

Slutrapport: Utveckling av vaccin mot koccidios hos slaktkyckling – identifiering av skyddande immunfunktioner, 2004-2006. Dnr 156/03 projektnummer 0343005

BESKRIVNING AV PROJEKTET

Projektet pågick under tre år (2004-2006) med en forskare (Eva Wattring) anställd 50% och hade som mål att bidra till utvecklingen av moderna subenhetsvaccin mot koccidios hos slaktkyckling.

När projektet startades fanns i princip inga metodologiska resurser att studera hönsfåglars immunfunktioner vid SVA eller SLU. Mycket arbete har därför lagts ned på metodutveckling och vi har etablerat fruktbara internationella samarbeten med hönsimmunologer och därigenom fått tillgång till viktiga reagens och expertis inom området. Vi samarbetar i dagsläget framförallt med professor Bernd Kaspers grupp vid Ludwig-Maximilians-Universitet i München, Tyskland, och Dr Helle Juul-Madsens grupp vid Danmarks Jordbrugsforskning (DIAS) i Foulum, Danmark. Eftersom mycket tyder på att cytotoxiska T-celler ("T-mördar celler; CTL) är centrala i immuniteten mot *Eimeria*-infektioner har vi lagt stor vikt vid detektion av höns-CTL. För att utföra denna typ av analyser krävs bl.a. tillgång till MHC I definierade djur (se nedan). Vi kontaktade därför Dr Helle Juul-Madsen som har tillgång till sådana djur för att starta ett samarbetsprojekt för utveckling av metoder för studier av cellmedierade immunfunktioner hos höns. Samarbetet har inletts med att Eva Wattring tillbringade 8 månader (oktober 2005 – maj 2006) som gästforskare vid DIAS finansierat av det Danska forskningsrådet för Teknologi og produktion.

Arbetet inom projektet har fokuserats på tre områden, inom vilka följande delmål uppnåtts:

I) Etablering av metoder för att studera hönsfåglars immunsvär

- a) en ny metod för att detektera och typa antigen-specifika hönslymfocyter har etablerats
- b) ett antal MHC I-definierade hönszellinjer som krävs för att detektera CTL-aktivitet har etablerats
- c) en metod för att påvisa och mäta CTL-aktivitet hos höns har satts upp
- d) metoder att mäta olika hönscytokiner, bl.a. ett ELISA-test för höns-IFN- α har utvecklats

II) Utvärdering av potentiella adjuvans för *Eimeria*-vaccin

Effekten av olika typer av immunstimulerande DNA på vita blodkroppar från höns har studerats *in vitro* och vilket bl.a. resulterat i ny kunskap om hur hönsceller reagerar.

III) Utvärdering av subenhetsvaccin mot koccidios med DNA adjuvans

Ett vaccinations- och infektionsförsök där DNA-adjuvans i vaccin mot koccidios utvärderades startades i december 2006

RAPPORTERING AV DELPROJEKTEN

I. Etablering av metoder för att studera hönsfåglars immunsvär vid *Eimeria*-infektioner

En förutsättning för detta projekt var tillgång till metoder för att studera hönsfåglars immunsystem. Därför har mycket av arbetet inom projektet ägnats åt att etablera en metodologisk plattform för immunologisk forskning på höns. Då den i dagsläget tillgängliga kunskapen om skyddande immunitet mot *Eimeria*-infektioner pekar mot att cellmedierat immunsvär är avgörande för fåglarnas överlevnad fokuserade vi på metoder för att studera T-cellsfunktioner samt cytokiner som är viktiga för dessa.

a) Identifiering av *Eimeria*-specifika T- och B-celler:

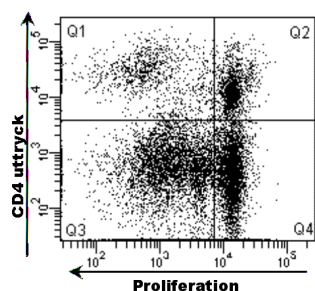
Bakgrund

Vid ett specifikt immunsvär mot ett infektionsämne genereras kloner av antigenspecifika T- och B-celler. När dessa åter stöter på antigenet aktiveras de och börjar bl.a. att dela sig (proliferera). För att identifiera celler som prolifererar kan man färga in dem med ett grönt färgämne (CFSE) som fångas i cytoplasman. När cellerna sedan delar sig halveras det gröna färgämnet vid varje celldelning ⁽¹⁾. Med hjälp av flödescytometri analyserar man hur mycket

grön färg varje cell innehåller och kan på så sätt avgöra hur många celler som prolifererat och hur många celldelningar de genomgått. Genom att också märka cellerna med specifika reagens för cellytemarkörer och/eller cytokiner som kopplats till andra färgämnen (t.ex. orange eller rött) kan man samtidigt identifiera de celler som prolifererat (t.ex. T- eller B-celler) och/eller vilka cytokiner de producerar. Denna metod har använts för att studera immunceller från flera däggdjursarter och vi bestämde oss för att etablera metoden för höns-celler. Först sattes metoden upp för att identifiera celler som aktiverats till proliferation med mitogena substanser (ämnen som kan få ett stort antal lymfocyter att proliferera) med lyckat resultat (se delprojekt II). Vi fortsatte sedan med att detektera antigenspecifik proliferation. Eftersom antalet celler som är specifika för ett antigen är avsevärt mindre än de som svarar vid mitogenstimulering är det mycket svårare få metoden känslig nog att detektera denna typ av proliferation. Detta projekt utfördes i samarbete med DIAS och vi använde därför i det första experimentet MHC I-definierade djur med känd immunstatus mot olika virusinfektioner.

