

Slutrapport:

Studier av immunsvaret mot lungmaskinfektion hos nötkreatur

Bakgrund

Nötkreaturens lungmask, *Dictyocaulus viviparus*, är en betesburen parasit som kan orsaka omfattande sjukdomsproblem⁽¹⁾. Djuren infekteras på bete genom intag av larver som utsöndrats av smittade djur. Larverna sväljs ner, penetrerar tarmslemhinnan och transporteras med blod och lymfa till kröslymfknutorna och sedan vidare till lungorna. I lungorna tränger de ut i alveolerna och vandrar upp genom luftvägarna. Under denna migration från magtarmkanalen till lungorna genomgår larverna en mognadsprocess och utvecklas till vuxna maskar. Dessa, som kan bli upp till 8 cm långa, lever i de större luftvägarna och luftstrupen. De kliniska symtomen vid lungmaskinfektion är beroende av infektionsdosen och kan variera från tillfällig hosta till grava andningssvårigheter och kraftigt påverkat allmäntillstånd. I allvarliga fall kan sjukdomen få dödlig utgång om inte adekvat behandling sätts in. Under migrationsfasen i lungorna orsakar larverna kraftiga inflammatoriska reaktioner och kliniska symtom kan ibland ses redan i detta skede. De vuxna parasiterna orsakar en kronisk katarral bronkit med infiltration av inflammatoriska celler, framför allt eosinofiler. Slem, inflammatoriskt exsudat, ägg och larver kan täppa till luftvägarna och orsaka atelektas och emfysem. I Sverige är infektionen vanlig och väl spridd i flera delar av landet. Exempelvis visade en undersökning av 15 ekologiskt drivna besättningar att 11 av dessa var infekterade och i två sågs klinisk lungmasksjuka⁽²⁾. I en annan undersökning som omfattade besättningar med både ekologiskt och konventionell drift påvisades lungmaskinfektion på totalt 40% av gårdarna⁽³⁾.

Djur som utsatts för upprepade infektioner blir så småningom immuna, vilket gör att lungmasksjuka i typiska fall inträffar under den första betessäsongen. Sedan 1950-talet finns det ett kommersiellt vaccin bestående av bestrålade larver (Bovilis Lungworm; Merck Animal Health). Detta vaccin är effektivt och har tidigare använts i stor utsträckning i Europa. Men som alla levande vacciner har det flera nackdelar såsom kort hållbarhet och risk för kontamination med andra patogena mikroorganismer. Sedan mitten av 80-talet har användningen av vaccinet minskat till följd av lanseringen av långtidsverkande avmaskningsmedel. Eftersom vaccinet består av levande larver och dess effekt är beroende av att immunsvaret stimuleras ytterligare genom efterföljande naturliga infektioner kan detta vaccin inte kombineras med långtidsverkande avmaskningsmedel. Det har emellertid rapporterats från flera länder att problem orsakade av lungmask har ökat under senare tid och nu även drabbar äldre djur⁽⁵⁾. En bidragande orsak till detta kan vara att den kontinuerliga behandlingen med avmaskningsmedel under kalvarnas första betessäsong förhindrar utveckling av skyddande immunitet. Det finns således ett uttalat behov av nya kompletterande kontrollmetoder. Utveckling av ett icke levande vaccin baserat på definierade parasit-antigen framställda med moderna molekylärbiologiska metoder skulle kunna utgöra ett viktigt steg i den riktningen.

För att designa ett effektivt subenhets-vaccin krävs både identifiering av mask-antigen som kan stimulera till ett skyddande immunsvaret och ett adjuvans som kan styra immunsvaret mot korrekt typ av immunsvaret. Trots att vaccinering mot lungmasksjuka har tillämpats under så lång tid vet man fortfarande relativt lite om vilka immunologiska faktorer som ligger bakom utvecklingen av skyddande immunitet. Sammanfattningsvis kan sägas att de studier som utförts framförallt har inriktats på antikroppssvaret och de immunreaktioner som sker när parasiterna befinner sig i värdjurets lungor⁽⁵⁻⁹⁾. Sammantaget kan sägas att resultaten från dessa studier visar att ett immunsvaret av s.k. T-hjälparcell 2 (Th2) typ dominerar hos *D. viviparus*-infekterade djur, med bl.a. rekrytering av eosinofiler och ett ökat uttryck av cytokinet interleukin-4 (IL-4) i lungorna.

