milch, Serum, PBMC) entnommen und konserviert. Im Oktober 2007 wurde mit der Aufarbeitung der Probenmaterialien begonnen.

2. Ergebnisse bisher: Tierversuch 2 intramammäre Infektion

➤ Klinische Befunde

Alle Schafe zeigten während des Tierversuches ein ungestörtes Allgemeinverhalten bei erhaltener Fresslust.

In beiden Versuchsgruppen kam es ab 4 Stunden post infectionem zu einem biphasischen Temperaturanstieg. Anschließend gab es keine signifikanten Unterschiede im Verlauf der Temperaturkurven (Abb. 1) mehr.

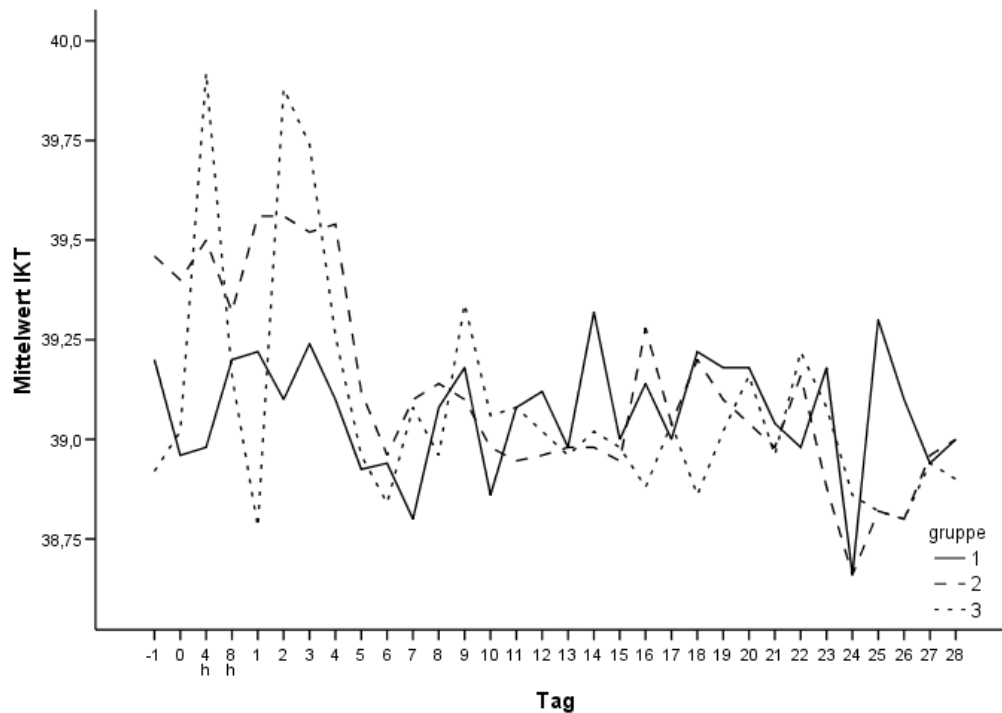


Abb. 1: Verlauf der Inneren Körpertemperatur (Mittelwerte) innerhalb der 3 Gruppen (Gruppe 1= Negativkontrolle, Gruppe 2: mit *M. agalactiae* Vpmuy (phase locked mutants) infizierte Schafe, Gruppe 3: Mit *M. agalactiae* PG2 (Positivkontrolle) infizierte Schafe)

Besonders auffallend (und übereinstimmend mit klinischen Berichten in der Literatur) war der hochgradige Rückgang der Milchleistung in den infizierten Euterhälften (Siehe Abb. 2). Die Milchmengen der infizierten Hälften reichten von wenigen ml bis zur vollständigen Agalaktie. Die Milch selbst war stark verändert und hatte zum Teil kolostrumartigen Charakter, zum Teil zeigte das Sekret eine molkeähnliche Konsistenz, mit flockenartiger Beimengung. Ein Übergehen der Infektion von einer Euterhälfte auf die zweite, in der Literatur für Mastitiden durch Mykoplasmen als charakteristisch beschrieben, konnte nur bei einem Schaf dokumentiert werden (Schaf 11). Möglicherweise geschieht die rasche Infektion der zweiten Euterhälfte in der Regel galaktogen, was in diesem Versuch durch die strikten Hygienemaßnahmen beim Melken der Schafe verhindert wurde.

