

## **Slutrapport 2007-2009 för projektet: Utveckling av vaccin mot koccidios hos slaktkyckling**

### **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 slaktkyckling-uppfödningen. Infektionen kontrolleras där i dagsläget genom profylaktisk tillsats av koccidiehämmande substanser, koccidiostatika, i fodret. I ekologisk broileruppfödning 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 framställs. 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 då bl.a. alltför dyra för att de skall kunna användas inom broileruppfödningen. Målet är därför att utveckla ett effektivt vaccin som är billigt att framställa. Ett subenhetsvaccin framställt med rekombinant teknik skulle kunna uppfylla dessa krav. Det är vidare 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-mördar celler (cytotoxiska T-celler; CTL) som dödar infekterade celler. Generellt anses det ofta svårt att inducera immunsvaret med CTL med avdödade vaccin. På senare tid har man dock funnit att sk. immunstimulerande DNA är ett effektivt stimuli för att aktivera CTL-svar i vart fall hos däggdjur.

### **SYFTE OCH STRATEGI**

Projektets övergripande syfte är att identifiera nyckelkomponenterna i den skyddande immuniteten mot *Eimeria*-infektioner på ett sådant sätt att ett effektivt vaccin mot koccidios hos slaktkyckling kan tas fram. För att uppfylla detta arbetar vi med följande delmål: 1) fortsatt metodutveckling för att studera hönsfåglars immunsystem, 2) studera utvecklingen av skyddande immunitet hos experimentellt *Eimeria*-infekterade fåglar, 3) utvärdera lämpliga adjuvans för vaccin mot koccidios och 4) påbörja utvärdering av subenhetsvaccin mot koccidios.

Under 2007-2009 har vi drivit tre delprojekt:

- I)** Infektionsstudie för att studera mRNA-uttryck av immunfunktionsmarkörer
- II)** Fortsatt arbete med att etablera en metod att detektera *Eimeria*-specifika CTL
- III)** Utvärdering av ett potentiellt subenhetsvaccin i en vaccinations/infektionsstudie.

### **I. INFEKTIONSSTUDIE MED FOKUS PÅ MEKANISMER OCH CYTOKINER INVOLVERADE I SKYDDANDE IMMUNITET MOT *EIMERIA*-INFEKTIONER**

Vi har i en tidigare infektionsstudie (III) utvecklat en modell i vilken upprepade lågdosinfektioner resulterar i en mycket starkt skyddande immunitet hos fåglarna. Denna modell använde vi i detta delprojekt för att närmare studera de immunfunktioner som är inblandade i immuniteten. Genom att jämförda hur parasiterna etablerar sig och förökades 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 information om vilka delar/stadium av parasiten som bör ingå i ett vaccin och vilken typ av immunsvaret som ett vaccin måste inducera för att ge skyddande immunitet.

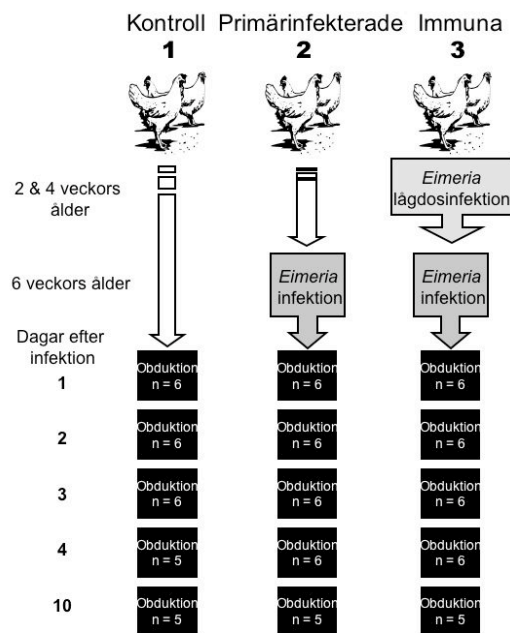
Som nämnts tidigare har lymfocyter som uttrycker cellytareceptorn CD8 associerats till immunitet mot koccidios. En tänkbar funktion för dessa celler är att de är "T-mördarceller", CTL, som dödar parasitinfekterade celler. För detta använder de bland annat proteinet perforin, som skapar porer i cellmembranet 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. Vi har därför kvantifierat mRNA-uttrycket av perforin i fåglarnas blindtarms tonsiller som ett mått på CTL-aktiviteten.

## MATERIAL OCH METODER.

Försöket omfattade tre grupper av fåglar (Figur 1): oinfekterade (grupp 1), enbart "challenge"-infektion (grupp 2) och immuna efter upprepade infektioner (grupp 3). Den djurexperimentella delen av försöket utfördes under oktober-november 2007 och omfattade 90 Bovans-kycklingar som anlände till SVA:s djurhus som daggamlar och sedan hölls under SPF-förhållanden. Vid 2 veckors ålder delades fåglarna upp i de tre huvudgrupperna med fem under-grupper vardera (för avlivning olika dagar) med en jämn fördelning med avseende på kroppsvikt och nivå av maternella antikroppar mot *Eimeria*. Grupp 3 inokulerades då (dag 0) med 1000 *E. tenella* oocystor/fågel, vilket upprepades efter två veckor (dag 13). Vid sex veckors ålder (dag 26) inokuleras både grupp 2 och 3 med 1000 *E. tenella* oocystor/fågel ("challenge"-infektion). Därefter avlivades sex djur från varje grupp efter 1, 2, 3, 4 och 10 dagar. Blindtarmsvävnad, blindtarms-tonsiller, mjälte och blod samlades från varje individ för isolering av nukleinsyra. Serumprover samlades före varje infektionstillfälle (dag 0, 12 & 26) och 9 dagar efter "challenge"-infektionen (dag 35) för att studera utvecklingen av *Eimeria*-specifika antikroppar. Utsöndringen av oocystor (parasitägg) i avföringen följdes dag 5 till 10 efter varje infektion med flotation enligt standardprotokoll. Antikroppsbestämningarna utfördes med ELISA-metodik. Nukleinsyra, DNA och RNA, isolerades från vävnadsproverna och mängden *E. tenella*-DNA i blindtarmsvävnaden, liksom uttryck av mRNA för olika gener undersöktes med kvantitativ real-tids RT-PCR metodik.