Det är välkänt att Th2-svar ofta dominerar vid maskinfektioner men även s.k. Th1- och Th17-svar har betydelse för utveckling av immunitet mot vissa maskar⁽¹⁰⁾. För att underlätta framtagandet av nya vaccin mot lungmaskinfektion är det viktigt att fortsätta studier bedrivs för att tydligare identifiera vilka mekanismer som ger upphov till skyddande immunitet. Särskilt fattas kunskap om infektionens tidiga skede då djurets immunsystem först kommer i kontakt med parasiten.

Vilken typ av immunsvaret som utvecklas vid en infektion styrs i stor utsträckning av de celler som först träffar på infektiösa ämnen och hur detta påverkar dem. Invaderande mikroorganismer känns inte bara igen av antigen-specifika receptorer på B- och T-celler, utan även celler tillhörande det medfödda, ospecifika immunförsvaret (t.ex. makrofager, granulocyter och mastceller) via receptorer som känner igen främmande strukturer på ett mer generellt sätt, s.k. pathogen recognition receptors (PRR). Mycket tyder till och med på att den primära aktiveringen av det ospecifika immunförsvaret kanske är den mest avgörande händelsen för hur infektionsförloppet utvecklas. Det ospecifika immunförsvarets celler frisätter signalsubstanser (kemokiner och cytokiner) som i sin tur påverkar andra immunceller och på så sätt styr vilken typ av specifikt immunsvaret som utvecklas t.ex. Th1 eller Th2⁽¹¹⁾. Immunsvaret under den tidiga delen av *D. viviparus*-infektionen, då parasiten penetrerar tarmen och via kröslymfknutorna migrerar till lungorna, har inte ännu kartlagts. Eftersom dessa tidiga händelser är avgörande för utvecklingen av ett skyddande immunsvaret kommer vi i det aktuella projektet att studera immunsvaret i tarm och kröslymfknutor som lungmasklarverna passerar under de första dagarna efter infektion.

Syfte och strategi

Projektets övergripande syfte är att identifiera de immunreaktioner som leder till att skyddande immunitet mot lungmaskinfektion utvecklas hos nötkreatur. Denna kunskap skall sedan användas för att utveckla moderna vaccin mot sjukdomen. Syftet med detta delprojekt var att studera den tidiga fasen av lungmaskinfektionen, från infektionen via mag-tarmkanalen tills det att larverna nått lungorna, för att identifiera hur immunsystemet aktiveras vid den första kontakten med parasiten. Vi har därför vid experimentell infektion av kalvar samlat vävnadsprover från bl.a. lymfknutor och i dessa studerat immunceller samt analyserat uttrycket av olika cytokiner.

Material och metoder

Kalvar och försöksupplägg

Under våren/försommaren 2009 utförde vi ett infektionsförsök (etiskt tillstånd C75/9) omfattande 30 stycken 2 - 4 månader gamla förmedlingskalvar. Vid ankomsten fördelades kalvarna efter kroppsvikt in i 5 grupper (n = 6) med så jämn genomsnittlig kroppsvikt som möjligt. Efter en tre veckors aklimatiseringsperiod inokulerades fyra av grupper oralt med lungmasklarver (10 L₃-larver/kg kroppsvikt) och avlivades sedan efter 1, 3, 5 respektive 14 dagar. Kalvarna i den femte gruppen utgjorde oinfekterade kontroller och avlivades även de dag 1, 3, 5 eller 14 (en eller två kalvar per dag). Från varje kalv togs vävnadsprover från tunntarmen (främre, mellersta och bakre delen), kröslymfknutorna (3 stycken), mediastinal- och trakeobronkial-lymfknotorna samt från lungorna. Dessutom togs material från flanklymfknutan, d.v.s. en lymfknuta som sannolikt inte påverkas av lungmasklarverna. Prover sparades i s.k. RNA-later för extraktion av RNA, samt i formalin för histologisk undersökning.

