

Slutrapport 2010-2013 för projektet: Utveckling av vaccin mot koccidios hos slaktkyckling H0943197
Eva Wattrang

GENERELL BAKGRUND

Koccidios är en tarmsjukdom som orsakas av intracellulära protozoer av släktet *Eimeria*. Hos hönsfåglar ses en klinisk bild med alltifrån dödsfall på grund av massiva infektioner till nedsatt tillväxt och foderutnyttjande på grund av subkliniskt anslag. Infektionens utfall beror bland annat på infektionsdos och immunitetsutveckling hos fåglarna. Inom modern svensk fjäderfäuppfödning orsakar koccidios stora problem inom framförallt slaktkycklinguppfödningen. Infektionen kontrolleras där i dagsläget genom profylaktisk tillsats av koccidiehämmande substanser, koccidiostatika, i fodret. I ekologisk slaktkycklinguppfödning är denna behandling inte tillåten. Användning av koccidiostatika är dock inte hållbar i längden bland annat för att parasiterna utvecklar resistens mot preparaten, och för att profylaktisk behandling med kemikalier inte är försvarbar enligt ”den svenska modellen” för djurhållning. Inom EU ställs nu också krav på att medlemsländerna skall arbeta för att alternativ till koccidiostatika utvecklas. Det är sammantaget därför mycket angeläget att alternativa metoder att kontrollera fjäderfäkoccidios, t.ex. vaccination, tas fram.

Det är känt att fåglar som genomgått upprepade infektioner med samma *Eimeria*-art utvecklar immunitet. Man använder även infektion med levande, i vissa fall försvagade, *Eimeria*-parasiter som vaccin. Dessa vaccin behöver dock framställas genom infektion av fåglar och blir alltför dyra för att de skall kunna användas inom slaktkycklinguppfödningen. Målet är därför att utveckla ett effektivt vaccin som är billigare att framställa. Ett subenhetsvaccin framställt med rekombinant teknik skulle kunna uppfylla dessa krav. Det är känt att det är framförallt cell-medierade immunfunktioner som är inblandade i den skyddande immuniteten mot koccidios hos höns. Framförallt har T-celler som uttrycker CD8 utpekats som viktiga i försvaret. Dessa celler är hos däggdjur framförallt sk. ”T-mördarceller” (cytotoxiska T-celler; CTL) som dödar infekterade celler.

PROJEKTETS SYFTE & STRATEGI

Projektets övergripande syfte är att identifiera nyckelkomponenterna i den skyddande immuniteten mot *Eimeria*-infektioner så att ett effektivt vaccin mot koccidios hos slaktkyckling kan tas fram. Med detta mål har vi under 2010-2013 framförallt arbetat med delprojekten som beskrivs nedan, I projektet har docent Eva Wattrang varit huvudansvarig med hjälp av laboratorieingenjör Per Thebo och docent Anna Lundén. Projektet involverar flera internationella samarbeten och för det beskrivna arbetet har vårt nära samarbete med Dr Helle Juul-Madsens grupp vid Århus Universitet, forskningscenter Foulum, varit särskilt värdefullt. Samarbetet har resulterat i en rad sampublicationer under projektperioden⁽¹⁻⁶⁾.

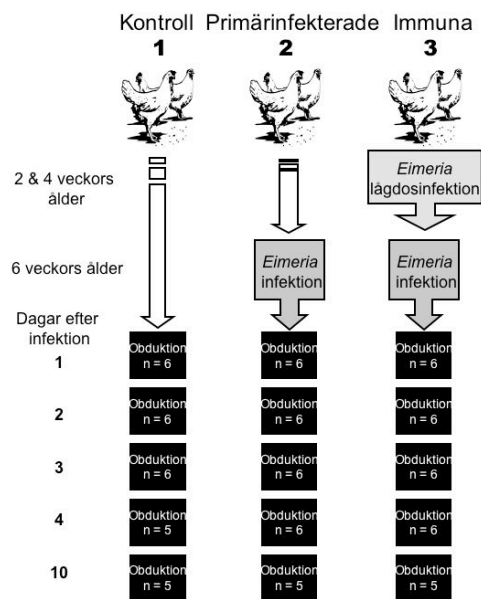
RAPPORTERING DELPROJEKT

I. Infektionsstudie med fokus på mekanismer och cytokiner involverade i skyddande immunitet mot Eimeria-infektioner

Bakgrund

Vi har tidigare inom detta projekt utvecklat en modell i vilken upprepade lågdosinfektioner med *E. tenella* resulterar i en mycket starkt skyddande immunitet. Denna modell använde vi i detta delprojekt för att närmare studera de immunfunktioner som är inblandade i immuniteten. Genom att jämförda hur parasiterna förökade sig hos immuna fåglar och hos fåglar som infekterades för första gången får vi information om när i parasitens livscykel immunsystemet är effektivt. Genom att studera olika immunfunktioner i relation till parasitinfektionen hos immuna djur får vi information om vilka mekanismer som är skyddande. Sammantaget ger

detta viktig kunskap om vilka av parasitens utvecklingsstadier som bör ingå i ett vaccin och vilken typ av immunsvaret som ett vaccin måste inducera för att ge skyddande immunitet.



Figur 1. Gruppnummer och behandlingar vid *Eimeria*-infektionsförsöket

Som nämnts tidigare har lymfocyter som uttrycker cellytereceptorn CD8 associerats till immunitet mot koccidios. En tänkbar funktion för dessa celler är att de är "T-mördarceller", CTL, som dödar parasitinficerade celler. För detta använder de bland annat proteinet perforin, som skapar porer i cellmembranet på den cell som skall dödas, och enzymer i granzyme-familjen, som aktiverar mekanismer som tvingar den attackerade cellen att "begå självmord", d.v.s. gå i apoptos. CTL använder också en receptor kallad Fas-ligand (FasL) som binder "dödsreceptorn" Fas på den cell som ska dödas och därigenom tvingar cellen i apoptos. Vi avser därför att kvantifiera mRNA-uttrycket av några av dessa gener i fåglarnas blindtarmstonsiller och blindtarmsvävnad som ett mått på CTL-aktiviteten.

