

Utvärdering av vacciner mot Bovint Respiratoriskt Syncytialt Virus hos nötkreatur

Sara Hägglund¹ och Jean-Francois Valarcher^{2,3}

¹ Forskarassistent, SLU, Inst för Kliniska Vetenskaper, Uppsala.

² Enhetschef, SVA, Enheten för Virologi, Parasitologi och Immunbiologi, Uppsala.

³ Lektor, SLU, Inst för Kliniska Vetenskaper, Uppsala.

1. Bakgrund

Bovint respiratoriskt syncytialt virus (BRSV), ett Pneumovirus i familjen *Paramyxoviridae*, är en vanlig orsak till lunginflammation hos kalvar världen över. Viruset är mycket smittsamt och sprids årligen snabbt mellan gårdar över stora geografiska områden. Det föreligger ett stort behov av effektiva vacciner i Sverige och övriga världen. Vaccinerna bör ha en snabbt insättande effekt för att kunna användas i anslutning till förmedling av kalvar till den specialiserade köttjursuppfödningen. De bör vara verksamma trots närvaro av antikroppar från modersmjölken (maternella antikroppar), och därmed skydda kalven även när halten av dessa antikroppar sjunkit under skyddande nivåer. Ett generellt problem vid BRSV vaccination är att maternella antikroppar hos kalvar hämmar immunsvaret mot vaccination under de första levnadsmånaderna även vid antikropps nivåer som inte ger ett fullständigt skydd mot infektion och sjukdom. De flesta kommersiella vacciner inducerar inte heller ett fullständigt virologiskt skydd som kan bryta virusets smittcykel. Dessutom har endel vacciner visat sig framkalla skadliga immunsvår med ökad sjuklighet vid påföljande infektion och säkerheten hos produkterna måste noggrant utvärderas innan användning.

Projektet har haft för avsikt att fördjupa kunskaperna om ett experimentellt vaccin: BRSV-Immunostimulating Complexes (BRSV-ISCOMer). Tidigare resultat har visat att detta vaccin inducerar ett mycket gott kliniskt och virologiskt skydd hos kalvar som haft maternella antikroppar vid immunisering omkring två till tre månaders ålder (Hägglund et al., 2004). Vid initieringen av detta projekt saknades däremot kunskap om säkerhet och effektivitet hos yngre kalvar, och inte heller var vaccinet väl karakteriserat. För att BRSV-ISCOMer skall kunna utgöra basen till ett framtida kommersiellt vaccin har projektet därför fokuserat på immunogenitet, effektivitet och säkerhet hos unga kalvar (tre veckor till två månader gamla). Dessutom har vaccinet noggrant karakteriserats för att vidare kunna utvecklas och anpassas till storskalig produktion. Projektet har kommit att utgöra en del av basen till ett Europeiskt samarbete där vacciner med DIVA egenskaper (differentiation of vaccinated and infected animals) utvecklats och testats på mus och lamm, samt i en inom konsortiet utvecklad Europeisk standardiserad BRSV infektionsmodell på unga kalvar med maternella antikroppar. En doktorand har under 2010 anställts i den svenska delen av detta konsortium, vilket vidare kommer att gagna SLF H0750358 Kött i form av produktion av ytterligare resultat och resultatförmedling.

2. Material och metoder

2.1. Klassiska BRSV-ISCOMer

2.1.1. Produktion

Klassiska BRSV-ISCOMer producerades av BRSV vilket renats och koncentrerats via ultracentrifugation samt solubiliseras med en detergent. Med hjälp av gradient-ultracentrifugering över sukros kunde virusproteiner sedan utvinnas för att användas till ISCOM formation. På grund av att detta virus är svårt att odla i hög koncentration testades olika system för optimal produktion med befintlig utrustning. Slutligen användes stora kvantiteter veroceller, vilka kontrollerades för kontaminationer (BVDV och mykoplasma). Produktionen utfördes i SVAs faciliteter. Vaccinet, jämte kontroll-ISCOMer vilka baserats på cellulära proteiner från oinfekterade veroceller (vero-ISCOMer), samt BRSV proteiner utan adjuvant komponent, dialyserades och koncentrerades med hjälp av ultracentrifugering. Separata vaccin-batcher har sparats för kontroll av standardisering.

