

Slutrapport:

Det tidiga immunsvaret mot nötkreaturens lungmask, *Dictyocaulus viviparus*

Anna Lundén & Eva Wattrang

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 ⁽⁴⁾. 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. Sammantaget kan sägas att de studier som utförts framförallt har inriktats på antikroppssvaret och de immunreaktioner som sker när parasiterna befinner sig i värdjurets lungor ⁽⁴⁻⁸⁾. 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⁽⁹⁾. För att underlätta framtagandet av nya vaccin mot lungmaskinfektion är det viktigt att fortsatta 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.

Syfte och strategi

Denna studie in går i ett större projekt vars 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 det delprojekt som nu rapporteras 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 studerat morfologiska förändringar i histologiska snitt från tarmen och kröslymfknutorna från experimentellt *D. viviparus*-infekterade kalvar.

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 kalvs togs vävnadsprover från tunntarmen (främre, mellersta och bakre delen), kröslymfknutorna (3 stycken), mediastinal- och tracheobronkial-lymfknutorna samt från lungorna. Dessutom togs material från flanklymfknutan, d.v.s. en lymfknuta som ansågs sannolikt opåverkad av lungmasklarverna. Prover lades i formalin för histologisk undersökning.

Histologiska undersökningar

De formalinfixerade proverna från de tre tarmavsnitten, krös-, flank- och tracheobronkiallymfknutorna 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) i såväl tarmslemhinnan som i de olika lymfknutorna. I varje tarmavsnitt räknades dessa celler i 5 högförstoringsfält (600 x), d.v.s. totalt 15 fält per kalv. I lymfknutorna räknades antalet eosinofiler i 10 högförstoringsfält (400 x) på varje snitt, 7 fält i lymfknutornas paracortex och 3 fält i margsinus.

Resultat

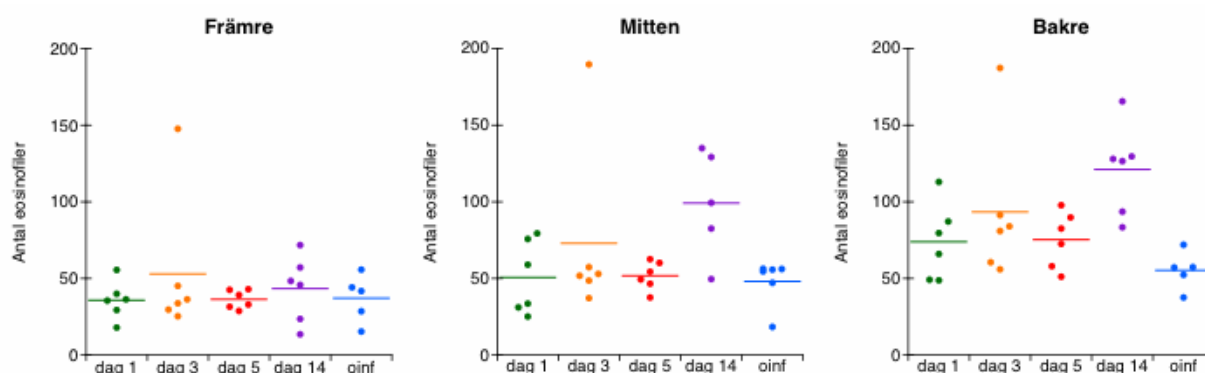
Utfall av den experimentella *D. viviparus*-infektionen

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.