Die Zellzahl in der infizierten Hälfte war ab 4 Stunden post infectionem massiv erhöht (Durchschnitt in der 1. Woche bei beiden Gruppen über 6 Mio Zellen/ml) und sank während des gesamten Tierversuches nicht mehr unter 2 Mio Zellen/ml (ab der 3. Woche über 7 Mio Zellen in beiden Versuchsgruppen). Aufgrund der hochgradigen Milchveränderungen und der Agalaktie konnten zwischen 5. und 8. Tag post infectionem keine und in den folgenden Tagen/Wochen nur jeweils 1- 4 Schafe pro Gruppe für die Zellzahlmessung herangezogen werden.

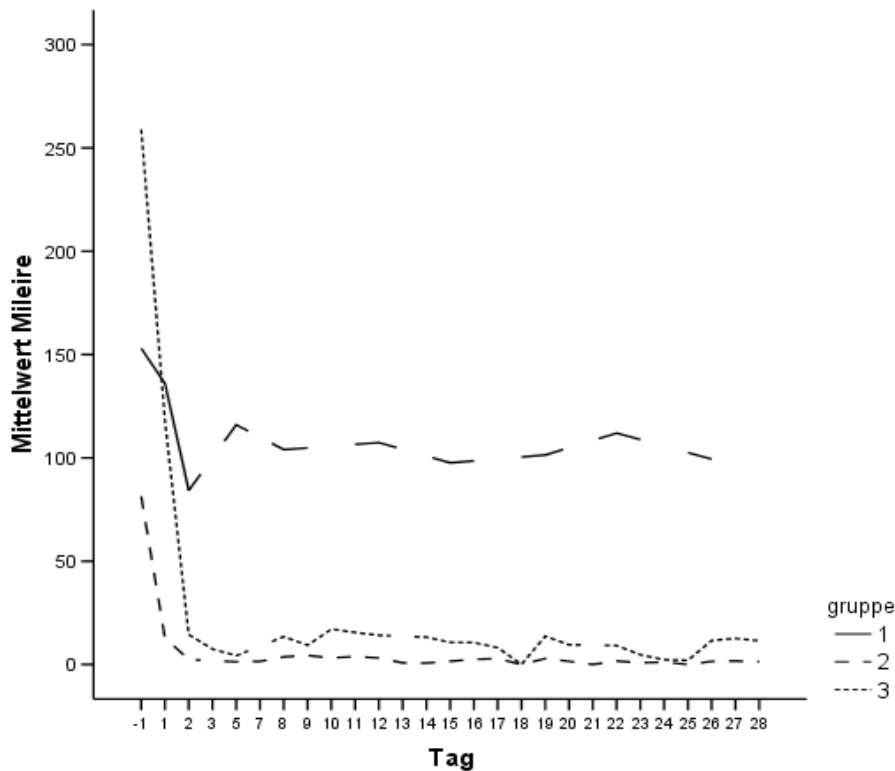


Abb. 2: Durchschnittliches Tagesgemelk der infizierten Euterhälfte (Mileire=Milchleistung rechts in ml, Gruppe 1= Negativkontrolle, Gruppe 2: mit *M. agalactiae* Vpmuy infizierte Schafe, Gruppe 3: mit *M. agalactiae* PG2 infizierte Schafe)

Zwischen beiden Versuchsgruppen (Gruppe 2: mit phaseninvarianten Mutanten von *M. agalactiae*, Gruppe 3: mit *M. agalactiae* PG2 infizierte Tiere) gab es in der Ausprägung der klinischen Symptome keine signifikanten Unterschiede. Auch in der pathohistologischen Untersuchung zeigte sich das pathomorphologische Bild einer Mykoplasmenmastitis in Form einer interstitiellen Mastitis in beiden Versuchsgruppen.

- Serologische Untersuchung und BU der inneren Organe/Lymphknoten

Die serologischen (Serokonversion) und bakteriologischen Untersuchungen (Euterschnitte, verschiedene Körperlymphknoten, post mortem Untersuchung) am Institut für Bakteriologie lassen den Schluss zu, dass es bei allen Versuchstieren zu einer systemischen Infektion gekommen war.