Material och Metoder

Tolv höns vaccinerades vid åtta veckors ålder mot infectious Bursal disease virus (IBDV) med ett inaktiverat vaccin (stram D78, 14.5 log₂ VN enheter/dos i en "vatten-i-olja" emulsion; Nobilis® Gumboro Inac., Intervet International Boxmeere, Nederländerna). Hönsen hade två olika MHC I haplotyper, B19 (n=6) och B210 (n=6). I försöket ingick också åldersmatchade ovaccinerade höns med samma MHC I haplotyper (n=6). Blodprov samlades före vaccination samt 1, 3, 5, 7, 16 och 97 veckor efter vaccinationen. ELISA-teknik användes för att bestämma antikroppar mot IBDV i serum vid alla provtagningstillfällena.



Figur 1. CFSE färgade mjältceller från en tupp vaccinerad mot IBDV, stimulerade *in vitro* med IBDV-antigen i 6 dagar. Q1 & Q3 prolifererande celler, Q2 & Q4 icke-prolifererande celler, Q1 & Q2 celler som uttrycker CD4.

Proliferation av IBDV-specifika T-celler bestämdes med hjälp av CFSE-teknik vid provtagningen 97 veckor efter vaccination. CFSE-färgningen utfördes på vita blodkroppar som renades fram från heparinstabiliserat hönsblod enligt etablerade protokoll. CFSE (caroxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester; Vybrant™ CFDA SE cell Tracer Kit, Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA) tillsattes till cellerna enligt tillverkarens protokoll och cellerna

inkuberades 6-7 min i rumstemperatur varefter upptaget av färg stoppades genom tillsats av fetalt kalvserum och fri färg tvättades bort genom upprepade centrifugeringar i PBS. Cellerna suspenderades sedan i cellodlingsmedium, sattes till cellodlingsbrunnar med IBDV antigen och inkuberades vid 40 °C, 7 % CO₂ och mättad luftfuktighet i 5-7 dagar. Cellerna färgades sedan med immunfluorescens-teknik med antikroppar mot cellytemolekyler (t.ex. CD4 [”T-hjälpar celler] och CD8 [”T-mördar celler”]) konjugerade med orange eller röda färgämnen. Flödescytometrisk analys användes för att bestämma cellernas grad av grönfärgning (mått på celldelning) och samtidigt detektera cellernas uttryck av cellytemolekyler.

Resultat och Diskussion

Antikropsbestämningarna visade att alla vaccinerade höns serokonverterade mot IBDV men antikropsnivåerna var signifikant högre i blod från djur med B210 haplotypen än hos djur med B19 haplotypen. Med hjälp av CFSE-tekniken detekterades proliferation av både CD4 positiva (”T-hjälpar” celler) och CD8 positiva (”T-mördar” celler) IBDV-specifika T-celler (Figur 1). Proliferation kunde bara detekteras hos de vaccinerade hönsen. Antalet T-celler som prolifererade varierade stort mellan olika individer och ingen skillnad mellan djur med de olika MHC I haplotyperna observerades. Detta är första gången som antigenspecifika lymfocyter påvisats på detta sätt hos höns. Vi fann att CFSE-metodiken var mycket användbar för ändamålet då man både kan uppskatta antalet celler som svarar på stimulering och fastställa deras identitet. Då metoden är baserad på flödescytometri går analyserna relativt snabbt och man undviker att använda radioaktiva isotoper som annars är vanliga vid detektion

av cellproliferation. På DIAS kommer metoden att utvecklas vidare för att detektera lymfocyter specifika för andra höns patogener och vi kommer att utveckla metoden för detektion av *Eimeria*-specifik proliferation.

b) Etablering av en panel MHC I-definierade höns cellinjer

Bakgrund

Det har rapporterats att CD8+ lymfocyter är associerade till skyddande immunitet mot *Eimeria*-infektioner hos höns. Hos däggdjur är CD8 en klassisk markör för CTL och det har föreslagits att CTL kan ha en avgörande roll i *Eimeria*-försvaret genom att döda parasitinfekterade celler. Vi anser därför att det är viktigt att klargöra om höns-CTL kan döda *Eimeria*-infekterade celler och ifall denna funktion är central i den skyddande immuniteten mot parasiten. För att påvisa och mäta CTL-aktivitet krävs att vissa tekniska kriterier uppfylls. Till att börja med måste CTL ("mördarcell") och den infekterade cellen ("målcell") vara av samma MHC I-haplotyp ("vävnadstyp"). Vidare måste den infekterade cellen presentera det främmande antigenet på MHC I-molekylen för att CTL skall kunna känna igen att cellen är infekterad och döda den. Slutligen måste man ha en metod för att detektera att målcellerna dödas. För stora djurslag löser man ofta problemet med MHC I-kompatibilitet genom att använda CTL och målceller från samma individ. Med små djur som kycklingar och höns kan detta tillvägagångssätt givetvis vara problematiskt. Det finns dock MHC I-definierade höns linjer där alla djur har samma MHC I-haplotyp. Om man använder denna typ av djur kan man t.ex. etablera MHC I definierade cell-linjer som kan användas som målceller åt CTL från alla djur med samma MHC I. Genom vårt samarbete med DIAS har vi tillgång till de 15 MHC I-definierade höns linjer som hålls där.