2.1.2. Karaktärisering

BRSV-ISCOMerna karaktäriserades med hjälp av elektronmikroskopi för storlek och morfologi; med aminosyraanalys, SDS-page och Bradford för proteininnehåll, samt med western-blot, dot-blot och mass-spektrometri för identifiering av proteiner. Identifikation och relativ kvantifikation har skett i samarbete med INRA, Paris. Mass-spektrometern utfördes i två oberoende laboratorier i två länder.

2.1.3. Studie mus (etiskt tillstånd C32/10)

För att säkerställa BRSV-ISCOM vaccinets säkerhet och immunogenicitet inför immunisering av kalv, utfördes en studie på djurslaget mus (SVA). Tjugo 9 veckor gamla möss av honkön och rasen balb/c delades in i fyra grupper om fem djur. Djuren immuniserades subkutant två gånger med fem veckors intervall, med (en för mus mycket liten dos); i) BRSV-ISCOM, ii) BRSV proteiner, iii) PBS eller iv) vero-ISCOMer. Serum analyserades för antikroppssvar och lymfocyter från mjälte analyserades för cellulärt immunsvar.

2.1.4. Studie kalv (etiskt tillstånd C68/10)

Tjugo 2-7 veckor gamla BRSV-naïva kalvar av mjölkras köptes in från en konventionell BVD-fri besättning i Svealand. Kalvarna fördelades i fyra grupper om fem djur, enligt BRSV-specifika maternella antikroppar och ålder. De immuniserades subkutant två gånger med tre veckors intervall, med i) BRSV-ISCOM, ii) BRSV-proteiner (utan adjuvant), iii) adjuvant (utan proteiner), eller iv) PBS. Två veckor efter andra vaccination utfördes en experimentell BRSV infektion i form av aerosol. Serum och nässekret samlades in för immunologi och virologi och kalvarna genomgick dagliga kliniska undersökningar av veterinär. Sex dagar efter infektion avlivades samtliga djur för obduktion, lungsköljning och histopatologi, samt för vidare immunologiska och virologiska analyser (Hägglund et al., 2011).

2.2. BRSV-ISCOMer baserade på rekombinanta proteiner (rBRSV-ISCOMer)

För att anpassa BRSV-ISCOMer till storskalig produktion initierades utformandet av ett motsvarande vaccin, baserat på rekombinant framställda virusproteiner.

2.2.1. Produktion

I ett samarbete med INRA, Paris, etablerades produktion av rekombinanta BRSV proteiner i Sverige. Dessa propagerades i E.coli och renades. De renade proteinerna formulerades dels i form av BRSV-ISCOMer (rBRSV-ISCOMer), dels i admix med AbISCO, vilket är ett kommersiellt adjuvant i form av ISCOMer utan antigen. Studien delfinansierades av SLF H0750358 Kött.

2.2.2. Karaktärisering

Vaccinerna karaktäriserades med hjälp av SDS-page, western blot, dot-blot och bradford-analys för proteininnehåll. Associationen mellan BRSV proteiner och ISCOM partiklar studerades med hjälp av ultracentrifugering över sukrosgradient och detektion av proteiner och ISCOMer i olika fraktioner (via fluorescens och bradford för detektion av lipider och proteiner).

2.2.3. Studie mus (etiskt tillstånd C209/11)

För att utvärdera olika vaccinformuleringars immunogenicitet utfördes en initial studie på mus. Femton balb/c möss av honkön delades in i tre grupper om fem. Mössen immuniserades subkutan, två gånger med fyra veckors intervall, med samma kvantitet proteiner (en för mus mycket liten dos) och adjuvant i form av; i) rBRSV-ISCOMer, ii) rBRSV i admix med AbISCO 300 (adjuvant för kalv) eller iii) AbISCO 300. Serum analyserades för antikropsvar och lymfocyter från mjälte analyserades för cellulärt immunsvär.

