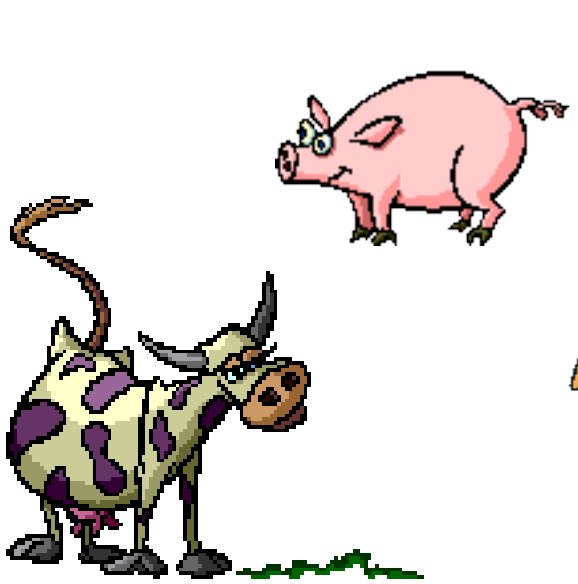
Veterinærinstituttet

Technical University of Denmark

DTU

Den rette vaccine til den rette infektion

Gregers Jungersen, dyrlæge, ph.d,
Professor i Veterinær immunologi og vaccinologi



Dagens tekst

- Immunologi ved forskellige infektioner
- Immunologiske korrelater for beskyttelse
- Den rette vaccine til den rette infektion
  - PRRS
  - Lawsonia

Forløbet af en infektion

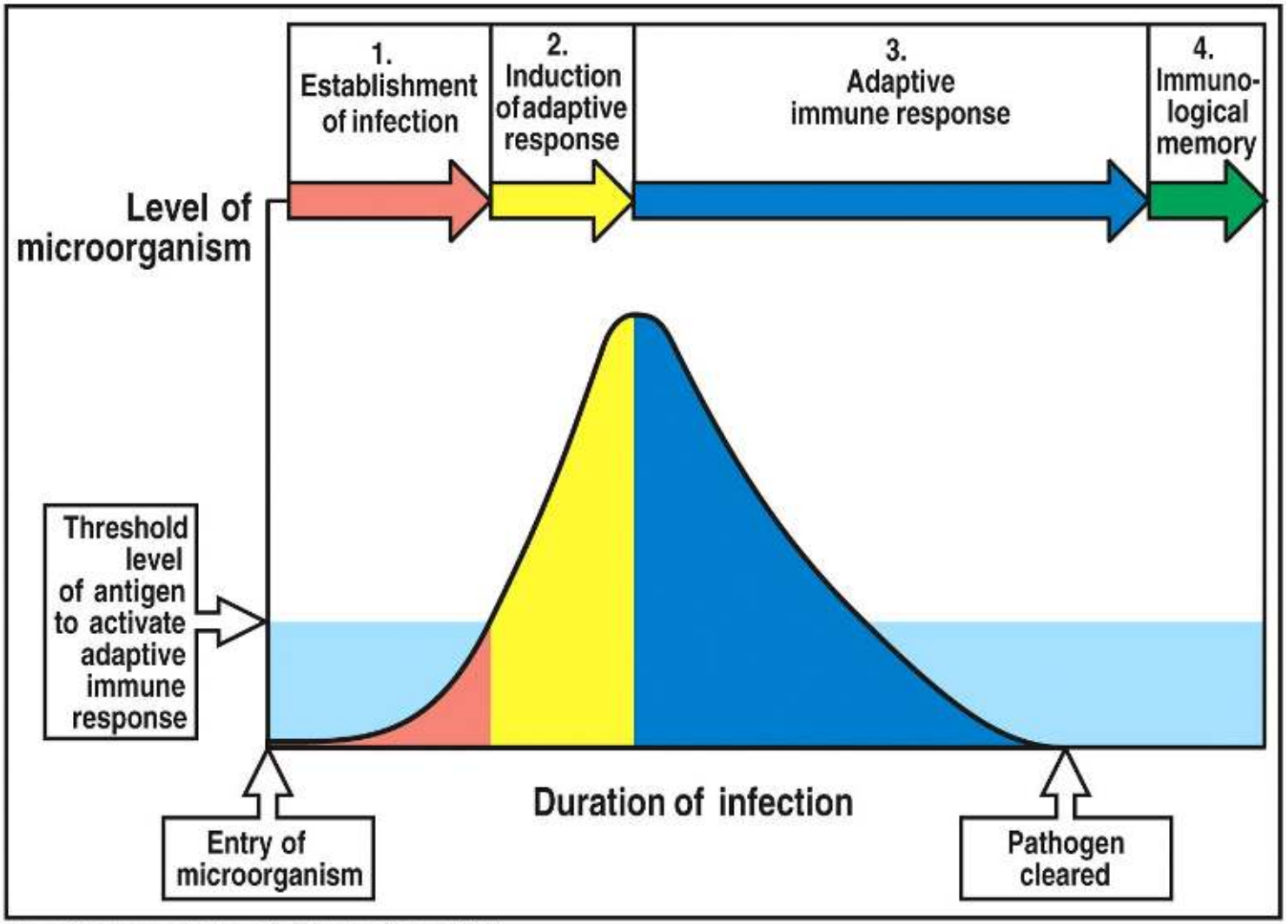


Figure 10-1 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

Veterinærinstituttet

Respons på VACCINATION

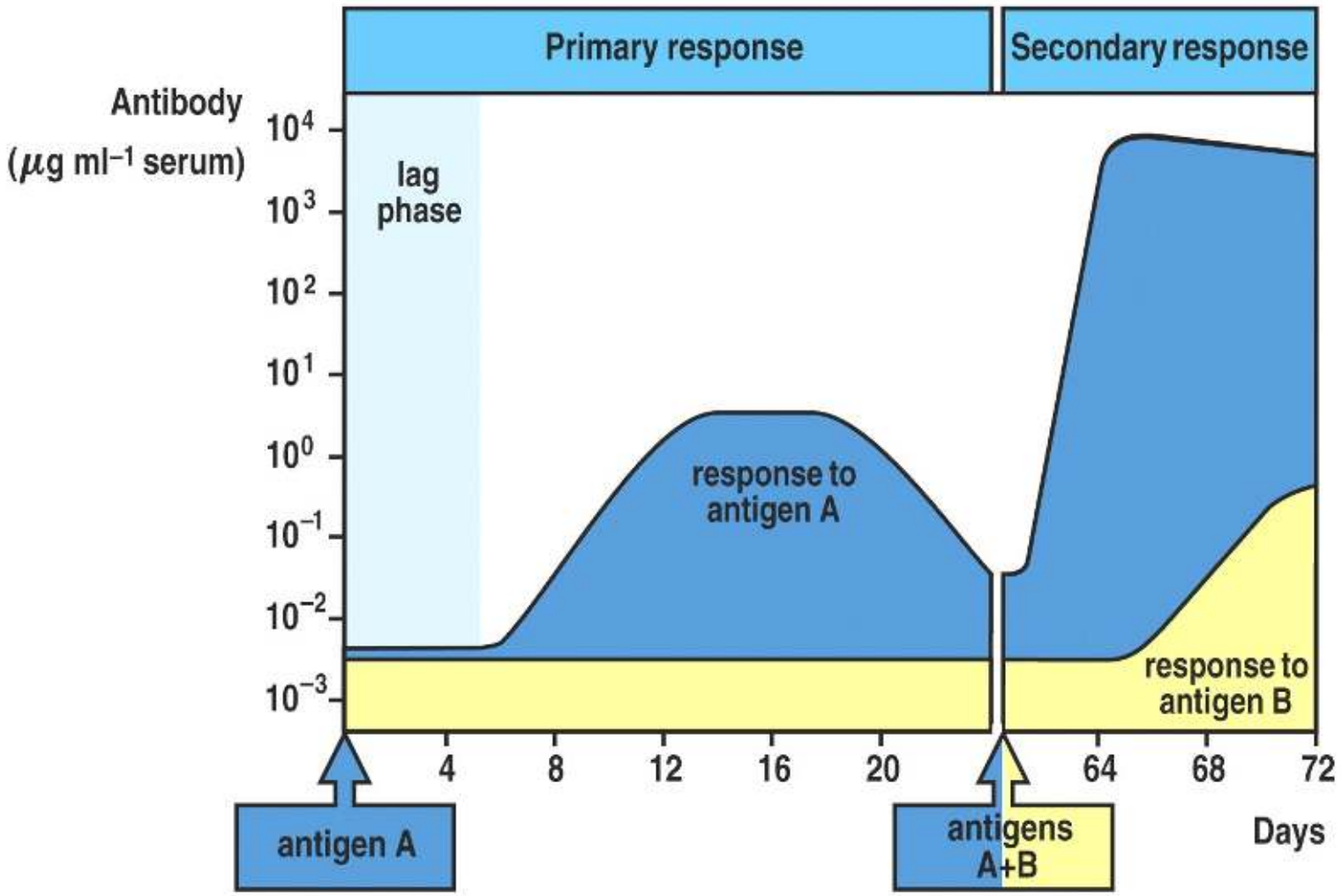


Figure 1-20 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

Veterinærinstituttet

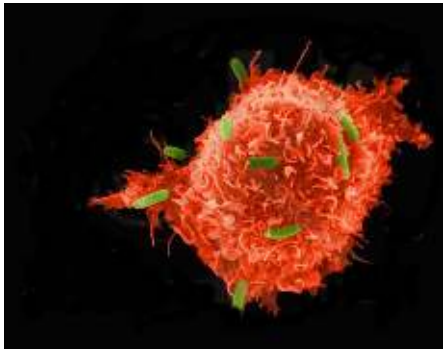
Immunsystemet beskytter imod 4 klassiske typer patogener
- hver type bekæmpes forskelligt

Type af patogen	Eksempel	Sygdom	Relevant immunsvar
Extracellulære bakterier, svampe og parasitter	*E. coli* *Clostridium tetani* *Trypanosoma brucei* *Actinobaccilus pleuropneumoniae*	Bl.a. fravænningsdiarré Stivkrampe Sovesyge Ondartet lungesyge	ANTISTOFFER mod toksiner eller overfladeproteiner på agens
Intracellulære bakterier og parasitter	*Lawsonia intracellularis* *Mycobacterium paratuberculosis* *Plasmodium falciparum* *Toxoplasma gondii*	Proliferativ enteropati Paratuberkulose Malaria Toxoplasmose	ANTISTOFFER mod ekstracellulære stadier HJÆLPER T CELLE aktivering af makrofager DRÆBER T CELLER mod inficerede celler
Virus (intracellulære)	Influenza virus PRRSV Varicella zoster-virus	Influenza PRRS Skoldkopper	ANTISTOFFER mod ekstracellulære stadier DRÆBER T CELLER mod inficerede celler
Parasitære orme (extracellulære)	*Ascaris* *Schistosoma spp.*	Spolorm Bilharziose	Eosinofile granulocytter Antistof afhængig celle-medieret cytotoksicitet (ADCC)

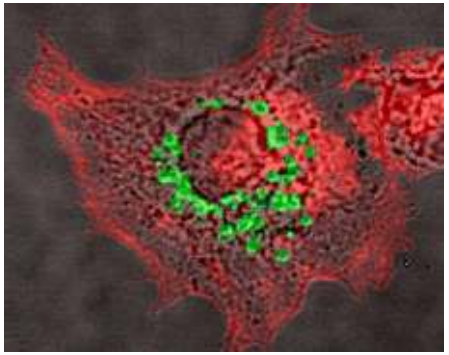
Veterinærinstituttet

DTU

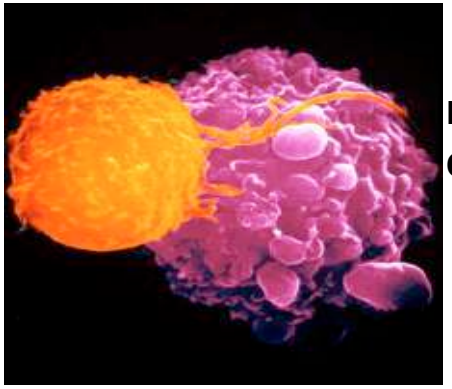
Reguleringen af immunsystemet er kompleks



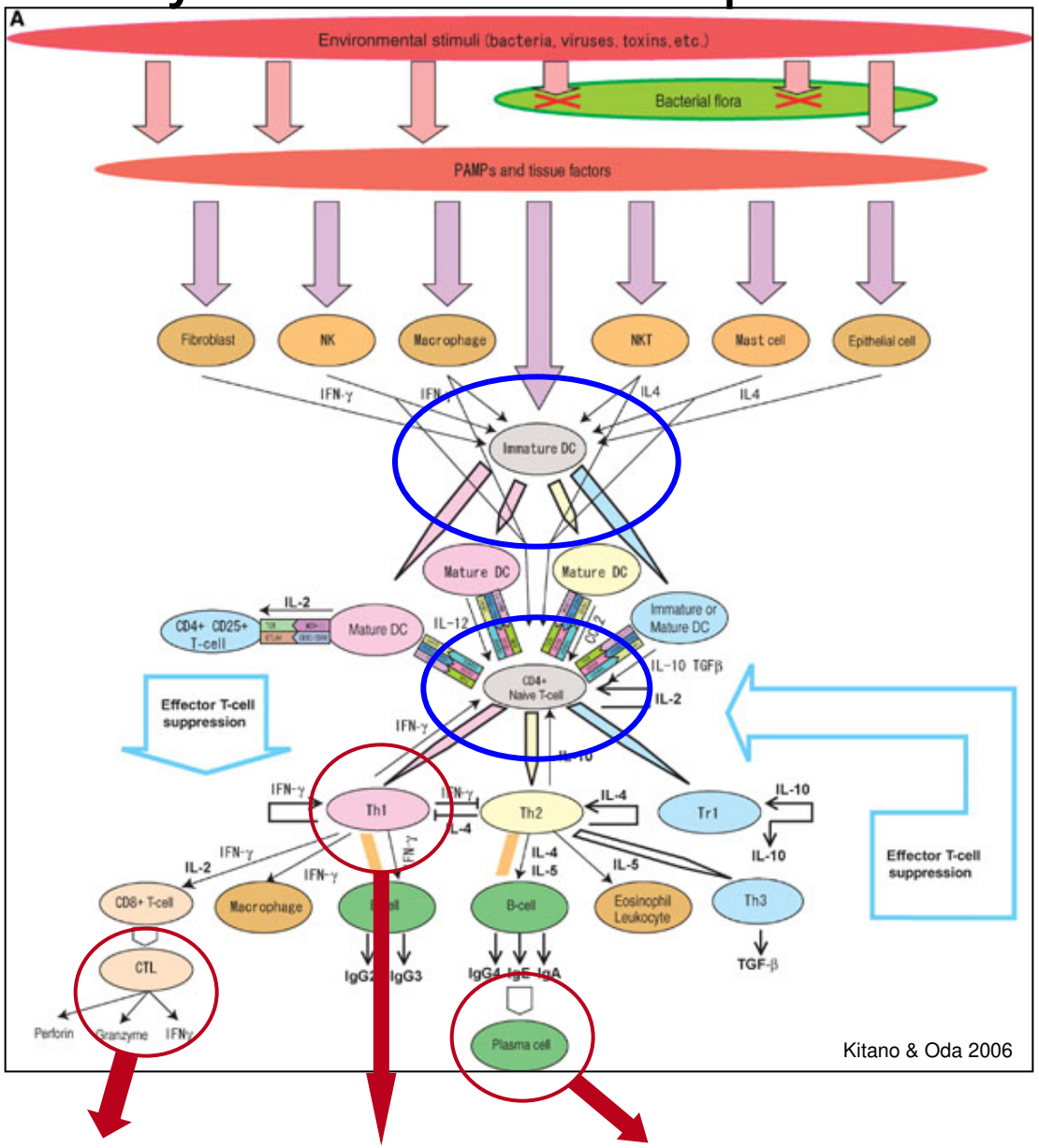
1. Kontakt



2. Optagelse i celler



3. Interaktion med immun celler



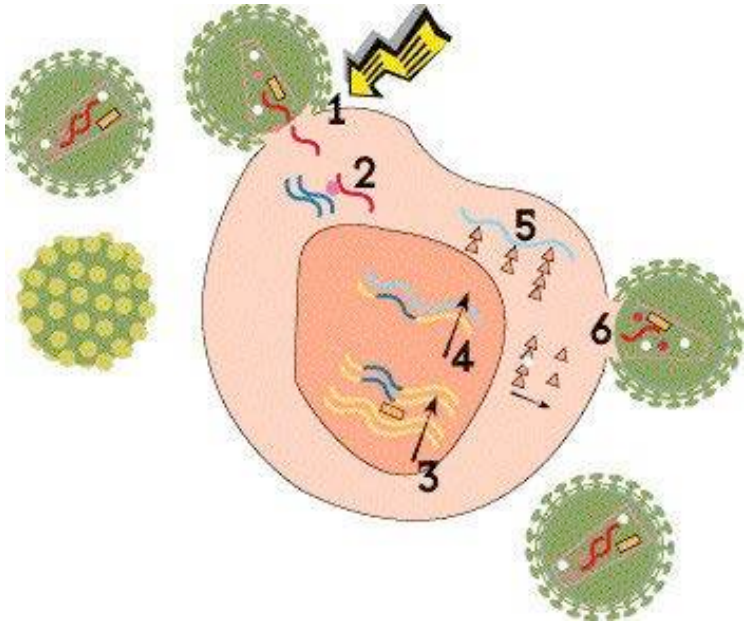
Virus Intracellulære bakterier Extracellulære bakterier

Hvad fejler grisen?