Material och Metoder

Höns homozygota för MHC I haplotyperna B19, BW1, respektive B2 inseminerades med sperma samlad från MHC I matchade tuppar. Befruktade ägg samlades och inkuberades i ägginkubator vid 37,7 °C och 55 % luftfuktighet i 10 dagar. Fostren avlivades och kroppen utom huvudet finfördelades med sax och trypsinerades till en singel-cell suspension enligt etablerade protokoll. Cellerna såddes i cellodlingsflaskor och efter ca 2-5 dagars odling vid 40 °C, 7 % CO₂ och mättad luftfuktighet, kunde adherenta celler (embryofibroblaster) expanderas. Cellerna expanderades till så stort antal som möjligt och frystes kontinuerlig in i flytande kväve vid så låga passager som möjligt. Cellerna klarade ca. fem passager i cellkultur innan de slutade att expandera. Embryofibroblastcellinjen DF-1 inköptes från American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). Denna cellinje är spontant immortaliserad ("odödlig") med ursprung i 10 dagars foster från East Lansing linjen och uttryckte enligt uppgift MHC I haplotypen B21 ⁽²⁾. Tre stycken B-cellinjer erhöles från Dr Thomas Goebel, München. Dessa B-cellinjer växer i suspension och är immortaliserade med hjälp av retrovirus-transformering och uttryckte enligt givarens uppgift MHC I haplotyperna B2, B15 respektive B21. PCR-baserad microsatellitanalys enligt Fulton et al. ⁽²⁾ användes för att verifiera de olika cellinjernas MHC I haplotyper. Immunfluoresence-färgning med antikroppar mot höns-MHC I och MHC II och flödescytometrisk analys användes för att detektera och kvantifiera de olika cellinjernas uttryck av dessa molekyler.

Resultat och Diskussion

Vi har sålunda sammanställt en panel med MHC I definierade höns celler bestående av tre primära cellinjer och fyra immortaliserade cellinjer. Alla cellinjers MHC I haplotyp verifierades med PCR-analys och våra cellinjer representerar alltså fem olika haplotyper. Dessa MHC I haplotyper valdes dels på grund av att tidigare studier har visat att djur med dessa haplotyper har olika nivåer av antikroppssvar efter vaccination, B21 och BW1 svarar med höga nivåer, B19 med låga och B2 och B15 är intermediära ⁽³⁾. Eftersom djuren verkar

olika benägna att producera antikroppar är det också möjligt att de har olika nivåer av T-cells svar och vi var angelägna att kunna använda djur som representerar olika immunreaktivitet. Djur homozygota för B2 har också tidigare visats ha starka cellulära immunsvaret mot *Eimeria*-infektioner ⁽⁴⁾. Celltyperna i vår panel har olika för och nackdelar vad beträffar deras användbarhet i CTL-test. Immortaliserade celler är till exempel lättare att hålla i odling medan primära celler kan vara mer "ursprungliga" och lättare för immunsystemet att "känna igen". Vidare är embryofibroblaster lätta att infektera med olika patogener men har ett lägre uttryck av MHC I vilket kan påverka CTL-svaret. B-celler å andra sidan uttrycker höga nivåer av MHC I men kan kanske vara svårare att infektera samt uttrycker också MHC II vilket eventuellt kan påverka CTL-svaret. En utav utmaningarna med ett *Eimeria*-specifikt CTL-test är att ta fram målcellerna. *Eimeria*-parasiter kan inte odlas rutinmässigt i cellkultur men metoder att etablera en primär, non-produktiv infektion av celler i cellkultur finns beskrivna ⁽⁵⁾. Vi arbetar därför just nu med att etablera protokoll för att infektera de MHC I-definierade höns-cell-linjer i cellkultur för att använda som målceller i CTL-testet.

c) *Detektion av Eimeria-specifik CTL-aktivitet hos höns:*

Bakgrund

Vi behövde vidare välja en metod för att detektera att målceller dödas. Vår avsikt var att adaptera en modern och känslig flödescytometribaserad metod för analys av höns-celler. Den nyligen beskrivna metoden där detektion av aktiverat caspase 3 (ett enzym) används för att mäta död (apoptos) hos målceller ⁽⁶⁾ vekade uppfylla våra krav på robusthet och känslighet. Denna metod går kortfattat ut på att infekterade målceller som färgats gröna med CFSE blandas med vita blodkroppar från exempelvis ett immunt djur. Efter 2-4 timmar odling färgas cellerna för celldöd med antikroppar mot aktiverat caspase 3 som kopplats till ett orange färgämne. CTL-aktiviteten bestäms sedan som proportionen dödade (orange) celler bland målcellerna (gröna). Denna metod detekterar alltså inte bara att CTL-aktivitet finns utan antalet dödade målceller kan också användas som ett mått på hur många, alternativt hur aktiva, CTL är.