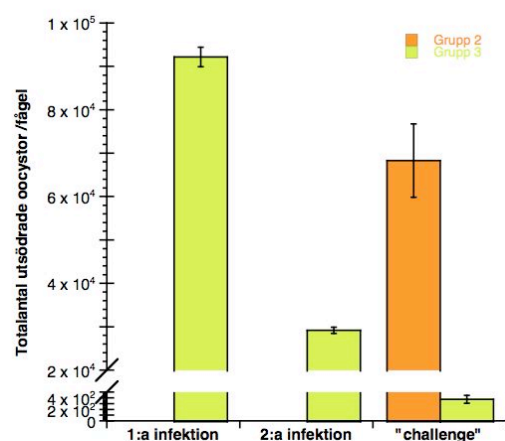
## RESULTAT

Som ett mått på anslaget av parasitinfektionen analyserades utsöndringen av oocystor i fåglarnas avföring från dag 5 till dag 10 efter varje inokulation med *Eimeria* (Figur 2). Som förväntat utsöndrade grupp 3 ett stort antal oocystor efter den första infektionen. Efter den andra infektionen utsöndrade de ett lägre antal oocystor och efter "challenge"-infektionen endast ett obetydligt antal oocystor. Resultaten visar alltså tydligt att fåglarna i grupp 3 hade utvecklat en skyddande immunitet mot parasiten vid tidpunkten för "challenge". Grupp 2,



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

som infekterades för första gången vid ”challenge”, utsöndrade också som förväntat en stor mängd oocystor. Grupp 1 utsöndrade inte oocystor vid något tillfälle under experimentet.



Figur 2. *E. tenella*-oocyst utsöndring i träck (gruppmedelvärde ± 1 konfidensintervall) vid infektion av fåglar före ”challenge” (grupp 3) samt vid ”challenge” (grupp 2&3).

Vi påvisade och kvantifierade även *E. tenella*-DNA i blindtarmsvävnad (Tabell 1) och följde på så sätt parasitens etablering och förökning under infektionens gång i de olika djurgrupperna. Parasit-DNA påvisades i enstaka prover redan dag 1 och 2 efter infektionen. Från och med dag 3 efter infektionen är majoriteten av proverna från grupp 2 positiva för *E. tenella*-DNA och mellan dag 3 och 4 efter infektion ökade mängden parasit-DNA ca 200 gånger. Mindre än 50 % av proverna från grupp 3 var positiva för *E. tenella*-DNA någon gång under experimentet och mängden parasit-DNA i de positiva proverna från dag 4 och dag 10 efter infektionen var > 200 gånger lägre än i prover från

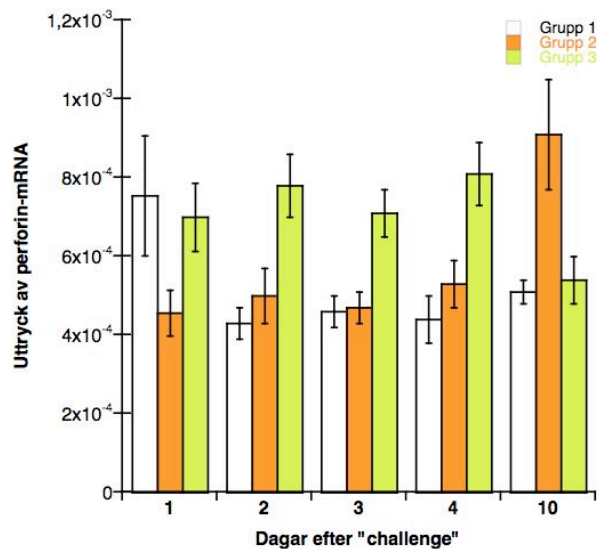
grupp 2. Som förväntat var inga prover från de oinfekterade fåglarna i grupp 1 positiva för *E. tenella*-DNA. Dessa resultat visar tydligt att parasitens uppförökning i de ”immuna” fåglarna stoppas mycket tidigt, dag 3-4 efter infektionen.

**Tabell 1. *Eimeria tenella*-DNA i blindtarmar från kycklingar infekterade dag 0 samt oinfekterade kontrollkycklingar**

|                        | Antal positiva blindtarmar/antal testade blindtarmar |         |         |         |         |
|------------------------|------------------------------------------------------|---------|---------|---------|---------|
|                        | Medelmängd <i>E. tenella</i> -DNA ± 1SE (aM)         |         |         |         |         |
|                        | Dag 1                                                | Dag 2   | Dag 3   | Dag 4   | Dag 10  |
| <b>Grupp 2</b>         |                                                      |         |         |         |         |
| förstagångsinfekterade | 0/12                                                 | 1/12    | 10/12   | 12/12   | 10/10   |
|                        | -                                                    | 0,2     | 5,4±1,6 | 268±120 | 240±97  |
| <b>Grupp 3</b>         |                                                      |         |         |         |         |
| immuna                 | 2/12                                                 | 5/12    | 5/12    | 1/12    | 5/12    |
|                        | 0,07±0,03                                            | 0,9±0,3 | 1,0±0,3 | 0,0001  | 1,2±0,6 |
| <b>Grupp 1</b>         |                                                      |         |         |         |         |
| oinfekterade           | 0/12                                                 | 0/12    | 0/12    | 0/10    | 0/10    |
|                        | -                                                    | -       | -       | -       | -       |