Infektion med virus

Smitte

Virus bruger kroppens celler som fabrik for nye virus

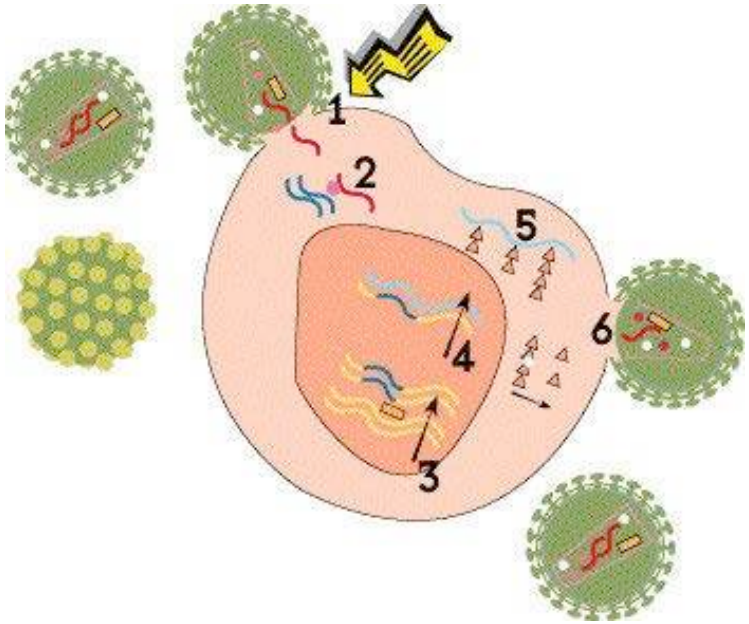


Veterinærinstituttet

DTU

Infektion med virus

Virus bruger kroppens celler som fabrik for nye virus

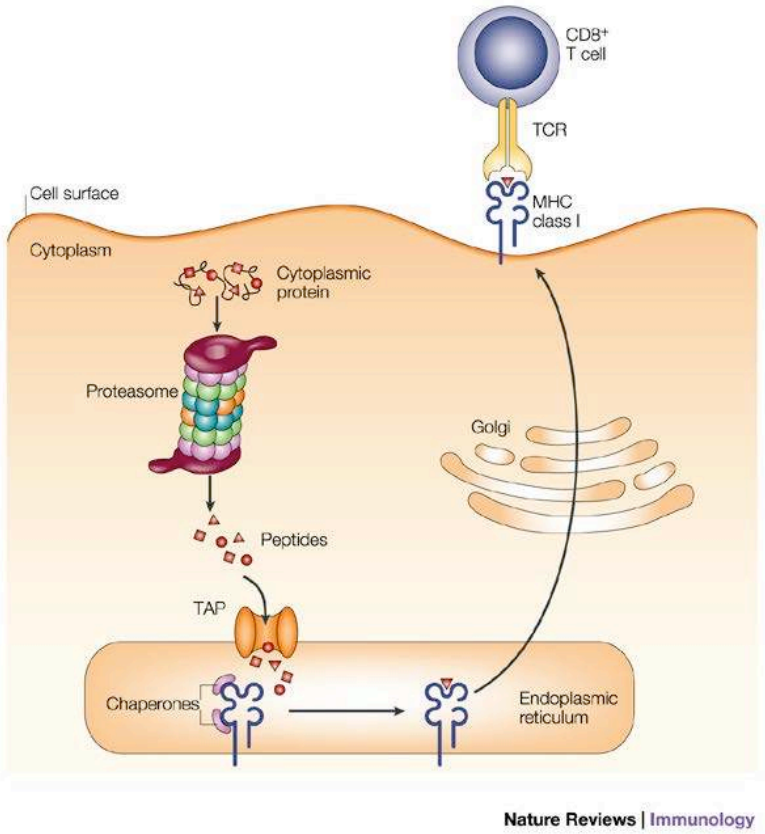


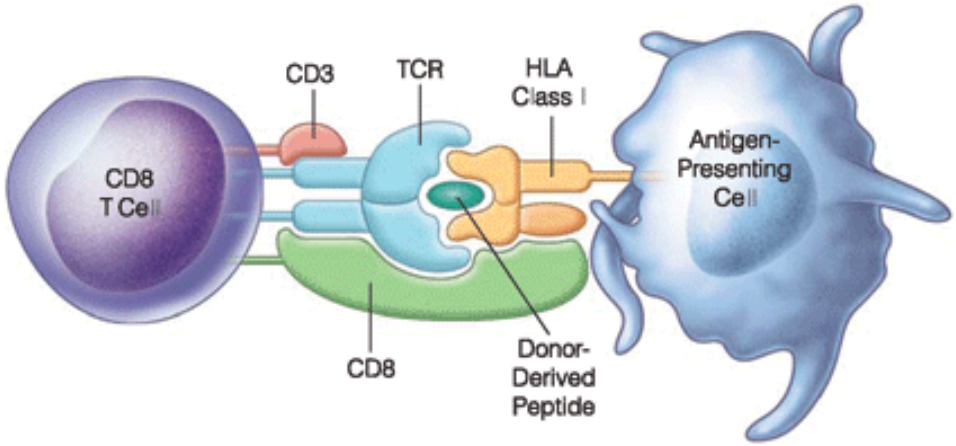
Antistoffer kan neutralisere spredning til nye celler,

men ikke forhindre virus replikation

Veterinærinstituttet

Peptider fra "produktionen" loades i MHC klasse I molekyler



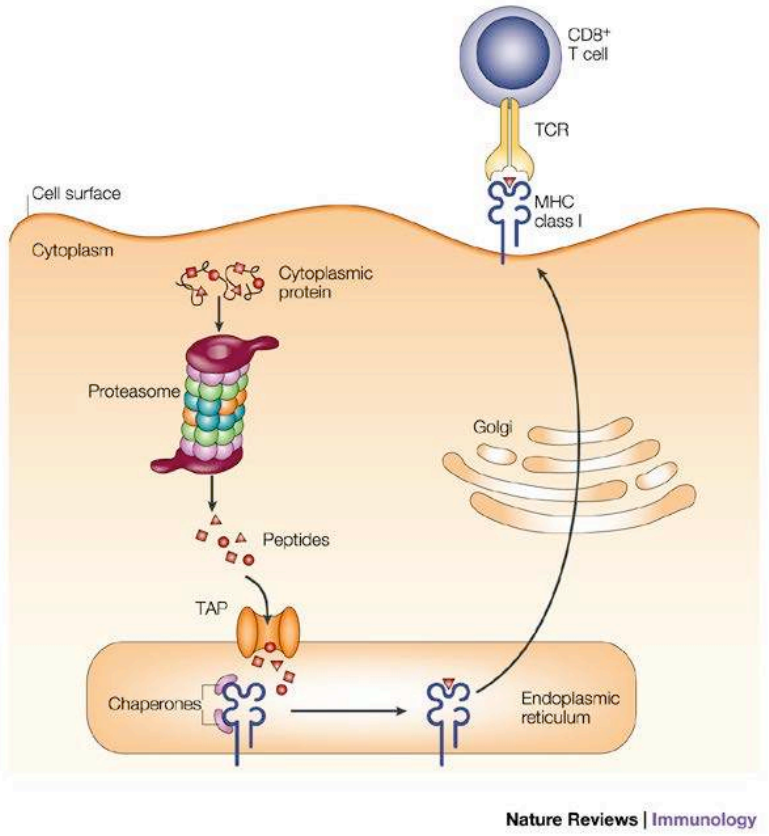


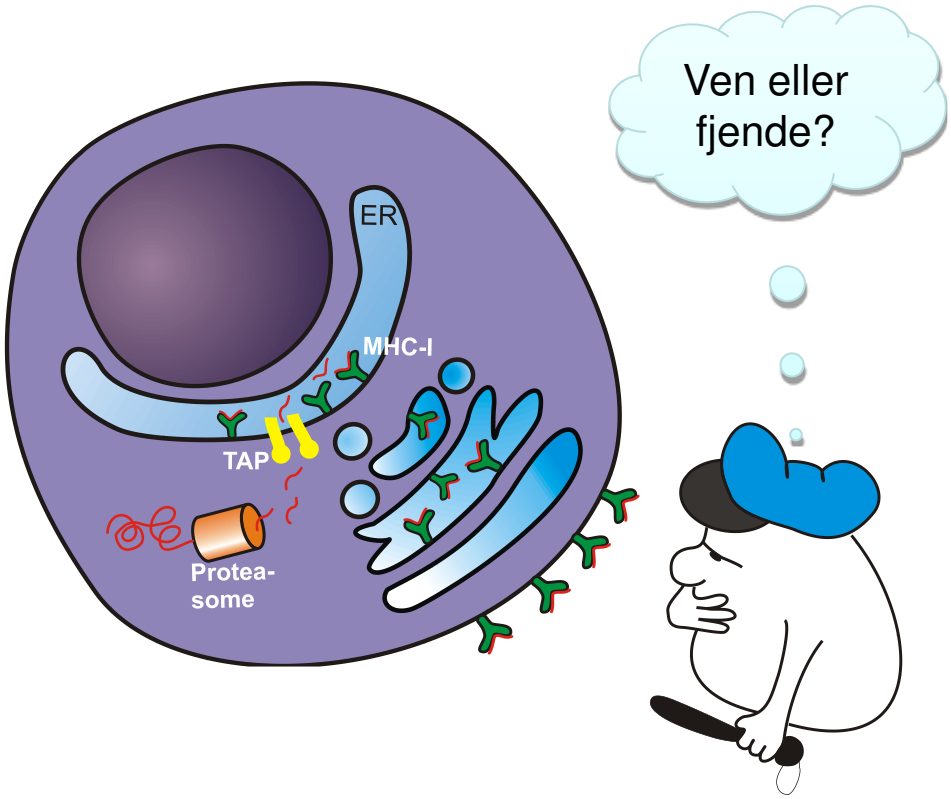
Brudstykker af egne og virus proteiner pakkes i MHC klasse I molekyler og præsenteres på cellens overflade

Cytotoksiske T celler overvåger om cellen producerer egne proteiner eller virus

Veterinærinstituttet

Peptider fra "produktionen" loades i MHC klasse I molekyler





Brudstykker af egne og virus proteiner pakkes i MHC klasse I molekyler og præsenteres på cellens overflade

Cytotoksiske T celler overvåger om cellen producerer egne proteiner eller virus

Veterinærinstituttet

Virusinficeret celle dræbes af cytotoksiske T celler

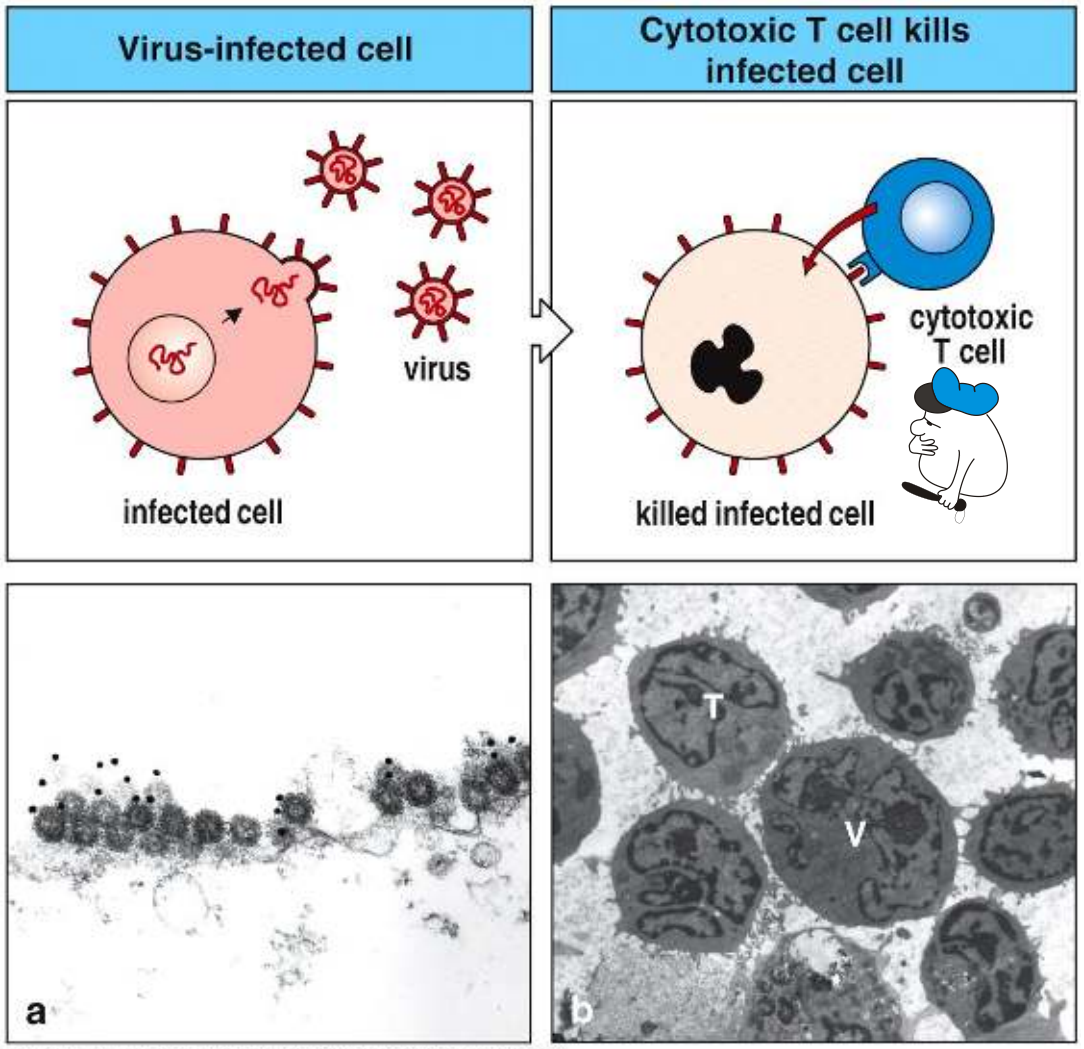
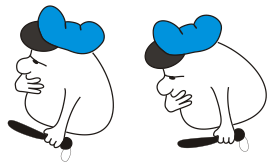


Figure 1-25 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

Hvordan måler vi om der er dannet



efter infektion eller vaccination?