- Veränderungen im Differentialblutbild

8 Stunden (in der mit dem Wildstamm infizierten Versuchsgruppe) bzw. 24 Stunden (bei den mit phaseninvarianten Mutanten infizierten Schafen) post infectionem konnte ein deutliches Absinken der Neutrophilen Granulozyten und der Monozyten im Blut beobachtet werden,

gefolgt von einer Lymphopenie am 2. Tag nach der Infektion (siehe Abb. 3 und 4). Die Neutropenie im Blut dürfte durch den Influx von neutrophilen Granulozyten in die infizierte Milchdrüse bedingt sein und mit dem massiven Anstieg des Zellgehaltes der Milch negativ korrelieren. Wir erwarten, dass die noch durchzuführenden Zytokinbestimmungen in der Milch (z. B. IL-8 als chemotaktisch wirkendes Zytokin) in der Frühphase der Infektion diese These bestätigen.

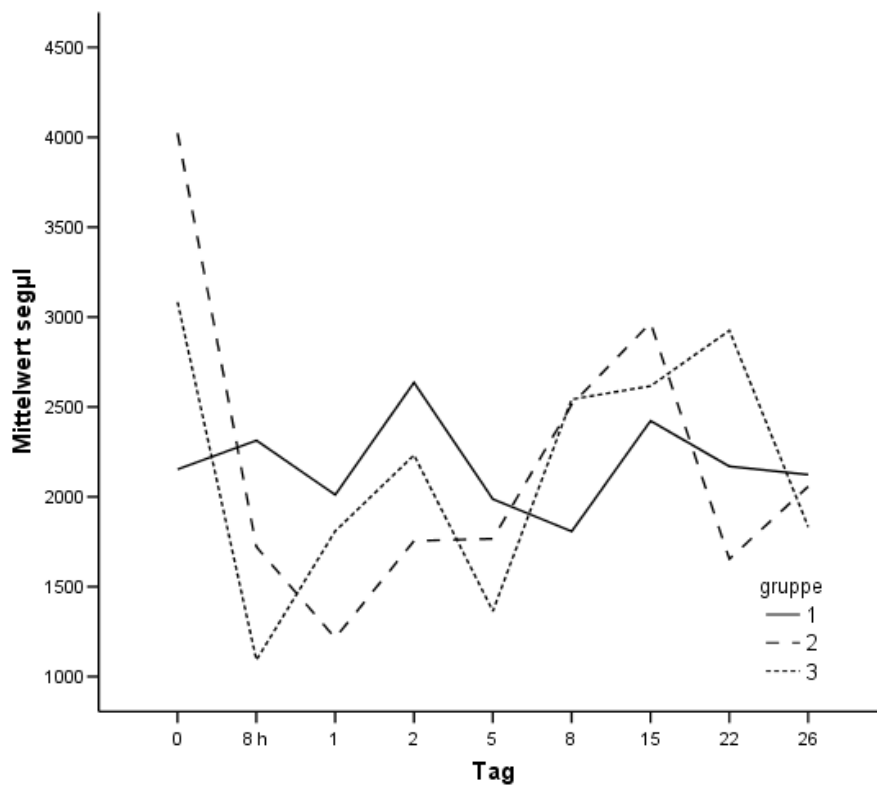


Abb. 3: Verlauf der der Zahl der segmentkernigen neutrophilen Granulozyten im Blut innerhalb der Versuchsgruppen (angegeben als arithmetischer Mittelwert in μl , Gruppe 1= Negativkontrolle, Gruppe 2: mit *M. agalactiae* *Vpmuy* infizierte Schafe, Gruppe 3: Mit *M. agalactiae* *PG2* infizierte Schafe)

Die Auswanderung der Lymphozyten aus der Blutbahn in die infizierte Euterhälfte am 2. Infektionstag (Siehe Abbildung 4) entspricht dem Angehen der adaptiven Immunabwehr, die durch B- und T- Lymphozyten bedingt wird.