Som ett mått på immunsystemets aktivering analyserades serumhalten av antikroppar mot parasiten under experimentets gång. Vid 2 veckors ålder, före den första lågdosinfektionen, påvisades maternella *Eimeria*-antikroppar hos en stor andel av fåglarna. Att kycklingar vid 2 veckors ålder fortfarande kan ha relativt höga antikropps nivåer och att dessa nivåer visar en stor individuell variation observerades också i vår föregående infektionsstudie (III). Vi tog därför hänsyn både till kroppsvikt och antikropps nivå vid gruppindelningen i detta experiment och medelhalten av maternella *E. tenella*-specifika antikroppar i serum skiljer sig därför inte signifikant åt mellan grupperna. Tolv dagar efter den första lågdosinfektionen hade antikropps nivåerna i grupp 3 stigit något jämfört med före infektionen. Tretton dagar efter den andra lågdosinfektionen (dag 26) observerades en tydlig höjning av antikropps nivåerna i grupp 3 och dessa var förhållandevis oförändrade nio dagar efter ”challenge”-infektionen (dag 35). Vid den andra provtagningen var de oinfekterade djuren i grupp 1 och 2 seronegativa och förblev så under resten av experimentet. Fåglarna i grupp 2 hade alltså inga påvisbara *Eimeria*-antikroppar vid provtagningen 9 dagar efter ”challenge”-infektionen. Resultaten visar därmed tydligt att immunsystemet hos fåglarna i grupp 3 aktiverats av *E. tenella*-infektionerna.

För att få en indikation på aktiveringsgraden hos CTL ("T-mördarceller") under infektionens gång mätte vi uttrycket av perforin-mRNA i blindtarmstonsillerna (Figur 3). Mellan dag 2 och 4 efter infektion var uttrycket av perforin-mRNA i blindtarmstonsillerna högre hos de immuna fåglarna i grupp 3 jämfört med det hos fåglarna i grupp 1 och 2. Dag 10 efter infektionen däremot, var uttrycket högst hos de förstagångsinfekterade fåglarna i grupp 2. Dessa resultat indikerar alltså att CTL aktiveras snabbt efter infektionen hos immuna djur jämfört med de förstagångsinfekterade fåglarna där aktivering tycks ske under infektionens senare del.



Figur 3. Perforin-mRNA uttryck i blindtarmstonsiller (gruppmedelvärde  $\pm 1$ SE) vid experimentell *E. tenella*-infektion av förstagångsinfekterade (grupp 2) och immuna (grupp 3) fåglar samt oinfekterade fåglar (grupp 1).

## KONKLUSIONER OCH FORTSATT ARBETE

Sammantaget visar dessa resultat att vi med hjälp av två föregående infektioner med *E. tenella* fick fåglarna i grupp 3 att utveckla en starkt skyddande immunitet. Hos de immuna fåglarna stoppades parasitens förökning dag 3-4 efter infektion vilket sammanföll med uppreglering av uttrycket av perforin-mRNA. Detta indikerar att aktiverade CTL är viktiga för att bromsa upp parasiternas förökning. Hos de förstagångsinfekterade fåglarna förökade sig parasiten kraftigt från och med dag 3-4 och de utsöndrade stora mängder parasitägg (oocystor). Ett ökat uttryck av perforin-mRNA observerades dag 10 efter infektion av dessa fåglar vilket tyder på att CTL även aktiveras under en primärinfektion. Vid denna tidpunkt är dock parasitens livscykel redan avslutad så detta CTL-svar hinner inte bromsa infektionen. Ackumulering av tillräckligt många CTL-minnes-celler verkar alltså vara en viktig komponent i den skyddande immuniteten mot koccidiosis.

Detta är första gången perforin har studerats i anslutning till *Eimeria*-infektioner hos fåglar och resultaten kommer att presenteras vid 9th International Veterinary Immunology Symposium i augusti 2010 i Tokyo, Japan <sup>(1)</sup>. Vi kommer även att analysera materialet för mRNA-uttryck av granzyme och IFN- $\gamma$  som också reflekterar CTL-aktivitet. Resultaten kommer därefter att sammanställas för publikation i en internationell peer-review tidskrift.

## II. METODUTVECKLING FÖR ATT DETEKTERA *EIMERIA*-SPECIFIKA CTL

Det har rapporterats att CD8+ lymfocyter är associerade till skyddande immunitet mot *Eimeria*-infektioner hos höns. Hos däggdjur är CD8 en klassisk markör för "T-mördarceller", 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 i laboratoriet krävs att vissa tekniska kriterier uppfylls:

1. Först måste CTL ("T-mördarcell") och den infekterade cellen ("målcell") vara av samma MHC I-haplotyp ("vävnadstyp"). Vi har genom ett internationellt samarbete tillgång till MHC I-definierade höns-linjer (se nedan, B) och har i tidigare projekt etablerat olika MHC I-definierade höns-cell-linjer som kan användas som målceller.
2. Vidare måste den infekterade cellen presentera det främmande antigenet på MHC I-molekylen för att CTL skall kunna känna igen att cellen är infekterad. Vi har därför

arbetat med att etablera och optimera metoder för att infektera celler i kultur med *Eimeria*-parasiter (se nedan, A).

3. Slutligen måste man ha en metod för att detektera att målcellerna dödas. Vi har tidigare etablerat en känslig metod som påvisar celldöd, apoptos, i höns-celler genom att detektera aktivering av enzymet caspase 3. Under denna projektperiod har vi fortsatt optimera denna metod för att detektera CTL-aktivitet hos höns (se nedan, B).