2.2.4. Studie kalv (etiskt tillstånd 330/11)

I samarbete med IAH, Compton, Storbritannien och INRA, Paris, Frankrike jämfördes tre Europeiska vaccinkandidater i 3-9 veckor gamla kalvar med höga halter BRSV-specifika maternella antikroppar. Av dessa vacciner utgjordes ett av levande virus vilket försvagats genom borttagandet av en gen, medan två var baserade på rekombinanta BRSV proteiner, formulerade med två olika adjuvans. Tjugo BRSV-naïva kalvar delades in i fyra grupper om fem djur, baserat på ålder och förekomst av maternella antikroppar. En av dessa grupper utgjorde ovaccinerade kontroller. Ytterligare tre BRSV seronegativa kalvar utgjorde sentineldjur för att studera eventuell spridning av vaccinvirus från det levande vaccinet. Den skyddande effekten av vaccination mot en virulent experimentell BRSV infektion studeras för närvarande. Studien utfördes i säkerhetsklass P2, SVA och delfinansierades av SLF H0750358 Kött.

2.3. Etablering av nya laboratorieanalyser inom projektet

2.3.1. Murin antikropsanalys (BRSV-specifik IgG, IgG₁ och IgG_{2a})

Ett kit (BRSVab, SVANOVA) användes som bas till etablerandet av antikrops analys för mus-serum, med utbyte av konjugat till kommersiellt tillgängliga anti-murina IgG₁ och IgG₂ monoklonaler, samt en polyklonal anti-murin IgG. Som positiv och negativ kontroll

användes BRSV-specifika murina monoklonala antikroppar av IgG₁ och IgG₂ typ (gåva av G. Taylor, IAH, Storbritannien).

2.3.2. Murin och bovin lymfocytproliferering med kvantifiering utan radioaktivitet

I samarbete med G. Taylor, IAH, Storbritannien etablerades en BRSV-specifik analys för lymfocytproliferering, vilken mäter mängden BRSV-specifika minnesceller i mjälte, lymfknuta eller blod. Av hälsoskäl modifierades tekniken med ett icke radioaktivt sätt att mäta cellproliferering, genom tillsatts av en icke toxisk reagent vilken undergår en mätbar färgändring vid inträde i levande celler. En annan fördel med denna teknik är att cellprolifereringen kan mätas upprepade gånger, vid olika tidpunkter.

2.3.3. Bovin cytokin mRNA, klassisk PCR och kvantitativ realtids PCR

Klassisk PCR såväl som kvantitativ realtids PCR för detektion av fyra cytokiner samt en 'housekeeping gene' har optimerats inom projektet. För absolut kvantifiering av cytokin mRNA i prover skapades spädningsserier av prover med känt antal cytokin mRNA kopior (plasmider). Dessa spädningsserier inkluderas i varje real-tids PCR analys, för generering av en standardkurva. Resultaten från prover med okänd halt cytokin m-RNA jämförs med standardkurvan och antalet cytokin m-RNA kopior i provet kan beräknas. Originalplasmider amplifierades genom retransformering i kompetenta DH5 α celler och isolering/rening av plasmid DNA. Slutprodukten konfirmerades genom klyvning med restriktions enzym och/eller med klassisk PCR och gel-elektrofores. Plasmider, klassiska PCR analyser samt realtids PCR analyser tillhandahölls av Valarcher.

2.3.4. Bovin cellreceptor mRNA, kvantitativ realtids PCR

Inom ramen för ett veterinärt examensarbete (se 5.1) utvecklades en kvantitativ realtids PCR för TLR-4 (mRNA), en cellreceptor som tros vara involverad i RSV patogenes. Analysen applicerades på prover från ett vaccinförsök på kalv och kommer vidare att användas på prover från påföljande försök innan publicering.

2.3.5. Bovin subtyps-antikropsanalys (BRSV-specifik IgG₁, IgG₂, IgA)

Bovin indirekt ELISA för IgG₁ och IgG₂ etablerades såsom beskrivet för mus (2.1.1). Som positiva och negativa kontroller användes bovint sera vars halt IgG₁ och IgG₂ tidigare bestämts vid DTU, Danmark samt IAH, Storbritannien. En IgA capture ELISA etablerades, baserad på en tidigare publicerad dansk analys, och med hjälp av BRSV-specifika monoklonala antikroppar (gåva av G. Taylor, IAH, Storbritannien) såväl som kommersiellt tillgängliga monoklonala antikroppar.