Rerytering av eosinofiler till tarmslemhinnan

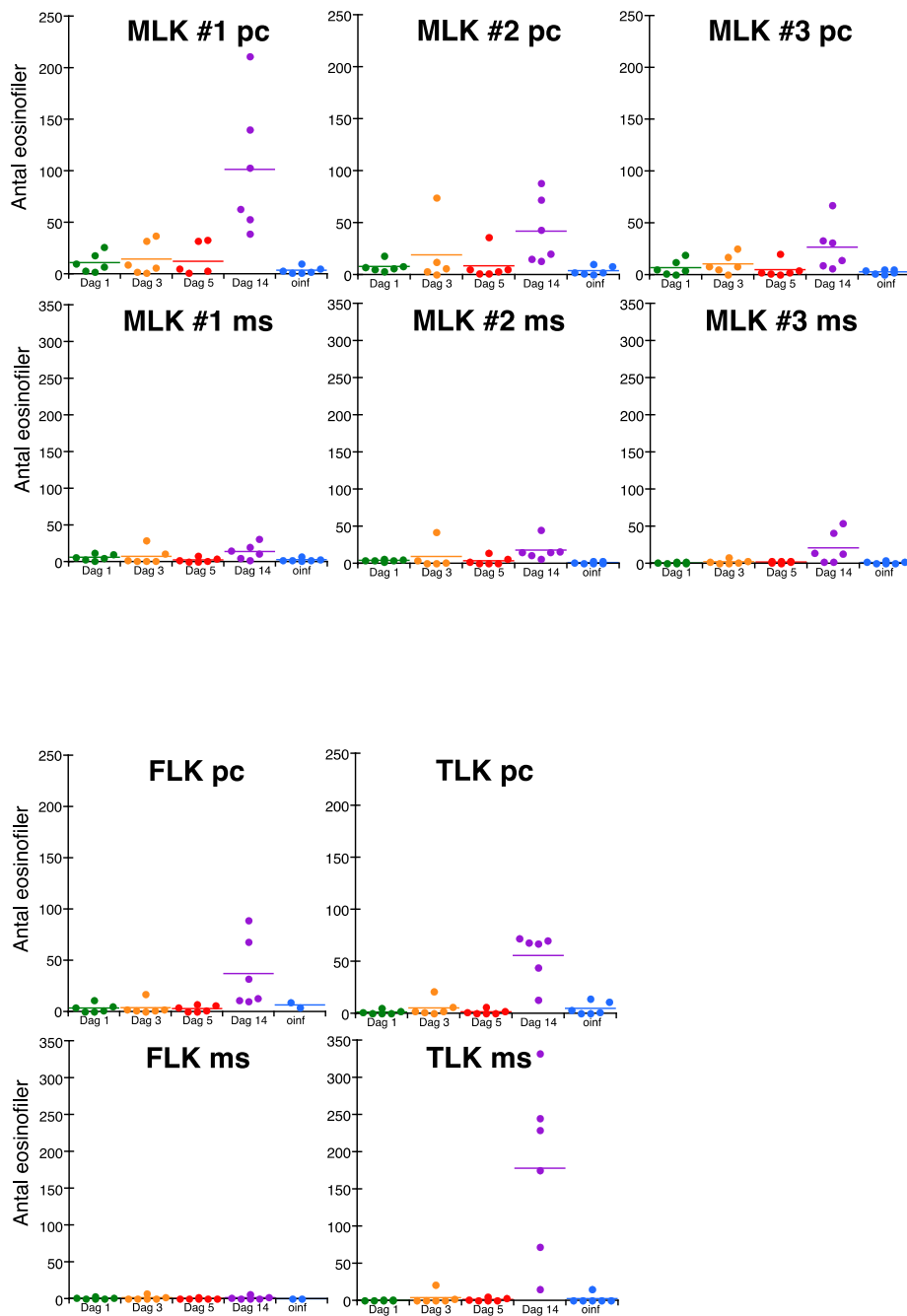
Antalet eosinofiler i tre avsnitt av tunntarmen (jejunum), främre, mitten och bakre delen, undersöktes med hjälp av ljusmikroskopi av histologiska snitt från alla kalvar (Fig. 1). Resultaten visade att antalet eosinofiler i tarmslemhinnan generellt hos alla kalvar var något högre i de bakre delarna jämfört med den främsta delen av tunntarmen. Hos de infekterade kalvarna sågs också en ökning av antalet eosinofiler i slemhinnan i den mittersta och framförallt bakre delen av tunntarmen dag 14 efter infektion jämfört med de oinfekterade kalvarna. Vid de tidigare provtagningstillfällena var antalet eosinofiler i dessa tarmavsnitt på liknande nivåer som hos de oinfekterade kalvarna. I den främsta delen av tunntarmen var antalet eosinofiler i slemhinnan under hela experimentet på nivåer jämförbara med de hos de oinfekterade kalvarna.