Material & metoder

Försöket omfattade tre grupper av fåglar: oinficerade, förstagångsinficerade och immuna efter upprepade infektioner och försöksupplägget beskrivs schematiskt i Figur 1.

Parasitinfektionernas anslag följdes vid alla tillfällen genom att analysera utsöndringen av "parasitägg" (oocystor) i träck dag 5-10 efter infektion. Vid den avslutande *E. tenella*-infektionen följdes också parasitens förökning i blindtarmsvävnad genom analys av *E. tenella*-DNA med kvantitativ real-tids PCR-metodik. Uttryck av FasL, perforin, IFN- γ och granzyme A samt kontrollgenerna β -aktin, GAPDH och H6PD bestämdes med kvantitativ real-tids RT-PCR metodik genom analys av RNA från blindtarmar och blindtarmstonsiller samlade vid obduktion enligt Figur 1.

Resultat & diskussion

Resultat erhållna inom detta delprojekt under tidigare projektperioder presenterades i detalj i slutrapporten för 2007-2009. Resultat från försöket har också presenterats vid två vetenskapliga konferenser under 2010^(7, 8). Sammantaget har vi fastställt att fåglarna i grupp 3 (Figur 1) efter de två lågdosinfektionerna erhållit en starkt skyddande immunitet då de utsöndrade mycket få oocystor vid den slutliga *Eimeria*-infektionen. De förstagångsinficerade fåglarna i grupp 2 utsöndrade som förväntat ett stort antal oocystor vid denna infektion. Närmare analys av parasitens förökning i fåglarnas blindtarmsvävnad med kvantitativ real-tids PCR-metodik visade att parasitens utveckling stoppades från och med dag 3 efter infektion hos de immuna fåglarna i grupp 3. Vid samma tidpunkt påbörjades däremot en mycket påtaglig uppförökning av parasit-DNA i blindtarmarna hos de förstagångsinficerade fåglarna i grupp 2.

För att få en indikation på närvaro av aktiverade CTL under infektionens gång mätte vi uttrycket av perforin-, granzyme- och FasL-mRNA i blindtarmsvävnaden (Figur 2). Hos de immuna fåglarna i grupp 3 var uttrycket av dessa tre proteiner högre tidigt efter infektionen, dag 1 till 4, jämfört med det hos fåglarna i grupp 1 och 2. Detta sammanfaller sålunda med när parasitens förökning stoppas hos de immuna fåglarna. Detta indikerar att aktiverade CTL är viktiga för att bromsa upp parasiternas förökning. Dag 10 efter infektionen däremot, var uttrycket av perforin-, granzyme- samt FasL-mRNA högst hos de förstagångsinficerade

fåglarna i grupp 2 vilket tyder på att CTL även aktiveras under en primärinfektion. Vid denna tidpunkt är dock parasitens livscykel redan avslutad varför detta CTL-svar inte hinner bromsa infektionen. Detta är första gången dessa markörer studeras i anslutning till *Eimeria*-infektioner hos fåglar och resultaten indikerar att ackumulering av aktiverade CTL kan vara en viktig komponent i den skyddande immuniteten mot koccidios. Ytterligare arbete krävs dock för att påvisa CTL i infekterad vävnad och visa att de har en aktiv ”mördarfunktion” (se nedan). Resultaten sammanställs nu för publikation i en internationell peer-review tidskrift.

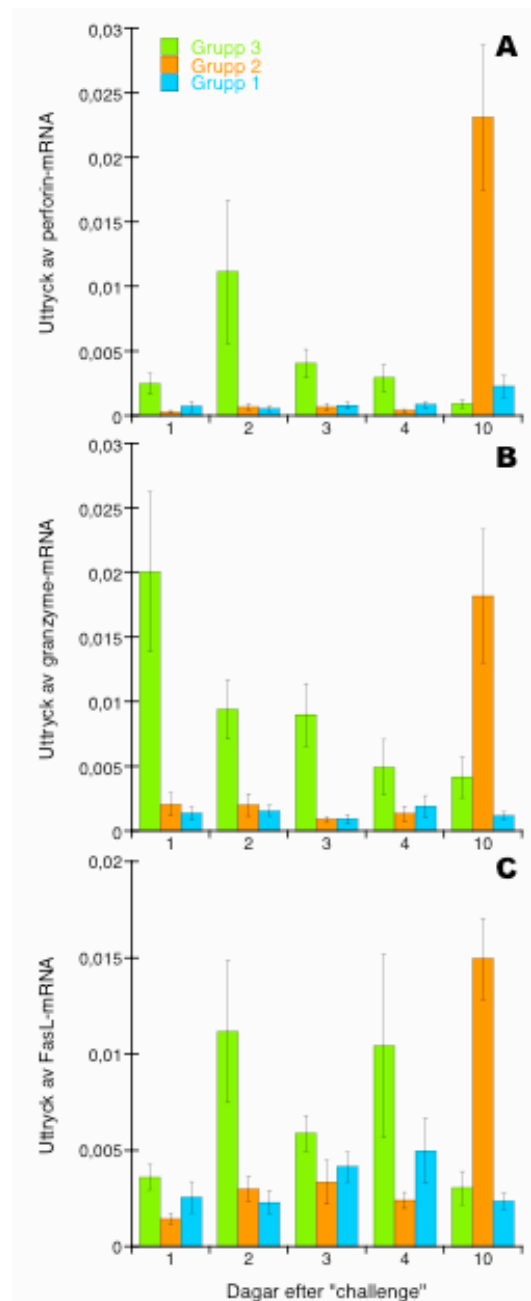
II. Studier för att identifiera aktiverade CTL hos höns