Veterinærinstituttet

Intracellulære bakterier

Immunitet afhængig af T hjælper (T_H1) celler og interferon-gamma (IFN-γ)

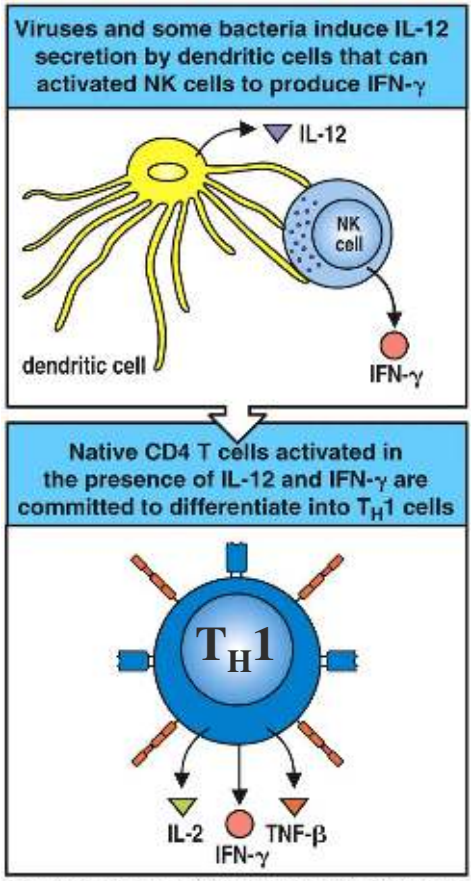


Figure 10-9 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 200

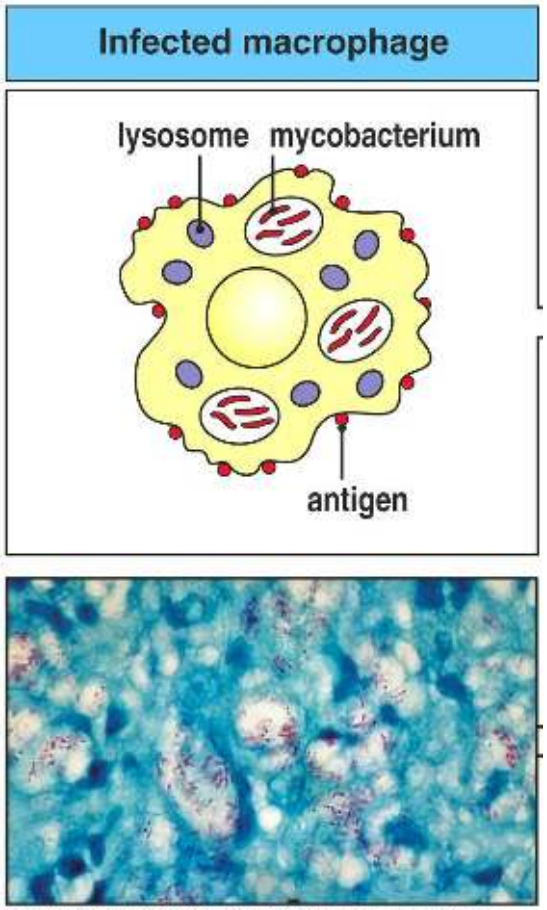


Figure 1-26 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

Veterinærinstituttet

Intracellulære bakterier

Immunitet afhængig af T hjælper (T_H1) celler og interferon-gamma (IFN-γ)

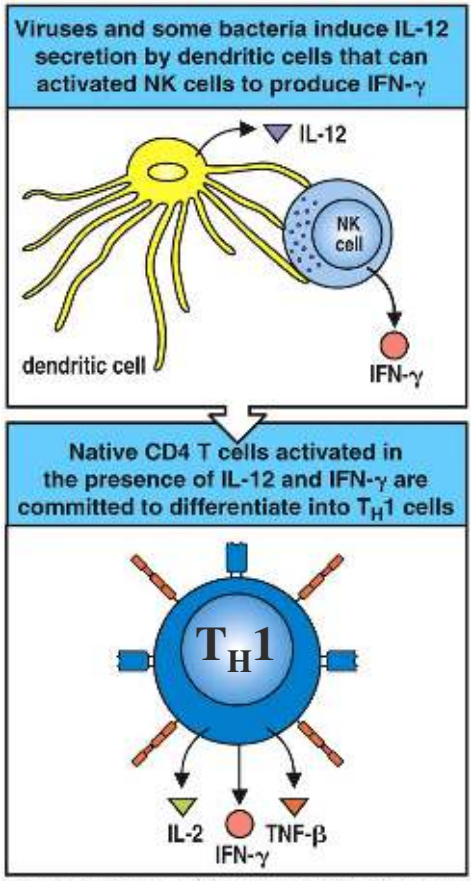


Figure 10-9 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 200

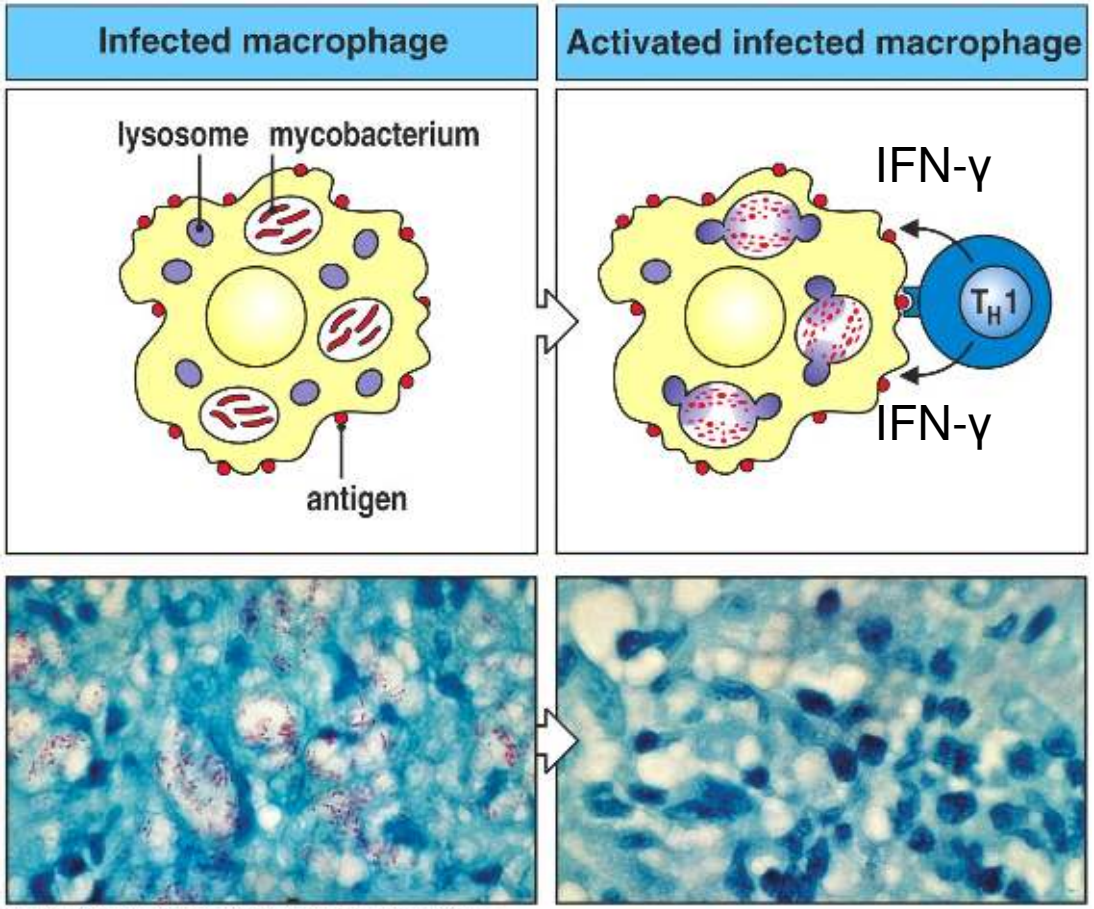


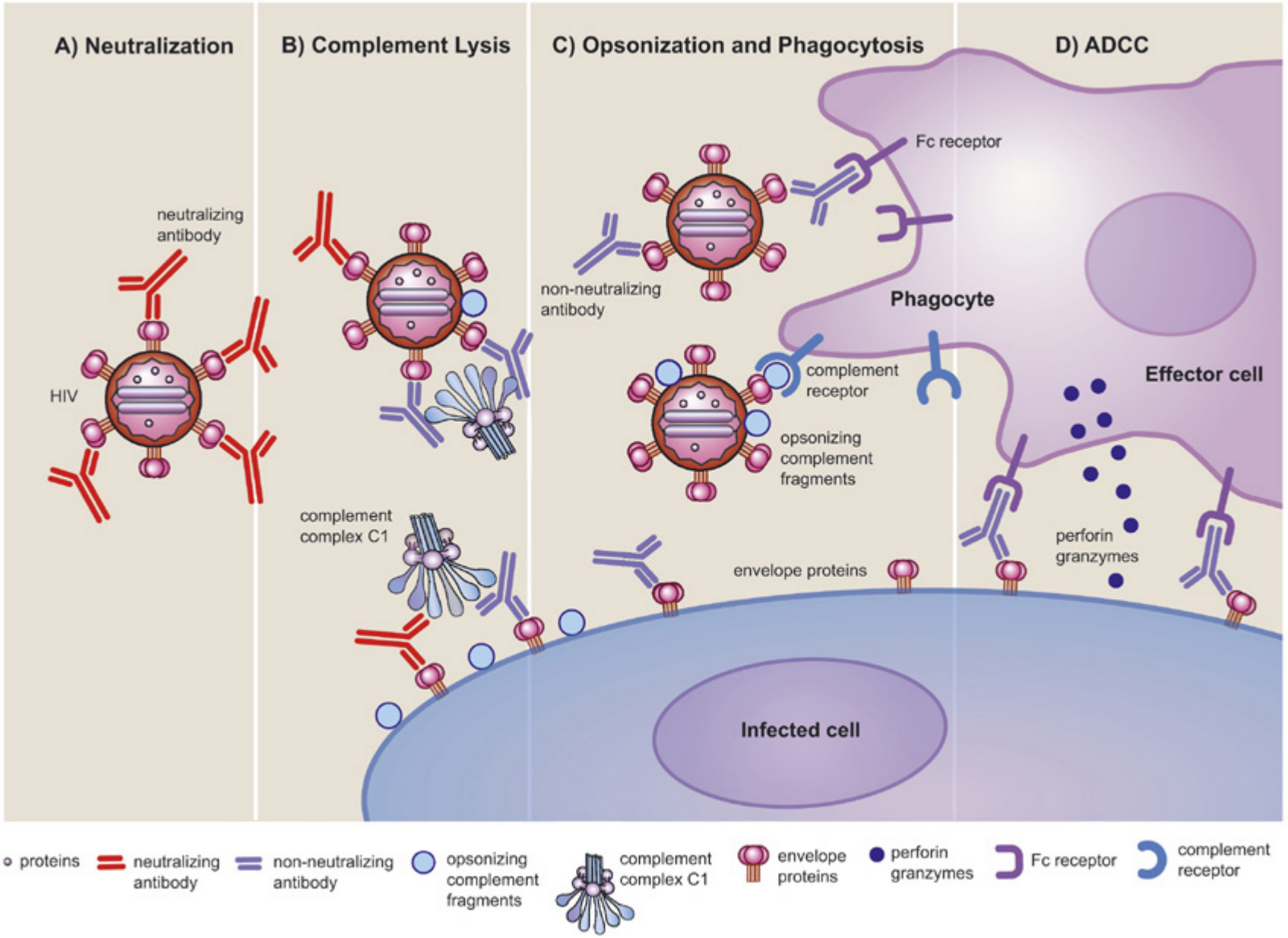
Figure 1-26 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

Veterinærinstituttet

Kvaliteten af et immunrespons efter vaccination afhænger af hvilken infektion der skal bekæmpes

- Antistoffer
  - Toksin
  - Extracellulær bakterie
  - Virus
    - Neutraliserende?
- Cellemedieret immunsvar
  - Hjælper (T_H1) T-celler
    - Intracellulære bakterier
  - Cytotoksiske T-celler
    - Virus (*Lawsonia*?)
      - Ofte bedre X-beskyttelse mellem serotyper

Antistoffers effektormekanismer

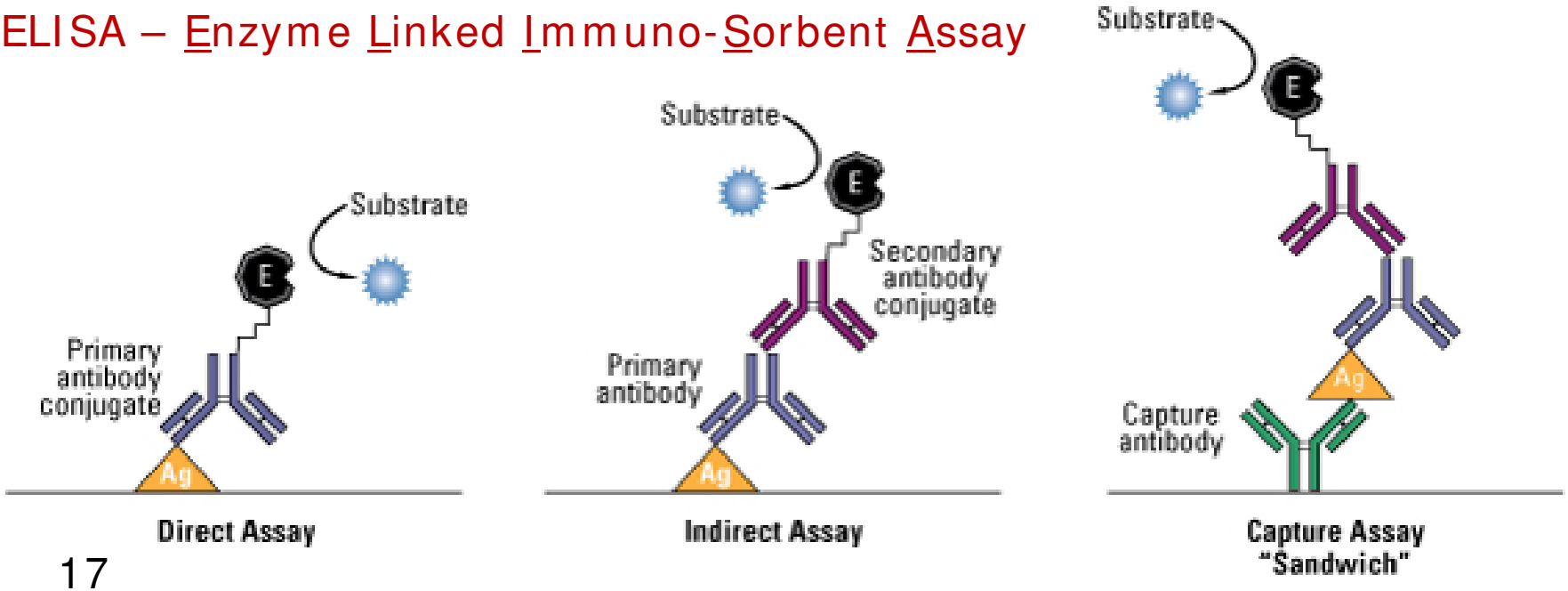


from M. Huber & A. Trkola (2007) Journal of Internal Medicine, 262(1)

Standard måling af antistof svar

- Antistof niveau
  - Evt en bestemt antistof isotype
- Slimhinde sIgA respons (svært)
- Neutraliserende titer
  - F.eks. inhibering af infektion i celle kultur

ELISA – Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay

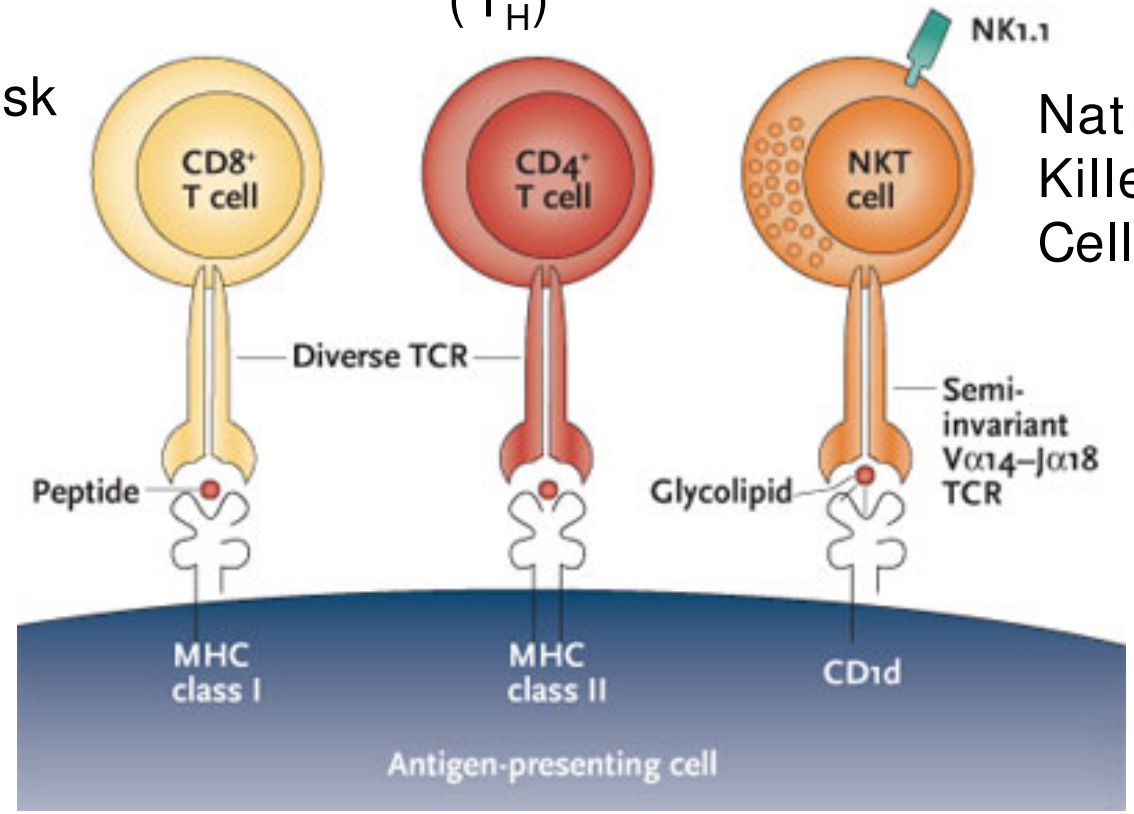


3 Effektor T-celler

Cytotoksisk T-celle (CTL)