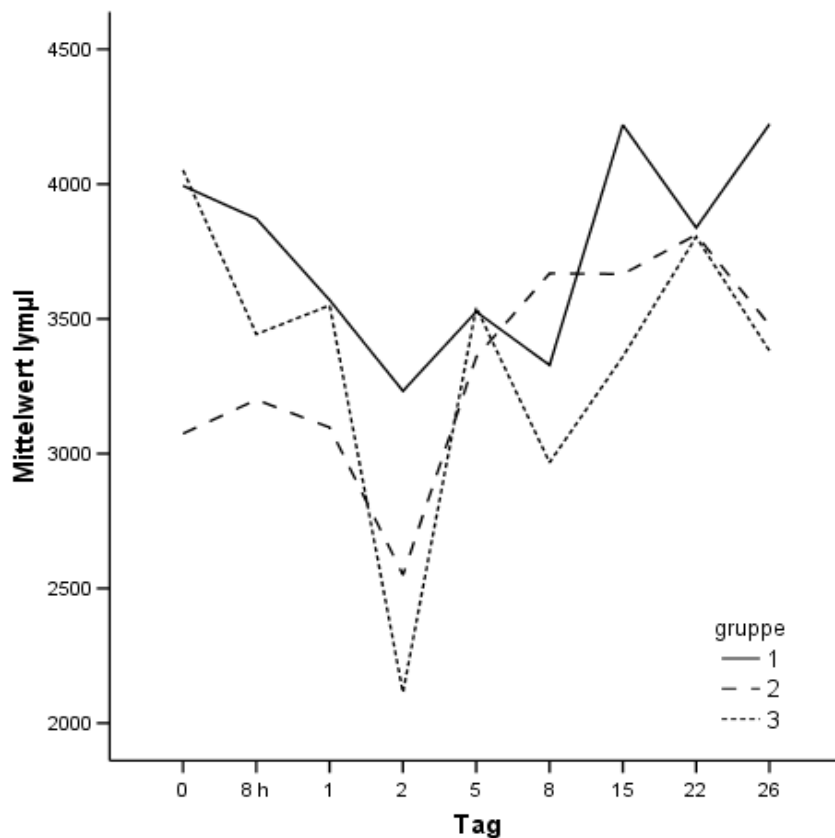


Abb. 4: Verlauf der Zahl der Lymphozyten im Blut innerhalb der Versuchsgruppen (angegeben als arithmetischer Mittelwert in μl , Gruppe 1= Negativkontrolle, Gruppe 2: mit *M. agalactiae* *Vpmuy* infizierte Schafe, Gruppe 3: Mit *M. agalactiae* PG2 infizierte Schafe)

Immunologische Untersuchungen

Zur Evaluierung der zellvermittelten adaptiven Immunantwort wurden antigenspezifische Lymphozytenproliferationstests mit den kryo-konservierten PBMC durchgeführt (^3H -Thymidin proliferations assays). Die Durchführung dieser Tests erwies sich als sehr arbeitsintensiv, da die Methode für die Fragestellung adaptiert werden musste. So gab es z. B. aus der Literatur keine Angaben über die zur *in vitro* Restimulation benötigte Antigenmengen, sodass in allen Tests das zur *in vitro* Restimulation verwendete Antigen mehrfach titriert werden musste.