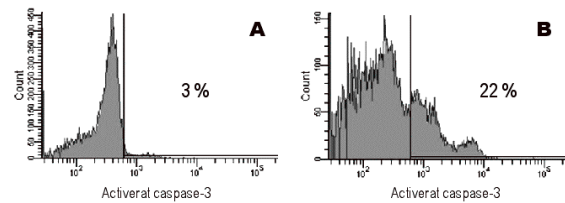
Material och Metoder

Höns-celler, vita blodkroppar eller cell-linjerna beskrivna ovan, bestrålades två gånger med 240 mJ UV-ljus med minst 1 minut mellan bestrålningarna. Cellerna odlades sedan i 2-4 h vid 40 °C, 7 % CO₂ och mättad luftfuktighet. Efter inkuberingen fixerades cellerna med 2 % paraformaldehyd i PBS i 20 min vid 4 °C varefter de permeabiliserades med 0,2 % Tween 20 (Sigma-Aldrich) i PBS i 15 min. Cellerna färgades sedan för intracellulärt uttryck av aktiverat caspase 3 med en antikropp mot humant aktiverat caspase 3 (C92-605; BD Biosciences) konjugerad till det orange färgämnet phykoerythrin. I vissa experiment CFSE-färgades höns-cell-linjerna enligt metoden beskriven i *Ia* före UV-behandlingen. Vid CTL-test IBDV infekterades CFSE-färgade målceller i cellkultur i 20 h vid 40 °C, 7 % CO₂ och mättad luftfuktighet. Därefter tillsattes vita blodkroppar i olika spädningar så att förhållande mellan vita blodkroppar och målceller varierade från 100:1 till 1:10. Cellkulturerna inkuberades ytterligare 4 h vid 40 °C, 7 % CO₂ och mättad luftfuktighet varefter cellerna fixerades, permeabiliserades och färgades för aktiverat caspase 3 som beskrivits ovan. För att erhålla nyligen immuniserade MHC I-definierade djur vaccinerades 25 vuxna höns (ca 2 år gamla) homozygota för några olika MHC I haplotyper mot IBDV. Dessa djur hade aldrig tidigare varit infekterade med, eller vaccinerade mot, IBDV. Hönsen vaccinerades först med ett levande vaccin (stam D78, $\geq 4.0 \log^{10}$ TCID₅₀/dos; Nobilis® Gumboro D78, Intervet International) och fick sedan 2 booster-vaccinationer med 4-5 veckors intervall med ett inaktiverat vaccin (stam D78, 14.5 log₂ VN enheter/dos i en "vatten-i-olja" emulsion; Nobilis® Gumboro Inac., Intervet International). Blod prov samlades före vaccination och 1-3 veckor efter varje vaccination, vidare samlades blod och mjältprover vid avlivningen 4 veckor

efter den sista vaccinationen. ELISA-teknik användes för att bestämma antikroppar mot IBDV i serum vid alla provtagningstillfällena.

Resultat och Diskussion

Vi började med att utvärdera antikroppen som är framtagen för att detektera humant caspase 3 för korsreaktivitet med hönsproteinet. Med hjälp av UV-ljusbestrålning inducerade vi apoptos i hönsceller som sedan färgades med antikroppen och analyserades med flödescytometri. Vi fann då att denna antikropp korsreagerar med aktiverat höns caspase 3 och alltså går utmärkt att använda för att detektera celldöd i hönsceller (Figur 2). Vi fortsatte sedan med att adaptera "caspase 3 CTL-testet" till hönssystemet. Vi använde UV-ljus för att inducera celldöd i grönfärgade hönsceller och använde då vår panel av MHC I-definerade målceller. I dessa försök fann vi att "caspase 3-testet" fungerade utmärkt för att detektera celldöd i dessa celler. Vi har sålunda avklarat de tekniska förutsättningarna för att mäta höns-CTL-aktivitet.



Figur 2. Intracellulär immunofluorescence-färgning av aktiverat caspase-3 i obehandlade (A) eller UV-behandlade (B) hönsceller

Vi behövde sedan CTL-celler från immuna djur för att kunna etablera och förfina metoden. Då det är väl vedertaget att CTL är nyckelkomponenter i immuniteten mot virusinfektioner var det logiskt att använda virus-specifika CTL som "positiv kontroll" för denna utvärdering. Först använde vi blodkroppar samlade från djur 97 veckor efter vaccinering med ett inaktiverat IBDV-vaccin. Vi använde då vita blodkroppar direkt när de var reade från blod och efter att de hade stimulerats med IBDV i cellkultur i 6 dagar. Trots att dessa blodkroppar kunde stimuleras med antigen så att celldelning kunde påvisas, som beskrivits ovan, var andelen CD8+ celler (potentiella CTL) bland blodkropparna både direkt och efter stimulering mycket låg (2-9%). Andelen IBDV-specifika CTL är då givetvis ännu lägre och vi kunde inte påvisa någon IBDV-specifik CTL aktivitet hos någon av dessa djur. Då andelen IBDV-specifika T-celler mycket sannolikt är beroende av hur lång tid som förflutit sedan

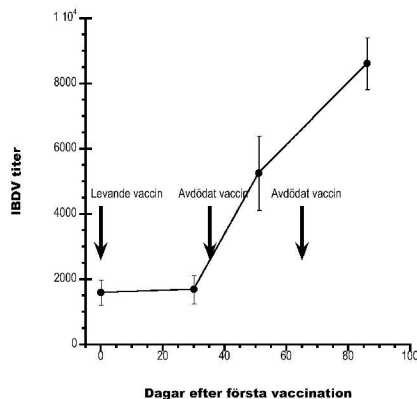


Figure 3. Medel titrar (\pm 95% konfidenzintervall) IBDV-specifika antikroppar efter IBDV vaccination av vuxna höns

immunisering gick vi därför vidare med att testa nyvaccinerade djur. Förutom celler från blod ville vi även testa mjältceller eftersom andelen CD8+ celler är betydligt högre i mjälten än i perifert blod. Vi vaccinerade därför höns först med levande och därefter med inaktiverat IBDV. Resultaten från antikropsbestämningarna i serum (Figur 3) visar att inget av djuren svarade med antikropsproduktion efter den första vaccinationen med levande vaccin. Efter den andra vaccinationen med inaktiverat virus svarade dock många höns men antikropsnivåerna var relativt låga och överinstämde med de man normalt observera vid en första immunisering. Efter den tredje vaccinationen steg antikropsnivåerna hos de flesta djuren. Vi testade vita

blodkroppar för både CTL-aktivitet och proliferation vid flera tillfällen under experimentets gång och vid avlivningen (då även mjältceller) men kunde inte vid något tillfälle detektera IBDV-specifik T-cellsaktivitet med någon av metoderna. Trots att djuren producerade IBDV-specifika antikroppar var alltså T-cells aktiviteten inte detekterbar för våra metoder. Ett flertal faktorer kan ha bidragit till dessa resultat. Till att börja med är det välkänt att inaktiverade vaccin ofta inducerar starka antikrops svar och ger svaga T-cells svar. Därför använde vi ett levande vaccin till den första vaccinationen eftersom levande vaccin anses vara det bästa valet för att inducera CTL-svar. I vårt experiment verkade dock det levande vaccinet inte inducera något som helst immun svar. Man kan spekulera att ett tekniskt fel eventuellt inaktiverade