Bakgrund

Detta delprojekt var fokuserat på identifiering av de celler som förmedlar skydd mot *Eimeria*-parasiter hos immuna fåglar. I immunsystemets ”mördarceller” (t.ex. CTL och NK-celler) förvaras perforin och granzyme i s.k. granula. När en infekterad cell känns igen av ”mördarcellen” tömmer den ut sina granula (degranulerar). Under degranuleringen exponeras en struktur som kallas CD107a temporärt på ”mördarcellens” yta. Påvisande av CD107a på cellytan betyder därför att ”mördarcellen” aktiverats och degranulerat. Detta har utnyttjats för detektion av aktiverade ”mördarceller” i flera däggdjurssystem. En antikropp som binder höns-CD107a hade vid projektstarten nyligen beskrivits och vi etablerade därför denna metod för att kunna studera inblandningen av CTL i skyddet mot koccidios. Metoden bygger på att cellerna analyseras för uttryck av CD107a samt för ett urval av andra cellytemarkörer som differentierar olika typer av ”mördarceller” med hjälp av flerfärgs-flödescytometri.

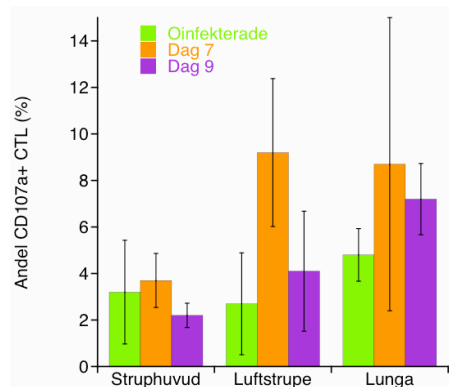
Material & metoder

För utvärdering av CD107a-uttryck på CTL från olika vävnader hos normala fåglar (”viloläge”) användes vita blodkroppar isolerade från blod, mjälte, övre luftvägar, lungor, blindtarmstonsiller och blindtarmsvävnad från friska höns. Cellerna ”färgades” med ett urval av antikroppar som känner igen olika cellytemarkörer. De olika antikropparna är kopplade till olika färgämnen (fluoroforer) och olika typer av vita blodkroppar kan därigenom identifieras och särskiljas med flödescytometri. De antikroppar som användes identifierade: CD45, CD8 β och γ/δ TCR (CTL uttrycker CD45 och CD8 β men är negativa för γ/δ TCR), samt CD107a (degranulering).



Figur 2. Uttryck av perforin- (A), granzyme- (B) och FasL-mRNA (C) i blindtarmsvävnad (gruppsmedelvärde \pm 1 SE) vid experimentell *E. tenella*-infektion av förstagångsinfekterade (grupp 2) och immuna (grupp 3) fåglar samt oinfekterade fåglar (grupp 1).

För stimulering av degranulering i cellkultur odlades vita blodkroppar 4 h i närvaro av phorbol 12-myrisitate 13-acetate (PMA; 10 ng/ml) och ionomycin (0.5 µg/ml). Cellerna analyserades därefter för uttryck av CD107a på cellytan enligt ovan.



Figur 3. Andelen CTL som uttrycker CD107a i vävnad från oinfekterade kycklingar (n=12) samt kycklingar dag 7 (n=6) respektive dag 9 (n=6) efter infektion med IBV. Resultaten visas som gruppmedelvärdet ± 95% konfidensintervall.

För utvärdering av CD107a-uttryck på virusaktiverade CTL infekterades 3 veckor gamla hönkycklingar med infektiös bronkit virus (IBV; stam M41; $2 \times 10^{5.2} \text{EID}_{50}/\text{fågel}$). IBV-nukleinsyra kvantifierades i svabbprover från munhålan med kvantitativ real-tids PCR-metodik. Vita blodkroppar isolerades från struphuvudet, luftstrupen och lungorna från fåglar avlivade 7 (n=6) respektive 9 dagar (n=6) efter infektion samt från oinfekterade kontrollfåglar (n=12). Uttrycket av CD107a på CTL analyserades direkt efter isoleringen av vita blodkroppar samt efter 4 h induktion med PMA och ionomycin i cellkultur enligt ovan.

För utvärdering av CD107a-uttryck på CTL vid koccidiosis

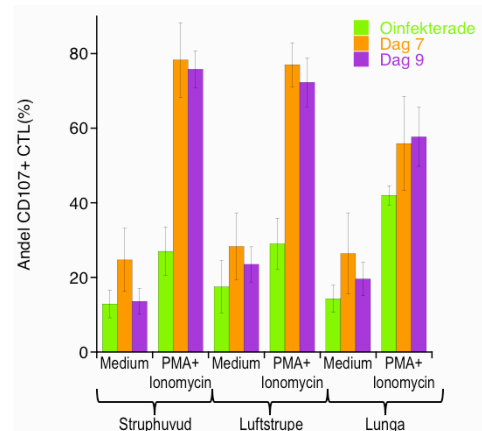
utfördes *E. tenella*-infektioner enligt försöksupplägget i Figur 1. Parasitinfektionernas anslag följdes vid alla tillfällen genom att analysera utsöndringen av ”parasitägg” (oocystor) i träck dag 5-10 efter infektion. Vid den avslutande *E. tenella*-infektionen isolerades vita blodkroppar från blindtarmar och blindtarmstonsiller samlade vid obduktion enligt Figur 1. Uttrycket av CD107a på CTL analyserades direkt efter isoleringen av vita blodkroppar samt efter 4 h induktion med PMA och ionomycin i cellkultur enligt ovan.

Resultat & diskussion

Eftersom CD107a-uttryck inte kunnat detekteras på höns-celler tidigare ville vi initialt utvärdera om uttryck av denna markör överhuvudtaget kunde användas för att mäta aktivering av CTL hos höns.