➤ Titration der spezifischen Antigene

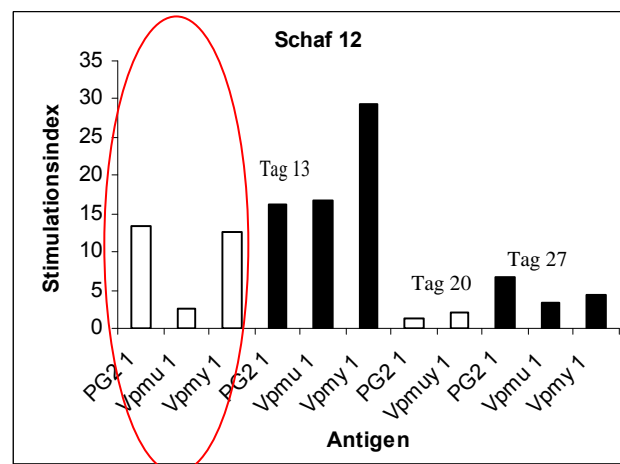
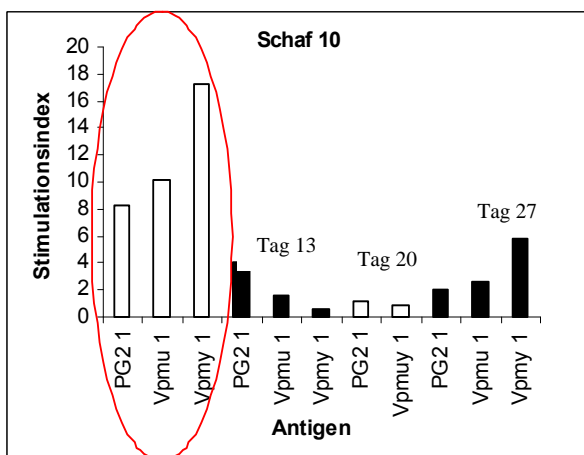
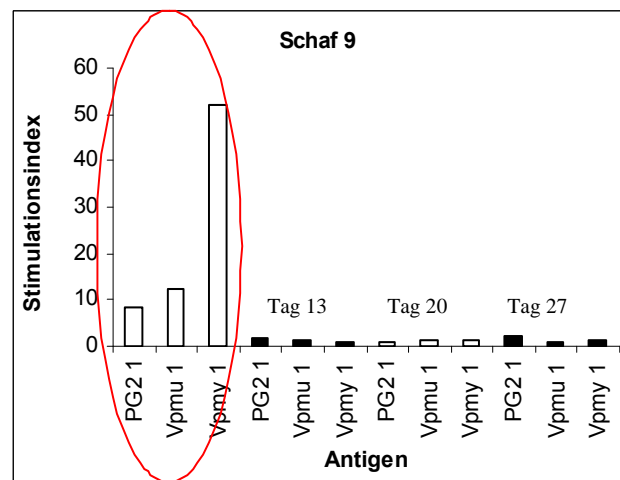
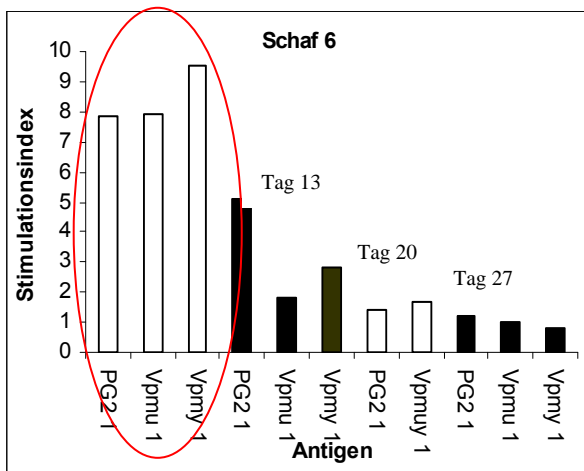
Für die antigenspezifische *in vitro* Restimulation der PBMC wurden hitzeinaktivierte Proteinfractionen von *M. agalactiae* PG2 und von den phaseninvarianten Mutanten verwendet.

Im Lymphozytenproliferationstest wurden die Antigenkonzentrationen 5 $\mu\text{g/ml}$ (n=15 Tiere), 2,5 $\mu\text{g/ml}$ (n=3), 2 $\mu\text{g/ml}$ (n=19), 1 $\mu\text{g/ml}$ (n=40, entsprechend allen Schafen zu jedem Zeitpunkt), und 0,5 $\mu\text{g/ml}$ (n=14) verwendet. Dabei konnten die besten Ergebnisse mit den

Antigenkonzentrationen von 1 µg/ml erzielt werden, sodass diese Konzentration auch in den Folgeuntersuchungen verwendet wird.

➤ Ergebnisse des Lymphozytenproliferationstestes

Es zeigten sich individuelle Schwankungen im Zeitpunkt des erstmaligen Auftretens einer antigenspezifischen Proliferation der T-Lymphozyten. Auffällig war, dass die T-Lymphozyten mehrerer Schafe bereits am Tag 6 nach der Infektion eine antigenspezifische Proliferation zeigten. In Bezug auf die Infektion mit den phaseninvarianten Mutanten zeigte sich, dass das Vpmy Antigen eine stärkere *in vitro* Proliferation hervorrief als das Vpmu Antigen. In den Abbildungen 5 a-f sind die Stimulationsindizes der entsprechenden Versuche dargestellt. Die Stimulationsindizes beschreiben das Verhältnis der antigen-spezifischen Proliferation der T-Lymphozyten (gemessen durch den Einbau von ³H-Thymidin in counts per minute, cpm) im Vergleich zu Proben des gleichen Tieres, die ohne spezifisches Antigen *in vitro* restimuliert wurden. Die Darstellung der entsprechenden Ergebnisse beschränkt sich dabei auf jene 6 Schafe, die in der Frühphase (Tag 6) eine signifikante antigenspezifische Proliferation zeigten.



