

Appendix

Nederlandse Samenvatting

INLEIDING

Cooperia oncophora is de voornaamste dunne darm nematode bij runderen in streken met een gematigd klimaat, zoals West Europa. Dieren worden geïnfecteerd door opname van infectieuze larven die zich op het grasland bevinden. In de dunne darm van het rund ontwikkelen deze larven zich tot volwassen wormen die zich sexueel voortplanten en eieren leggen. De eieren worden in de mest uitgescheiden en kunnen op die manier weer het grasland besmetten; in de mestplak ontwikkelen die eieren zich opnieuw tot larven. Deze cyclus houdt in dat als er nergens ingegrepen wordt, de runderen zich voortdurend kunnen herbesmetten door het eten van gras.

Cooperia wordt over het algemeen als een relatief weinig pathogene worm beschouwd en dit is mede te verklaren door de snelle weerstandsontwikkeling tegen *Cooperia*. Dit verhindert de opbouw van een belangrijke wormpopulatie in de darm en bijgevolg worden slechts minimale letsels veroorzaakt. Echter, ook asymptomatische infecties kunnen interfereren met de darmfysiologie en in die mate een negatieve invloed op de gastheer hebben. Herkauwers besmet met maagdarm nematoden produceren onder hun normale capaciteit en een minder goed gewichtsaanzet is waarschijnlijk het meest voorkomende effect. Daarnaast zijn er ook negatieve invloeden beschreven op de melkproductie. Om deze verliezen te compenseren worden dieren preventief behandeld met anti-worm middelen. Dit heeft als voordeel dat de productieverliezen geringer worden maar door het uitblijven van infectie wordt de kans op het ontwikkelen van weerstand eveneens kleiner, waardoor dieren in een daaropvolgende weideseizoen gevoeliger blijven voor infectie. Een bijkomend nadeel van intensief behandelen is het ontstaan van resistentie tegen anti-worm middelen. Dit houdt in dat een deel van de wormpopulatie niet meer gevoelig is voor behandeling en dus in de gastheer gehandhaafd blijft. Daarenboven is er heel wat bekommernis vanuit de voedselketen, met name betreffende het voorkomen van residuen in melk- en vleesprodukten. Mede hierdoor is er een groeiende vraag naar alternatieve behandelingsmethoden zoals bijvoorbeeld een vaccin. De ontwikkeling van een vaccin is gebaseerd op 3 belangrijke pijlers: 1) het begrijpen van de mechanismen geassocieerd met de opbouw van weerstand, met name: hoe worden de wormen uit de gastheer verdreven? en, 2) hoe wordt bij herinfectie verhinderd dat de worm zich in de gastheer nestelt? 3) het identificeren van die eiwitten die worm specifiek zijn en geassocieerd met weerstandsontwikkeling. In dit proefschrift is vooral aandacht geschonken aan dit eerste aspect. Aan de hand van experimentele infecties in kalfjes, die ook de meest gevoelige populatie zijn, hebben we getracht een inzicht te krijgen in die mechanismen die geassocieerd worden met de opbouw van weerstand tegen *Cooperia*.

RESPONDER TYPEN

Een kenmerk van de experimentele infecties met *Cooperia* die wij hebben gebruikt is dat men op basis van parasitologische parameters in staat is om drie types dieren te onderkennen. ‘*Low responders*’: dit zijn gevoelige dieren die slecht in staat zijn om weerstand te ontwikkelen. Na infectie blijven de dieren langdurig eieren uitscheiden in hun mest en op het ogenblik dat ze geslacht worden, vindt men nog steeds een groot aantal wormen in de dunne darm. ‘*Intermediate responders*’: dit zijn dieren die op het ogenblik van infectie nog gevoelig zijn maar zij slagen erin in de loop van de infectie weerstand te ontwikkelen wat leidt tot een daling in ei-uitscheiding. Bij slachten varieert het aantal wormen in de dunne darm, zowel lage als hoge aantallen worden teruggevonden. Indien een hoog aantal wormen gepaard gaat met een lage ei-uitscheiding betekent dit dat de weerstand van de gastheer een effect heeft gehad op de vruchtbaarheid van de wormen, en minder op het uitdrijven van de wormen. Tot slot zijn er ook nog ‘*High responders*’: dit is slechts een heel klein deel van de populatie en deze dieren blijken resistent te zijn tegen infectie met *Cooperia*. Na infectie vertonen zij geringe tot geen ei-uitscheiding en bij slachten worden ook nauwelijks wormen teruggevonden in de dunne darm. Het is nog steeds niet duidelijk of de resistentie immunologisch, fysiologisch dan wel genetisch is bepaald, vermoedelijk zal het een combinatie zijn.