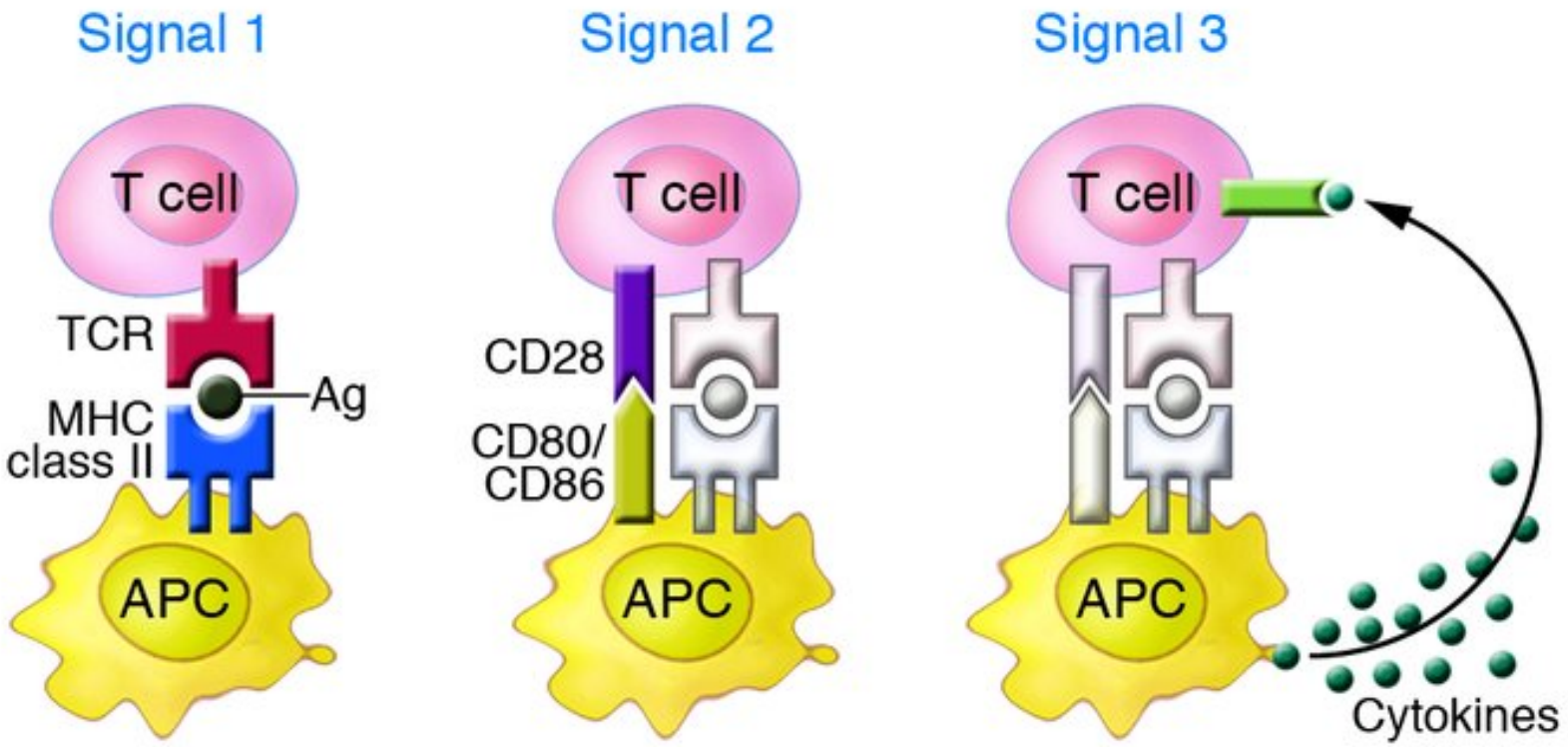
Hjælper T-celle (T_H)

Natural Killer Cell



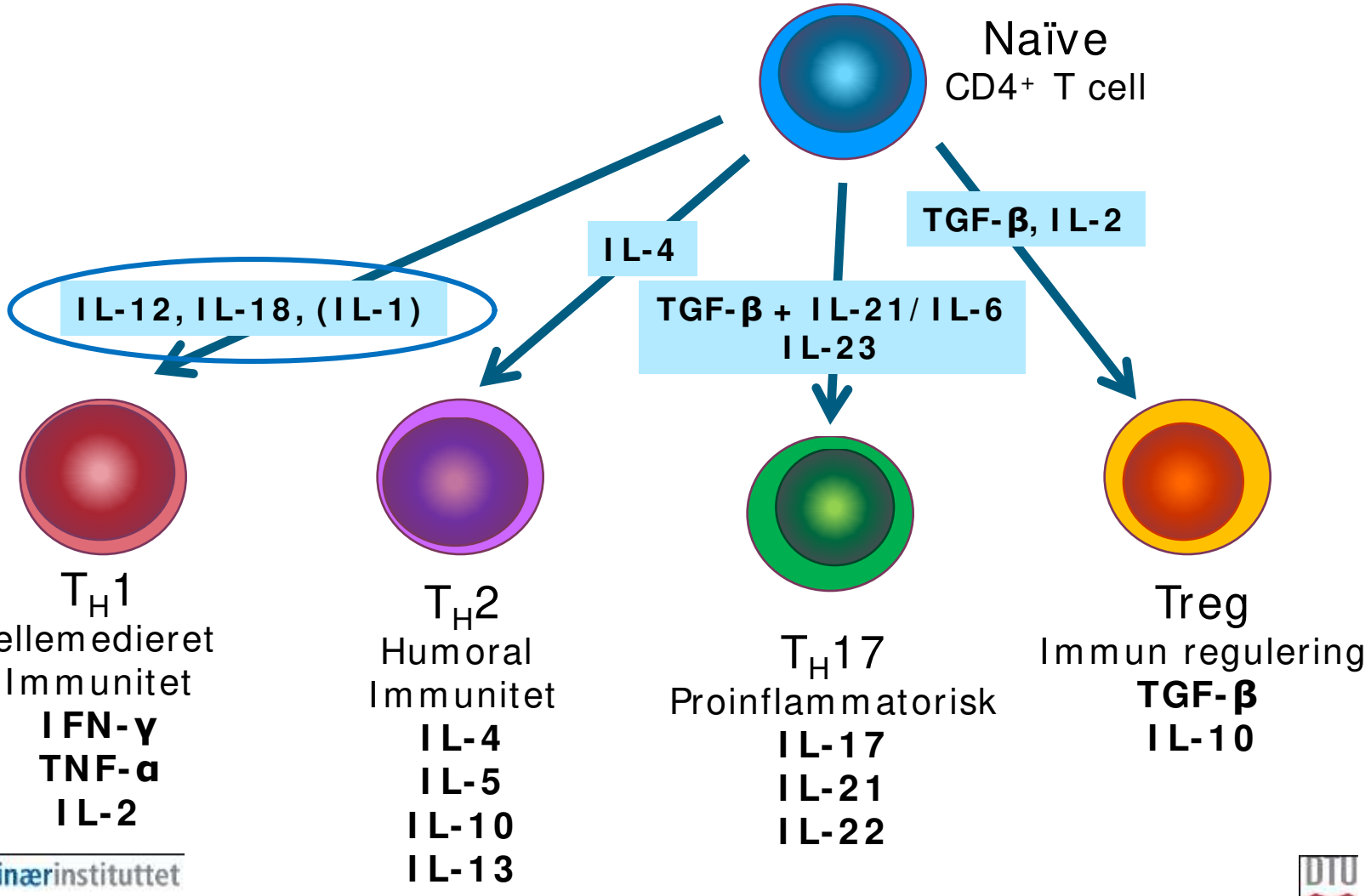
www.the-scientist.com

Aktivering af T-celler



Gutcher & Becher *J Clin Invest.* 2007

Cytokiner styrer differentiering af T_H celler



Veterinærinstituttet

DTU

Måling af cellemedieret immunitet (T_H1)

- Intradermal **kutantest**
  - Antigen optages af Langerhans celler i kutis og præsenteres for circulerende lymfocytter. CD4+ T_H1 celler der genkender Ag vil producere cytokiner → celleinfiltration og ødem = hudfortykkelse
  - *In vivo* assay

DTH – delayed type hypersensitivity reaction

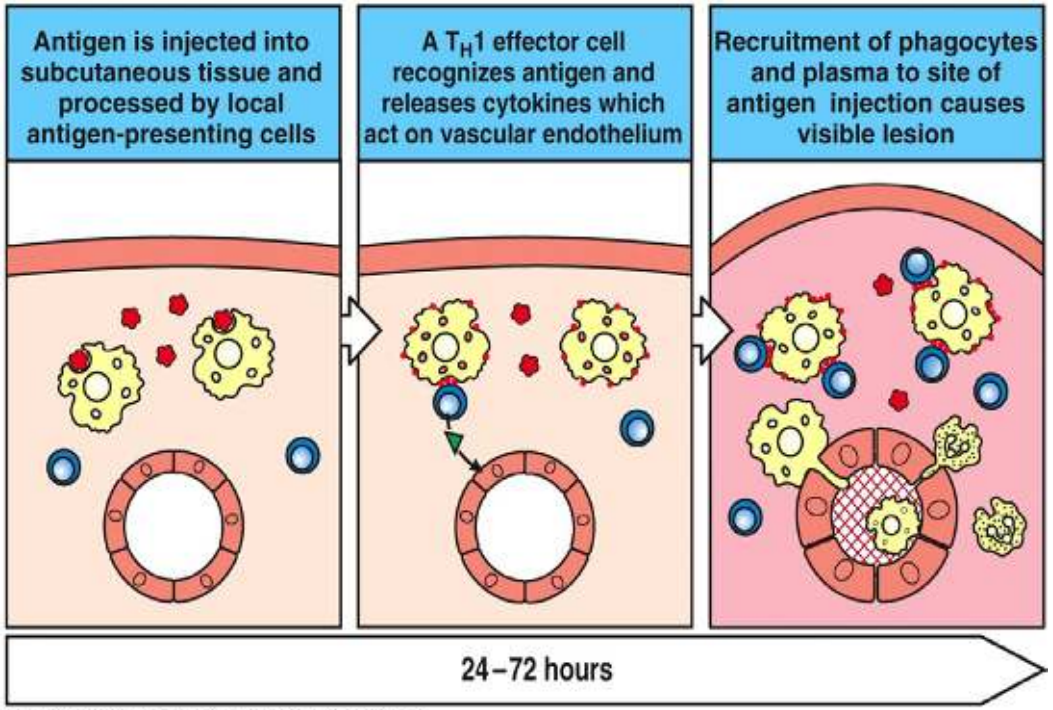
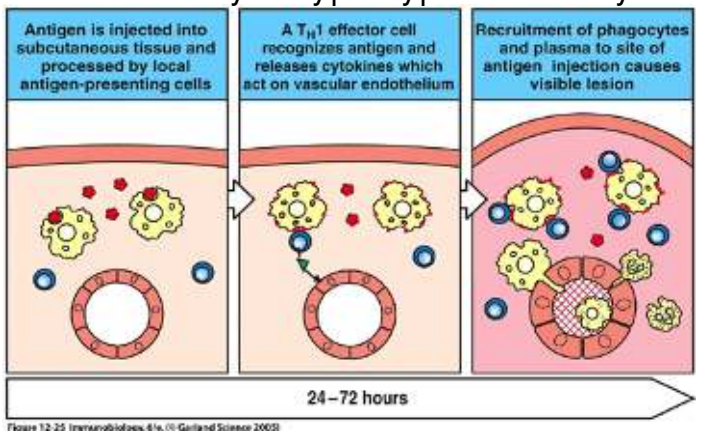


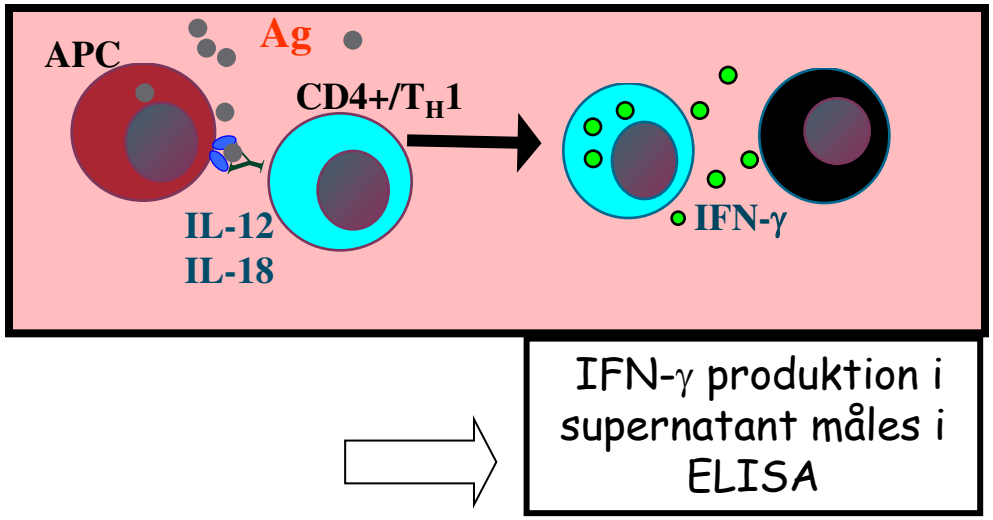
Figure 12-25 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

Måling af cellemedieret immunitet (T_H1)

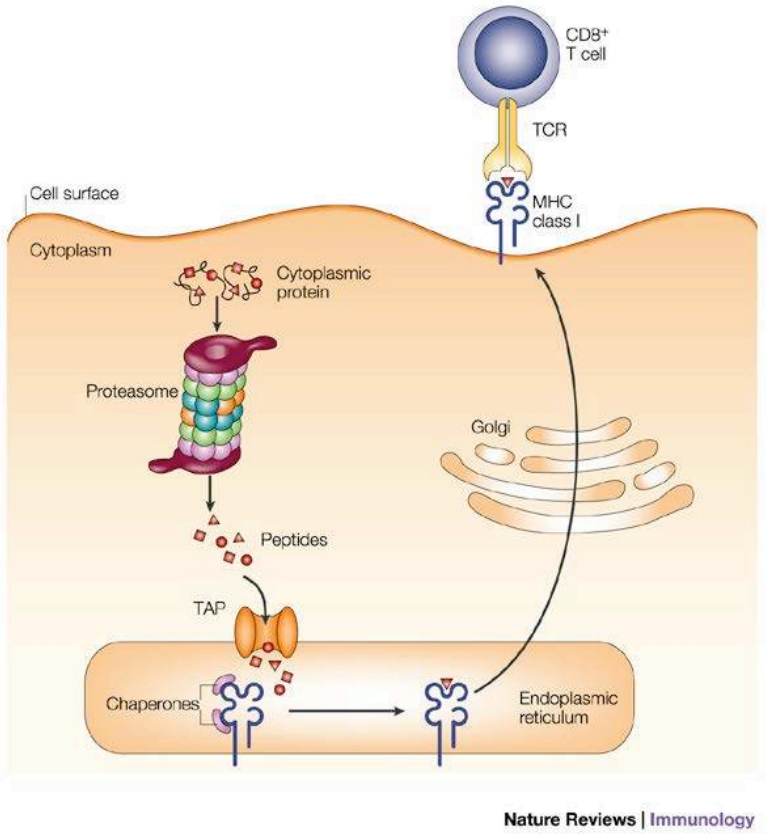
- Intradermal **kutantest**
  - *In vivo* assay
- Interferon-gamma (IFN-γ) assay
  - Isolerede lymfocytter eller heparin stabiliseret blod inkuberes i 20-22 timer med antigen.
  - T_H1 celler der genkender Ag vil producere → **IFN-γ** (ELISA)
  - *In vitro* assay