2.3.6. Bovina dendritiska celler (etiskt tillstånd C178/9)

I samarbete med G. Taylor, IAH, Storbritannien, etablerades bovina dendritiska celler i cellkultur. Celler med typisk morfologi har upprepade gånger odlats fram från perifert blod och karaktärisering av cellmarkörer har initieras med FACS. Dessa celler kommer att användas för att ta reda på de initiala signaler som antigenpresenterande celler kommunicerar när de tar upp och presenterar BRSV-ISCOMer för immunsystemet.

3. Resultat

3.1. Klassiska BRSV-ISCOMer

3.1.1. Klassiska BRSV-ISCOMer; karaktärisering

ISCOMeras utseende, homogenitet och storlek bestämdes med hjälp av negative stain transmission elektronmikroskopi (nsTEM). De klassiska ringliknande ISCOM partiklarna återfanns och medelstorleken hos 1644 automatiskt detekterade partiklar var 56,4 nm (SD 11.1 nm). Med hjälp av mass-spektrometri i två oberoende laboratorier, western-blot och dot-blot, identifierades och relativt kvantifierades de virusproteiner som ingår i BRSV-ISCOMer (manuskript, se 5.3) och dessa data har medverkat till utvecklandet av ett vaccin baserat på rekombinanta virus proteiner. För första gången (oss veterligt) har andelen virusproteiner jämte cellulära proteiner kvantifierats i BRSV-ISCOMer. En kalvdos innehållande 188 ug proteiner totalt utgörs till mindre än hälften av BRSVproteiner, vilket är 3-20 gånger mindre än i andra publicerade studier där subunit BRSVvacciner givits till kalv. Vi har material för att i framtiden utforska de cellulära proteinernas roll som immunstimulerare.

3.1.2. Klassiska BRSV-ISCOMer, immunogenicitet hos mus

I motsats till BRSV proteiner utan adjuvant, vero-ISCOMer och PBS, inducerade BRSV-ISCOMer både cellulärt immunsvaret och antikroppar av typen IgG₁ och IgG_{2a} hos mus (Fig 1). Antikropps-isotypen IgG_{2a} hos mus är associerat till ett cytotoxiskt immunsvaret (typ Th1) som anses vara effektivt mot BRSV samt motverka allergiska reaktioner (typ Th2). Analyserna hade mycket hög specificitet, dvs. inga IgG₂ antikroppar detekterades av konjugatet anti-murint IgG₁ och tvärtom (Fig 1, ofyllda kontrollstaplar).

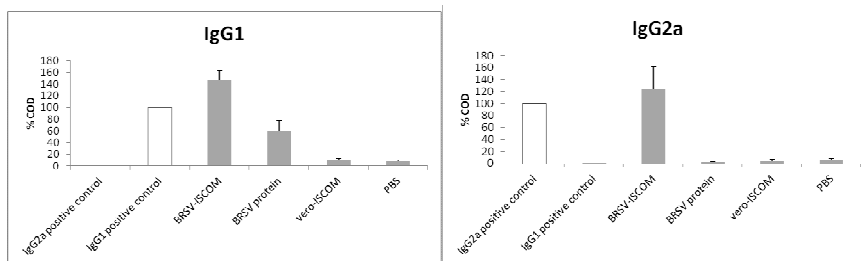


Fig 1. BRSV-specifika IgG₁ och IgG_{2a} antikroppar i serum hos mus en vecka efter andra vaccination (grupp medel \pm SD, presenterade som procent av positiv kontroll i form av ofylld stapel).

3.1.3. Klassiska BRSV-ISCOMer; immunogenicitet, skydd och säkerhet hos unga konventionella kalvar

Klassiska BRSV-ISCOMer inducerade ett starkt kliniskt och virologiskt skydd hos unga kalvar med BRSV-specifika maternella antikroppar. Skyddet mot virusutsöndring efter infektion var mycket starkt, både i övre och nedre luftvägar (Tabell 1). Detta skydd associerades till ett starkt och snabbt lokalt och systemiskt antikroppssvar (IgG₁ och IgG₂), så väl som T cellssvar vilket dominerades av produktion av IFN γ . Kalvar som inte utsöndrade detekterbart virus (negativa i PCR och cellkultur) efter experimentell infektion hade särskilt höga halter IgA i lungorna (Fig 2.) (Hägglund et al., 2011).