Realtids-PCR-analyser

Vi har tidigare utvecklat kvantitativa realtids-PCR-metoder för att detektera och mäta mRNA för bovint IL-4 och IL-10⁽¹²⁾. Med realtids-PCR-metodiken kan mRNA-uttrycket kvantifieras både

absolut genom användandet av standarder med känt nukleinsyrainnehåll och relativt genom att jämföra uttrycket av testgenen med uttrycket av en s.k. referensgen som uttrycks konstant i cellerna. Det senare medför att prov innehållande olika antal celler (t.ex. vävnadsprov) kan jämföras. Vi har i denna studie använt GAPDH & β -aktin som generella referensgener.

Med hjälp av en extraktionsrobot extraherades RNA från 3 kröslymfknotor och en flanklymfknota från varje kalv. Proverna behandlades med DNase för att bryta ner eventuella DNA-rester. Därefter konverterades mRNA till cDNA med hjälp av omvänt transkriptas (reversed transcriptase). Varje prov analyserades sedan med realtids-PCR-metoder⁽¹²⁾ baserade på specifika primers och TaqMan-prober för IL-4, IL-10 respektive de två referensgenerna. Kvantifiering av uttrycket av respektive gen gjordes med hjälp av standardkurvor baserade på spädningsserier av specifika plasmider. Därefter normaliserades uttrycket av IL-4 och IL-10 gentemot uttrycket av GAPDH och β -aktin.

Histologiska undersökningar

De formalinfixerade proverna från krös-, flank- och tracheobronkiallymfknotorna bäddades in i paraffin, snittades och färgades med haematoxylin och eosin enligt standardprotokoll. Snitten undersöktes i ljusmikroskop och efter en första översiktlig genomgång beslöt vi att kvantifiera förekomsten av eosinofila granulocyter (eosinofiler). Dessa celler räknades i 10 högförstoringsfält (400x) på varje snitt, 7 fält i lymfknotornas paracortex och 3 fält i märgsinus.

Resultat

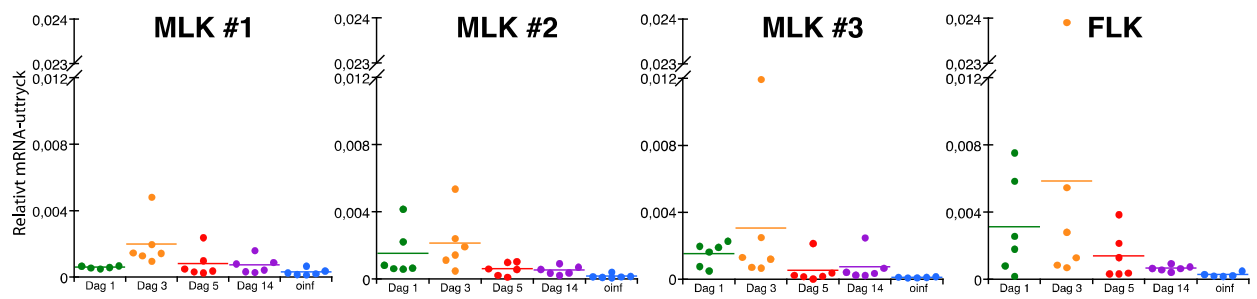
Utfall av den experimentella *D. viviparus*-infektionen

Hos de kalvar som avlivades 1, 3 respektive 5 dagar efter infektion observerades inga kliniska symtom på lungmaskinfektion. Däremot uppvisade alla infekterade kalvar som behölls fram till dag 14 kliniska symtom på luftvägsinfektion såsom hosta och ökad andningsfrekvens, och vid obduktion påvisades lungmaskar hos dem. Inga av de oinfekterade kontrollkalvarna visade några tecken på lungmaskinfektion och inga lungmaskar påvisades hos dessa vid obduktion.