Vi kartlade uttrycket av CD107a på CTL isolerade från blod och olika vävnader hos friska höns. Resultaten visade att detta uttryck var lågt, $\leq 6\%$ av CTL uttryckte CD107a, vilket överinstämde med hypotesen att CD107a endast uttrycks då CTL aktiverats och degranulerar för att döda en t.ex. infekterad cell. Vidare utvärderade vi om höns-CTL kan stimuleras till degranulering i cellkultur. Resultaten visade att en kombination av PMA och ionomycin gav den mest påtagliga ökningen av CD107a-uttrycket, 10-40 gångers ökning i stimulerade cellkulturer jämfört med celler odlade utan stimuli, hos CTL isolerade från blod och mjälte. I dessa försök kunde vi även etablera de optimala odlings- och analysförhållandena för detektion av CD107a-uttryck. Sammantaget visar resultaten att CD107a-uttryck kan användas för att studera aktivering av höns-CTL i cellkultur och att goda förutsättningar förelåg för att denna markör även skulle kunna användas för att studera CTL-aktivering ”direkt” i fåglar (*in vivo*). Dessa resultat presenterades vid den internationella konferensen Avian Immunology Research Group meeting i Edinburgh, augusti 2012 ⁽⁴⁾.

För att utvärdera om CD107-uttryck kan utnyttjas för att detektera CTL-aktivering som sker i fågel vid t.ex. en infektion, använde vi ett infektiösaämne, virus, där aktivering av CTL förväntas vara hög. Fåglar



Figur 4. Andelen CTL som uttrycker CD107a efter 4 h odling i ostimulerad cellkultur (medium) eller i cellkultur stimulerad med PMA och ionomycin. CTL isolerades från vävnad från oinfekterade kycklingar (n=12) samt kycklingar dag 7 (n=6) respektive dag 9 (n=6) efter infektion med IBV. Resultaten visas som gruppmedelvärdet ± 95% konfidensintervall.

infekterades experimentellt med IBV och kliniska symptom på luftvägsinfektion observerades hos de infekterade fåglarna från dag 2 efter infektion. Alla infekterade fåglar hade också IBV-nukleinsyra i oralsekretet och en högre mängd nukleinsyra, ca 1 log mer, påvisades dag 7 efter infektion jämfört med dag 9 efter infektion. Andelen CTL bland de vita blodkropparna var högre i struphuvudet och i luftstrupen hos de infekterade fåglarna dag 7 och 9 jämfört med de oinfekterade fåglarna. Ett högre uttryck av CD107a påvisades på CTL isolerade från luftstrupen dag 7 och lungorna dag 7 och 9 jämfört med de oinfekterade fåglarna (Figur 3). Dessa resultat visar att CTL har degranulerat, och därmed sannolikt också dödat virusinfekterade celler, i de vävnader där IBV infekterar och förökar sig intracellulärt. Vi fann också att CTL från infekterade fåglar, i struphuvud, luftstrupe och lungor, både dag 7 och dag 9 degranulerade i högre grad vid stimulering med PMA och ionomycin i cellkultur jämfört med CTL från oinfekterade fåglar (Figur 4). Detta indikerar att CTL i IBV infekterad vävnad har aktiverats generellt och snabbt kan stimuleras till att döda. Sammantaget visar resultaten att uttryck av CD107a kan användas för att studera CTL-aktivering i fåglar *in vivo*. Resultaten från stimuleringen av degranulering i cellkultur visar att CTL från infekterade fåglar verkar ha en högre aktiveringspotential vilket alltså också kan användas för att studera CTL-funktion. Dessa resultat presenterades vid den internationella konferensen International Veterinary Immunology Symposium i Milano, augusti 2013 ⁽⁶⁾ och håller nu tillsammans med resultaten från etableringen av metoden (ovan) på att sammanställas för publikation i en internationell peer-review tidskrift. Sammanfattningsvis visar dessa studier att vi etablerat en robust och användbar metod för att studera aktivering av CTL från höns.

Vi fortsatte därför detta delprojekt med att studera CD107a-uttryck hos CTL från immuna och förstagångsinfekterade fåglar vid *E. tenella*-infektion. Syftet med detta försök var att fastställa om CTL degranulerar i parasitinfekterad vävnad och/eller om CTL visar en högre aktiveringspotential under *Eimeria*-infektionen. Vi använde vår etablerade modell för att inducera skyddande immunitet hos kycklingar genom två *E. tenella* infektioner (Figur 1). Som väntat var kycklingarna också i detta experiment tydligt immuna vid den tredje *E. tenella*-infektionen, när CD107a-uttrycket studerades, då de utsöndrade betydligt färre oocystor, ca 1×10^3 oocystor/fågel, jämfört med de förstagångsinfekterade fåglarna vid samma tillfälle, ca 5×10^7 oocystor/fågel. Till skillnad från tidigare experiment utsöndrade dock fåglarna betydligt färre oocystor redan vid försökets andra *E. tenella*-infektion, ca 2×10^4 oocystor/fågel jämfört med tidigare experiment ca 2×10^5 oocystor/fågel. Detta visar att immunitetsutvecklingen vid det senaste experimentet gick snabbare än vad vi tidigare observerat. Resultaten från analyserna av CTL och CD107a-uttryck i blindtarmsvävnad och blindtarmstonsiller visade att andelen CTL var ca 3,5 gånger högre i blindtarmsvävnad dag 10 efter infektion hos de förstagångsinfekterade kycklingarna jämfört med oinfekterade fåglar. De immuna fåglarna visade inga förändringar i andelen CTL i blindtarmsvävnad vid något av provtagningstillfällena. Uttrycket av CD107a på CTL direkt efter att cellerna isolerats från blindtarmsvävnaden skilde sig inte mellan oinfekterade, immuna och förstagångsinfekterade fåglar. Analyserna av CD107a-uttryck på CTL som stimulerats 4 h i cellkultur visade att CTL från förstagångsinfekterade fåglar dag 10 efter infektion hade ca 2 gånger högre ökning av CD107a-uttrycket vid PMA och ionomycin stimulering jämfört med oinfekterade och immuna fåglar. Sammantaget visar resultaten att de förstagångsinfekterade fåglarna dag 10 efter infektion har en högre andel CTL i blindtarmarna och att dessa CTL har en högre aktiveringspotential jämfört med oinfekterade fåglar. Detta överinstämmer med vad vi tidigare observerat för förstagångsinfekterade fåglar i denna infektionsmodell beträffande ”CTL-markörerna” perforin, granzyme och FasL (Figur 2) och stärker därmed antagandet att CTL aktiveras vid *Eimeria*-infektion men kommer för sent till infektionsplatsen vid det första infektionstillfället. Att inga tydliga förändringar i andelen CTL och deras CD107a-uttryck