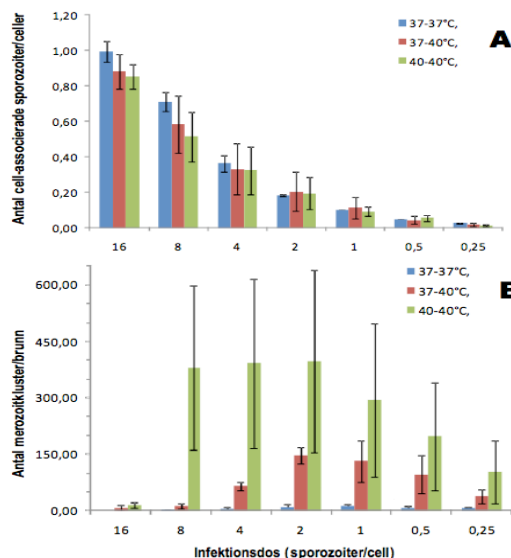
**A. ETABLERING AV EIMERIA-INFEKTERADE MÅLCELLER:** *Eimeria*-parasiter kan inte regelrätt odlas i cellkultur men det finns beskrivet att *E. tenella*-sporozoiter kan infektera celler i kultur och genomgå några steg av livscykel. För detta måste oocystornas skal öppnas och de så kallade sporozoiterna frigöras. Sporozoiterna tillsätts cellkulturer och kan där binda till celler och ta sig in i dessa. Inne i cellen sker en flerfaldig uppförökning av parasiten varefter den "sprängs" och ett stort antal av nästa parasitstadium, merozoiter, släpps ut. I cellkultur avstannar livscykeln i detta skede medan den i fåglarna fortsätter med att uppförökningsprocessen 2-4 gånger innan nya oocystor bildas och utsöndras med avföringen. Vi har under projektperioden arbetat med att etablera och förfinas protokoll för att ta fram levande sporozoiter ur oocystor, så kallad excytering, att få dessa sporozoiter att infektera celler i kultur och att detektera de infekterade cellerna. För att starta upp detta arbete bjöd vi bl.a. in Dr Adrian Smith från Oxford University, England, på ett en veckas besök på SVA våren 2008. Dr Smith är *Eimeria*-immunolog och har mycket stor erfarenhet av arbete med höns-*Eimeria* i cellkultur.

## MATERIAL OCH METODER

För dessa studier används oocystor som isolerats från träck och steriliserats med natriumhypoklorit. Sporozoiterna frigörs (excystering) genom att oocystskalen krossas med glaskulor ( $\varnothing=0,5$  mm) och därefter digererats med taurokolatsyra och trypsin. Sporozoiterna rensas därefter från oocystskalen på en DE-52 anjonbytar-kolonn. De renade sporozoiterna tillsätts sedan till cellkulturer. Vi har hittills använt en nöt-cellinje, MDBK (Madin-Darby bovine kidney) för att optimera infektionsprotokollen eftersom dessa celler tidigare använts för infektion med *E. tenella* i cellkultur. I vissa experiment har sporozoiterna färgats med olika fluorokromer, CFSE (grön fluorescens) eller PKH-26 (gul-orange) före tillsats till cellkulturerna. För att utvärdera infektionsprotokollen analyseras hur stor andel av cellerna sporozoiterna bundit till/trängt in i (andel cellassocierade sporozoiter) 18 h efter infektion. Detta görs i cellkulturer som fixerats med metanol och färgats med Giemsa-lösning. I andra replikat av kulturerna följs utvecklingen av parasitinfektionen i ljusmikroskop med jämna mellanrum upp till 142 h efter infektionen (7 dagar). Efter cirka 46-95 h kan man observera ansamlingar av fria merozoiter. Detta är ett bevis på att sporozoiterna inte har enbart associerats till cellerna utan även trängt in i dem och genomgått en del av sin livscykel och uppförökats.

## RESULTAT

Vi har funnit att dessa experiment kräver relativt färsk oocystor (max 3,5 månader gamla). Äldre oocystor ger lägre utbyte av sporozoiter efter excytering samt färre merozoiter vid infektion. Med ett optimerat protokoll för excytering och färsk oocystor erhålls ett utbyte av ca 1 sporozoit per oocysta dvs ca 12,5%. Vidare har vi arbetat med att erhålla en så hög infektionsfrekvens av cellerna i cellkulturen som möjligt bl.a. genom att variera infektionsdos (sporozoiter/cell) och temperatur vid infektionen (Figur 4). Vi fann att antalet cellassocierade sporozoiter ökade dosberoende ända upp till den högsta testade dosen med 16 sporozoiter/cell. Avseende antalet merozoitkluster var dock doser mellan 8 och 2 sporozoiter/cell optimalt då högre infektionsdoser medförde att cellerna inte överlevde i



Figur 4. *E. tenella*-infektion av MDBK celler i cellkultur A) antal cell-associerade sporozoiter 18 h efter infektion, B) antal merozoitkluster 95 h efter infektion. Temperaturen var 37°C eller 40°C under de första 18 h respektive de sista 77 h av infektionen. Medelvärden av  $\geq 3$  experiment  $\pm 1$ SE.

kultur. De två odlingstemperaturer som prövades var 37°C (optimalt för MDBK cellerna) och 40 °C (fåglars kroppstemperatur). Vi fann att antalet cellassocierade sporozoiter vid 18 h inte tydligt påverkades av temperaturen men observerade en tendens till högre frekvens cellassocierade sporozoiter vid 37°C. Utveckling till merozoiter å andra sidan skedde i princip endast vid 40°C. Vi försökte då höja infektionsfrekvensen genom odla cellerna vid 37°C under de första 18 h, och sedan öka till 40°C. Detta medförde ett ökat antal merozoitkluster jämfört med odling vid enbart 37°C men 40°C under hela odlingstiden gav fortfarande flest antal merozoitkluster. Vi har därmed bestämt infektionsdosintervall

och temperatur för optimal infektion med *E. tenella* i cellkultur.