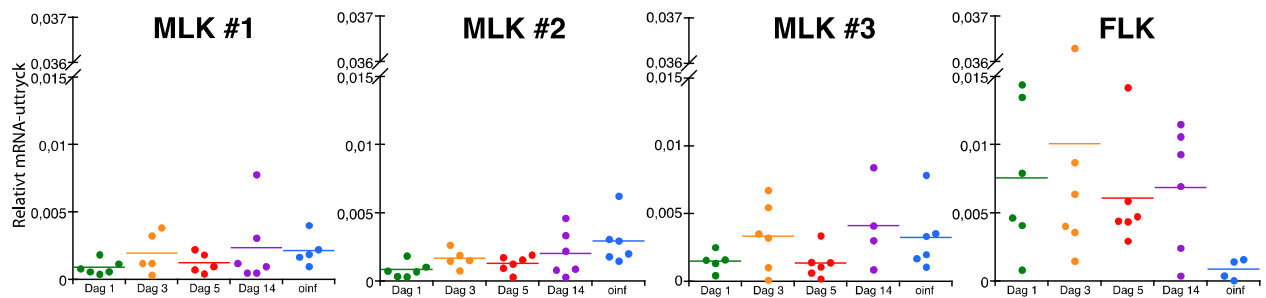
Uttryck av IL-4 och IL-10-mRNA i lymfknotor

Uttrycket av IL-4 och IL-10-mRNA analyserades i tre olika kröslymfknotor och i flanklymfknotan från alla kalvar (Fig. 1 & 2). Resultaten från dessa analyser visar att IL-4-mRNA-uttrycket i kröslymfknotorna från dag 1 och 3 efter infektion var förhöjt jämfört med det i lymfknotorna från de oinfekterade kontrollkalvarna. Vid de två följande tidpunkterna, dag 5 och 14, var IL-4-uttrycket hos majoriteten av de infekterade kalvarna på ungefär samma nivå som hos den oinfekterade kontrollgruppen. Även i flanklymfknotan var uttrycket av IL-4-mRNA förhöjt hos de kalvar som avlivades dag 1 och 3 jämfört med det hos kontrollkalvarna (Fig. 1).

Uttrycket av IL-10-mRNA i kröslymfknotorna var på samma nivå hos de infekterade som hos de oinfekterade kalvarna vid alla provtagningstillfällena. I flanklymfknotan påvisades dock ett förhöjdt uttryck av IL-10-mRNA hos de infekterade djuren jämfört med kontrollgruppen (Fig. 2).