observerades i de immuna kycklingarna tror vi kan bero på den snabba och starka immunitetsutvecklingen som observerades i detta experiment. Immunsvaret kan helt enkelt vara för snabbt och effektivt att döda parasiterna och en för liten andel CTL aktiveras så att vi inte kan observera det då den totala CTL-populationen från blindtarmarna analyseras tillsammans. Med dessa resultat som grund har vi därför planerat ett nytt experiment till januari-mars 2014 då vi kommer att studera CTL och CD107a-uttryck vid både den andra och den tredje *E. tenella*-infektionen. Förhoppningsvis kommer detta experiment ge ett mer slutgiltigt svar på inblandningen och aktiveringen av CTL i *Eimeria*-skyddet hos immuna djur. Resultaten från dessa experiment kommer därefter att sammanställas för publikation.

III. Metodutveckling för att detektera Eimeria-specifika CTL

Bakgrund

De ovan beskrivna resultaten stöder tidigare framlagda hypoteser att CTL kan ha en avgörande roll i *Eimeria*-försvaret genom att döda parasitinfekterade celler. Vi anser därför att det är viktigt att även direkt undersöka om höns-CTL kan döda *Eimeria*-infekterade celler och ifall denna funktion är central i den skyddande immuniteten mot parasiten. Att etablera test för CTL-aktivitet är ett mycket omfattande projekt där flera avgörande krav måste lösas/uppfillas: bland annat måste CTL och målceller vara av samma "vävnadstyp", s.k. MHC klass I- haplotyp, målcellerna måste infekteras av smittämnet i fråga, CTL måste vara korrekt aktiverade och man måste kunna mäta att målcellerna dödas. Vi har under tidigare projekt arbetat med flera av dessa frågor och bland annat etablerat en metod för att detektera att målceller dödas av CTL, den s.k. caspase 3-metoden, och tagit fram potentiella målceller med känd MHC I-haplotyp. Under 2010-2013 har vi framförallt arbetat med att förbättra protokollen för att infektera celler i cellkultur med *Eimeria*-parasiter, så att de kan användas som s.k. målceller i CTL-test, och med att utvärdera metoder för aktivering av CTL i cellkultur.

Material & Metoder

För infektion i cellkultur med *Eimeria*-parasiter har vi använt arten *E. tenella*. Oocystor har renats från träck vid experimentella infektioner av kycklingar (se ovan). Oocystorna har sporulerat ("mognat" och blivit infektiösa) vid 26 °C och steriliserats från kontaminering av bakterier och andra mikroorganismer med natrium-hypoklorit. Oocystornas "skal" har sedan brutits upp med surt pH och skakning med glaskulor varvid s.k. sporocystor frigjorts. Därefter har sporocystorna öppnats med gallsalter och s.k. sporozoiter frigjorts. Sporozoiterna har renats från oocyst- och sporocyst-skaldelar med hjälp av gelfiltrering. De rena sporozoiterna har använts för att infektera cellkulturer, antingen direkt eller frysts ned och förvarats i flytande kväve och därefter tinats före infektion. I cellinfektionsförsöken har vi använt följande celltyper: en cell-linje från nötkreatursnjure, MDBK; två typer av embryonala hönsfibroblaster, en kontinuerlig cell-linje, DF-1; primära celler, CEF; samt en cell-linje med hönsmakrofager, HD11. I försöken sätts cellerna till cellodlingsbrunnar i flat-bottnade mikrotiterplattor och får fästa och växa till under 24 h vid 37 eller 40°C beroende på celltyp. Därefter sätts renade sporozoiter till cellkulturerna och får infektera cellerna under 16 h vid 40°C. Sporozoiter som inte trängt in i cellerna sköljs då bort och antalet celler till vilka sporozoiter har adhererat till eller trängt in i räknas i ljusmikroskop. Cellkulturerna odlas vidare vid 40°C och antalet s.k. merozoit-kluster räknas i ljusmikroskop efter 72 h odling. I försök där parasitens förökning inne i cellerna studerats har radioaktivt (³H) märkt uracil tillsatts till de infekterade kulturerna antingen vid 0, 16 eller 40 h efter infektion. Kulturerna har sedan frysts vid 16, 40 respektive 64 h efter infektion och inkorporering av ³H-uracil i arvsmassan hos parasiter som delat sig har analyserats med hjälp av instrument som detekterar β-strålning.

Beträffande detektion av CTL-aktivitet har vi under 2010-2013 i samarbete med Foulum utfört flera experiment. Vi har infekterat MHC I-definierade höns med Newcastle virus (NDV) eller IBV. Vi har sedan tagit vita blodkroppar från mjälte mellan 3-7 dagar efter infektion och odlat dessa i kultur under olika förhållanden (tillsats av levande virus och/eller concanavalin A; Con A, eller interleukin-2). Cellerna har odlats i 3-7 dagar och dagligen följts med avseende på aktivering av olika T-cells typer. Slutligen har CTL-aktivitet utvärderats genom att inkubera de stimulerade mjältcellerna i 4 h tillsammans med MHC I-matchade, virusinfekterade målceller. Frekvensen dödade målceller har sedan analyserats genom att påvisa aktiverat caspase 3 (ett mått på s.k. apoptos; "självmord") hos målcellerna med hjälp av immunfluorescens och flödescytometri.