För att på ett effektivt sätt detektera och i framtiden sortera *E. tenella*-infekterade celler har vi arbetat med fluorescensfärgning av sporozoiter. När en färgad parasit invaderat en cell kan den detekteras med hjälp av fluorescensmikroskopi eller flödescytometri. Vi utvärderade ett grönt färgämne, CFSE, som binder till proteiner i sporozoiten och ett gul-orange färgämne, PKH-26, som binder fetter i sporozitens membran. Båda färgämnena färgade in sporozoiterna väl och de färgade parasiterna var lätta att detektera i t.ex. fluorescensmikroskop. När färgade sporozoiter användes för att infektera MDBK celler påverkades deras förmåga att associera till cellerna inte påtagligt av någondera färgämne i koncentrationer som med lätthet kunde detekteras; 5  $\mu$ M för CFSE och 2,5  $\mu$ M för PKH-26. Däremot var utvecklingen till merozoiter nedsatt vid 5  $\mu$ M CFSE medan PKH-26 kunde användas vid 2,5  $\mu$ M utan att merozoitutvecklingen hämmades. Dessa resultat visar att PKH-26 färgen tolererades bäst av parasiten och denna kommer därför att användas i fortsatta studier.

## KONKLUSIONER OCH FORTSATT ARBETE

Vi har etablerat och förfinat protokoll för infektion med *E. tenella* sporozoiter i cellkultur och tagit fram nya metoder för detektion av *Eimeria*-infekterade celler. Detta är mycket viktigt för det vidare arbetet med att ta fram metoder för att detektera *Eimeria*-specifika CTL. För att kunna användas som målceller i CTL-test behöver majoriteten av cellerna vara parasitinfekterade. En stor fördel med de fluorescensfärgade parasiterna är därför att vi kan använda flödescytometri för att sortera ut parasitinfekterade celler. Denna metodologi möjliggör också vidare studier av hur celler påverkas av att infektionen, t.ex. med avseende på MHC I-uttryck, som är viktiga för att förstå immunsvaret mot parasiten. Vi har hittills arbetat med MDBK-celler som tidigare visats mottagliga för *E. tenella*-infektion i cellkultur. Vi kommer nu att fortsätta arbetet med att infektera de MHC I-definierade höns-cell-linjerna som inte tidigare använts för *Eimeria*-infektion. När infektions- och cellsorterings-protokollen etablerats i höns-cellerna kommer resultaten att sammanställas för publikation i en internationell peer-review tidskrift.

**B. ETABLERING AV "CASPASE 3-METODEN" FÖR DETEKTION AV HÖNS-CTL:** Som beskrivits utförligt i föregående rapporter har vi i samarbete med Dr Helle Juul-Madsens grupp vid Det Jordbruksvidenskabelige Fakultet, Aarhus Universitet (tidigare Danmarks



Jordbruksforskning), forskningscenter Foulum, arbetat mycket med att etablera en robust metod för att påvisa CTL-aktivitet hos hönsceller. Vid Foulum hålls ett antal höns-linjer som är definierade med avseende på MHC I-haplotyp. Lymfocyter från dessa fåglar kan därmed användas i CTL-analyser. Då virusinfekterade celler är den typiska målcellen för CTL har vi använt virusinfektioner som modell och ”positiv-kontroll” i arbetet med att optimera CTL-testet. När CTL dödar infekterade celler tvingas dessa att gå i apoptos (”begå självmord”) varvid enzymet caspase 3 aktiveras i dem vilket kan utnyttjas som ett mått på CTL-aktivitet.

## MATERIAL OCH METODER

Till dessa experiment användes fåglar definierade med avseende på MHC I-haplotyp som föddes upp under konventionella uppfödningsformer och vaccinerades med kommersiella levande vaccin enligt rekommendation av tillverkaren. Vi har framförallt arbetat med Newcastle disease virus och Infektiös bronkit virus (IBV). Vita blodkroppar isolerade från blod eller mjälte användes i CTL-testet. För att öka andelen CTL odlades dessa 3-6 dagar i närvaro av vaccinviruset (levande eller UV-inaktiverat) med eller utan tillsats av bl.a. concanavalin A (Con A). Målceller förbereds 18-20 h före CTL-testet genom att de färgas gröna med CFSE samt infekteras med levande vaccinvirus. I CTL-testet blandas de vita blodkropparna med målceller av samma MHC I-haplotyp och odlas i 4 h vid 40°C. Därefter fixerades proverna och färgas med en antikropp, konjugerad till ett orange färgämne, som binder aktiverat caspase 3. Andelen målceller positiva för aktiverat caspase 3, d.v.s. både gröna och orange, bestäms sedan med hjälp av flödescytometri.

## RESULTAT

I detta delprojekt har vi bl.a. jämfört att använda vita blodkroppar från blod och mjälte och prövat olika odlingsförhållanden för att i cellkultur uppföröka antalet CTL-celler före CTL-test. Vita blodkroppar från mjälte var att föredra eftersom de har en högre andel CD8<sup>+</sup> celler, d.v.s. potentiella CTL än vita blodkroppar från blod. Vidare fann vi att vaccinerade djur sannolikt har en låg frekvens antigen-specifika CTL varför uppförökning (expansion) av dem är nödvändig före CTL-testet. Vi fann att levande virus i kombination med Con A, ett lektin som stimulerar lymfocyter att dela sig, ger en uppförökning av de CD8<sup>+</sup> vita blodkropparna. I prover där den CD8<sup>+</sup> lymfocyterna aktiverats och expanderat har vi också kunnat detektera antigen-specifik CTL-aktivitet med caspase 3-testet.