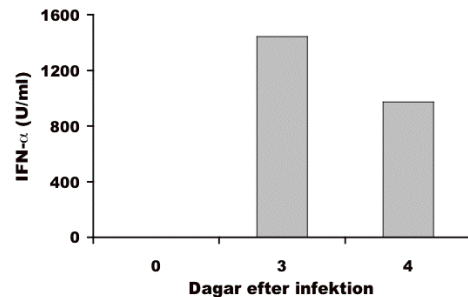
vaccinet eller att dosen, som var avpassad till 1-28 dagar gamla kycklingar (Intervet produktinformation) var för låg för vuxna djur. Eftersom det levande vaccinet falierade blev djuren enbart immuniserade men inaktiverat vaccin vilket kanske kan förklara de uteblivna T-cells svaren. Vi har dock i *I a*) påvisat IBDV-specifik T-cells proliferation efter vaccination med enbart inaktiverat vaccin hos fåglar som vaccinerats vid 8 veckors ålder ⁽⁷⁾. En annan förklaring till de låga T-cells svaren i detta experiment kan sålunda vara fåglarnas höga ålder vid deras första vaccination. Det är känt att äldre individer har lägre specifika immunsvår när de träffar på helt nya antigen än unga individer som exponeras för samma antigen. Det har också framlagts en teori att detta beror på att äldre individer har låga nivåer av naiva T-celler och i stor grad är beroende av immunsvår från korsreaktiva T-minnes celler ⁽⁸⁾.

Mot bakgrund av dessa resultat har vi startat ett nytt experiment där MHC I-definierade kycklingar genomgår ett vaccinations program mot Newcastle disease virus (NDV). Dessa djur kommer sedan först att utvärderas med avseende på NDV-specifik T-cells proliferation och när vi kan detektera sådan kommer vi att testa dem för CTL-aktivitet. Det senare är planerat till hösten 2007. Som nämnts tidigare har vi påbörjat arbetet med att infektera målceller med *Eimeria*-parasiter och kommer sedan att utvärdera CTL-testet med vita blodkroppar från djur som är immuna mot koccidiosis.

d) Detektion av höns-cytokiner:

Bakgrund:

Den grupp proteiner som går under samlingsnamnet cytokiner har viktiga regulatoriska funktioner i immunsystemet. Exempelvis så styr de cytokiner som produceras när immunsystemet för första gången möter ett infektiösaämne vilken typ av specifikt immunsvår som utvecklas. För hönsfåglar, som för de flesta av lantbrukets djur, finns det begränsat med specifika reagens för att detektera cytokiner. Då IFN- α spelar en nyckelroll i utvecklandet av CTL-svar har vi hittills fokuserat på att etablera metoder för att detektera detta cytokin. Genom samarbete med professor Bernd Kaspers, Munchen, Tyskland, har vi bl.a. fått tillgång till antikroppar mot höns-IFN- α som hans forskargrupp tagit fram.



Figur 4. Medelnivåer av IFN- α i serum från kycklingar experimentellt infekterade med IBDV dag 0.

Material och Metoder

Vi har tillgång till tre monoklonala musantikroppar och ett polyklonalt kanin anti-serum mot höns IFN- α . Dessa antikroppar har utvärderats med avseende på användning i ELISA-metodik. Genom samarbete med DIAS har vi fått tillgång till serumprover från kycklingar samlade dagligen efter en experimentell infektion med IBDV.

Resultat och Diskussion

Vi har testat fram en antikroppskombination som i ELISA dos-beroende detekterar rekombinant höns-IFN- α i ett godtagbart koncentrationsintervall. Denna ELISA utvärderas nu för detektion av naturligt höns-IFN- α i biologiska prover. Preliminära resultat med serum från IBDV infekterade fåglar visar att vi kan detektera IFN- α i serum 3 och 4 dagar efter infektion (Figur 4). Fortsättningsvis kommer detta test att användas för att följa och förstå induktionen av CTL-svar i hönsfåglar under infektion och efter vaccination. Vi har vidare tillgång till metoder för att detektera bl.a. höns-IL-6-aktivitet samt real-tids PCR-metodologi för att detektera uttrycket av cytokin-mRNA i höns-celler och vävnadsprover.