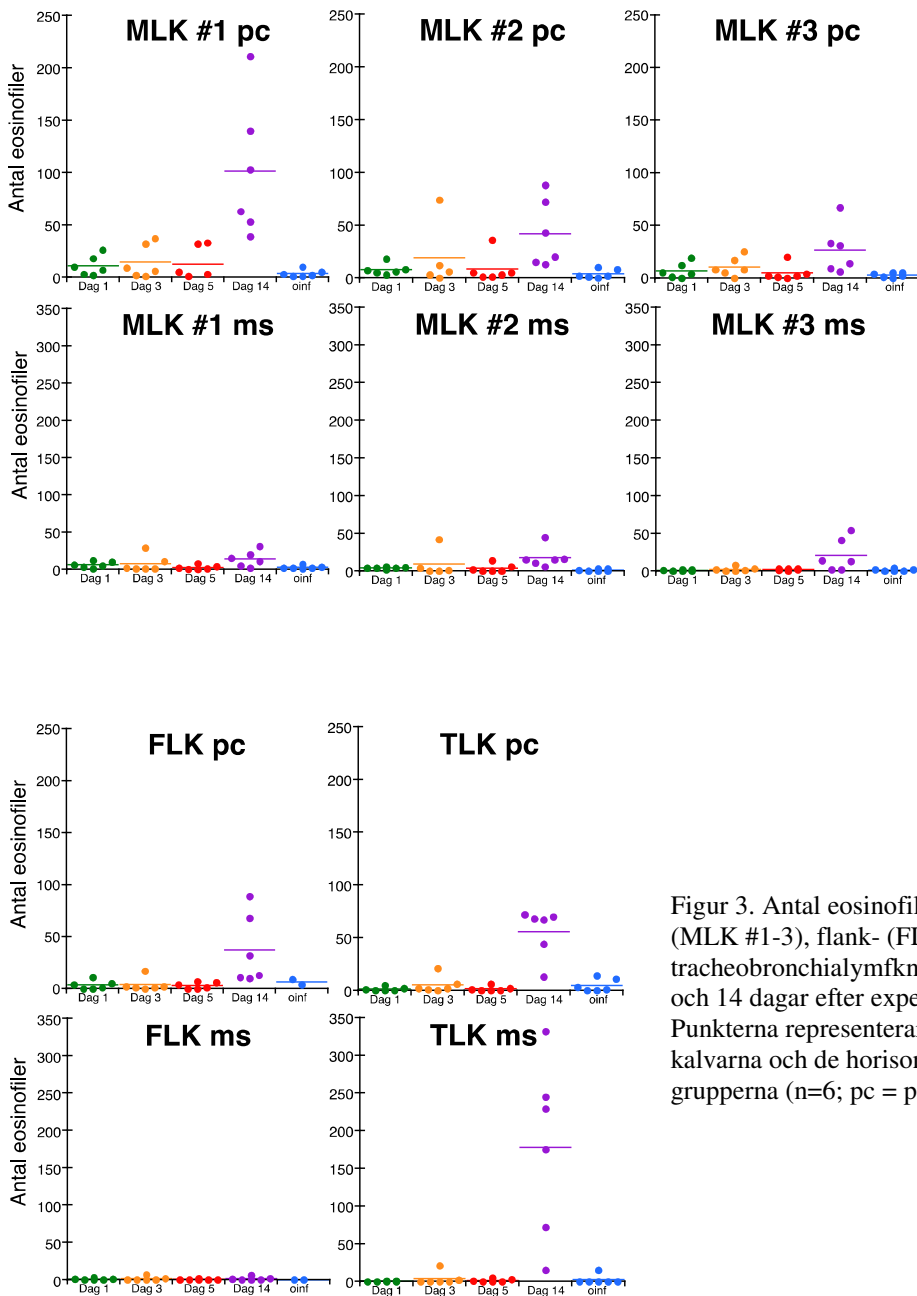
Figur 1. Uttryck av IL-4-mRNA i tre mesenterial (krös)- (MLK #1-3) och flanklymfknotor (FLK) hos kalvar 1, 3, 5 och 14 dagar efter experimentell lungmaskinfektion. Punkterna representerar värden för de individuella kalvarna och de horisontella linjerna medelvärdet för grupperna (n=6).



Figur 2. Uttryck av IL-10-mRNA i tre mesenterial (krös)- (MLK #1-3) och flanklymfknotor (FLK) hos kalvar 1, 3, 5 och 14 dagar efter experimentell lungmaskinfektion. Punkterna representerar värden för de individuella kalvarna och de horisontella linjerna medelvärdet för grupperna (n=6).

Rekrytering av eosinofiler till lymfknotor

Antalet eosinofiler i paracortex och märgsinus undersöktes med hjälp av ljusmikroskopi av histologiska snitt från krös-, flank- som tracheobronkiallymfknotorna från alla kalvar (Fig. 3). Resultaten från denna undersökning visade att hos de infekterade kalvar som avlivades dag 14 var antalet eosinofiler förhöjt i såväl krös-, flank- som tracheobronkiallymfknotorna jämfört med de oinfekterade kalvarna. Detta var mest uttalat i lymfknotornas paracortex. Vid de tidigare provtagningstillfällena låg antalet eosinofiler hos de infekterade djuren på nivåer jämförbara med de hos kontrollgruppen (Fig. 3).