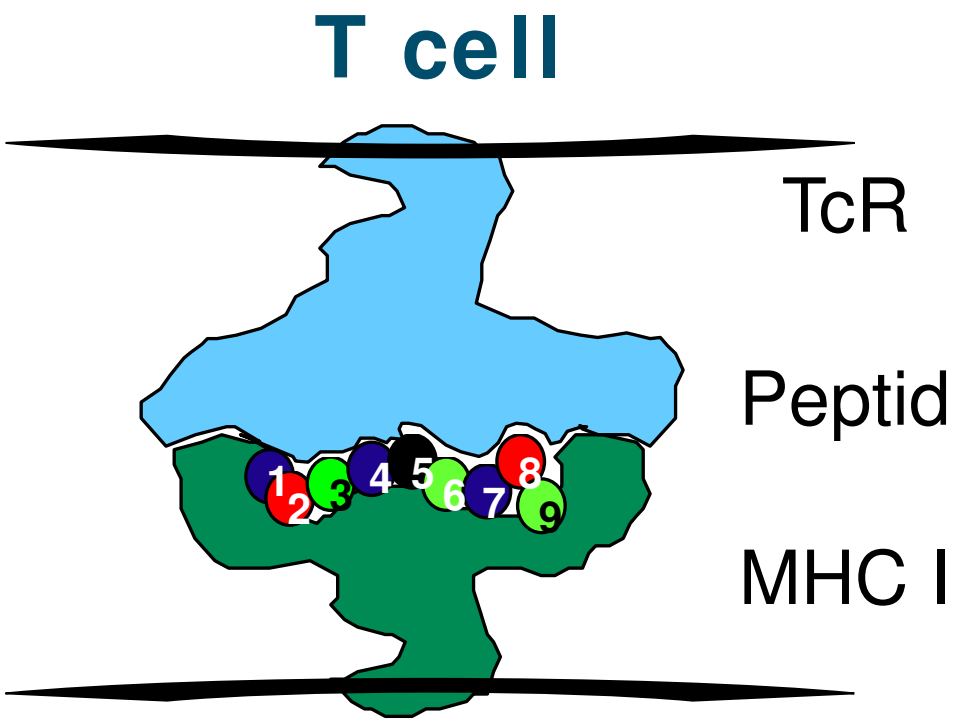
DTH – delayed type hypersensitivity reaction





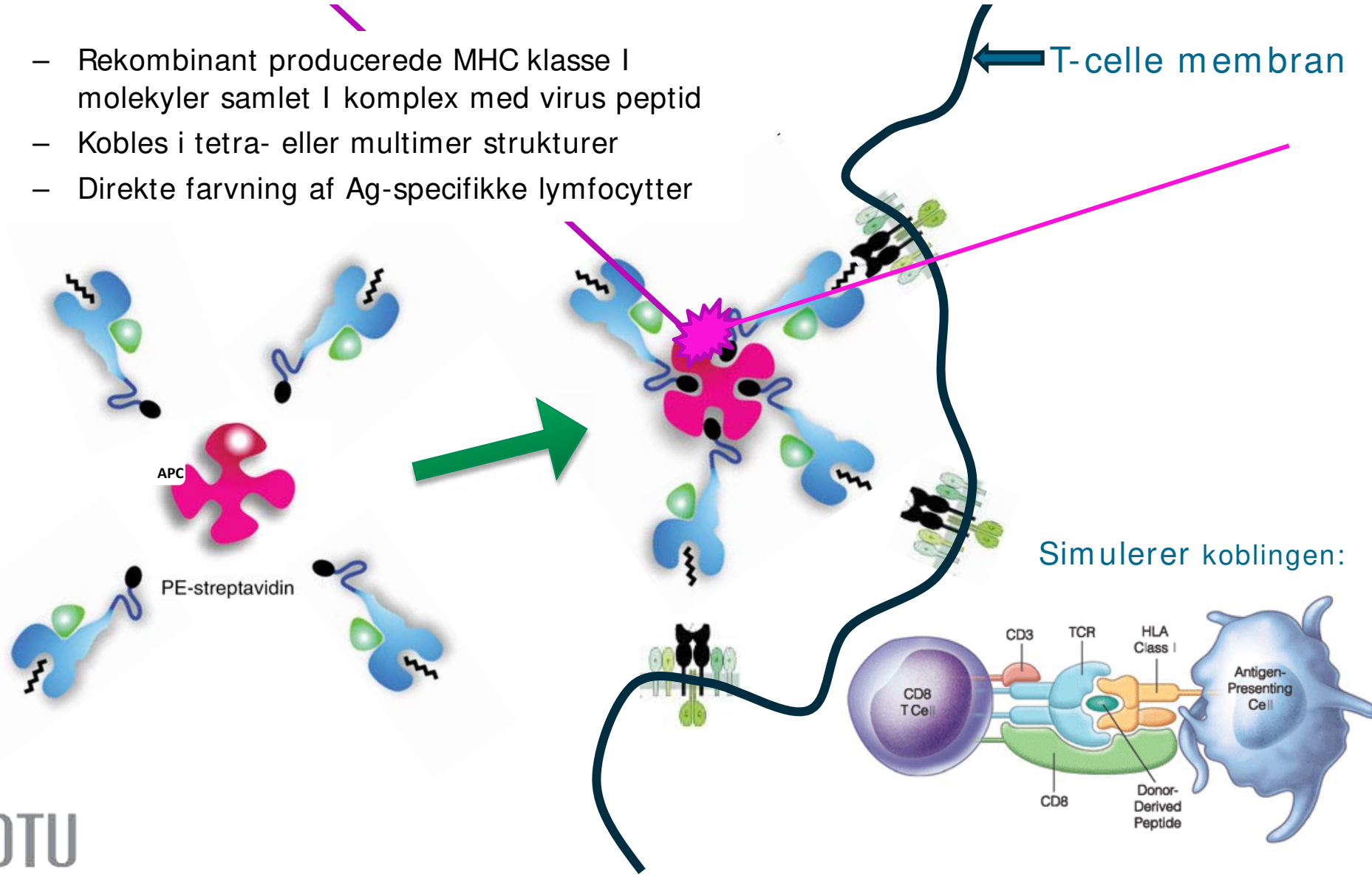
Måling af cytotoksiske T celler (CTL)





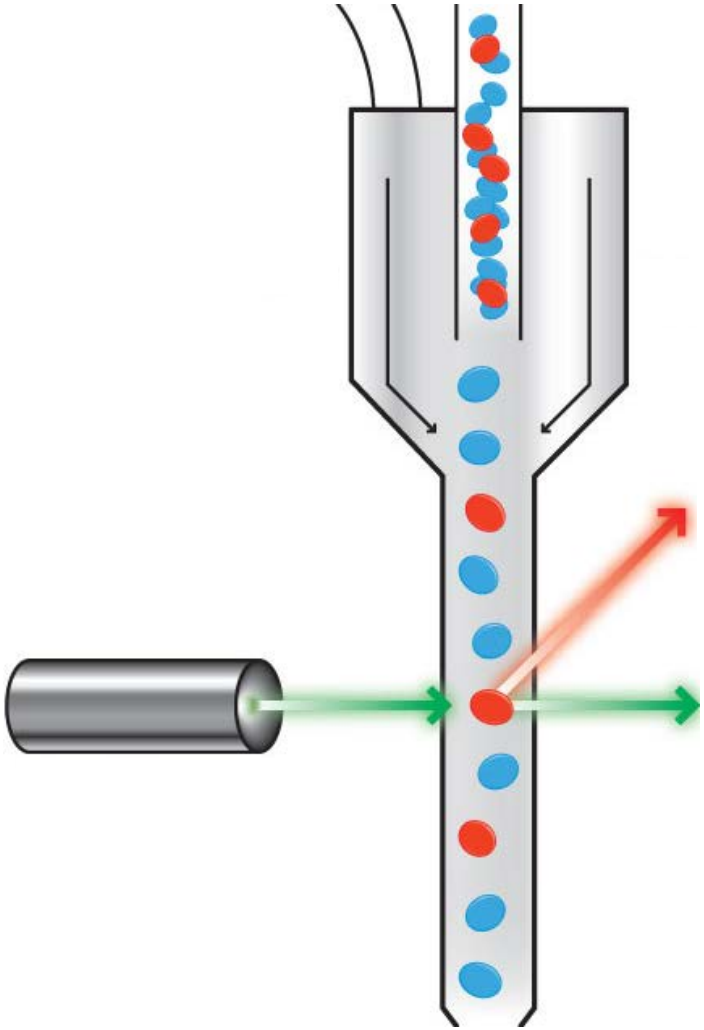
Farvning af cytotoksiske (CD8+) T-celler med Tetramerer

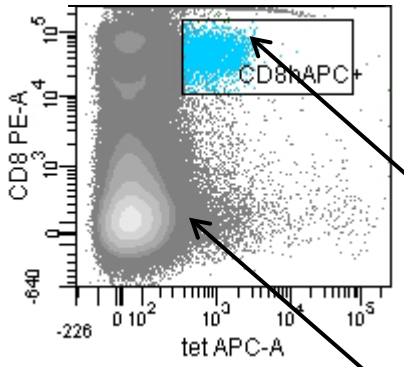
- Rekombinant producerede MHC klasse I molekyler samlet I komplex med virus peptid
- Kobles i tetra- eller multimer strukturer
- Direkte farvning af Ag-specifikke lymfocytter

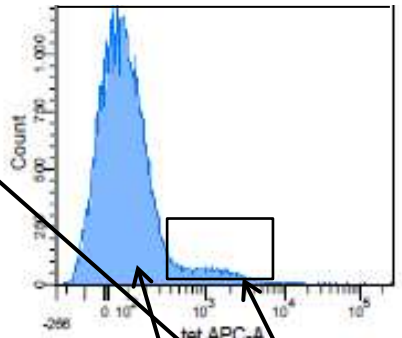


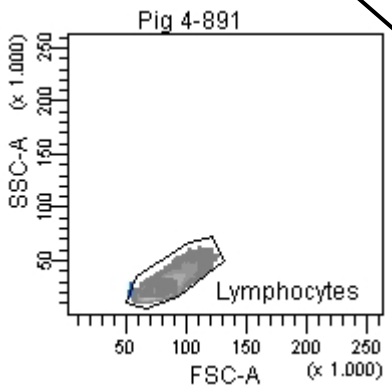
Tetramer production figure modified from: Generation of peptide–MHC class I complexes through UV-mediated ligand exchange
Boris Rodenko, Mireille Toebes, Sine Reker Hadrup, Wim J E van Esch, Annemieke M Molenaar, Ton N M Schumacher & Huib Ovaa
Nature Protocols 1, 1120 - 1132 (2006) Published online: 31 August 2006 Corrected online: 19 October 2006
doi:10.1038/ nprot.2006.121