Resultat & Diskussion

Eimeria-parasiter kan inte regelrätt odlas/förökas i cellkultur men *E. tenella*-sporozoiter kan infektera vissa celltyper i kultur och genomgå några steg av livscykel. Som beskrivits i tidigare rapporter har vi etablerat och förfinat ett tidigare beskrivet system där en nötkreaturscell-linje (s.k. MDBK) använts för infektion med *E. tenella*-parasiter. Med detta system som utgångspunkt har vi under denna projektperiod fortskridit med fokus på framförallt jämförande studier av infektion av MDBK cellerna och olika höns-cell-linjer. De testade höns-cellerna är definierade med avseende på MHC I-haplotyp och kan sålunda användas i CTL-test i framtiden. Vi har också etablerat en metod som gör det möjligt att följa parasitens utveckling inne i värdcellen genom tillsats av ³H-uracil till de infekterade cellkulturerna. Uracil används av parasitceller men inte av däggdjursceller vid celledelning och en ökad radioaktiv signal innebär att parasiterna har delat sig och då inkorporerat ³H-uracil i sin arvs massa.

Vi har jämfört *E. tenella*-infektionens förlopp i MDBK celler med det i tre olika typer av höns-celler; embryonala fibroblaster (DF-1 Och CEF) och makrofager (HD11). Vid infektion av de embryonala fibroblasterna fann vi att parasiterna fäste vid/trängde in i DF-1 och i CEF cellerna i samma frekvens som i MDBK cellerna men parasiterna utvecklades inte till s.k. merozoiter i fibroblasterna vilket de gjorde i MDBK cellerna. För att utreda ifall parasiterna överhuvudtaget utvecklades i dessa höns-celler använde vi ³H-uracil för att studera parasitens delning inne i cellerna. Resultat från dessa experiment visade att *E. tenella* hade högst aktivitet 16-64 h efter infektion i alla tre celltyperna men aktiviteten var ca två gånger högre i MDBK cellerna jämfört med fibroblasterna. Detta visar alltså att parasiterna genomgår viss utveckling i hönsfibroblasterna även om inte livscykeln fullföljs till merozoitstadiet. ³H-uracil metoden visade sig också vara ett viktigt tillägg till våra tidigare metoder och kommer att ge oss ytterligare möjlighet att utvärdera och förbättra infektionsmodellen. Vid *E. tenella*-infektion av makrofagcell-linjen HD11 fann vi att parasiterna fäste vid/trängde in i samt utvecklades till merozoiter i HD11 i samma eller t.o.m. högre frekvens som i MDBK.

I studierna av CTL-aktivering i virusinfekterade höns har vi arbetat med att optimera förhållandena för förökning (expansion) och aktivering av mjältceller av CTL-typ (CD8 β + γ / δ TCR-). Vi har funnit att CTL-celler förökar sig och aktiveras bäst vid odling i närvaro av T-cells stimuleraren Con A. Vidare har vi funnit att en odlingstid på 2-4 dagar verkar optimal för detektion av CTL-aktivitet.

Sammantaget har vi i detta delprojekt: optimerat förhållandena för att utföra *Eimeria*-infektion i cellkultur, identifierat MHC I-definierade höns-celler som kan infekteras med *E. tenella*, samt identifierat odlingsförhållanden för expansion och aktivering av höns-CTL. Vi har sålunda nått det delmål där en metod för att detektera *Eimeria*-specifik CTL aktivitet kan sättas upp. Vi kommer då att infektera MHC I-definierade kycklingar som vi får tillgång till

genom vårt samarbete med Foulum med *E. tenella* och studera CTL-aktivitet hos mjältceller mot *E. tenella*-infekterade målceller under immunitetsutvecklingen. Resultaten från sådana studier kommer att ge viktig ny kunskap om skyddande immunitet mot koccidios hos höns.

IV. Identifiering av Eimeria-specifika T-celler

Bakgrund

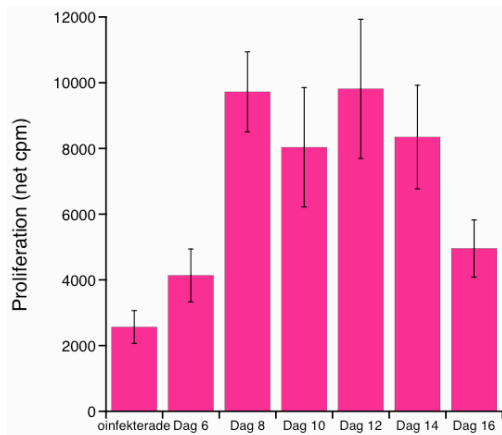
Vid ett specifikt immunsvaret mot ett infektiösaämne genereras kloner av antigenspecifika T- och B-celler. När dessa åter stöter på antigenet aktiveras de och börjar bl.a. att dela sig (proliferera). Att detektera och identifiera antigen-specifika T-celler är ett mycket viktigt redskap för att förstå immunitetsutvecklingen mot ett infektiösaämne. Vi har därför arbetat med att sätta upp metoder för att studera *Eimeria*-specifik T-cellsproliferation hos höns. Under projektperioden har vi utfört ett antal pilot-försök för att identifiera när under infektionen, vilken typ av celler som behövs samt vilka odlingsförhållanden som krävs för att detektera *Eimeria*-specifik proliferation.