Het grote voordeel van dit model is dat door het vergelijken van de immuniteitsreactie tussen *Low* en *Intermediate responders*, men in staat wordt gesteld om die mechanismen te identificeren die geassocieerd zijn met het ontwikkelen van weerstand in de *Intermediate responders*. Immers, een dergelijk mechanisme zal in *Low responders* vermoedelijk niet ontwikkeld worden.

IMMUNITEIT TEGEN COOPERIA

Voor de bescherming tegen ziekteverwerkers die in de darm binnendringen heeft het lichaam zowel een niet specifieke afweersysteem (bijvoorbeeld het darmslijmvlies en de motiliteit van de darm) en een specifieke afweersysteem dat gericht is tegen een bepaald pathogeen. In principe zijn er twee specifieke immunologische reacties mogelijk, een antilichaam-gemedieerde reactie en een cel-gemedieerde reactie. De antilichaam-gemedieerde reactie komt op gang als B cellen, na contact met de ziekteverwekker, geactiveerd worden en antilichamen gaan produceren. Antilichamen zijn specifiek voor een bepaald ziekteverwekker en voornamelijk belangrijk tegen pathogenen die zich buiten een cel bevinden, zoals bijvoorbeeld wormen. Hiernaast bestaat de cel-gemedieerde immunrespons, waarin voornamelijk T cellen een rol spelen. Er zijn twee types T cellen. T cellen kunnen een direct effect hebben op

geïnfecteerde cellen en deze doden (cytotoxische T cellen, CD8+) of indirect, door het uitscheiden van signaalstoffen, andere cellen stimuleren tot het vernietigen van de pathogeen (helper T cellen, CD4+). Op basis van de signaalstoffen die helper T cellen secreteren en het type antilichaam dat geproduceerd wordt, zijn er twee groepen gedefinieerd, T helper 1 en T helper 2. T helper 2 cellen spelen een belangrijke rol bij worm infecties, zowel in muizen, mensen als landbouwhuisdieren. Aan de hand van hun signaal stoffen zorgen zij dat B cellen geactiveerd worden en effectiever antilichamen gaan produceren van het type IgG1, IgE en IgA, in tegenstelling tot IgM en IgG2 geassocieerd met T helper 1. Daarnaast worden ontstekingscellen gerecruteerd naar de plaats van infectie, zoals mestcellen en eosinofielen. Mestcellen en eosinofielen kunnen op hun beurt geactiveerd worden en allerlei stoffen secreteren in hun omgeving. Deze zijn toxisch voor de wormen, maar hebben ook een invloed op de fysiologie van de darm, zoals bijvoorbeeld een verhoogde secretie van darmvloeistoffen en een verhoogde darmmotiliteit, waardoor wormen gemakkelijker kunnen uitgedreven worden. Mestcellen en eosinofielen worden het beste geactiveerd door antilichamen, die op specifieke receptoren op hun oppervlakte binden, en op dit punt werken de antilichaam-gemedieerde en cel-gemedieerde immunresponsen samen.

In hoofdstuk 2 en 3 hebben we de weerstandsontwikkeling na een primaire infectie (dit is bij dieren die voorafgaand nooit geïnfecteerd zijn geweest) gekarakteriseerd. Uit hoofdstuk 1 blijkt dat, naast een parasitologische karakterisatie ook een immunologische karakterisatie van respondertypen mogelijk is. *Intermediate responders* vertonen een duidelijke antilichamen respons na infectie (met name IgG1 en IgA), terwijl *Low responders* dat in mindere mate of niet doen. Daarenboven, werd aan de hand van correlatie analyses aangetoond dat de serologische respons een nadelig effect heeft op de parasiet. In hoofdstuk 2 hebben we de lokale respons in de darm van geïnfecteerde dieren gekarakteriseerd. Om dit gedetailleerd te kunnen doen, werd de dunne darm van het kalf (die een lengte heeft variërend van 25 tot 40 meter) in 6 segmenten onderverdeeld en elk van deze segmenten werd afzonderlijk geanalyseerd. Dit toonde aan dat weerstandsontwikkeling verschillende parasitologische en immunologische gevolgen heeft. In een niet immuun dier, vindt men *Cooperia* terug in het voorste deel van de dunne darm. In de loop van de infectie zien we dat in dieren die immuun worden de worm geleidelijk naar het achterste deel van de darm verhuist. Dit ten gevolge van een immunologische reactie in het voorste deel van de darm, die het verblijf voor de worm waarschijnlijk onaangenaam maakt. Het verplaatsen naar het achterste deel van de darm, gaat uiteindelijk gepaard met het uitdrijven van de worm, en typisch is dat mannelijke wormen het eerst verdreven worden. Bij vrouwelijke wormen wordt een daling in vruchtbaarheid