## KONKLUSIONER OCH FORTSATT ARBETE

Vi har etablerat caspase 3-metoden för att detektera CTL-aktivitet hos höns, vilket är första gången metoden används i detta djurslag, och vi är på väg att etablera ett protokoll för optimal stimulering av CTL-celler för att påvisa deras aktivitet. Arbetet fortgår genom ett väl fungerande samarbetet med Foulum <sup>(2, 3)</sup> och fortsätter under nästa projektperiod varefter resultaten kommer att sammanställas för publicering i en internationell peer-review tidskrift.

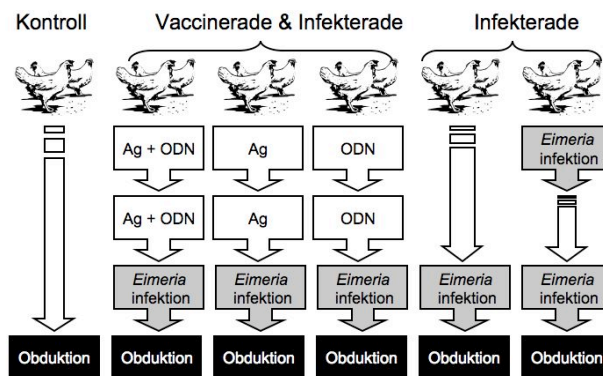
## III. UTVÄRDERING AV ETT SUBENHETSVACCIN MED DNA-ADJUVANS

Syftet med detta försök var att utvärdera immunisering med ett recombinant *Eimeria tenella*-protein för skydd mot koccidiosis. Som adjuvans användes AbISCO-100 (”tredje generationes iscom”) som anses inducera ett ”balanserat” svar med både antikroppar och CTL i kombination med immunstimulerande DNA i form av en syntetisk oligodeoxyribonukleotid (ODN) som vi tidigare funnit aktivera vita blodkroppar från höns.

## MATERIAL OCH METODER

Vaccinationsförsöket omfattade 6 grupper med 6 HyLine brown tuppsycklingar (Figur 5), som föddes upp under SPF-förhållanden i SVA:s djurhus. Grupp 2-4 vaccinerades vid 2 och 6

veckors ålder. Grupp 6 infekterades med *E. tenella*-oocystor vid 2, 4 och 6 veckors ålder och alla utom grupp 1 infekterades (challenge-infektion) vid 8 veckors ålder (Tabell 2). Blodprov samlades från alla kycklingar vid 2, 6, 8 och 9 veckors ålder. Alla kycklingar avlivades vid 9 veckors ålder. Vaccinantigenet erhöles från Dr Fiona Tomley, Institute of Animal Health, Compton, England, och var ett rekombinant sporozoit-protein från *E. tenella* som uttryckts i *Eschericia coli*. Vaccinet injicerades intra-muskulärt i lårmuskeln och bestod av 50 µg rekombinant protein/dos kombinerat med adjuvanset AblSCO-100 (30 µg/dos; Isconova AB, Uppsala) och ODN 2006 (30 µg/dos; Scandinavian Gene Synthesis AB, Köping). Kycklingar i grupp 3 fick vaccin utan ODN 2006 och kycklingar i grupp 4 fick enbart AblSCO-100 och ODN 2006 utan vaccinantigen. Efter varje infektionstillfälle vägdes fåglarna individuellt dagligen från infektionsdagen till och med dag 7 eller 8 efter infektion. Från och med eftermiddagen dag 5 till och med dag 8 efter infektion samlades träcken gruppvis varje dag, och antal oocystor per gram träck (OPG) och totalantalet utsöndrade oocystor per fågel bestämdes enligt standardmetod. Kliniska symptom (blod i träck, allmäntillstånd, aptit) noterades dagligen vid varje infektionstillfälle. Alla fåglar avlivades 7 dagar efter challenge-infektionen. Blindtarmarna vägdes och inspekterades makroskopiskt och tarmlesionernas omfattning bestämdes individuellt för varje fågel enligt en 4-gradig skala (s.k. lesion scoring) enligt internationellt etablerade protokoll. Därefter digererades blindtarmsvävnaden med trypsin och antalet oocystor i blindtarmarna bestämdes individuellt för varje fågel. Mjälte och blindtarmstonsiller samlades för immunologiska analyser. Oocystor artbestämdes med ljusmikroskopi och PCR-analys. Halten av specifika antikroppar (IgG) i serum bestämdes med ELISA-metodik. Antikroppar mot två olika antigenpreparationer analyserades, vaccinantigenet (rekombinant protein) och ett lysat av *E. tenella*-oocystor (nativt protein). Vita blodkroppar från mjältar identifierades med avseende på uttryck av olika cellytemolekyler, CD4, CD8α respektive Bu-1, med immunofluorescensfärgning och flödescytometri. Mjältceller stimulerades också i cellkultur med rekombinant och nativt protein samt med mitogenet concanavalin A. Celldelning i cellkulturerna bestämdes med två olika metoder; CFSE-metoden och inkorporering av radioaktivt thymidin.



Figur 5. Djurgrupper och behandlingar vid vaccinations- och *Eimeria*-infektionsförsöket

## RESULTAT

Kycklingarna i grupp 6 inokulerades med en låg dos

**Tabell 2. Infektionsdos (antal viabla oocystor) samt totalantal oocystor utsöndrade per fågel vid upprepade infektioner med *E. tenella***

| Inokulering | Infektionsdos | Antal utsöndrade oocystor |                    |
|-------------|---------------|---------------------------|--------------------|
|             |               | Grupp 6                   | Naiva              |
| 1:a         | 1500          | $546 \times 10^4$         | i.t.               |
| 2:a         | 3000          | $87 \times 10^4$          | $5349 \times 10^4$ |
| 3:e         | 2200          | $5 \times 10^4$           | $9385 \times 10^4$ |

.t. – inte testat, Naiva – åldersmatchade kycklingar som infekterades för första gången med samma dos oocystor som grupp 6.

jämfört med fåglar som inokulerades för första gången med samma dos (Tabell 2). Resultaten visar alltså tydligt att vi med upprepade lågdosinfektioner inducerat immunitet hos fåglarna.