II. Utvärdering av potentiella adjuvans för *Eimeria*-vaccin

Bakgrund

De allra flesta icke-levande vacciner behöver hjälpsubstanser, adjuvans, för att kunna aktivera immunsvaret i tillräcklig grad så att skyddande immunitet utvecklas. Majoriteten av de adjuvans som används idag anses inducera framförallt Th2-svar medan Th1-svar förefaller betydligt svårare att aktivera. Modern vaccinforskning ägnas därför mycket åt att ta fram adjuvans som inducerar Th1-svar. Eftersom mycket tyder på att ett Th1-typ svar krävs för att erhålla skyddande immunitet mot *Eimeria*-infektioner hos hönsfåglar har vi börjat evaluera vilken typ av adjuvans som är lämpliga för ett subenhetsvaccin mot koccidios. Inom vaccinforskning har de senaste åren stort intresse fokuserats på s.k. immunstimulerande DNA som adjuvans vilket bl.a. anses vara den bästa induceraren av Th1-svar. Vi började därför att utvärdera denna typ av adjuvans för användning i hönsfåglar. För att utvärdera vilken typ av DNA som verkar lämplig att inkludera i ett koccidievaccin inleddes arbetet med en *in vitro*-studie. I denna första utvärdering prövade vi olika korta syntetiska oligodeoxynukleotiderna (ODN) förmåga att inducera olika immunfunktioner hos vita blodkroppar från höns. ODN valdes ut med avseende på deras tidigare beskrivna förmåga att inducera immunfunktioner i t.ex. höns-, häst-, gris- och människoceller. De ODN som användes beskrivs i Tabell 1 och innefattar bl.a. ODN med sekvenser där basen guanin (G) följs av basen cytidin (C), sk. CpG-motiv. Det anses att CpG-motiv är mycket viktiga, t.o.m. nödvändiga, för att immunsystemet skall aktiveras av DNA. Hos en del däggdjur (fr.a. mus och människa) har man visat att en speciell cellulär receptor, Toll Like Receptor-9 (TLR-9), står för igenkänningen av CpG-motiv. ODN med den omvända sekvensen, d.v.s. GpC-motiv användes som kontroll till ODN med CpG-motiv. Vidare användes ODN med olika typer av bindning mellan nukleotiderna; fosfodiester (den naturliga formen av nukleinsyra) och fosforothioat (en syntetisk form av nukleinsyra). ODN i fosfodiester form är naturliga men känsliga för nedbrytning vilket kan medföra att de är mindre aktiva. Fosforothioat-ODN är mycket resistent för nedbrytning och anses mer aktiva men kan ibland orsaka biverkningar p.g.a. att de stannar kvar i vävnaden under längre tid.

Material och Metoder

En panel med 11 olika ODN (Tabell 1) från Cybergene AB (Huddinge) användes i studien. Vita blodkroppar som isolerats från blodgivarehöns (Hy-Line white, SVA, Håttunaholm) odlades i cellkultur tillsammans med 5 eller 25 µg ODN/ml cellodlingsmedium. Vissa ODN testades också tillsammans med ytterligare tillsats av 5 µg lipofectin (Invitrogen)/ml cellodlingsmedium. Lektinet concanavalin A (Con A, 20 µg/ml, GE Healthcare, Uppsala) användes som positiv kontroll för induktion av proliferation. Efter 48 h inkubering vid 40 °C, 7 % CO₂ och mättad luftfuktighet, tillsattes radioaktivt ³H-thymidin (GE Healthcare) och cellerna odlades vidare i 24 h. Radioaktiviteten som inkorporerats i de celler som undergått delning bestämdes med scintigrafi. Cellernas proliferation uttrycktes som stimulationsindex (SI) dvs radioaktiviteten i stimulerade kulturer delat med radioaktiviteten i kulturer som odlats i enbart cellodlingsmedium. Vi använde också CFSE-metoden (se *Ia*) för att identifiera de celler som svarade med proliferation vid ODN stimulering. I dessa experiment odlades cellerna i 5 dagar innan analysen. För denna analys användes antikroppar mot CD3 (en T-cells markör), Bu-1 (en B-cells markör), immunoglobulin (Ig; en B-cells markör) och MHC II (en antigenpresentations molekyel som bl.a. finns på B-celler). För att separera ut B-celler från resten av de vita blodkropparna använde vi i vissa experiment sk immuno-magnetisk separation. Vi lät antikroppar kopplade till mycket små magnetkuler binda till vita blodkroppar i ett provrör. Därefter placerades provet i en stark magnet och de celler som bundits av antikropparna hölls då fast mot provrörsväggen av magneten. Icke inbundna celler kunde hållas av och samlas upp i ett annat provrör. Genom att flytta bort det ursprungliga provröret från magneten kunde vi också ta tillvara de inmärkte cellerna. Vi separerade på detta sätt ut B-celler från vita hönsblodkroppar med hjälp av en antikropp mot Bu-1. De olika

cellpopulationerna (ursprungs preparationen, framrenade B-celler och vita blodkroppar utan B-celler) stimulerades sedan med ODN och Con A och proliferationen mättes med hjälp av ³H-tymidin som beskrivits ovan.

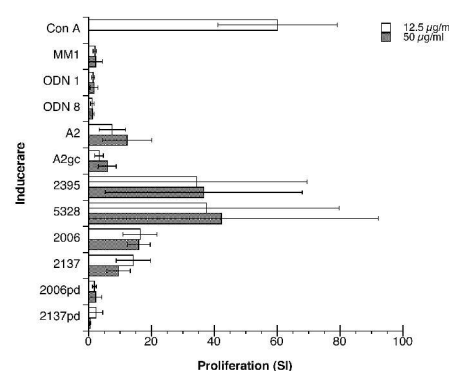
Tabell 1. Namn och nukleotidsekvens för ODN som användes för att inducera proliferation hos vita blodkroppar från höns

Namn	Sekvens från 5' till 3'	Namn	Sekvens från 5' till 3'
MM1	ggGGTCATCGATGAgggggG	5328	tgctgcttttcgggcgcgcgccg
1	TCGATCGACGTTGAGGGGGG	2006	tcgtcgtttttgctgcttttgctgt
8	GGAGTCGTACGTCAGGGGGG	2137	tgctgcttttgctgcttttgctgt
A2	gctagacgttagcgt	2006pd	TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
A2gc	gctagacgttaggct	2137pd	TGCTGCTTTTGTGCTTTTGTGCTT
2395	tcgtcgtttttcgggcgcgcgccg		

Versaler i nukleotidsekvensen anger fosfodiesterbindningar mellan baserna, gemener anger fosforothioatbindningar.