Material & Metoder

I dessa experiment har vi använt hönkycklingar, Bovans robust, som fötts upp från dag-gamla i SVAs djurhus under SPF-förhållanden. I de flesta experimenten har kycklingarna vid ca 18 dagars ålder infekterats med 1000 infektiösa, sporulerade, *E. tenella*-oocystor/fågel. Vid ett tillfälle infekterades en grupp kycklingar istället med 3000 infektiösa, sporulerade, *E. tenella*-oocystor/fågel. Kycklingarna har delats in i grupper med avseende på jämn fördelning av vikt och maternella antikroppar mot *E. tenella* i serum vid 18 dagars ålder. Kycklingarna har avlivats gruppvis varannan dag fr.o.m. 6 till 16 dagar efter den experimentella *E. tenella*-infektionen. Parasitinfektionernas anslag följdes vid alla tillfällen genom att analysera utsöndringen av "parasitägg" (oocystor) i träck dag 5-10 efter infektion samt genom värdering av makroskopiska blindtarmsskador ("lesion scoring") dag 6 efter infektion. Efter avlivning har vita blodkroppar renats från blod och mjälte och cellerna har stimulerats i cellkultur i 96 h med antigen framställt av sonikerade *E. tenella*-sporozoiter, de sista 24 h i närvaro av radioaktivt (^3H) märkt tymidin ($0,5 \mu\text{Ci}/1 \times 10^6$ vita blodkroppar). Proliferationen analyserades genom detektion av inkorporering av ^3H -tymidin i arvsmassan hos celler som delar sig med hjälp av instrument som detekterar β -strålning. Vid ett tillfälle avlägsnades med hjälp av immuno-magnetisk separation (EasySep-metodik) de T-celler som uttrycker den s.k. γ/δ T-cells receptorn (γ/δ TCR) från mjältcellerna innan de odlades i cellkultur. Andelen celler med olika typer av TCR och renheten i cellpreparationer med och utan γ/δ TCR-celler bestämdes med immunfluorescensfärgning och flödescytometri.

Resultat & Diskussion

Vi har utfört ett flertal experimentella *E. tenella*-infektioner inom detta delprojekt och identifierat förhållanden, odlingsstid, medium etc, som möjliggör detektion av antigenspecifik proliferation hos mjältceller. Vi har inte detekterat antigen-specifik proliferation i blodcellskulturer. Vid de optimerade odlingsförhållandena visar de sammanlagda resultaten från fyra infektioner med 21 infekterade kycklingar vid varje provtagningstillfälle och 27 oinfekterade kontrollkycklingar tydligt *Eimeria*-specifik proliferation i mjältcellskulturer från fåglar som avlivats dag 8 till dag 14 (Figur 4). Proliferationssvaret varierar dock mycket i storlek mellan individer och är generellt förhållandevis lågt. En hög "bakgrundsproliferation" i ostimulerade kontrollkulturer (enbart odlingsmedium) observerades också ofta, speciellt i cellkulturer från oinfekterade kycklingar, vilket försvårar analyserna. Ett stort antal observationer behövs därför för att kunna använda denna metod för att utvärdera immunsvaret vid *Eimeria*-infektioner.



Figur 4. Proliferation inducerad med antigen från *E. tenella* i kulturer med mjältceller från oinfekterade kycklingar (n=27) samt kycklingar infekterade med *E. tenella* dag 0 och provtagna vid de indikerade tillfällena efter infektionen (n=21 varje provtagningsstillfälle). Resultaten visas som gruppmedelvärdet \pm 95% konfidensintervall.

Med syfte att försöka reducera variationen mellan individer testade vi att använda en högre infektionsdos. Standarddosen, 1000 oocystor/fågel, är framtestad med avseende på maximal oocystproduktion. En högre dos ger inte högre antal oocystor i träcken sannolikt på grund av begränsningar i blindtarmsceller tillgängliga för parasiternas förökning. Vi har dock observerat en variation i infektionens anslag mellan fåglar med avseende på blindtarmsskador vid dosen 1000 oocystor/fågel. Vår hypotes var därför att en högre infektionsdos som ger ett likartat anslag i blindtarmsskador skulle ge jämnare tillgång till parasitantigen för immunsystemet och då ett mer likartat proliferations svar mellan individer. Vi jämförde därför mjältcellsproliferation hos fåglar som infekterats med 1000 respektive 3000

oocystor/fågel (n=6 + 6 varje provtagningsdag 6-16 dagar efter *E. tenella*-infektion). Vi fann att dosen 3000 oocystor/fågel gav ett jämnare anslag med blindtarmsskador.

Proliferations svaren påverkades dock inte av infektionsdosen utan var likartade för de båda grupperna.

Det är beskrivet att T-celler med γ/δ TCR lätt stimuleras till celledelning vid kultur och därför ofta är ligger bakom till proliferation i ostimulerade kulturer och kan störa och dölja antigenspecifik proliferation i stimulerade kulturer. Då mjältcellspreparationer har en icke försumbar andel γ/δ TCR-uttryckande celler ville vi utvärdera ifall dessa celler orsakade den bakgrundsproliferation vi observerat och om vi kunde förbättra det *Eimeria*-specifika proliferations svaret om γ/δ TCR-cellerna avlägsnades. Vi fann i detta experiment att T-celler med γ/δ TCR utgjorde ca 20 % av de vita blodkropparna i mjältcellspreparationerna jämfört med ca 60% T-celler med α/β TCR. Efter immunomagnetiskt borttagande av γ/δ TCR-T-celler observerades <1% kvarvarande γ/δ TCR-celler bland mjältcellerna (n=12). Vi fann dock att borttagandet av γ/δ TCR-celler inte nämnvärt påverkade varken bakgrundsproliferationen eller den *Eimeria*-inducerade proliferationen.