För att utvärdera den immunitet som inducerats av vaccination respektive lågdosinfektion inokulerades fåglarna med en hög dos *E. tenella*-oocystor (challenge-infektion). Dosen

oocystor vid tre tillfällen före challenge-infektionen för att inducera immunitet mot infektionen. Inga kliniska symptom på sjukdom eller påverkan på tillväxten observerades efter lågdosinfektionerna. Antalet oocystor som utskiljdes i träcken från de infekterade fåglarna minskade dock påtagligt både efter den andra och efter den tredje inokulationen



testades ut före försöket för att ge påtagliga blindtarmslesioner hos icke-immuna fåglar 7 dagar efter infektion. Fåglarna vägdes dagligen under försöket och tillväxten visade stor variation både mellan dagar och mellan individer oavsett grupp. Dag 5 och 6 efter infektion visade grupp 2-5 generellt betydligt lägre tillväxt grupp 1 och 6 men på grund av den stora variationen var denna tillväxtshämning inte statistiskt signifikant. Kliniskt och parasitologiskt utfall av challenge-infektionen redovisas i Tabell 3. Fåglarna i grupp 2-5 uppvisade kliniska symptom på sjukdom från eftermiddagen dag 5 efter challenge, utsöndrade oocystor i träcken och hade stora mängder oocystor och omfattande skador i blindtarmarna dag 7 efter challenge. Inga signifikanta skillnader med avseende på infektionsanslaget observerades för fåglarna i grupp 2-5. Fåglarna i grupp 6 däremot utsöndrade ca tusen gånger färre oocystor i träcken och uppvisade inga skador i blindtarmslemhinnan och endast två individer hade ett mycket lågt antal, framförallt defekta, oocystor i blindtarmarna. Vi kan därför dra slutsatsen att det testade vaccinet inte inducerade immunitet som skyddade mot challenge-infektionen. Upprepad lågdosinfektion gav däremot en mycket stark skyddande immunitet.

**Tabell 3. Kliniska observationer, totalantal oocystor per fågel utsöndrade i träck samt lesion score för, och total antal oocystor i, blindtarmar samlade dag 7 från fåglar infekterade med *E. tenella* dag 0**

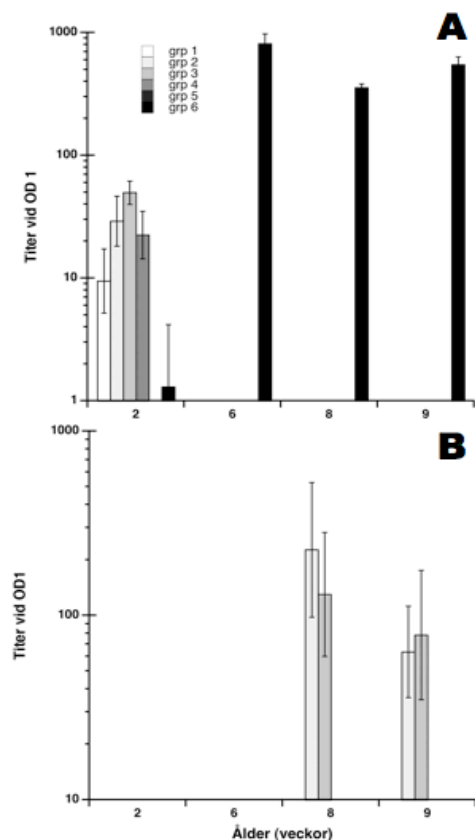
| Grupp | Klinik                         | Oocystor i träck      | Lesion score <sup>1</sup> | Oocystor i tarm <sup>1</sup>                |
|-------|--------------------------------|-----------------------|---------------------------|---------------------------------------------|
| 1     | u.a.                           | 0,0                   | 0,2 ± 0,1                 | 0,0 ± 0,0                                   |
| 2     | Blod i träck dag 5 (em), 6 & 7 | 116 x 10 <sup>6</sup> | 3,5 ± 0,1                 | 27 x 10 <sup>6</sup> ± 7 x 10 <sup>6</sup>  |
| 3     | Blod i träck dag 5 (em), 6 & 7 | 126 x 10 <sup>6</sup> | 3,3 ± 0,2                 | 36 x 10 <sup>6</sup> ± 14 x 10 <sup>6</sup> |
| 4     | Blod i träck dag 5 (em), 6 & 7 | 182 x 10 <sup>6</sup> | 2,8 ± 0,2                 | 15 x 10 <sup>6</sup> ± 6 x 10 <sup>6</sup>  |
| 5     | Blod i träck dag 5 (em), 6 & 7 | 111 x 10 <sup>6</sup> | 3,7 ± 0,1                 | 63 x 10 <sup>6</sup> ± 15 x 10 <sup>6</sup> |
| 6     | u.a.                           | 0,1 x 10 <sup>6</sup> | 0,0 ± 0,0                 | 21 ± 14                                     |

u.a. – utan anmärkning. 1 - uttryckt som gruppgenomsnitt ± SE.

Antikroppshalterna mot både nativa ("naturliga") *E. tenella*-proteiner och vaccinantigenet bestämdes i serumprover samlade under experimentets gång (Figur 6). Alla kycklingar hade varierande halter av maternella antikroppar mot nativt antigen vid tidpunkten för vaccination och första lågdosinfektion (2 veckor ålder; Figur 6A). Inga maternella antikroppar kunde detekteras vid 6 veckors ålder. Vid denna tidpunkt (2 veckor efter den andra lågdosinfektionen) hade fåglarna grupp 6 serokonverterat mot nativt *E. tenella*-protein och de förblev seropositiva försöket ut. Inga fåglar i de övriga grupperna uppvisade antikroppar mot nativa *E. tenella*-proteiner efter att de maternella antikropparna hade avklingat.