Flowcytometri (FACS) måling af mærkede celler







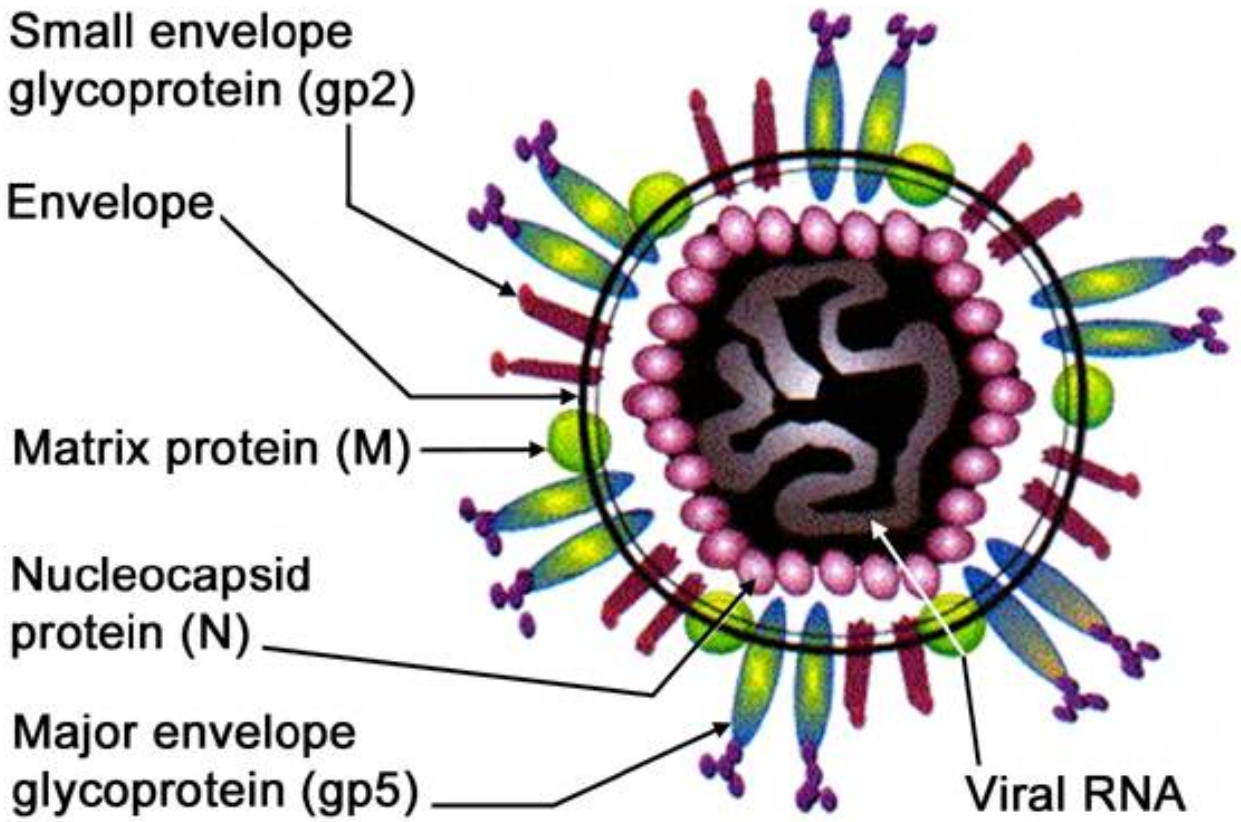


Fluorescens positiv celle population

Fluorescens negativ celle population

Veterinærinstituttet

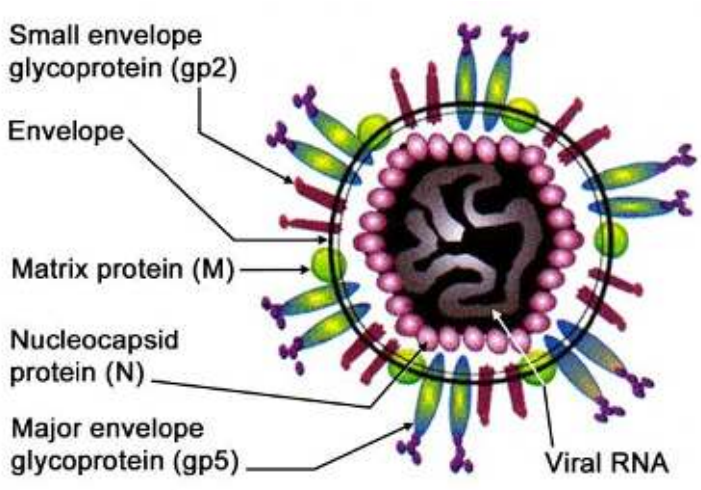
Eksempel 1: PRRS

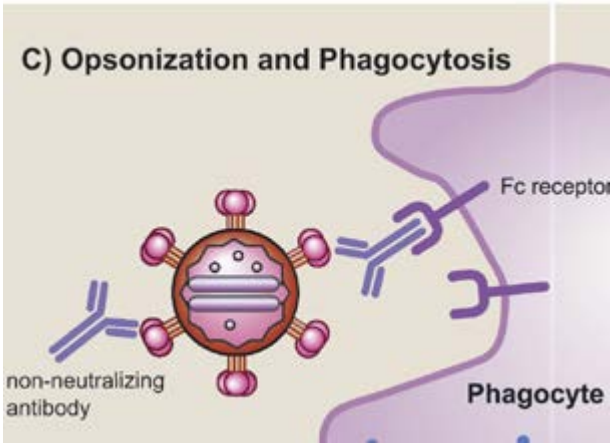


Veterinærinstituttet

PRRS Antistoffer:
Den gode, den onde og den grusomme

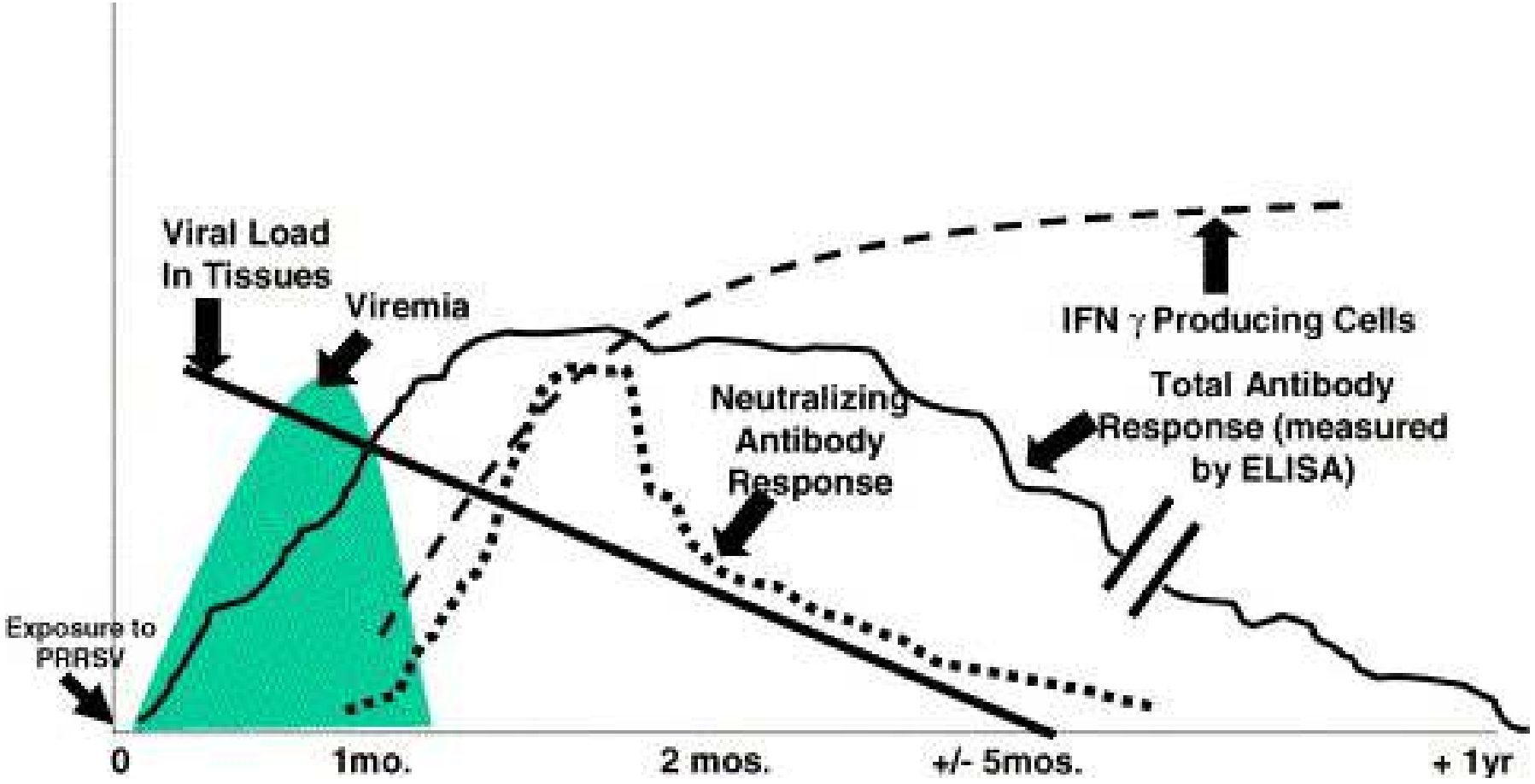
- **Den gode:** Neutraliserende antistoffer mod GP5 protein
- **Den onde:** Irrelevante antistoffer mod nsp2, N og M protein
- **Den grusomme:** Antistoffer (N og GP5) der øger optagelse af infektive virus makrofager (ADE)





ADE: Antibody Dependent Enhancement

Veterinærinstituttet



Udvikling af immunologiske hændelser efter PRRSV infektion

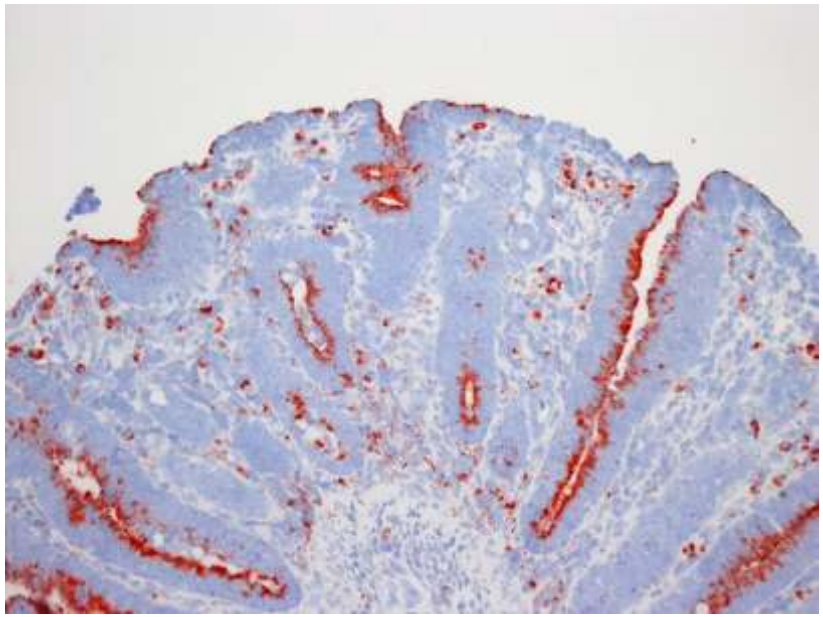
Lopez OJ, Osorio FA. Role of neutralizing antibodies in PRRSV protective immunity. Vet Immunol Immunopathol. 2004 Dec 8;102(3):155-63.

En ny og bedre vaccine mod PRRS skal:

- Danne Neutraliserende Antistoffer
- Undgå ADE antistoffer
- Fremme et CD4+ og CD8+ cellemedieret immunsvar
  - Aktivere makrofager via CD4+
  - Standse virus replikation ved CD8+ cytotoksicitet

Eksempel 2: *Lawsonia intracellularis*

- Ca 1400 proteiner i genomet
- Lokaliseret på begge sider af basalmembranen
- Obligat intracellulær
- Beskyttende immunitet er ikke klarlagt



Lawsonia inokulation med tarmhomogenat

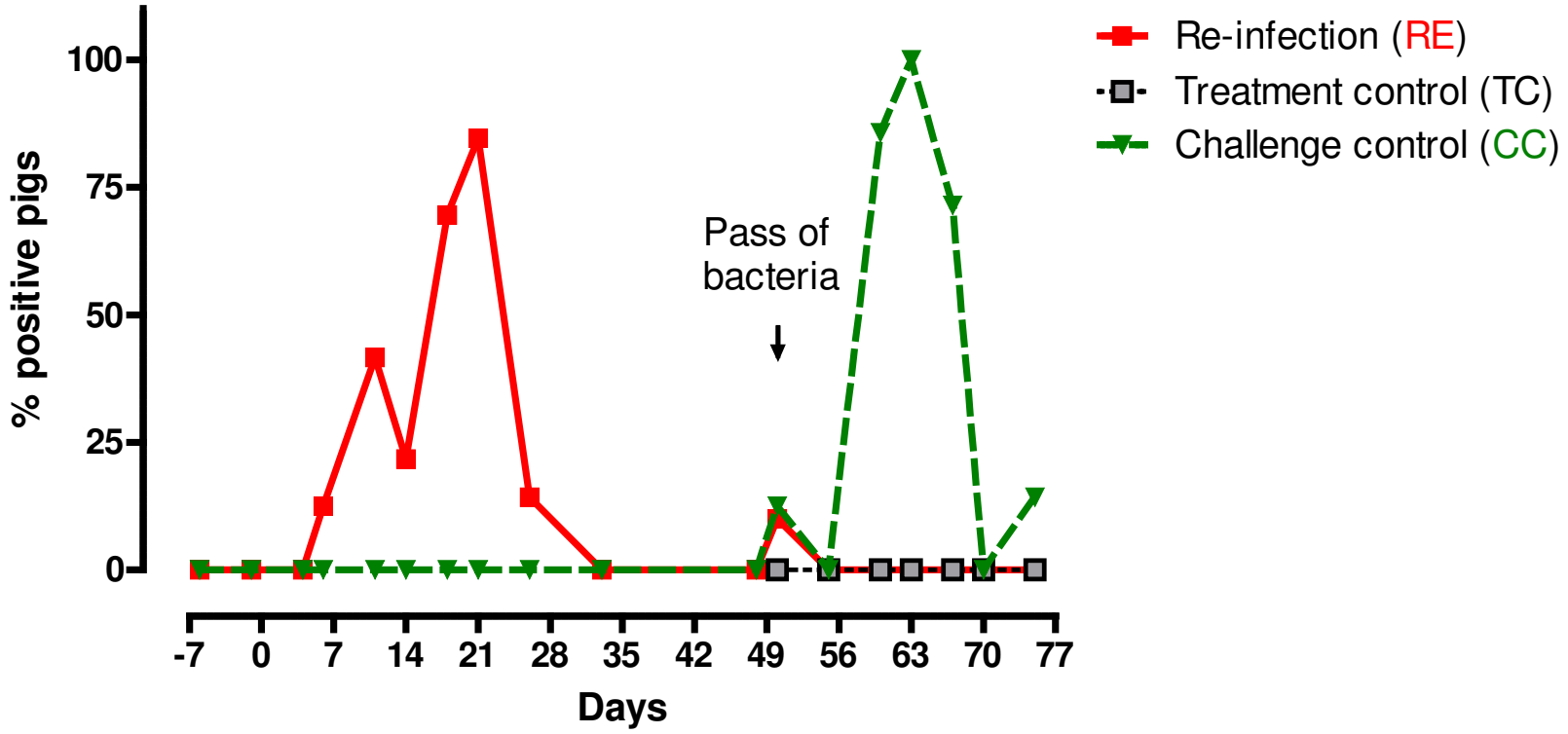
- To re-infektion forsøg i 2006 og 2008 (totalt 44 grise)
- Primær infektion ved 5 uger
- Antibiotic clearance of the infection
- Challenge ved 12 uger

Day:	0	21	31	49	Kill day 70-84
Group	Primary infection	Antibiotic treatment	Resolving/healing	Challenge infection	
Re-infection (Re-I)					
Treatment control (TC)					
Challenge control (CC)					