Dessa resultat har presenterats vid 5th Conference of the Scandinavian-Baltic Society for Parasitology i Köpenhamn, september 2013 ⁽⁹⁾. Sammantaget har vi gjort nödvändig och viktig metodutveckling för att kunna studera immunsvaret vid *Eimeria*-infektioner hos höns. Resultaten utgör en viktig grund för den fortsatta identifieringen av *Eimeria*-specifika T-celler. Fortsatt utveckling av denna och andra metoder för studier av immunitet mot koccidiosis har också inletts. Bl.a. har vi börjat utvärdera produktion av cytokinet IFN- γ som mått på *Eimeria*-specifika immunsvaret. IFN- γ kan produceras av t.ex. CTL och T-hjälparceller och är bl.a. viktigt i styrningen av immunsvaret. Parallellt med proliferationsanalyserna kommer vi att med ELISA-teknik mäta produktionen av IFN- γ i cellkulturerna som beskrivits ovan. Vidare analyser inkluderar identifiering av de celler som producerar IFN- γ med en flödescytometri baserad metod som utvecklats i samarbete med Foulum ⁽²⁾. Vi har också börjat utvärdera analyser av s.k. blastogenes (celler som är aktiverade/skall dela sig ökar i storlek) med flödescytometri för att studera antigenspecifika T-celler hos höns ⁽⁵⁾. När vi etablerat ett slutgiltigt protokoll för detektion och identifiering *Eimeria*-specifika T-celler kommer resultaten att sammanställas för publikation i en vetenskapligt granskad tidskrift.

Publikationer

1. Dalgaard, T.S., L.R. Norup, D. Rubbenstroth, E. Wattrang, and H.R. Juul-Madsen, *Flow cytometric assessment of antigen-specific proliferation in peripheral chicken T cells by CFSE dilution*. Vet Immunol Immunopathol, 2010. **138**(1-2): p. 85-94.
2. Dalgaard, T.S., L.R. Norup, E. Wattrang, and H.R. Juul-Madsen. *Evaluation of intracellular cytokine staining by flow cytometry for assessment of vaccine outcomes in chickens*. in *XIth Avian Immunology Research Group Meeting*. 2010. Budapest, Hungary.
3. Juul-Madsen, H.R., L.R. Norup, P.H. Jorgensen, K.J. Handberg, E. Wattrang, and T.S. Dalgaard, *Crosstalk between innate and adaptive immune responses to infectious bronchitis virus after vaccination and challenge of chickens varying in serum mannose-binding lectin concentrations*. Vaccine, 2011. **29**(51): p. 9499-507.
4. Wattrang, E., L.R. Norup, H.R. Juul-Madsen, and T.S. Dalgaard. *Preliminary characterisation of CD107a and CD57 as potential activation markers of chicken cytotoxic T-cells*. in *XII Avian Immunology Research Group Meeting*. 2012. Edinburgh, UK.
5. Dalgaard, T.S., L.R. Norup, J. Pleirup, R.M. Kjærup, E. Wattrang, and H.R. Juul-Madsen. *Evaluation of an easy flow-cytometric assay for detection of specific cell mediated immunity in activated whole blood or PBMC from chickens*. in *41st Scandinavian Society for Immunology Meeting*. 2013. Copenhagen, Denmark.
6. Wattrang, E., R.M. Kjærup, L.R. Norup, H.R. Juul-Madsen, and T.S. Dalgaard. *Degranulation of chicken cytotoxic T-cells during infectious brochitis virus infection*. in *10th International Veterinary Immunology Symposium*. 2013. Milan, Italy.
7. Magnusson, S.E., P. Thebo, A.L. Smith, A. Lundén, and E. Wattrang. *Immune responses at experimental Eimeria tenella infection of naive and immune chicken*. in *9th International Veterinary Immunology Symposium*. 2010. Tokyo, Japan.
8. Magnusson, S., P. Thebo, A.L. Smith, A. Lundén, and E. Wattrang. *Local perforin mRNA expression at experimental Eimeria tenella infection of naive and immune chicken*. in *XIth Avian Immunology Research Group Meeting*. 2010. Budapest, Hungary.
9. Lundén, A., P. Thebo, and E. Wattrang, *Parasite specific proliferation of chicken spleenocytes upon in vitro stimulation with Eimeria tenella antigen*. Trop Med Int Health, 2013. **18**(suppl. 1): p. 106.

Slutsatser & Resultatförmedling till näringen

Resultaten från denna projektperiod har bland annat bidragit med ny kunskap om immunitetsutvecklingen vid koccidios där "T-mördaceller", CTL, allt tydligare framstår som en viktig faktor. Projektet har också bidragit till att flera nya metoder för att studera hönsens immunsystem tagits fram och vi har nu en god plattform för studier av immunitetsutveckling mot koccidios hos höns. Ett viktigt och väl fungerande internationellt kontaktnät har också skapats. Vi har nu möjlighet att utvärdera hönsens immunsvaret vid *Eimeria*-infektioner med moderna immunologiska metoder. Den kunskap detta genererar ger oss förutsättningarna för att förstå vilken typ av immunsvaret ett vaccin måste inducera för att ge skydd mot sjukdomen. Vi kan vidare också utvärdera och ta fram lämpliga "hjälpstanser" (adjuvans) för att ett vaccin ska kunna inducera rätt typ av immunsvaret. Sammantaget har vi alltså lagt grunden för att ha mycket goda förutsättningar för att i framtiden delta i framtagandet av moderna vacciner mot koccidios hos slaktkyckling. Det är sålunda mycket angeläget för näringen att vi även i fortsättningen har en livskraftig forskning inom detta viktiga område.

Resultaten från projektet har och kommer vidare att förmedlas via publikationer i vetenskapligt granskade tidskrifter och i konferensrapporter och finns tillgängligt nationellt och internationellt. Projektet har också rapporterats vid branchmöten, senast vid projektrådsmötet för fjäderfä i oktober 2012. Docent Anna Lundén är ansvarig för ämnet vid undervisningen i parasitologi för veterinärstudenter och föreläser årligen för dessa.