Figur 1. Antal eosinofiler i tre tarmavsnitt (främre, mitten och bakre) hos kalvar 1, 3, 5 och 14 dagar efter experimentell lungmaskinfektion. Punkterna representerar värdena 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. 2). Resultaten från denna undersökning visade att hos de infekterade kalvar som avlivades dag 14 var antalet eosinofiler var 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. 2).



Figur 2. 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 medelvärdet 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 slemhinnan i tunntarmen och i kröslymfknotorna därför att 1) larverna måste passera genom tarmslemhinnan för att infektera värdjuret och det finns indikationer att detta sker i tunntarmen ⁽¹⁵⁾, 2) man anser att larverna migrerar genom kröslymfknotorna då de förflyttar sig från tarmen till lungorna under infektionens första fas ⁽¹⁵⁾ och 3) kröslymfknotorna är viktiga ”knytpunkter” för immunsvaret i tarmen och bukhålan där immunsystemet först träffar på parasiten vid infektion.

Vid den histologiska undersökningen av slemhinnan i tunntarmen, krös-, tracheobronkial- och flanklymfknotor 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 och uttryck av interleukin-4 (IL-4) mRNA ses i lungorna ^(5, 10). Ett ökat antal aktiverade eosinofiler har också observerats i mediastinallymfknotor från möss som infekterats med masken *Trichuris muris* som koloniserar mössens blindtarm ⁽¹¹⁾. 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 som ”krigare” 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 speciella receptorer (s.k. pattern recognition receptors) kan känna igen infektionsämnen och producera olika cytokiner t.ex. IL-4 ⁽¹⁵⁾. Dessa celler har sålunda även en funktion i regleringen av specifika immunsvar. Våra resultat visar att eosinofiler inte enbart rekryteras till den maskinfekterade vävnaden och indikerar att eosinofiler har en roll i regleringen av immunsvaret mot *D. viviparus*. En tänkbar funktion är antigenpresentation då eosinofiler i lymfknotorna 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 ⁽¹²⁾.

I denna studie observerades inga tydliga cellreaktioner i infektionens tidiga del, dag 1, 3 eller 5 efter infektion. Detta kan bero på att eventuella tidiga reaktioner på larvernas invasion i vävnaden var mycket lokala och att dessa helt enkelt missades vid provtagningen då ett relativt litet antal larver användes vid infektionen. Det kan också vara så att lungmasklarverna har förmåga att undvika att kännas igen av immunsystemet eller att nedreglera delar av det tidiga immunförsvaret. Sådana egenskaper har tidigare beskrivits vid andra maskinfektioner ⁽¹³⁾. Vi har dock vid en tidigare analys av cytokin-mRNA uttryck i vävnadsprover från lymfknotor i detta experiment funnit indikationer på tidiga svar med t.ex. IL-4 ⁽¹⁴⁾. Det är alltså möjligt att kalvarnas immunsystem aktiveras tidigt i infektionen trots att ett tydligt eosinofil-svar inte observeras förrän maskarna etablerats i lungorna.

Flanklymfknotorna 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 lymfknotor påverkas mer generellt under lungmaskinfektion än vad vi först antog. Då flera av immunsystemets celltyper ständigt är i cirkulation bland kroppens sekundära lymfoida organ kan dessa resultat eventuellt bero på migration av aktiverade eosinofiler via t.ex. blodet. Alternativt kan maskprodukter och/eller celldebris som transporterats från infekterad vävnad via lymfan till perifera lymfknotor ha stimulerat rekrytering av eosinofiler. Maskinfektionen kan också ha inducerat en inflammatorisk reaktion som lett till systemisk aktivering av immunsystemet.

Sammantaget visar vår studie att immunsystemet aktiveras mer generellt vid en infektion med nötkreaturens lungmask än vad som tidigare antagits och vi observerade 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

Preliminära resultaten från detta projekt har hittills presenteras som en poster vid en internationell veterinärimmunologisk 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*. 4th European Veterinary Immunology Workshop (EVIW), Edinburgh, UK.

Holmgren, S., Lundén, A., Sandros, B., Tråvén, M. & Wattrang, E. 2013: 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, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Sciences, SLU, Uppsala.

De här sammanställda resultaten kommer, tillsammans med resultaten från andra delprojekt, att publiceras i någon internationell vetenskaplig peer-review tidskrift.

