



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

**Fakulteten för veterinärmedicin
och husdjursvetenskap**

Institutionen för biomedicin och veterinär
folkhälsvetenskap

***Toxocara canis* hos nyfödda valpar**

Immunologiska faktorer vid överföring från tik till foster

Anna Emlén

*Uppsala
2017*

Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen

Delnummer i serien 2017:16

***Toxocara canis* hos nyfödda valpar**

Immunologiska faktorer vid överföring från tik till foster

Toxocara canis in newborn puppies

Immunological factors during transmission from bitch to fetuses

Anna Emlén

Handledare: Magnus Åbrink och Caroline Fossum, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Examinator: Eva Tydén, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Omfattning: 15 hp

Nivå och fördjupning: grund nivå, G2E

Kurstitel: Självständigt arbete i veterinärmedicin

Kurskod: EX0700

Program: Veterinärprogrammet

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2017

Serienamn: Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen

Delnummer i serie: 2017:16

Elektronisk publicering: <http://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: *toxocara canis*, immunförsvar, hund, dräktighet, valp

Keywords: *toxocara canis*, immune response, dog, pregnancy, puppy

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning	1
Summary	2
Inledning.....	3
Material och metoder	3
Litteraturoversikt.....	4
Toxocara canis: Livscykel och infektionsvägar	4
Livscykel	4
Infektionsvägar.....	4
Immunförsvar mot parasiten	5
Generellt vid maskinfektioner.....	5
Immunsvaret mot T. canis.....	5
Utveckling av immunitet.....	6
Immunförsvaret vid dräktighet.....	6
Hur parasiten undviker immunförsvaret	7
Ömsning av cutikula.....	7
Immunmodulering	8
Reaktivering av larver	8
Diskussion	9
Äldre forskning och litteratur	9
Mest troliga mekanismer för att undvika immunsvaret, samverkan mellan dessa.....	10
Reaktivering och vad det beror på.....	11
Möjlighet att eliminera infektion innan spridning till valpar	11
Slutsats	12
Referenslista	13

SAMMANFATTNING

Hundens spolmask *Toxocara canis* är en vanlig parasit hos unga valpar som i värsta fall kan orsaka dödsfall. Smittan sker framförallt intrauterint från den dräktiga tiken som bär inkapslade larver i sina vävnader. Dessa reaktiveras kring dag 40 i dräktigheten och vandrar över placenta till foster. Vid oral smitta kan larver anta två olika vägar i kroppen, antingen den tracheala vandring som krävs för att fullfölja sin livscykel, eller en somatisk vandring där de istället kapslas in i kroppens vävnader i väntan på dräktighet. Vid dräktighet supprimeras immunförsvaret naturligt och tros bidra till en reaktivering av larver i vävnadsarrest, som då vandrar över till valparna.

I den här uppsatsen diskuteras vilka mekanismer masken använder sig av för att undvika immunförsvaret i vävnadsarrest, vad reaktivering av larver i vävnaden beror på samt om det finns någon möjlighet att undvika intrauterin smittspridning till valpar.

Immunförsvaret mot *Toxocara canis* är i huvudsak ett Th2 svar med ökade IgE nivåer och eosinofili. Mekanismer som masken använder sig av för att undvika immunförsvaret innefattar bland annat en ömsning av det yttersta lagret av cutikula med eventuella antikroppar, komplement och celler som fäst till det. Parasiten har även immunmodulerande mekanismer såsom en produktion av morfinliknande substanser som kan hämma leukocytproliferation, samt C-type lectins. Dessa tros framför allt blockera bindningen av leukocyter till kärlendotel och därmed hämma de tidiga stegen av inflammation.

Det är inte fastställt vad reaktiveringen av larver i vävnad beror på, men den antas vara associerad med de ökade hormonnivåerna hos tiken i samband med dräktighet. Det diskuteras ifall TGF- β agerar som en signalsubstans masken kan känna igen, om det är prolaktin som direkt inducerar reaktivering, eller om en hittills okänd signalväg finns. Även immunsuppressionen vid dräktighet föreslås vara en möjlighet till att larver reaktiveras. Det är osäkert vilka receptorer masken använder och vilka substanser den kan känna igen.

Att undvika smittspridning till valpar är svårt i dagsläget eftersom mekanismerna för reaktivering inte är fastställda. Larverna i vävnadsarrest är svåra att komma åt farmakologiskt och den enda nuvarande metoden att säkert undvika överföring från en smittad tik är kontinuerlig behandling med anthelmintika i samband med dräktighet. Forskare hoppas kunna utveckla ett vaccin för att nå larver i vävnaden.