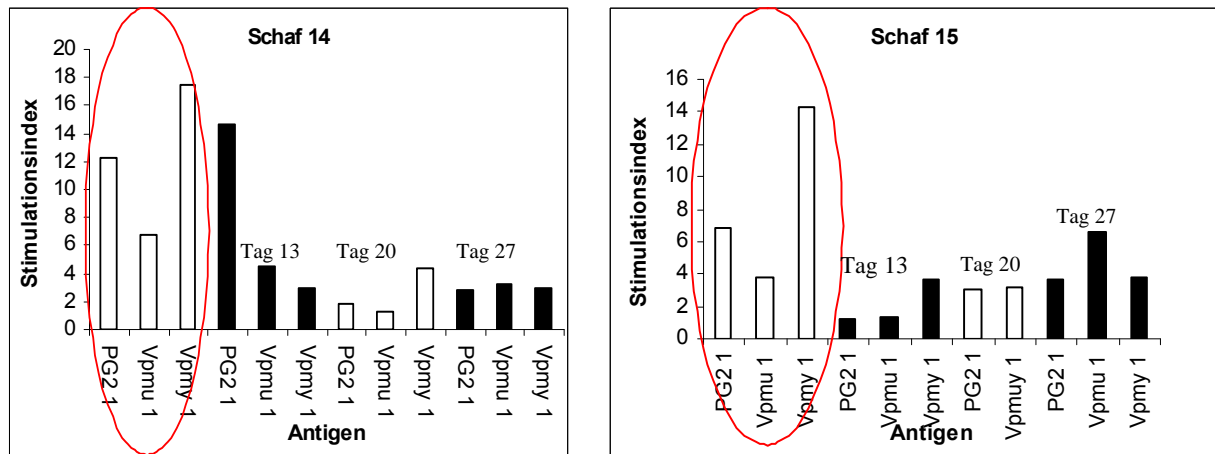


Abb. 5 Stimulationsindizes (cpm antigenstimulierte Zellen/cpm Mediumkontrolle) in der Frühphase der Infektion (Tag 6 – rot markiert) und an den Tagen 13, 20 und 27 bei je 3 Schafen, die mit phaseninvarianten Mutanten von *M. agalactiae* (Schafe 6, 9, 10), bzw. mit dem Wildtyp (Schafe 12,14 und 15) infiziert wurden.

➤ Weiteres Vorgehen

Zurzeit wird an einer Reproduktion der bisherigen Ergebnisse gearbeitet. Diese beinhaltet unter anderem auch eine Phänotypisierung der reaktiven Lymphozyten durch entsprechende gegen Leukozytendifferenzierungsantigene gerichtete Antikörper. Diese Phänotypisierung wird mittels Durchflusszytometrie erreicht. In den geplanten durchflusszytometrischen Messungen der antigen-spezifischen Proliferation der PBMC der in Abb. 5 dargestellten Schafe werden die PBMC mit dem Vitalfarbstoff **CFSE** (Carboxy-fluoreszein-succinimidylester) markiert, wiederum mit dem spezifischen Antigen stimuliert (verwendet wird wie oben die Konzentration 1µg/ml) und über 6 Tage inkubiert. Durch die Proliferation verteilt sich das CFSE auf die Tochterzellen, wodurch sich die Fluoreszenzintensität jeweils halbiert (Auswertung im Durchflusszytometer). Kombiniert wird diese Untersuchung mit der **Phänotypisierung der beteiligten Zelltypen durch fluoreszenzmarkierte Antikörper** (gegen CD4-, CD8 und WC1 sowie mit **der Messung von Interferon-γ und Interleukin 4** im Überstand der Zellkultur. Die Messung der Zytokine in der Milch (IL 8 und IL 1β) sowie die immunhistochemische Lokalisierung der verschiedenen Immunzelltypen im Gewebe sollen dann die Untersuchungen im Rahmen der intramammäre Infektion abschließen (geplanter Abschluss Ende Oktober). Unmittelbar daran anschließend sind eine Publikation dieser Ergebnisse und die Aufarbeitung des 1 Tierversuches vorgesehen.