Resultat och Diskussion

När dessa ODN testades med avseende på induktion av proliferation av vita blodkroppar



Figur 5. Proliferation av vita blodkroppar som odlats 72 h i närvaro av olika inducerare. Inducerarna användes i två olika koncentrationer: 12,5 µg/ml (vita staplar) och 50 µg/ml (grå staplar). Proliferationen uttrycks som stimulationsindex (SI) i jämförelse med ostimulerade celler och anges som medelvärdet av prover från ± 6 höns ± 95 % konfidensintervall.

(Figur 5) observerades att ODN i fosforothioatform var aktiva, medan ODN i fosfodiesterform verkade vara inaktiva. Förekomst av CpG-motiv verkade däremot vara av underordnad betydelse då både ODN med CpG-motiv och ODN med GpC motiv inducerade likvärdiga proliferations svar. Detta är särskilt intressant eftersom ODN med GpC-motiv anses vara i det närmaste inaktiva hos de flesta andra djurslag. Betydelsen av fosforothioatformen visades ytterligare då ODN 2006 och ODN 2137 testades i fosfodiesterform. Dessa ODN som fosfotioatform inducerade proliferation, förlorade i princip denna förmåga då de användes i fosfodiesterform (Figur 5). Vidare testades tillsats av lipofectin, en

substans som bl.a. förhindrar nedbrytning av DNA och underlättar upptaget av DNA i cellerna, som tidigare visats öka svaret på is-DNA i bl.a. gris- och människoceller. I vårt höns cellsystem verkade dock lipofectin inte ha någon potentierande effekt, varken på ODN som inducerade proliferation i sig själva eller på ODN som inte hade någon effekt utan lipofectin.

I mus och människa har man visat att det är de celler som har receptorn TLR-9 (t.ex. B-celler och dendritiska celler) som svarar på DNA. Bland annat har man observerat att det är B-cellerna, d.v.s. de celler som producerar antikroppar, som svarar med proliferation vid stimulering av vita blodkroppar med DNA. Studier av hönsfåglars genom har dock visat att de med största sannolikhet saknar motsvarigheten till däggdjurens TLR-9. Följaktligen var det särskilt angeläget att identifiera de celler som prolifererade vid ODN stimulering i vårt höns cellsystem. Vår analys visade att det var framförallt celler av B-cells typ, d.v.s. Bu-1, Ig och MHC II positiva, som prolifererade i ODN-stimulerade cellkulturer. För att utröna ifall B-cellerna själva svarade på stimuleringen med ODN, eller om någon annan cellpopulation behövde vara närvarande för att cellerna skulle proliferera separerade vi de olika typerna av vita blodkroppar innan ODN-stimuleringen. ODN-stimulering av de olika cellpopulationerna, ursprungliga vita blodkroppar, vita blodkroppar utan B-celler respektive enbart B-celler, visade att det enbart var B-cellerna som svarade på stimuleringen och att endast dessa celler behövde närvara för att cellerna skulle kunna proliferera. Resultaten visar alltså att det även hos hönsfåglar är B-celler som svarar med proliferation vid stimulering med ODN trots att dessa celler sannolik saknar motsvarighet till TLR-9. Sammantaget visar våra resultat på tydliga artskillnader i vilken typ av is-DNA som verkar stimulerande på immunsystemet. Det är därför viktigt att t.ex. ODN som skall användas som adjuvans utvärderas för att vara

optimalt för den djurart som vaccinet skall användas till.

Denna studie har gett ny kunskap om vilken typ av nukleinsyra som aktiverar hönsfåglars immunsystem. Med ledning av dessa resultat kommer vi att göra en första utvärdering av DNA som adjuvans i koccidiosvaccin (se nedan). Vi kommer också att fortsätta med evaluering av nukleinsyra som inducerare av immunfunktioner hos höns bl.a. med studier av cytokinproduktion.

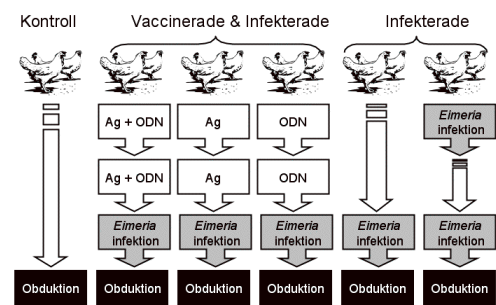
III. Utvärdering av subenhetsvaccin mot koccidios med DNA adjuvans

Bakgrund

Vi har alltså i *in vitro*-studien fått vägledning om vilken typ av nukleinsyra som skulle kunna fungera som adjuvans i hönsvaccin. Vidare fick vi genom samarbete med Dr Fiona Tomlyn, Institute of Animal Health Compton, England, tillgång till *Eimeria tenella*-proteiner som potentiellt kan ingå i ett subenhetsvaccin mot koccidios. Vi var därför angelägna om att experimentellt utvärdera dessa proteiner i kombination med DNA-adjuvans i challenge-försök. För att med ett vaccin aktivera ett adekvat immunsvår behövs kunskap om vilka immunmekanismer som leder till skyddande immunitet. Vi behöver därför studera utvecklingen av skyddande immunitet i höns efter *Eimeria*-infektion. Vid SWEPAR finns väl etablerade modeller för experimentell koccidieinfektion av höns⁽⁹⁾. Därför inledde vi detta projekts första *in vivo*-försök med ett experiment där vi inkluderade grupper av kycklingar som induceras till immunitet genom upprepade lågdos-infektioner med *Eimeria tenella*-parasiter såväl som grupper som vaccinerats med vårt experimentella subenhetsvaccin med ODN.

