

Invloed van vaccinatie op de immunrespons bij geiten

Introductie

Q koorts in Brabant

Noord Brabant werd in de periode 2007-2010 getroffen door Q koorts. De eerste gevallen werden herkend in 2007 in het dorp Herpen (gemeente Oss). Nieuwe gevallen werden vastgesteld in het voorjaar van 2008 en 2009, en bleken terug te voeren te zijn op infectie van geiten met *Coxiella burnetii* (Dijkstra et al. 2012). In de periode na 2009 werd duidelijk dat niet alleen patiënten die gemeld werden bij de GGD besmet waren. Onderzoek van Sanquin en het RIVM onder meer dan 1000 bloeddonoren wees uit dat ruim 12 % van de bevolking in de regio blootgesteld was geweest aan *C. burnetii*.

C. burnetii wordt uitgescheiden in urine, faeces, melk en met name in placenta en vruchtwater van zwangere geiten. Bij miskraam of geboorte komen bacteriën vrij, die door de lucht verspreid worden. Hoewel er gevallen bekend zijn van infecties via het drinken van rauwe melk, vindt de infectie voornamelijk plaats via de lucht (Anderson et al. 2013).

Vaccinatie van geiten reduceert ziekte bij de mens

De in 2009 ingevoerde vaccinatie van geiten bleek effectief te zijn bij het terugdringen van ziekte bij de mens. De vaccinatie geeft echter bijwerkingen in dieren die toenemen naarmate een dier vaker gevaccineerd is (Boerderij.nl, 31 juli 2013). Zo lijkt dat wat goed is voor de gezondheid van de mens minder goed te zijn voor de dieren.

De toenemende bijwerkingen zijn geen verrassing. Bij de mens is vaccinatie met een vergelijkbaar vaccin verboden bij mensen die Q koorts hebben gehad of eerder zijn gevaccineerd, omdat er dan ernstige bijwerkingen kunnen optreden. Bij de mens is ook gebleken dat een éénmalige vaccinatie voldoende is voor langdurige bescherming (productinformatie Q-VAX).

Het is belangrijk om antwoord te krijgen op de vraag of een jaarlijks herhaalde vaccinatie noodzakelijk is om dieren blijvend tegen Q koorts te beschermen.

Het afweersysteem van geiten en mensen is vergelijkbaar (Roest et al. 2013). In mensen is de invloed van vaccinatie op de immunrespons uitgebreid onderzocht (Schoffelen et al., 2013, 2014). Dit betekent dat de kennis die opgedaan is in het humane veld mogelijk vertaald kan worden naar de veterinaire sector.

Immunitet bij geiten

Bij onderzoek naar de blootstelling aan ziekteverwekkers zijn er meerdere manieren om aan te tonen of een dier is blootgesteld is of is geweest.

Om een acute besmetting vast te stellen gaat de voorkeur uit naar *detectie van de bacterie*. Dit kan door kweken (erg moeilijk bij *Coxiella*), of door gebruik van moleculaire diagnostiek (PCR). In de geitensector wordt *Coxiella* DNA in tankmelk bepaald m.b.v. een PCR.

Het meten van *antistoffen* tegen de bacterie (*serologie*) is de standaard bij mensen. Ook voor geiten is voor het bepalen van afweerstoffen een dergelijke redelijk goedkope test beschikbaar.

Cellulaire immunitet tegen *Coxiella* is essentieel is voor de beschermende werking, maar mogelijk ook de reden voor de bijwerkingen van het vaccin. Blootstelling van humaan bloed aan afgedode bacterie (zoals ook aanwezig in het geitenvaccin) geeft nog jaren na de infectie vorming van cytokines.

Cytokines activeren witte bloedcellen en zorgen dat deze op de plaats van blootstelling (in dit geval de plek van de vaccinatie) terecht komen. Dat is goed bij de afweer tegen een infectie. Cytokine vorming is minder goed voor het dier en kan onderhuidse abcessen en algehele malaise verklaren.

De cellulaire immunitetstest die door Schoffelen et al. (2013) ingezet werd in de vaccinatie campagne in de mens en die verbeterd is door Innatoss leek ook te gebruiken in dieren.

Doel van het onderzoek

Het doel was om te onderzoeken of geiten afweerstoffen of geheugencellen maken na vaccinatie en hoe dit verandert in de tijd. De vraag was of een eenmalige vaccinatie, net als in de mens, voldoende zou zijn om beschermd te blijven tegen Q-koorts.

Wat hebben we gedaan?

Groepen dieren

Bij het onderzoek was één boerderij betrokken. De dieren waren voorzien van een identificatiechip, waardoor de identiteit van het dier vast te stellen is en waarmee de voedselopname en melkproductie gevolgd kan worden. Bloedafnames werden uitgevoerd door de eigen dierenarts. Gezien de te verwachten verschillen tussen dieren werden groepen samengesteld van 10-20 dieren.