Primær infektion ved 5 uger

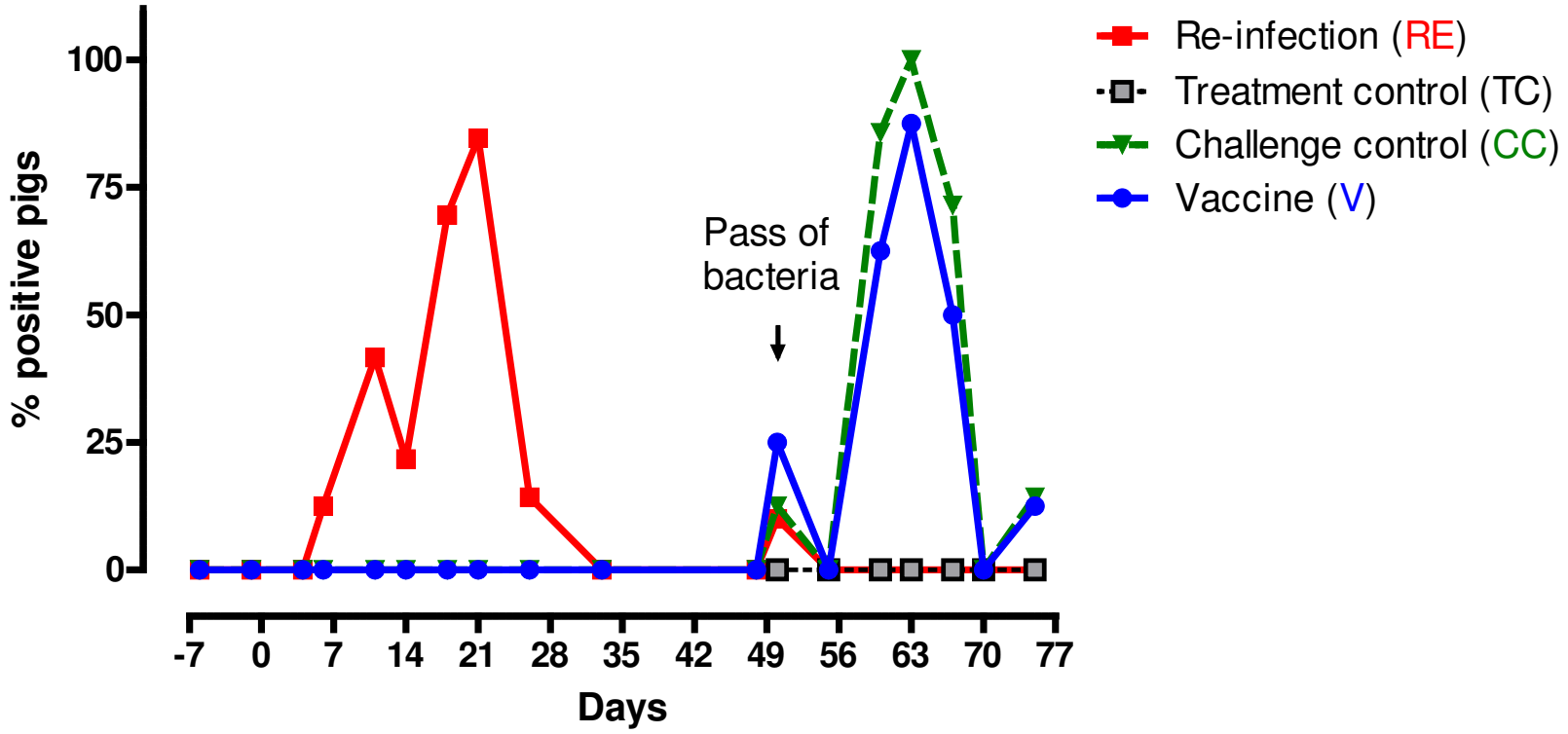
Challenge ved 12 uger

Lawsonia udskillelse i fæces



Veterinærinstituttet

Lawsonia udskillelse i fæces

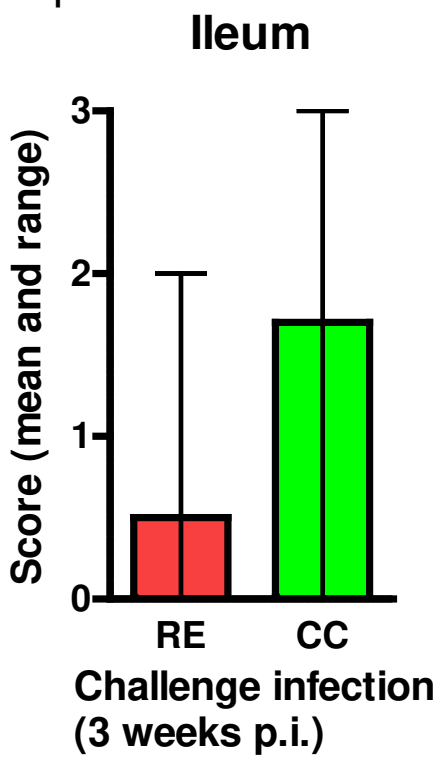


Veterinærinstituttet

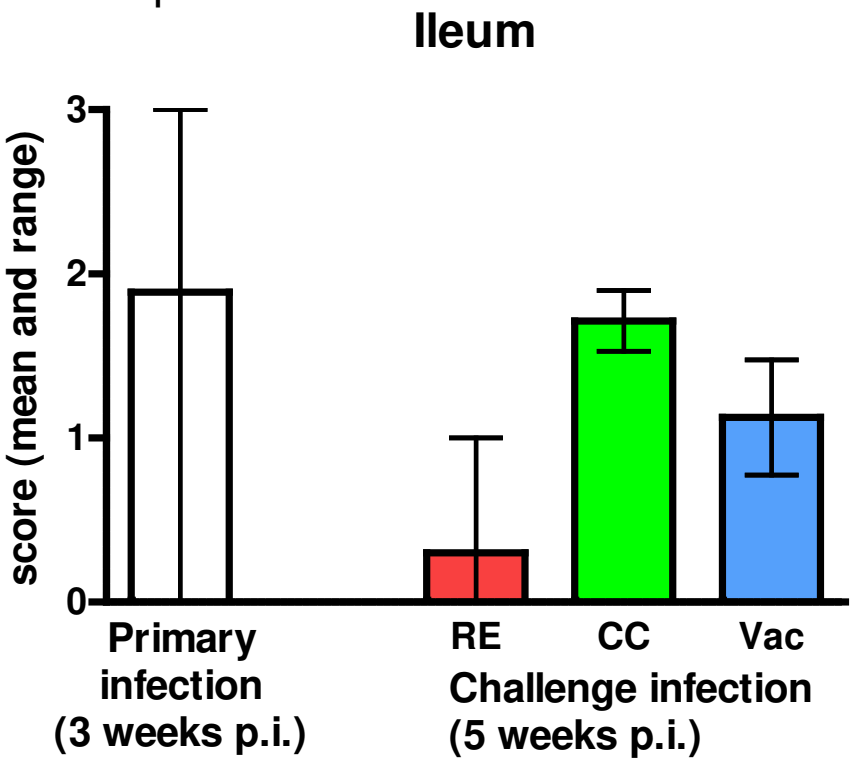
DTU

Patologisk score i tarm

Experiment I



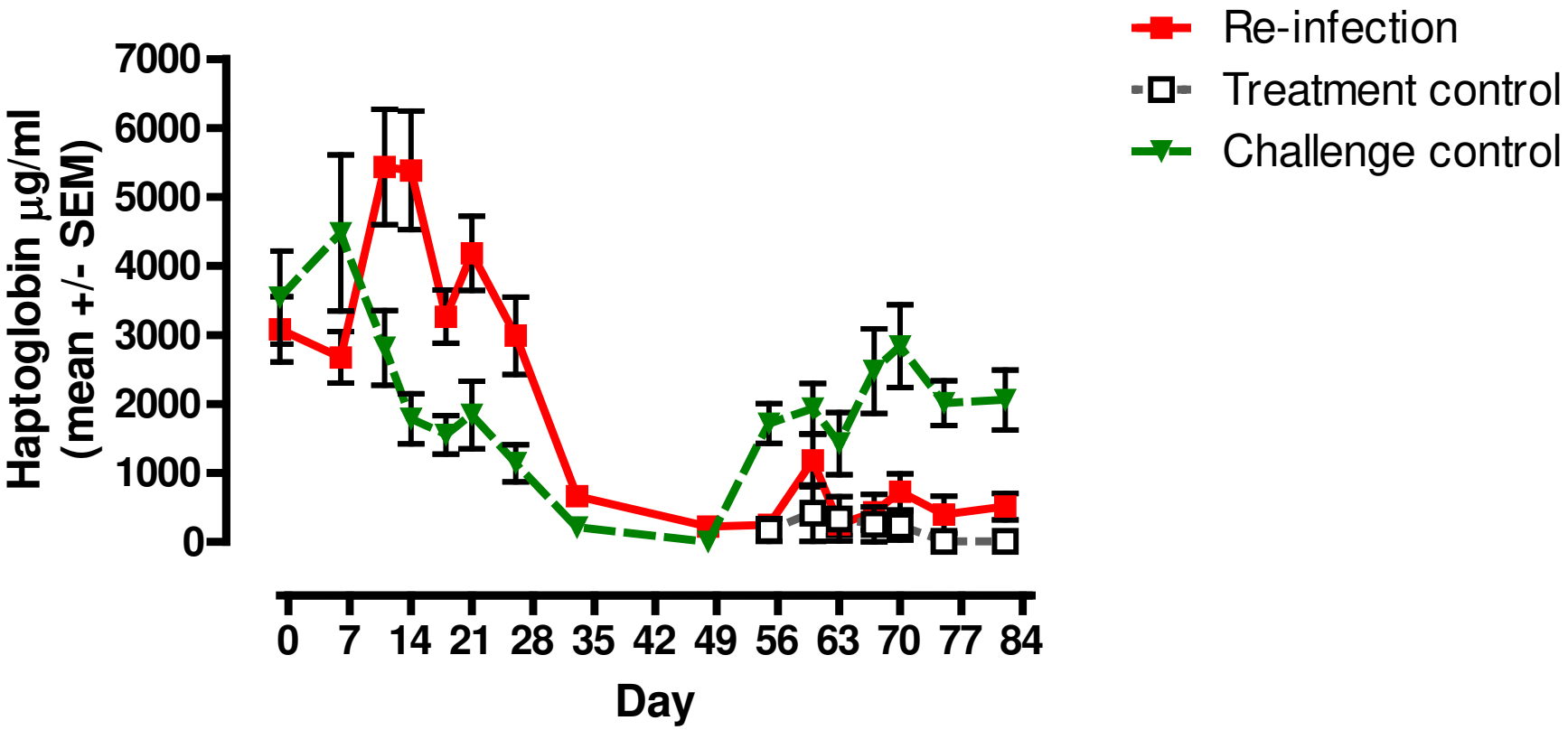
Experiment II



Veterinærinstituttet

DTU

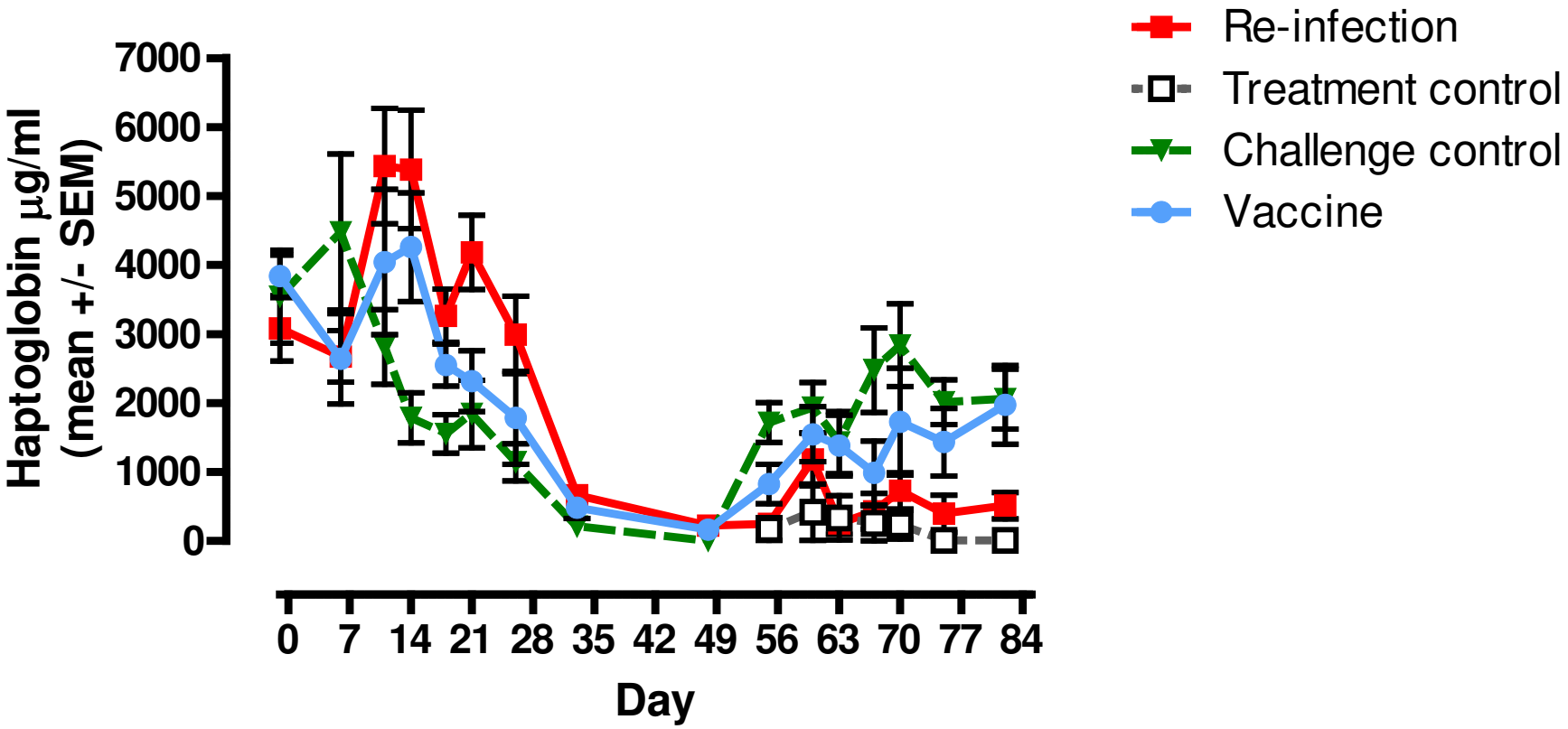
Serum akut fase protein



Veterinærinstituttet

DTU

Serum akut fase protein



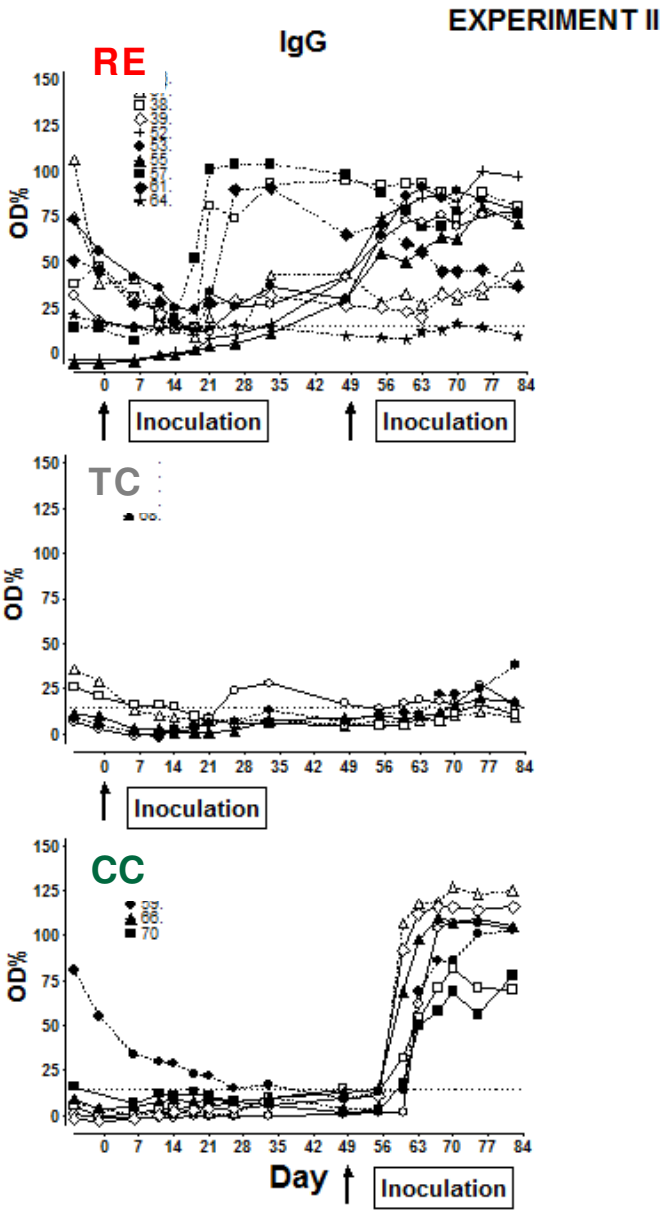
Veterinærinstituttet

DTU

Hvilket immunrespons skal styrkes hvis en ny vaccine skal være bedre end Enterisol?

L. intracellularis-specifikt IgG og IgA i serum

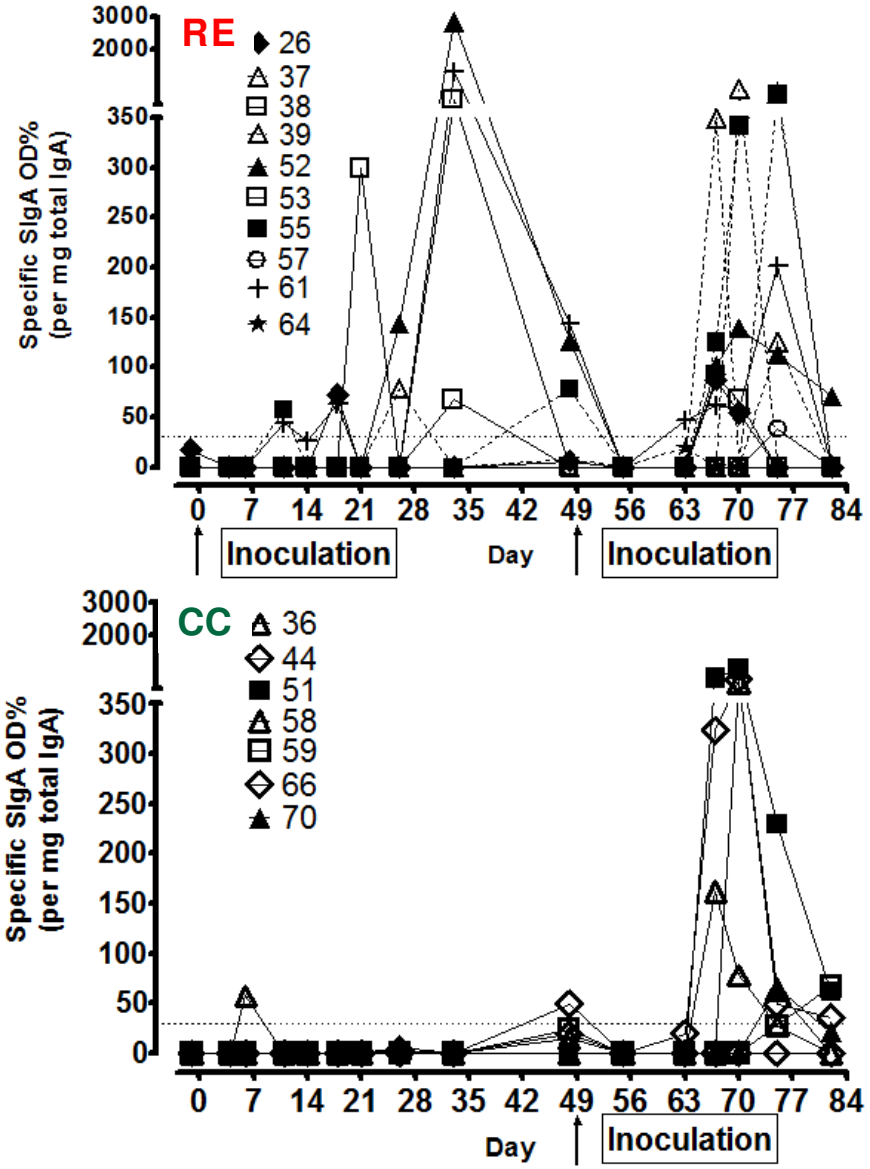
- Maternel IgG beskytter ikke
- Grise uden antistofsvar er også beskyttede
- Ældre smågrise udvikler mere robust antistofsvar



Veterinærinstituttet

Sekretorisk IgA i fæces

- sIgA respons på challenge kommer sent efter inokulation
- sIgA respons på challenge er ens i immune og naïve grise
- Ældre smågrise udvikler mere robust sIgA respons



Veterinærinstituttet

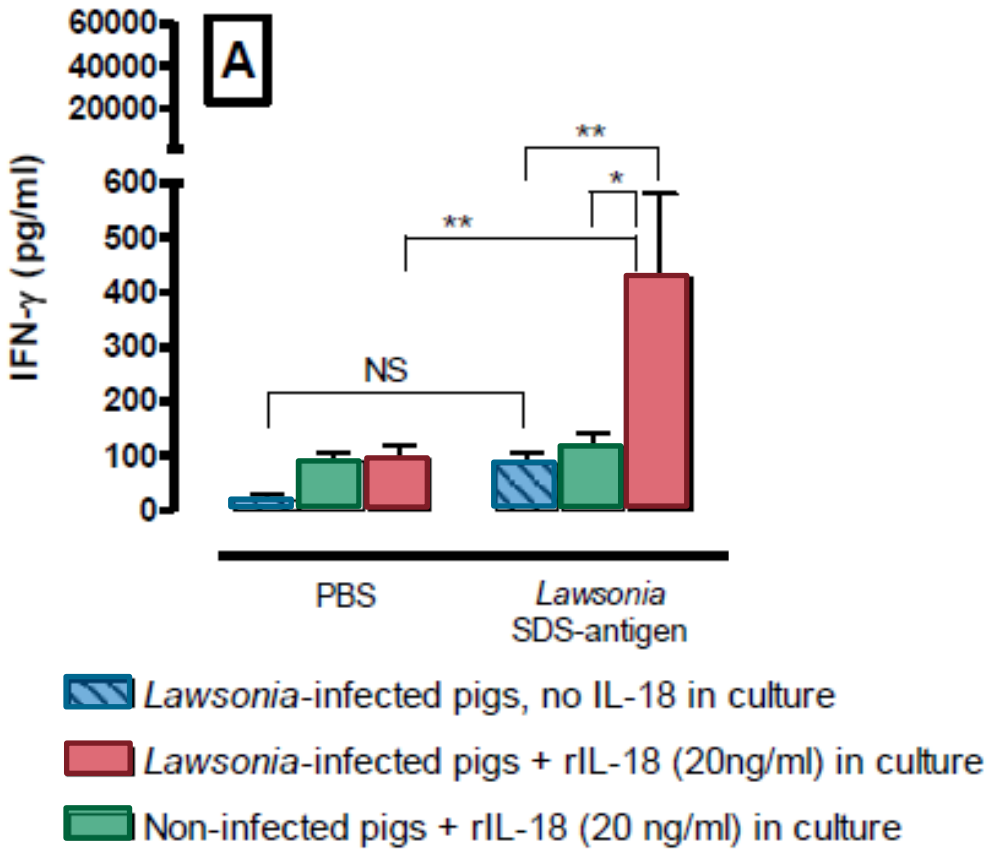
Cellemedieret immunrespons

CMI responses to *L. intracellularis* are not easily measured

Guedes & Gebhart 2010

- *L. Intracellularis* er obligat intracellular (cytosol)
- IFN-γ knock-out mus er mere modtagelige for *Lawsonia* infektion
- Tidligere DTH og IFN-γ assay målinger er lave og kun tilstede i få grise

Potensering med rIL-18 afslører IFN-γ respons



IFN-γ assay på *L. intracellularis inokulerede grise dag 48 p.i. (N= 12) og ikke-inokulerede* kontrol grise (N= 10) (Experiment I).