Figur 3. Antal eosinofiler i tre mesenterial (krös)- (MLK #1-3), flank- (FLK) och tracheobronchialymfknutor (TLK) hos kalvar 1, 3, 5 och 14 dagar efter experimentell lungmaskinfektion. Punkterna representerar värden för de individuella kalvarna och de horisontella linjerna medelvärden för grupperna (n=6; pc = paracortex; ms = margsinus).

Diskussion

De reaktioner som startas då immunsystemet första gången aktiveras av ett smittämne kan vara avgörande för utvecklandet av skyddande immunitet. Immunsvaret hos nötkreatur under den tidiga fasen av infektion med lungmasken *D. viviparus* har inte studerats tidigare. I denna första studie valde vi att fokusera på immunreaktioner i kröslymfknutorna därför att 1) man anser att larverna migrerar genom dessa då de förflyttar sig från tarmen till lungorna under infektionens första fas⁽¹⁾ och 2) de är viktiga ”knytpunkter” för immunsvaret i tarmen och bukhålan där immunsystemet först träffar på parasiten vid infektion. Våra resultat visar att immunsystemet aktiverades mycket snabbt vid lungmaskinfektionen då ett ökat uttryck av IL-4-mRNA observerades i kröslymfknutorna redan från dag 1 efter infektion. Interleukin-4 är ett cytokin som är starkt associerat till immunsvaret av s.k. Th2-typ som anses skyddande vid maskinfektion⁽¹³⁾. Cytokinet anses där ha en nyckelroll både i styrningen av naiva T-cellers utveckling till Th2-celler och som mediator av Th2-svarets effekter. Interleukin-4 produceras av bland annat av Th2-celler och av olika celler som hör till den ”naturliga”, ospecifika, delen av immunsystemet, t.ex. basofiler, mastceller och eosinofiler. Vi har tidigare observerat ett starkt ökat uttryck av IL-4-mRNA i celler som sköljts upp från kalvlungor vid en primär *D. viviparus*-infektion⁽¹²⁾. I

lungorna observerades då IL-4-svaret först 2 veckor efter infektion då också lungmasklarver och ett immuncellssvar med bl.a. ett ökat antal eosinofiler kunde observeras i lungsköljvätskan. Resultaten från vår nya studie visar alltså att uttrycket av IL-4 aktiveras redan i lungmaskinfektionens första fas när larverna infekterar tarmen. Det är troligt att det då är celler från det naturliga immunsvaret som uttrycker IL-4 när de via PRR aktiverats av generella maskstrukturer och/eller av den vävnadsskada som larvernas migration gett upphov till. I lymfknutor, där aktivering av naiva T-celler sker, kan då IL-4 styra det specifika immunsvaret mot ett Th2-svar.

Vi observerade också ett ökat uttryck av IL-4-mRNA i flanklymfknutorna under lungmaskinfektionens tidiga fas. Flanklymfknutorna inkluderades i studien med avsikten att de skulle fungera som "interna negativa kontroller" då vi inte förväntade oss att de skulle påverkas av infektionen. Våra resultat visar dock att lymfknutor påverkas mer generellt under lungmaskinfektion än vad vi först antog (se även diskussion kring eosinofiler nedan). Då det har visats att flera av immunsystemets celltyper ständigt är i cirkulation bland kroppens sekundära lymfoida organ kan dessa resultat bero på migration av IL-4 uttryckande celler. Alternativt kan maskprodukter och/eller celldebris som transporterats från infekterad vävnad via lymfan till perifera lymfknutor ha stimulerat IL-4 uttrycket. Maskinfektionen kan också ha inducerat en inflammatorisk reaktion som lett till systemisk aktivering av immunsystemet. I flanklymfknutorna observerades också ett ökat uttryck av IL-10-mRNA vid alla provtagningstillfällena under lungmaskinfektionen. Interleukin-10 är ett cytokin associerat till immunsvaret av Th2-typ som har både aktiverande men också starkt immunsupprimerande egenskaper. Vår observation kan därför tänkas reflektera en nedreglering av reaktioner i en lymfknuta som inte står i direktkontakt med maskinfekterad vävnad. För att få en bättre överblick och insikt i de komplexa immunreaktioner som induceras i lungmaskinfektionens tidiga fas arbetar vi nu med att utöka dessa resultat med analyser av fler vävnadsprover (tarmvävnad, Peryerska plack och lunglymfknutor) samt att inkludera fler cytokiner i analyserna (t.ex. IL-5, IL-25 och IL-33).