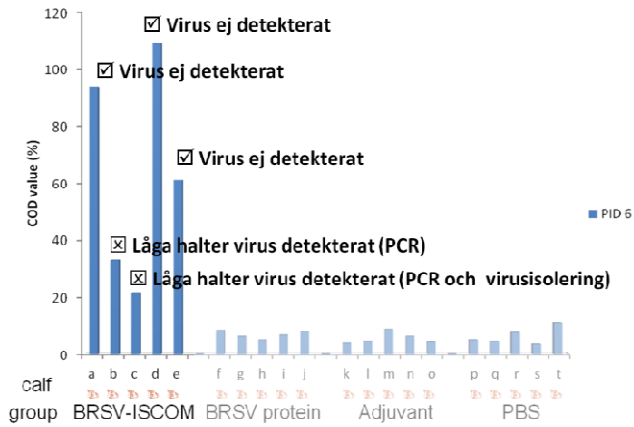


Fig. 2. BRSV-specifika IgA antikroppar i lungsköljningsprov dag 6 efter infektion av vaccinerade och ovaccinerade kalvar. Korrigerade OD värden (COD) presenteras som procent av positivt referenssera. I motsats till kalvar immuniserade med BRSV-ISCOMer hade alla kontrollkalvar låga halter IgA i lungorna och utsöndrade moderata eller höga halter virus (för PCR och virusisolering, se Tabell 1.)

Tabell 1. Effekt av vaccination på BRSV infektion. BRSV-specifika maternella antikroppar och detektion av BRSV hos kalv (identifierade som kalv 'a' till 't'), vaccinerade med BRSV-ISCOMer (n=5), BRSV proteiner (n=5) adjuvant (n=5) eller PBS (n=5) på 'post infection days' (PID) -35 och -14 och infekterade med BRSV på PID 0.

Grupp ^a	Kalv id	IgG ^b	Ålder vid 1 st vacc (dagar)	BRSV realtime PCR ^c (enheter korrelerar till TCID ₅₀)							BRSV virus isolering ^d	
				Nässekret							BAL	Lunga
				PID -1	1	2	3	4	5	6	6	6
BRSV-ISCOM	a	85	42	0	0	0	0	0	0	0	-	-
	b	25	62	0	0	0	0	0	0.3	0	-	-
	c	74	56	0	0	0	0	0.2	0.2	1	+ P2	-
	d	111	49	0	0	0	0	0	0	0	-	-
	e	208	24	0	0	0	0	0	0	0	-	-
BRSV protein	f	25	58	0	0	0	0.2	17	11	419	+ P1	+ P1
	g	228	40	0	0	0	8	128	620	2181	+ P1	-
	h	100	40	0	0	0	1	23	16	150	+ P1	+ P1
	i	80	61	0	0	0	1	37	202	422	+ P1	+ P1
	j	100	40	0	0	0	0	1	12	57	+ P1	+ P1
Adjuvant	k	126	55	0	0	0	6	156	203	352	+ P1	+ P1
	l	100	42	0	0	0	0	41	15	291	+ P1	-
	m	50	54	0	0	0	1	23	18	123	+ P1	-
	n	50	47	0	0	0	0	1	2,5	173	+ P1	+ P1
	o	164	39	0	0	0	3	10	512	956	+ P1	+ P1
PBS	p	111	62	0	0	0	0.1	7	153	142	+ P1	-
	q	143	55	0	0	0	9	99	1812	2212	+ P1	+ P1
	r	110	49	0	0	0	1	49	366	540	+ P1	+ P1
	s	<25	32	0	0	0	0	0.4	9	34	+ P1	+ P2
	t	98	31	0	0	0	0.2	73	368	484	+ P1	+ P1

^a Kalvar vaccinerade med BRSV-ISCOMer, BRSV proteiner, adjuvant eller PBS och infekterade med BRSV dag 0.

^b BRSV-specifika maternella antikroppar (titer, nio dagar fore första vaccination).