Vad beträffar vaccinantigenet (Figur 6B) uppvisade inga fåglar maternella antikroppar mot detta protein. Efter den andra vaccinationen serokonverterade grupp 2 och 3 mot vaccinantigenet. Antikroppshalterna var likartade i dessa båda grupper. DNA-tillsatsen verkade alltså inte påverka antikropps-nivåerna mot vaccinantigenet i detta försök. De vaccinerade fåglarna hade inga detekterbara antikroppar mot den nativa proteinpreparationen. Det skulle kunna bero på att det sporozoitprotein som motsvarar vaccinantigenet antagligen utgör en mycket liten andel av den nativa proteinpreparationen.

Andelen av olika lymfocytpopulationer analyserades i mjältar och blindtarmstonsiller samlade 7 dagar efter challenge-infektionen med *E. tenella*. Bland mjältlymfocyter var den mest påtagliga observationen att andelen B-celler (Bu-1 positiva) var högre hos de infekterade fåglarna (grupp 2-6) jämfört med de oinfekterade (grupp 1). Andelen celler som uttryckte CD8α (CTL) verkade också förhöjd i mjältar från de immuna fåglarna (grupp 6) jämfört med alla de andra fåglarna. I blindtarmstonsillerna var andelen lymfocyter som uttryckte CD8α förhöjd hos de fåglar som genomgick *E. tenella*-infektionen för första gången (grupp 2-5) jämfört med de oinfekterade (grupp 1) och de immuna (grupp 6) fåglarna. Resultaten indikerar att CD8α uttryckande lymfocyter, sannolikt CTL, rekryteras till tarmen under en akut infektion vilket överensstämmer med resultaten från andra studier. Hos de immuna djuren (grupp 6) verkar dock inte CTL rekryteras till blindtarmstonsillerna utan till mjälten. Ytterligare studier av cellmigrationens förlopp behövs dock för att utröna vilka lymfocytpopulationer som är viktiga för den skyddande immuniteten mot koccidiosis.



Figur 6. Antikropstitrar (gruppgenomsnitt  $\pm$ SE) mot nativa *E. tenella*-protein (A) och rekombinant vaccinantigen (B).

För att studera utvecklingen av cell-medierade immunsvaret mot *E. tenella* och identifiera vilka celler som svarar på antigenstimulering satte vi upp sk. lymfocyt-stimulationstester. Vi använde både en "traditionell" metod med inkorporering av radioaktivt tymidin och en ny metod baserad på det gröna färgämnet CFSE för att detektera celldelning hos lymfocyter. Som antigen använde vi både nativa *E. tenella*-proteiner och det rekombinanta vaccinantigenet. Oavsett detektionsmetod observerades dock en hög "bakgrundsproliferation" hos mjältceller i kontrollkulturer utan antigen. Det var därför endast möjligt att detektera en ökad celldelning efter stimulering med det starka mitogenet Con A. Inget av antigenen inducerade proliferation över bakgrunds-nivån. Anledningen till den höga bakgrunden är okänd. Vi har tidigare använt CFSE-metoden för att detektera proliferation hos höns-celler både med mitogen- och antigen-stimulation utan problem med bakgrundsproliferation.

## KONKLUSIONER

Genom upprepade lågdosinfektioner lyckades vi inducera en stark skyddande immunitet mot koccidiosis hos fåglarna. Denna modell har givit oss ett mycket

viktigt verktyg för att studera immunitet mot *Eimeria*-infektioner. Vi har redan (I) och kommer framgent att använda modellen för att förstå vilka komponenter i immunsvaret som leder till att immunitet utvecklas. Denna kunskap kommer sedan att användas i arbetet med ta fram effektiva vaccin. I detta försök gav inte vaccinet något detekterbart skydd mot challenge-infektionen. Det finns många tänkbara orsaker till detta, t.ex. att vaccinantigenet inte var relevant, att det rekombinanta proteinet inte var tillräckligt likt det nativa proteinet eller att challenge-dosen var för hög för att påvisa en eventuell lågradig immunitet, och det inte möjligt att avgöra vilken/vilka orsaker som var avgörande. Det går inte heller att avgöra vilken effekt DNA-adjuvanset hade på fåglarnas immunsvaret. Antikropssvaren mot vaccinantigenet verkar likartade men det är framförallt i de cellulära svaren vi förväntar oss effekter av immunstimulerande DNA. Resultat från detta försök presenterades vid European Coccidiosis Discussion Group i Compton, England, den 24 maj 2007<sup>(4)</sup>.

## PUBLIKATIONER

1. Magnusson, S.E., P. Thebo, A.L. Smith, A. Lundén, and E. Watrang. *Immune responses at experimental Eimeria tenella infection of naive and immune chicken*. in *9th International Veterinary Immunology Symposium*. 2010. Tokyo, Japan.
2. Dalgaard, T., L. Norup, D. Rubbenstroth, E. Watrang, and H. Juul-Madsen. *Do human MASIR methods apply to chickens?* in *3rd MASIR Meeting*. 2008. La Plagne.
3. Dalgaard, T.S., L.R. Norup, D. Rubbenstroth, E. Watrang, and H.R. Juul-Madsen, *Flow cytometric assessment of antigen-specific proliferation in peripheral chicken T cells by CFSE dilution*. Vet Immunol Immunopathol, 2010. Accepted for publication.
4. Watrang, E., P. Thebo, A. Lundén, K. Lövgren Bengtsson, T. Lövgren, A. Uggla, and J. Mattson. *Immune stimulating DNA - a possible adjuvant in vaccines against chicken coccidiosis?* in *European Coccidiosis Discussion Group*. 2007. Compton, UK.