Riber et al. Vet. Imm. Immunopathol. 2011.

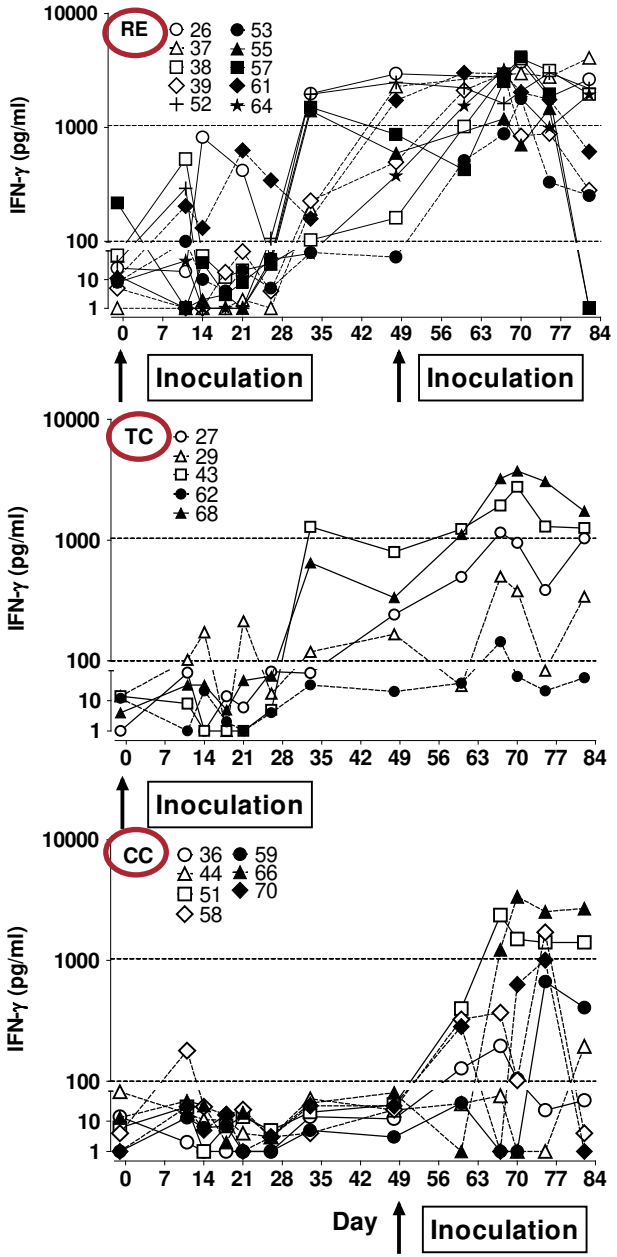
Veterinærinstituttet

DTU

rIL-18 potentiated (50 ng/ml)

IFN-γ assay

- IFN-γ respons efter primær infektion stiger i uger efter inokulation
- Umiddelbart IFN-γ boost efter challenge
- Ældre pigs udvikler et more robust IFN-γ respons

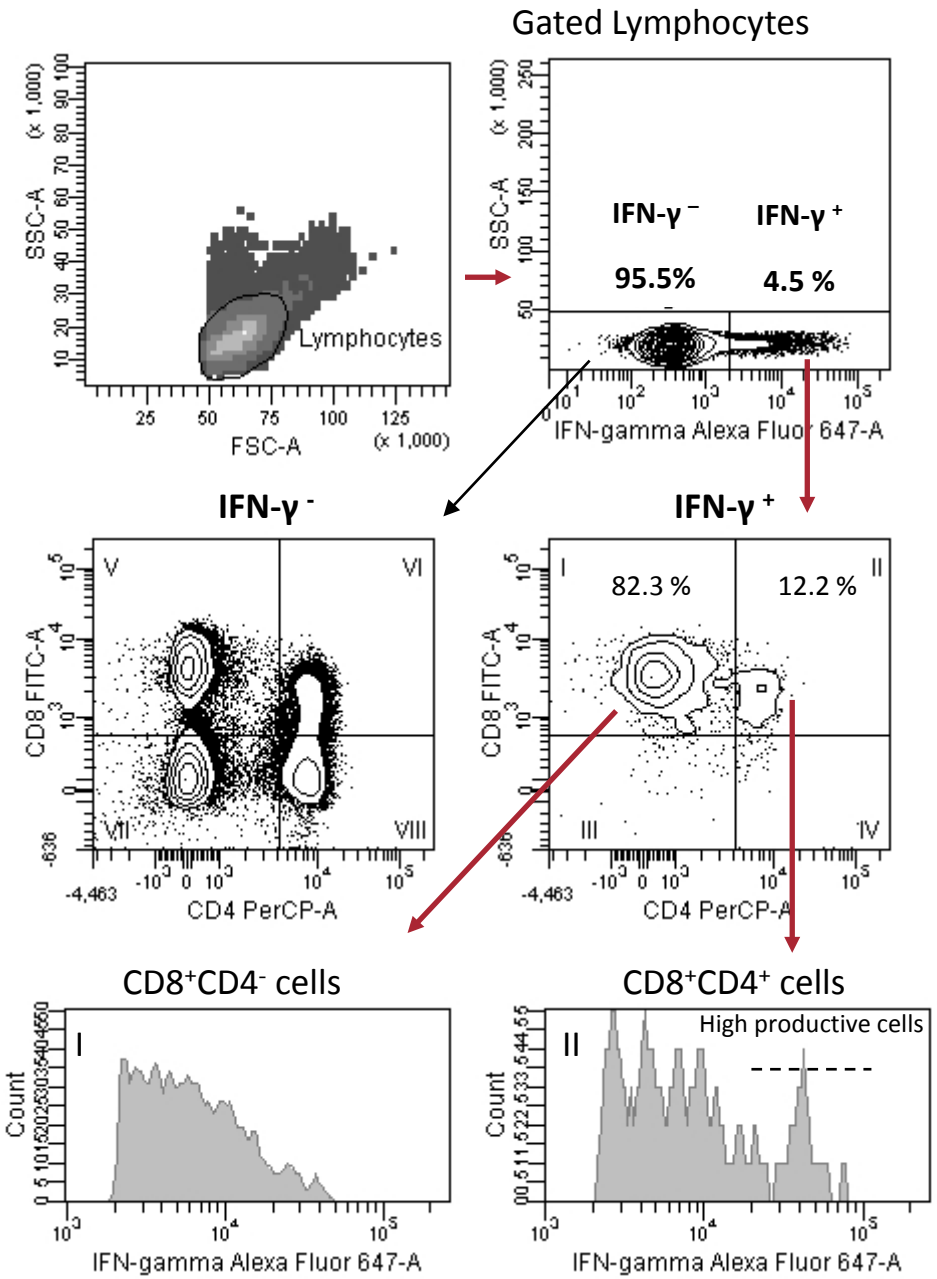


Veterinærinstituttet

Detaljering af IFN-γ producerende celler

***L. intracellularis*-specific CD4+ CD8+ er high IFN-γ producers**

***L. intracellularis*-specific CD4-CD8+ er low IFN-γ producers**



Veterinærinstituttet

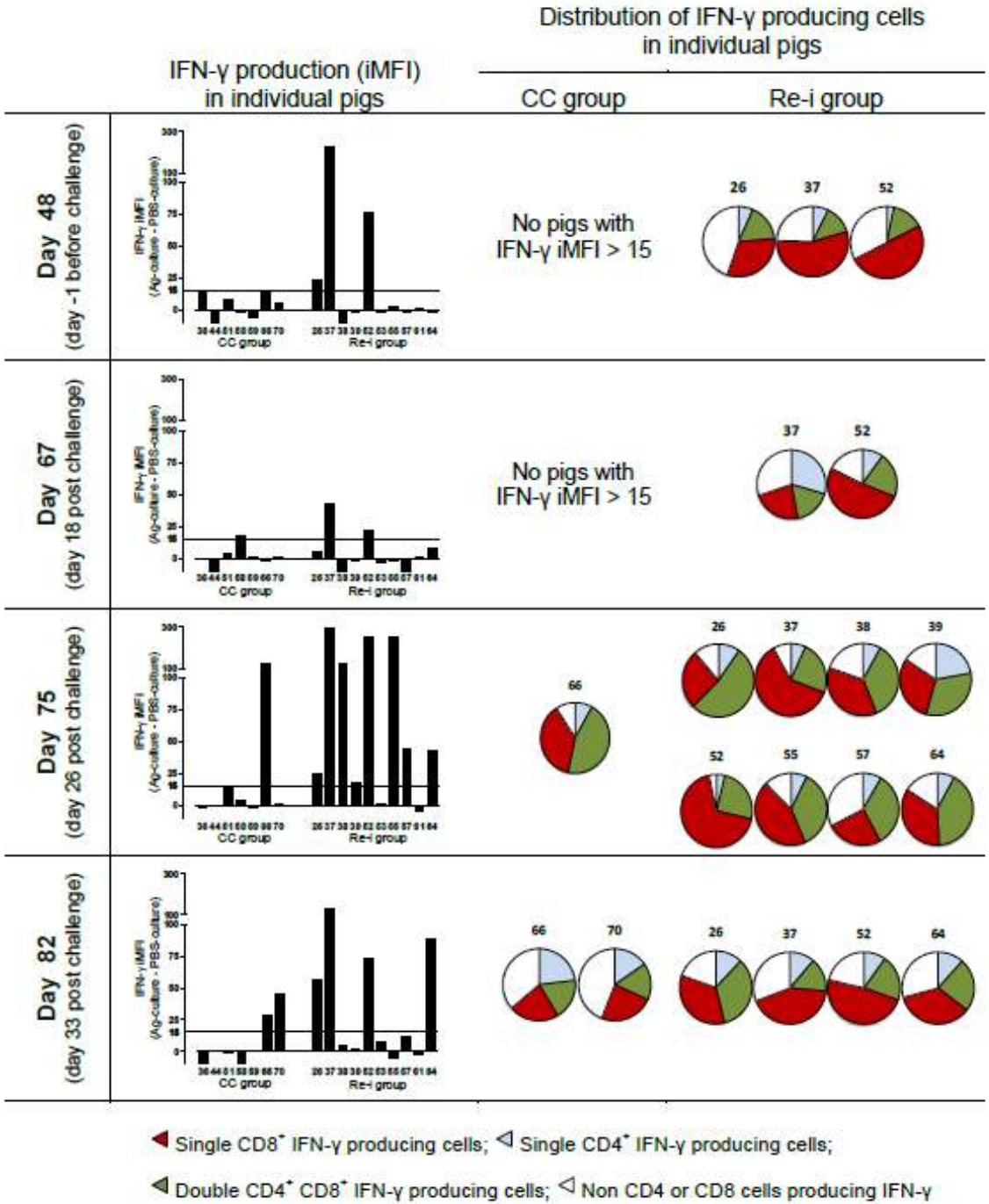
Detaljering af IFN-γ producerende celler

CD4+ CD8+ IFN-γ high
memory T_H cells

CD8+ IFN-γ low
effector cytotoxic T cells ?

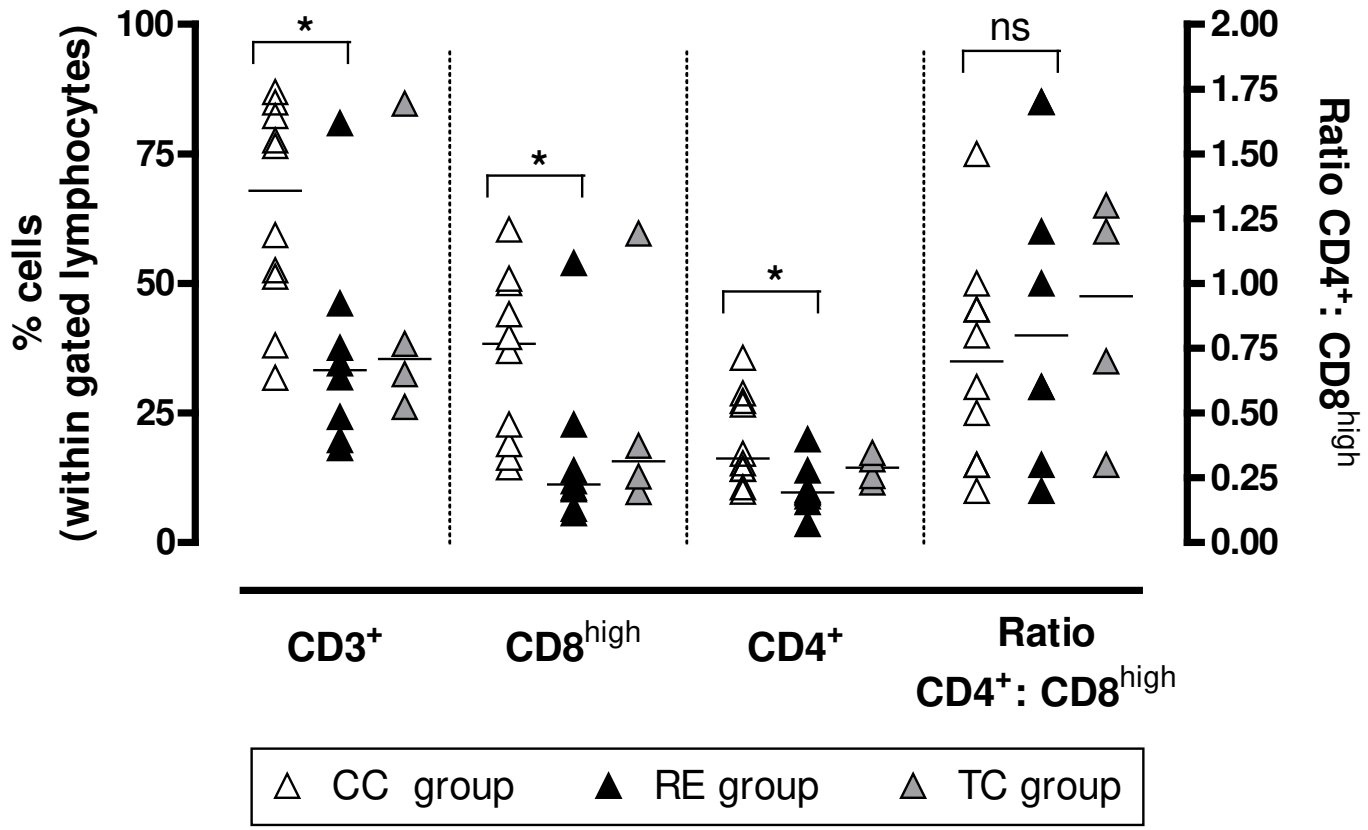
CD4+
T_H cells

CD4-CD8-
NK cells?



Veterinærinstituttet

L. intracellularis inficeret **lamina propria** har forøget antal CD4+ og CD8+ T-celler i forhold til immune grise.



Veterinærinstituttet

Lawsonia konklusioner

- **Cellemedieret immunrespons**
  - **Significant højere IFN-γ respons i immune grise**
  - **Produceres af både CD4+ CD8+ og CD8+ lymfocyter**

- **Serum IgG**
  - **Maternelle antistoffer beskytter ikke (nok)**
  - **Immunitet var ikke afhængigt af antistof respons**

- **Serum IgA**
  - **Ingen booster effekt af challenge inokulation**

- **Lokal Intestinal slgA**
  - **Ingen forskel i respons på challenge inokulation mellem immune og modtagelige grise**
  - **Kan først måles 2 uger inokulation**

Veterinærinstituttet

Cordes et al. Vet. Research 2012.

DTU

Hvilket immunrespons skal styrkes hvis en ny vaccine skal være bedre end Enterisol?

Vores bud:
Et cytotoksisk (CD8+) T-celle respons

Tak til:

DTU Veterinærinstituttet

Ulla Riber
Henriette Cordes Hvass
Lasse Eggers Pedersen
Jeanne Toft Jakobsen
Lien Thi Minh Ngyuen

Peter Heegaard
Lars Erik Larsen

Københavns Universitet

Søren Buus

Plum Island Animal Disease Center, USDA

William T. Golde

Veterinærinstituttet

Dagens tekst

- Immunologi ved forskellige infektioner
- Immunologiske korrelater for beskyttelse
- Den rette vaccine til den rette infektion
  - PRRS
  - Lawsonia

Den store ligning:

$$P_{ag} = \frac{AP+Sp-1}{Se+Sp-1} \Delta \int_a^b \varepsilon \Theta^{\sqrt{17}} + \Omega \int \delta e^{i\pi} = -1 \infty = \{2.7182818284\}^{\circ} \vartheta\varphi\acute{\varepsilon}\rho\tau\upsilon\theta\iota\sigma\pi\sigma\delta\phi\gamma\eta\xi\kappa\lambda \chi^2 \sum_{!}^{\gg} , \approx \lambda$$

Spørgsmål ?