Vid den histologiska undersökningen av krös-, tracheobronkial- och flanklymfknutor sågs ett ökat antal eosinofiler vid provtagningen 14 dagar efter lungmaskinfektion. Vid denna tidpunkt har larverna nått lungorna och en kraftig inflammatorisk reaktion med bl.a. eosinofiler ses i lungvävnaden. Ett ökat antal aktiverade eosinofiler har också observerats i mediastinallymfknutor från möss som infekterats med masken *Trichuris muris* som koloniserar mössens blindtarm⁽¹⁴⁾. Denna ökning observerades från två veckor efter *T. muris*-infektionen och var mest påtaglig hos möss som var genetiskt motståndskraftiga mot denna parasit. Eosinofiler betraktades tidigare i princip enbart som "effektor celler" som genom att frisätta olika substanser från sina granula deltog i försvaret mot framförallt maskinfektioner. Man har dock funnit att eosinofiler har en betydligt mer allsidig roll i immunförsvaret där de bl.a. med hjälp av PRR kan känna igen infektionsämnen och producera olika cytokiner t.ex. IL-4⁽¹⁵⁾. Dessa celler har sålunda även en funktion i regleringen av specifika immunsvaret. Våra resultat indikerar att eosinofiler har en roll i regleringen av immunsvaret mot *D. viviparus*. En tänkbar funktion är antigenpresentation då eosinofilerna framförallt observerades i paracortex där antigen presenteras för T-celler och det finns studier som indikerar att eosinofiler kan presentera antigen för aktiverade T-celler⁽¹⁵⁾.

Sammantaget visar vår studie att immunsystemet aktiveras tidigt vid en infektion med nötkreaturens lungmask och vi observerade cytokinsvar och cellulära reaktioner som tyder på initiering och reglering av ett immunsvaret av Th2-typ. Immunsvaret vid denna fas av lungmaskinfektionen har inte studerats tidigare och våra resultat bidrar till en ökad kunskap om initieringen av skyddande immunitet mot denna parasit vilket i förlängningen är värdefullt för utveckling av vaccin mot denna parasit.

Publikationer och övrig resultatförmedling

Resultaten från detta projekt har hittills presenteras som en poster vid en internationell veterinär-immunologisk konferens och vid Veterinär- och husdjursfakultetens forskningsdag 2013.

Holmgren, S., Lundén, A., Sandros, B., Tråvén, M. & Wattrang, E. 2012: Interleukin-4 and IL-10 mRNA expression and eosinophil recruitment in mesenteric lymph nodes from calves infected with the cattle lungworm, *Dictyocaulus viviparus*. European Veterinary Immunology Workshop (EVIW), Edinburgh, UK.

Holmgren, S., Lundén, A., Sandros, B., Tråvén, M. & Wattrang, E. 2012: Interleukin-4 and IL-10 mRNA expression and eosinophil recruitment in mesenteric lymph nodes from calves infected with the cattle lungworm, *Dictyocaulus viviparus*. Faculty Research Day, 2013-02-07, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Sciences, SLU, Uppsala.

Eftersom de hittills erhållna resultaten kommer att utökas genom ytterligare analyser av det insamlade materialet planerar vi en mer omfattande och vidare presentation av resultaten i någon internationell vetenskaplig tidskrift samt i lämplig svensk facklitteratur och i populärvetenskaplig form.