Tabel 1. Indeling van de groepen dieren

	Leeftijd	Voorgaande vaccinaties	Aantal	Opmerking
1	4m - 5m	0	20	Eigen fok
2	1j 1m – 1j 5m	1	10	Eigen fok
3	2j – 2j 6m	2	11	Eigen fok
4	3j 1m – 3j 6m	3	11	Eigen fok
5	4j 2m– 4j 6m	3	5	Van Q-koorts vrij bedrijf
6	4j 9m	4	4	Mogelijk in aanraking gekomen met Cb
7	4j 9m – 7j 8m	5	14	Mogelijk in aanraking gekomen met Cb

Invloed van vaccinatie op de immuunrespons bij geiten

Bij lammeren werd de immuunstatus bepaald:

- vóór de eerste vaccinatie
- 5 dagen na de vaccinatie
- vóór de boost (3 weken na de eerste vaccinatie)
- 3-4 weken na de boost

Bij dieren die voor de 2^e -5^e keer gevaccineerd werden werd bloed afgenomen:

- vóór de vaccinatie
- bij enkele dieren 5 dagen na de vaccinatie om inzicht te krijgen in de bijwerkingen
- 6 weken na de vaccinatie

Gebruikte testen

De cellulaire immuniteit werd bepaald door Innatoss Laboratories BV (Oss, NL). De test werd uitgevoerd volgens een eerder opgesteld protocol wat gebruikt is om de bevolking van Herpen te testen, wat gemodificeerd werd voor gebruik in geiten. In alle monsters werden de anti-Coxiella antistoffen bepaald met behulp van een standaard serologische test zoals beschreven door de leverancier.

Resultaten

Ontwikkeling van cellulaire immuniteit na vaccinatie

In geiten werkte de cellulaire immuniteitstest niet zoals verwacht. De positieve controle gaf niet de verwachte toename in interferon-gamma. Ook was bij een aantal dieren de niet-gestimuleerde waarde te hoog. Dieren, die na de uitbraak zijn geboren en dus zeer waarschijnlijk niet in aanraking is geweest met Coxiella reageren geen van alle op Coxiella.

Alleen oudere dieren die 5x gevaccineerd zijn én die mogelijk een natuurlijke besmetting hebben doorgemaakt lieten duidelijke meetbare cellulaire responsen zien. De variatie was echter te groot om er een conclusie aan te verbinden. In deze groep was de kans groot dat natuurlijke blootstelling aan Coxiella vóór 2009 de reden was voor de cellulaire responsen.

Ontwikkeling van cellulaire immuniteit na (her)vaccinatie

Na vaccinatie werd de immuunrespons nogmaals gemeten. Bij de lammetjes werd na 5 dagen, na 21 dagen (vóór de boost) en na 6 weken (3 weken na de boost) de Coxiella-specifieke IFN γ productie gemeten. Wanneer de oudere dieren na hervaccinatie getest worden ziet men een sterke toename in de cellulaire responsen.

Ontwikkeling van de humorale immuniteit na vaccinatie

Bij iedere bloedafname werden monsters verzameld om antistoffen in het bloed te kunnen meten. Hiervoor werd een standaardtest gebruikt. Om verschillen tussen experimenten uit te sluiten werden alle monsters bewaard en werden antistoffen tegelijk bepaald. De opbouw van antistoffen in de tijd werd bepaald voor alle groepen.

Tabel 2. Opbouw van antistof titers na vaccinatie. Een titer boven de 40 is "positief". Er wordt aangenomen dat deze dieren voldoende beschermd zijn.

Groep	Meting	Dieren	< 40	40-100	100-200	200-300	> 300
1	Pre	20	20				
*	3 wkn	18	4	14			
	6 wkn	20	1	11	8		
2	Pre	10	9		1		
	6 wkn	10				3	7
3	Pre	11	3	2	4	2	0
	6 wkn	11				1	10
4	Pre	11		5	3	2	1
	6 wkn	11					11
5	Pre	5			2	1	2
	6 wkn	5					5
6	Pre	4			1	1	2
	6 wkn	4					4
7	Pre	14		1		1	12
	6 wkn	14		1			13

* bij de tweede meting zijn 2 monsters uitgevallen

Discussie

In dit onderzoek is de cellulaire immuunrespons na vaccinatie met Coxevac vergeleken met de humorale respons, dat wil zeggen de vorming van antistoffen.

Cellulaire immuniteit

Bij de cellulaire immuniteitstest waren de resultaten van een groot aantal dieren niet goed te interpreteren. In de groep lammetjes die in voor de eerste keer gevaccineerd zouden worden was na 3 en 6 weken geen duidelijke cellulaire respons te meten. Ook bij oudere dieren die geboren zijn na de epidemie en meerdere malen gevaccineerd waren was de cellulaire respons slechts in een enkel geval aan te tonen. Opvallend was dat de groep oudere dieren vrijwel allemaal een cellulaire immuunrespons hadden. Dit kan het gevolg zijn van leeftijd, maar zou ook kunnen wijzen op een blootstelling aan Coxiella voor 2009. In Coxevac (het gebruikte vaccin) is een deel van de eiwitten verwijderd. Daardoor wordt de langdurige afweerreactie mogelijk niet voldoende gevormd. Een vaccin wat deze langdurige respons veroorzaakt is mogelijk op de lange termijn efficiënter.