^c Näsavbbar samlades in på angivna dagar och analyserades för BRSV RNA med real-time PCR. RNA kvantifierades med hjälp av en spädningsserie av BRSV med en känd TCID₅₀.

^d Celler från lungsköljprov (broncho alveolar lavage, BAL) och inflammerad lungvävnad samlades in dag 6 för virus-isolering, och definierades såsom synlig cytopatogen effect på turbinatceller efter en eller två pasager på turbinatceller i 25 cm² cellkulturflaskor (+ P1 eller +P2). Ingen synlig CPE efter två passager (-).

3.2. BRSV-ISCOMer baserade på rekombinanta proteiner (rBRSV-ISCOMer)

3.2.1. rBRSV vacciners immunogenicitet hos mus

Preliminära data hos mus tyder på att trots det minimala innehållet av rBRSV proteiner så inducerade båda vaccinformuleringarna ett starkt T-cells svar när minnesceller utsattes för naturligt virus. Antikroppssvaret mot ett av de ingående proteinerna var däremot bättre i gruppen där proteinerna inte inkorporerats i ISCOM partiklar. Data kommer vidare att analyseras inför publikation.

3.2.2. Jämförelse av tre Europeiska vaccinkandidater i unga kalvar med höga halter BRSV-specifika maternella antikroppar.

Preliminära observationer indikerar att alla tre vacciner i varierande grad inducerade ett kliniskt och patologiskt skydd mot en allvarlig experimentell BRSV infektion. Alla ovaccinerade kontroller utvecklade kliniska tecken på BRSV infektion, inklusive luftvägssymtom och feber överstigande 40°C. Ingen spridning av vaccinvirus har påvisats serologiskt och prover för virologi samt immunologi och patologi är för närvarande under analys.

4. Diskussion

Projektet SLF H0750358 Kött har uppfyllt sitt främsta mål att definiera klassiska BRSV-ISCOMers immunogenicitet, effektivitet och säkerhet hos unga kalvar med maternella antikroppar vid vaccination. Cellulära, patologiska och histopatologiska analyser, samt studier på mus, har kompletterat tidigare resultat och har jämte kliniska, virologiska och andra immunologiska fynd efter infektion på kalv tydligt visat att BRSV-ISCOMer inducerar ett mycket starkt skydd även på unga kalvar, utan att inducera allergiska eller överdrivna immunologiska reaktioner (vilket ändå borde konfirmeras i större försök). Moderna och klassiska tekniker har kombinerats för en optimal karaktärisering av vaccinet, och detta har utgjort basen till ett modifierat vaccin som är bättre adapterat till storskalig produktion. För att detta vaccin skall kunna utgöra ett verktyg i ett framtida kontrollprogram mot BRSV, och även kunna användas utan att störa epidemiologiska studier av viruset, har det kompletterats med DIVA egenskaper, dvs. infekterade djur kan urskiljas från infekterade. Studierna kring denna nya vaccinformulering har inte avslutats inom ramen för SLF H0750358 Kött, men kommer att fortsätta under finansiering av FORMAS under EMIDA-ERA NET. Vi räknar även med att avsluta studier om vaccinernas påverkan på cellulär nivå innan 2014. Den svenska gruppen har inga patentintressen i någon av produkterna.

5. Involverade i projektet

Hu K-F., Blodörn K., Pringle J., Poré L., Anderson J., Olofson A-S., Ellencrona K., Ahooghalandari, P., Juremalm M., Morein B., Larsen LE., Lövgren-Bengtsson K., Riffault S., Eléouët JF och Taylor G., har jämte författarna till denna rapport bidragit med vetenskapligt arbete eller rådgivning inom projektet.

6. Tack

Vi tackar personalen vid SVA/SLU virologi för generöst tillhandahållande av celler, utrustning och faciliteter för produktion och karaktärisering av virus och rekombinanta proteiner. Personalen vid SLU immunologi tackas för hjälp vid initieringen av projektet och

personalen vid SLU idisslarmedicin samt vid SVAs djurhus för skötsel av kalvar och möss, samt hjälp vid provtagning. Tack även till ISCONOVA AB och SVANOVA AB som vänligen ställt upp med rådgivning och material för virus och ISCOM produktion, samt DETOL AB som hyrt ut tjänster till projektet. Slutligen vill vi tacka Dr. G. Taylor, Compton, Storbritannien, samt Dr. S Riffault och Dr. JF Eleouët, INRA, Frankrike för ett mycket generöst och fruktbart vetenskapligt samarbete.