waargenomen, waardoor minder eieren geproduceerd en uitgescheiden worden. Karakterisatie van de immunreactie toonde aan dat hierin eosinofielen en parasiet-specifieke antilichamen (IgG1 en IgA) die lokaal worden geproduceerd, een essentiële rol spelen in de verminderde vruchtbaarheid en de uitdrijving van de volwassen wormen.

Het ontwikkelen van immuniteit is een eerste stap, maar belangrijk is ook hoe lang deze immuniteit in stand wordt gehouden en of ze ook beschermend is tegen herinfectie. Om dit te onderzoeken werd een experimenten uitgevoerd waarin dieren na een eerste infectie behandeld werden en gedurende een lange periode in een worm-vrije omgeving gehouden. Tenslotte werden de dieren opnieuw geïnfecteerd en werd de mate van bescherming geevalueerd door hun reactie te vergelijken met primair geïnfecteerde dieren. Om te onderzoeken of de mate van bescherming bepaald wordt door de zwaarte van de primaire infectie, werd het effect van een hoge en een lage primaire infectie op herinfectie vergeleken. In hoofdstuk 4 worden de parasitologische aspecten van een herinfectie beschreven. In beschermende dieren werden veel minder wormen teruggevonden dan in primair geïnfecteerde dieren en dit bleek onafhankelijk te zijn van de grootte van de primaire infectie. In tegenstelling hiermee bleek de invloed op de lengte en de vruchtbaarheid van de wormen wel bepaald door de grootte van de primaire infectie. In dieren die een hogere primaire infectie hadden meegemaakt, werd een nadelig effect op de worm lengte en een verminderde vruchtbaarheid op een eerder tijdstip waargenomen. Daarnaast werd duidelijk dat het verschil tussen *Low* en *Intermediate responders* ook na herinfectie behouden blijft. Hoewel de *Low responders* enigszins beschermd waren in vergelijking met primair geïnfecteerde kalfjes, bleven ze gevoeliger dan *Intermediate responders*.

Hoofdstuk 5 beschrijft de rol van B cellen en antilichamen bij herinfectie. Antilichamen worden veel vroeger na infectie en in grotere hoeveelheden geproduceerd. Bij herinfectie blijken ze ook een groter effect te hebben op de larvale stadia dan op volwassen wormen. Naast hun rol als antilichaam producerende cellen, hebben we ook aangetoond dat B cellen mogelijk een bijdrage leveren tot het in stand houden van de T helper 2 respons. Dit kan door het tot expressie brengen van bepaalde moleculen op hun celoppervlak, die dan op hun beurt met moleculen op het oppervlak van T cellen kunnen interageren.

In hoofdstuk 6 werd het aandeel van de T-cel gemedieerde immuunreactie in bescherming tegen herinfectie bestudeerd. De conclusie van dit hoofdstuk is dat bij dieren met een herinfectie dezelfde mechanismen als bij primair geïnfecteerde dieren een rol spelen, met dit verschil dat de reactie veel sneller en effectiever gebeurt.

In conclusie kan gesteld worden dat de ontwikkeling van weerstand en bescherming tegen herinfectie met *Cooperia* deels beïnvloed wordt door de genetische achtergrond van de dieren. Low responders reageren weliswaar met een immuunreactie op de infectie maar deze blijkt niet effectief te zijn, wormen worden niet uitgedreven en bij herinfectie zijn de dieren slechts deels beschermd. De effectieve immuun reactie, zoals die wordt waargenomen in *Intermediate responders* wordt gekenmerkt door de ontwikkeling van een T helper 2 respons. Dit gaat gepaard met de productie van parasiet-specifieke antilichamen in het serum en in de darm van geïnfecteerde dieren. Verder blijken B cellen, T helper cellen en eosinofielen essentieel te zijn voor het uitdrijven van de worm. Al deze waarnemingen worden geïntegreerd in de discussie zoals beschreven in hoofdstuk 7.