Material och Metoder

Försöket omfattade totalt 8 grupper om 6 kycklingar vardera, 6 grupper HyLine Brown tuppkycklingar (Figur 6) och två grupper MHC I definierade (B21) kycklingar från DIAS (en oinfekterad och en lågdosinfekterad). Kycklingarna fick sin första vaccination/lågdosinfektion vid två veckors ålder. De vaccinerade kycklingarna erhöi en ytterligare vaccination vid 8 veckors ålder. Lågdosinfekterade kycklingar infekterades ytterligare tre gånger med i ca två veckors intervall. Alla kycklingar infekterades med en hög dos (challenge) vid 10 veckors ålder. Under försökets gång togs blodprover för antikroppsbestämningar och djuren vägdes dagligen. Sju dagar efter challenge avlivades alla kycklingar, mjältar samlades för immunologiska tester och infektionen utvärderades med bl.a. med avseende på tarmskador och parasitäggtutskiljning. Vaccinet injicerades intra-muskulärt och bestod av ett sporozooitprotein från *Eimeria tenella* 50 µg/dos kombinerat med adjuvanset Ablisco-100 30 µg/dos (Isconova AB, Uppsala) och ODN 2006 30 µg/dos (Scandinavian Gene Synthesis AB, Köping)



Figur 6. Djurggrupper och behandlingar vid vaccinations- och *Eimeria*-infektionsförsöket

Resultat och Diskussion

Försöket startade i december 2006 och challenge och avlivning av kycklingarna skedde i början av februari 2007. I experimentet har vi bl.a. 1) studerat immunitetsutvecklingen mot *Eimeria tenella* med hjälp av våra etablerade metoder (*I a & d*) 2) utvärderat effekten av vaccinet på infektionsanslaget vid challenge 3) med de MHC I definierade djuren fått tillgång till material för att etablera CTL-testet för *Eimeria*-infekterade djur. En del utav immunfunktionstesten utförs under våren-sommaren 2007 resultaten från försöket sammanställs vidare under 2007.

PUBLIKATION OCH RESULTATFÖRMEDLING

Alla resultat som genereras i detta projekt kommer att presenteras vid vetenskapliga konferenser och publiceras i referee-granskade vetenskapliga tidskrifter. Vi avser även att publicera relevanta resultat i lämplig facklitteratur, populärvetenskapliga publikationer och lantbruksforum. Resultat från hela projektet har presenterats för Koccidios-gruppen, Svensk Fågel 14/12-2006. Resultat från delprojekt *Ia* presenterades för första gången vid Avian Immunology Reserarch Group meeting 2006⁽⁷⁾. Ytterligare experiment håller på att inkluderas i materialet varefter det kommer att sändas för publikation i en internationell vetenskaplig tidskrift. I delprojekt *Ic & d* kvarstår som beskrivits experimentellt arbete varefter resultaten kommer att sammanställas för publikation. Delprojekt *II* har presenterats vid Avian Immunology Reserarch Group meeting 2004 och 2006^(10,11) och ett manuskript har insänts för publikation i en internationell vetenskaplig tidskrift. Resultaten från delprojekt *III* sammanställs under 2007 och skall därefter sändas för granskning och publikation.

REFERENSER

1. Lyons, A.B., *Divided we stand: tracking cell proliferation with carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester*. Immunol Cell Biol, 1999. **77**(6): p. 509-15.
2. Fulton, J.E., H.R. Juul-Madsen, C.M. Ashwell, A.M. McCarron, J.A. Arthur, N.P. O'Sullivan, and R.L. Taylor, Jr., *Molecular genotype identification of the Gallus gallus major histocompatibility complex*. Immunogenetics, 2006. **58**(5-6): p. 407-21.
3. Juul-Madsen, H.R., T.S. Dalgaard, C.M. Rontved, K.H. Jensen, and N. Bumstead, *Immune response to a killed infectious bursal disease virus vaccine in inbred chicken lines with different major histocompatibility complex haplotypes*. Poult Sci, 2006. **85**(6): p. 986-98.
4. Lillehoj, H.S., *Analysis of Eimeria acervulina-induced changes in the intestinal T lymphocyte subpopulations in two chicken strains showing different levels of susceptibility to coccidiosis*. Res Vet Sci, 1994. **56**(1): p. 1-7.
5. Miller, T.K., D.D. Bowman, and K.A. Schat, *Inhibition of the in vitro development of Eimeria tenella in chick kidney cells by immune chicken splenocytes*. Avian Dis, 1994. **38**(3): p. 418-27.
6. Jerome, K.R., D.D. Sloan, and M. Aubert, *Measurement of CTL-induced cytotoxicity: the caspase 3 assay*. Apoptosis, 2003. **8**(6): p. 563-71.
7. Dalgaard, T.S., E. Watrang, L.R. Norup, and H.R. Juul-Madsen. *Quantitation of IBDV specific CD4+ and CD8+ T cells in peripheral blood from vaccinated birds by recall expansion and flow cytometry*. in *9th Avian Immunology Research Group Meeting*. 2006. Paris, France.
8. Woodland, D.L. and M.A. Blackman, *Immunity and age: living in the past?* Trends Immunol, 2006. **27**(7): p. 303-7.
9. Thebo, P., A. Lundén, A. Uggla, and P. Hooshmand-Rad, *Identification of seven Eimeria species in Swedish domestic fowl*. Avian Patology, 1998. **27**: p. 613-617.
10. Watrang, E. *Oligodeoxynucleotide induced proliferation of chicken peripheral blood mononuclear cells*. in *8th Avian Immunology Research Group Meeting*. 2004. Munich, Germany.
11. Watrang, E. *Phosphorothioate oligodeoxyribonucleotides induce in vitro proliferation of chicken peripheral blood B-cells*. in *9th Avian Immunology Research Group Meeting*. 2006. Paris, France.