7. Publikationer

Projektet utgör en del av K. Blodörns och J. Andersons doktorandstudier. Dessa förväntas publicera vetenskapliga artiklar f.r.o.m. HT 2012, samt avhandlingar under 2014.

7.1. Examensarbeten

Blodörn, K. (2010). Development of a real-time RT-PCR for quantification of bovine TLR4 mRNA and evaluation of its use during a BRSV vaccine challenge. Veterinärprogrammet, SLU.

Poré, L. (2010) Evaluation du vaccin BRSV-ISCOMs chez les veaux. BTSA ANABIOTEC, Toulouse, France.

7.2. Internationella vetenskapliga konferenser/ kurser och resultatförmedling till närningen

Valarcher J-F., Hägglund S. **Keynote.** Vaccines and vaccination against viral disease in cattle. XXVII World Buiatrics Congress, Lisbon, Portugal, June 2012.

Hägglund S., Hu K-F., Blodörn K., Poré L., Anderson J., Ellencrona K., Pringle J., Riffault S., Eléouët JF., Taylor G., JF. Valarcher . **Muntlig presentation.** BRSV-ISCOMs induce clinical and virological protection in young calves with maternal antibodies. European Buiatrics Forum, Marseille, France, 16-18 Nov 2011.

Pringle J., Hägglund S., Hu K-F., Blodörn K., JF. Valarcher . **Muntlig presentation.** Forced oscillation technique measurements of pulmonary function: an objective tool to assess the respiratory function in cattle. European Buiatrics Forum, Marseille, France, 16-18 Nov 2011.

Hägglund S., Hu K-F., Blodörn K., Poré L., Anderson J., Olofson A-S., Ellencrona K., Juremalm M., Morein B., Larsen LE., Lövgren-Bengtsson K., Pringle J., Riffault S., Eléouët JF., Taylor G., Valarcher JF. **Poster.** BRSV-ISCOMs in young calves with maternal antibodies. The 7th International Symposium on Respiratory Syncytial Viral Infections Rotterdam, the Netherlands, 2-5 Dec 2010.

Valarcher J-F., Hägglund S. 2009. **Kurs.** Bovine Respiratory Syncytial virus: Epidemiology, Diagnostic and prevention. Luftveisseminar - Helsetjenesten for storfe, Oslo, Norway, 16-17 Feb 2009.

7.3. Publikationer, peer-reviewed, internationella tidskrifter

Hägglund, S., Hu, K., Vargmar, K., Pore, L., Olofson, A.S., Blodorn, K., Anderson, J., Ahooghalandari, P., Pringle, J., Taylor, G. Valarcher, J.F. (2011). Bovine respiratory syncytial virus ISCOMs-Immunity, protection and safety in young conventional calves. *Vaccine* 29, 8719-8730.

Pringle J., Valarcher JF., Hu KF., Blodörn K., Hägglund S.. Forced oscillation technique measurements of pulmonary function in calves undergoing experimental BRSV infection. Manuscript. (in preparation).

Hägglund S., Hu KF., Eléouët JF., Ellencrona K., Lövgren-Bengtsson K., Riffault S., Valarcher JF. Detailed characterization of ISCOMs against bovine respiratory syncytial virus. Manuscript. (in preparation).

8. Referenser

Hägglund, S., Hu, K., Vargmar, K., Pore, L., Olofson, A.S., Blodorn, K., Anderson, J., Ahooghalandari, P., Pringle, J., Taylor, G. Valarcher, J.F. (2011). Bovine respiratory syncytial virus ISCOMs-Immunity, protection and safety in young conventional calves. *Vaccine* 29, 8719-8730.

Hägglund, S., Hu, K.F., Larsen, L.E., Hakhverdyan, M., Valarcher, J.F., Morein, B., Taylor, G., Belák, S. Alenius, S. (2004). Bovine respiratory syncytial virus ISCOMs - protection in the presence of maternal antibodies. *Vaccine* 23, 646-655.