Forskargruppen

Det här beskrivna projektet ingår som del i det övergripande projektet ”Studier av immunsvaret vid lungmaskinfektion hos nötkreatur” som sedan 2003 drivs i samarbete mellan Anna Lundén, SLU, och Eva Wattrang, SVA, med Formas som huvudfinansier. Det övergripande projektets har bl.a. resulterat i en doktorsavhandling (Malin Hagberg, 2008).

Andra som deltagit i det nu rapporterade delprojektet är Sofia Holmgren, Madeleine Tråvén och Boel Sandros. Dessutom har Uzair Tauheed, masters-student vid Infektionsbiologiprogrammet vid Uppsala Universitet, jobbat inom projektet i två månader under sommaren 2010.

Referenser

1. Jørgensen R and C. Ogbourne (1985) *Bovine Dictyocauliasis: A Review and Annotated Bibliography*. Vol. 8. London: Commonwealth Agricultural Bureaux.
2. Höglund J, C Svensson and A Hessel (2001) *A field survey on the status of internal parasites in calves on organic dairy farms in southwestern Sweden*. *Vet Parasitol*, 99, 113-28.
3. Höglund J, S Viring and M Törnqvist (2004) *Seroprevalence of Dictyocaulus viviparus in first grazing season calves in Sweden*. *Vet Parasitol*, 125, 343-52.
4. Höglund J (2006) *Targeted selective treatment of lungworm infection in an organic dairy herd in Sweden*. *Vet Parasitol*, 138, 318-27.
5. McKeand JB (2000) *Vaccine development and diagnostics of Dictyocaulus viviparus*. *Parasitol*, 120 Suppl, S17-23.
6. Kooyman FN, AP Yatsuda, HW Ploeger and M Eysker (2002) *Serum immunoglobulin E response in calves infected with the lungworm Dictyocaulus viviparus and its correlation with protection*. *Parasite Immunol*, 24, 47-56.
7. Hagberg M, E Wattrang, R Niskanen, M Tråvén, J Höglund and A. Lundén (2005) *Mononuclear cell subsets in bronchoalveolar lavage fluid during Dictyocaulus viviparus infection of calves: a potential role for gamma/delta TCR-expressing cells in airway immune responses?* *Parasite Immunol*, 27, 151-61.

8. Scott CA, JB McKeand and E Devaney (1996) *A longitudinal study of local and peripheral isotype/subclass antibodies in Dictyocaulus viviparus-infected calves*. *Vet Immunol Immunopathol*, 53, 235-47.
9. Johnson DR, J Sales and JB Matthews (2005) *Local cytokine responses in Dictyocaulus viviparus infection*. *Vet Parasitol*, 128, 309-18.
10. Diaz A and JE Allen (2007) *Mapping immune response profiles: the emerging scenario from helminth immunology*. *Eur J Immunol*, 37, 3319-26.
11. Harn DA, J McDonald, O Atochina and AA Da'dara (2009) *Modulation of host immune responses by helminth glycans*. *Immunol Rev*, 230, 247-57.
12. Holmgren S, M Hagberg Gustavsson, A Lundén and E Wattrang, *Cytokine mRNA expression in bronchoalveolar lavage cells during Dictyocaulus viviparus infection in calves*. Submitted manuscript.
13. Anthony RM, LI Rutitzky, JF Urban Jr, MJ Stadecker and WC Gause (2007) *Protective immune mechanisms in helminth infection*. *Nature Rev Immunol*, 7, 975-87.
14. Svensson M, L Bell, MC Little, M de Schoolmeester and RM Locksley and KL Else (2011) *Accumulation of eosinophils in intestine-draining mesenteric lymph nodes occurs after Trichuris muris infection*. *Parasite Immunol*, 33, 1-11.
15. Rothenberg ME and SP Hogan (2006) *The eosinophil*. *Annu Rev Immunol*, 24, 147-74