Antistoffen

De antistofvorming is eenduidig. Antistoffen zijn na 3 weken al te detecteren en vrijwel alle lammetjes hebben 3 weken na de boost een positieve respons.

Uit de veterinaire praktijk blijkt dat dieren die de primaire vaccinaties hebben gehad (groep 1) voldoende beschermd zijn tegen Coxiella. Dit betekent dat een titer > 40 voldoende bescherming biedt.

Invloed van vaccinatie op de immuunrespons bij geiten

De titer loopt snel terug in de loop van het eerste jaar. Bij de één-jarigen pre-vaccinatie werd maar bij 1 dier een positieve titer gevonden net voor de hervaccinatie.

Uitgaande van een minimale titer van 40, is alleen een primaire vaccinatie onvoldoende voor blijvende bescherming. Na 1 jaar zijn de gevormde antilichamen vrijwel geheel verdwenen. Ook na de tweede vaccinatie is de antistof-titer bij een groot aantal dieren weer lager dan 40. Pas na 3 vaccinatierondes zakken de antistoffen na een jaar niet meer onder deze waarde.

Oorzaak voor bijwerkingen van de vaccinatie

Als bijwerkingen na de vaccinatie het gevolg zijn van een interactie met aanwezige antistoffen, dan is te verwachten dat de dieren vanaf jaar 3 bijwerkingen gaan krijgen.

Als de bijwerkingen het gevolg zijn van een eerdere stimulatie van het cellulaire immuunsysteem, dan is de verwachting dat deze op termijn verdwijnen, aangezien de dieren die niet langer blootgesteld worden aan *Coxiella* langzaam maar zeker uit de kudde zullen verdwijnen.

De vraag aan het platform is voor welke dieren in 2014 bijwerkingen zijn gerapporteerd en of hier een verschuiving te zien is.

In feite worden beide mogelijkheden worden ondersteund door de resultaten van dit onderzoek. De bijwerkingen worden vooral bij oudere dieren gezien, die mogelijk blootgesteld zijn geweest aan *Coxiella*. Tegelijkertijd is dit de groep met de hoogste antistoffen voor vaccinatie. Om een conclusie te kunnen trekken over het mechanisme, zal een deel van het onderzoek in een grotere groep dieren uitgevoerd moeten worden.

Het is belangrijk om bijwerkingen te blijven registreren.

Conclusies

Met deze studie zijn een aantal vragen beantwoord. Helaas is er geen antwoord gekomen op de primaire vraag van Innatoss of de cellulaire respons voorafgaat aan de serologische. Vaccinatie lijkt een andere respons op te wekken dan een daadwerkelijke infectie.

De belangrijkste conclusies:

- vóór vaccinatie zijn er geen dieren gevonden met een cellulaire of humorale immuun respons. Dit betekent dat er geen natuurlijk blootstelling is geweest in de eerste maanden;
- bij de primaire vaccinatie wordt alleen de antistofrespons opgewekt. Na 3 weken hebben alle dieren een meetbare titer. Na 6 weken zijn 19/20 lammetjes voldoende beschermd (titer > 40).
- één jaar na de primaire vaccinatie heeft 1 van de eenjarige dieren nog een positieve titer. De antistoffen verdwijnen snel.
- hervaccinatie geeft een snelle stijging in antistoftiter; na 6 weken is de titer bij alle dieren hoog tot zeer hoog.
- na 3 jaar blijven de titers ook na één jaar boven het afkappunt. Het is niet bekend wat er na 2 jaar zal gebeuren.
- de cellulaire respons in gevaccineerde dieren is niet of nauwelijks aantoonbaar. Alleen oudere dieren die mogelijk

blootgesteld zijn geweest aan *Coxiella*, hebben naast de antistof respons ook een cellulaire respons.

Mogelijk vervolgonderzoek

Met dit onderzoek is een start gemaakt met het in kaart brengen van de immuunrespons bij geiten in een normaal boerenbedrijf tijdens de jaarlijkse vaccinatie. Uitbreiding van dit onderzoek is mogelijk zinnig op de volgende punten:

- Hoe veranderen de antistoffen? Hoe lang stijgen de titers en wanneer gaan deze weer omlaag. Is het mogelijk om een effectieve vaccinatieschema te ontwerpen waarbij dieren niet meer jaarlijks gevaccineerd hoeven te worden.
- Voorspelt de aanwezigheid van antistoffen de bijwerkingen of is een cellulaire immuunrespons nodig om nadelige effecten te ondervinden van de vaccinatie. Een goede registratie van bijwerkingen is hiervoor noodzakelijk.
- Is op basis van de aanwezigheid van een cellulaire respons vast te stellen of een dier alleen gevaccineerd is of in het verleden ook op een natuurlijk manier blootgesteld is geweest aan de bacterie.