Slutsatser

För att kunna utveckla nya hållbara kontrollmetoder för lungmaskinfektion hos nötkreatur behövs utökad kunskap om hur skyddande immunitet utvecklas hos värdjuren. Resultaten från detta projekt bidrar med sådan kunskap. Vi har funnit att djuren reagerar med ett påtagligt immunsvaret när maskarna etablerats i lungorna. Det är rimligt att anta att ett sådant svar med aktivering av eosinofiler skall eftersträvas för att erhålla skydd med hjälp av vaccination.

Resultatförmedling till näringen

Förutom ovan nämnda vetenskapliga publikationer hoppas vi få tillfälle att presentera resultaten i lämplig svensk facklitteratur, vid branschmöten och i populärvetenskaplig form.

Referenser

1. Jørgensen, R.J. and C.P. Ogbourne, *Bovine dictyocauliasis: a review and annotated bibliography*. Vol. 8. 1985, London: Commonwealth Agricultural Bureaux.
2. Höglund, J., C. Svensson, and A. Hessle, *A field survey on the status of internal parasites in calves on organic dairy farms in southwestern Sweden*. *Vet Parasitol*, 2001. **99**(2): p. 113-28.
3. Höglund, J., S. Viring, and M. Törnqvist, *Seroprevalence of Dictyocaulus viviparus in first grazing season calves in Sweden*. *Vet Parasitol*, 2004. **125**(3-4): p. 343-52.
4. McKeand, J.B., *Vaccine development and diagnostics of Dictyocaulus viviparus*. *Parasitology*, 2000. **120 Suppl**: p. S17-23.
5. Hagberg, M., E. Wattrang, R. Niskanen, M. Tråvén, J. Höglund, and A. Lundén, *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, 2005. **27**(5): p. 151-61.
6. Johnson, D.R., J. Sales, and J.B. Matthews, *Local cytokine responses in Dictyocaulus viviparus infection*. Vet Parasitol, 2005. **128**(3-4): p. 309-18.
 7. Kooyman, F.N., A.P. Yatsuda, H.W. Ploeger, and M. Eysker, *Serum immunoglobulin E response in calves infected with the lungworm Dictyocaulus viviparus and its correlation with protection*. Parasite Immunol, 2002. **24**(1): p. 47-56.
 8. Scott, C.A., J.B. McKeand, and E. Devaney, *A longitudinal study of local and peripheral isotype/subclass antibodies in Dictyocaulus viviparus-infected calves*. Vet Immunol Immunopathol, 1996. **53**(3-4): p. 235-47.
 9. Diaz, A. and J.E. Allen, *Mapping immune response profiles: the emerging scenario from helminth immunology*. Eur J Immunol, 2007. **37**(12): p. 3319-26.
 10. Holmgren, S., M. Hagberg Gustavsson, A. Lunden, and E. Wattring, *Cytokine mRNA expression in bronchoalveolar lavage cells during Dictyocaulus viviparus infection in calves*. Parasite Immunol, 2014. **36**(2): p. 78-86.
 11. Svensson, L., B. Lilliehook, R. Larsson, and A. Bucht, *gammadelta T cells contribute to the systemic immunoglobulin E response and local B-cell reactivity in allergic eosinophilic airway inflammation*. Immunology, 2003. **108**(1): p. 98-108.
 12. Rothenberg, M.E. and S.P. Hogan, *The eosinophil*. Annu Rev Immunol, 2006. **24**: p. 147-74.
 13. Nutman, T.B., *Looking beyond the induction of Th2 responses to explain immunomodulation by helminths*. Parasite Immunol, 2015. **37**(6): p. 304-13.
 14. Holmgren, S., A. Lundén, B. Sandros, M. Tråvén, and E. Wattring. *Interleukin-4 and IL-10 mRNA expression and eosinophil recruitment in mesenteric lymph nodes from calves infected with the cattle lungworm, Dictyocaulus viviparus*. in *4th European Veterinary immunology Workshop*. 2012. Edinburgh, UK.
 15. Jarrett, W.F.H., McIntyre, W.I.M., Jennings, F.W., and Mulligan, W. *The natural history of parasitic bronchitis with notes on prophylaxis and treatment*. Vet Rec, 1959, 69,1329-1336.