SUMMARY

The canine roundworm *Toxocara canis* is a common parasite in young puppies and can in worst cases lead to death. The worm is most often transmitted in utero from the pregnant bitch carrying infectious larvae in her tissues. These larvae are reactivated around day 40 of pregnancy, after which the larvae start migrating to the puppies. Oral infection with *Toxocara canis* allows larvae to take one of two different paths in the body. Either the tracheal route demanded to fulfill its life cycle or a somatic migration where they instead settle in tissues, awaiting pregnancy. During pregnancy, the immune system is naturally suppressed and is thought to be a contributing factor for reactivation of larvae in tissue arrest.

This thesis discusses which mechanisms the parasite uses to avoid the immune system in tissue arrest, what causes reactivation in tissue and if there is any possibility to avoid intrauterine transmission to puppies.

The immune response against *Toxocara canis* majorly consists of a Th2 response with elevated IgE levels and eosinophilia. Mechanisms used by the worm to avoid the immune system includes a shedding of the outer layer of cuticula with any antibodies, complement products or cells attached to it. *Toxocara canis* also has mechanisms to modulate the immune response, for example a production of morphine like substances to inhibit proliferation of leucocytes, or C-type lectins that are thought to block the binding of leucocytes to vascular endothelium and therefore inhibit the early steps of inflammation.

It has not been settled what causes the reactivation of larvae in tissue, but it is assumed to be associated with the raise in hormone levels connected to pregnancy. It is discussed whether TGF- β acts as a signalling substance the parasite can recognize, if prolactin directly induces reactivation, or if a so far unknown signalling pathway exists. The natural immune suppression during pregnancy has also been suggested as a cause of larvae reactivation. It is not settled which receptors the worm uses or which substances it is capable of recognizing.

As of today, avoiding transmission to puppies is difficult since the mechanisms for reactivation are not settled. The tissue arrested larvae are difficult to reach with pharmacological methods and the only current method to securely avoid transmission from an infected bitch is continuous treatment with anthelmintics during pregnancy. Scientists hope to be able to develop a vaccine which can reach larvae in tissue.

INLEDNING

Hundens spolmask (*Toxocara canis*) är en vanlig parasit hos framför allt valpar. Hos vuxna hundar är prevalensen av äggutskiljande maskar låg, eftersom parasiten där inte kan fullfölja sin livscykel som inkluderar en migration genom kroppen. *T. canis* är en zoonos som även kan smitta till människa, där larverna vandrar ut i vävnader och ger så kallad visceral larva migrans (Läkemedelsverket, 2014). Infektion hos vuxna hundar ger sällan mer än en mild enterit, medan valpar kan få symptom som förstoppning eller diarré, kräkningar, svullen buk, anemi, raktis och dålig tillväxt. Maskar kan även penetrera levern och gå ut i bukhålan där de orsakar akut peritonit. Den vanligaste dödsorsaken för infekterade valpar är tarmruptur med påföljande peritonit på grund av maskbördan i tarmen (Schnieder *et al.*, 2011).

Spolmask smittar framför allt till valpar redan i livmodern och det är därför svårt att förhindra överföring till valpar. Hos tiken kan larver kapsla in sig i vävnaden och vänta på dräktighet, då de reaktiveras och vandrar över till foster (Webster, 1958b). Larverna inkapslade i vävnaden är svåra att komma åt med farmakologisk behandling men även för immunförsvaret (Loukas *et al.*, 2000).

I den här uppsatsen diskuteras vilka mekanismer *Toxocara canis* använder för att undvika immunförsvaret, samt vad reaktivering av larver i vävnaden beror på och om det går att undvika smittspridning från tiken till valpar.

Idag behandlas spolmaskinfektion med anthelmintika. Det finns ett antal läkemedelsklasser med indikation för spolmask hos hund, och resistensläget är idag inget större problem (Höglund, 2014). Trots detta är risken för resistens alltid överhängande. Syftet med den här uppsatsen är därför att undersöka hur långt forskningen kommit kring maskens infektionsvägar, samt eventuella möjligheter att eliminera infektion innan överföring till valpar. Detta skulle kunna minska användningen av anthelmintika för behandling av spolmask.

MATERIAL OCH METODER

Material har samlats från artiklar genom sökning i databaserna Web of Science, PubMed, Scopus och Google Scholar, med vikt på de första två. Sökord som använts inkluderar: (dog OR dogs OR canine), (immune response OR immune system OR immunity), (puppy OR puppies OR pups), (toxocara canis). Även äldre litteratur som inte funnits tillgänglig online har använts efter att ha hittats i dessa databaser och sedan letats upp i fysisk upplaga.

LITTERATURÖVERSIKT

***Toxocara canis*: Livscykel och infektionsvägar**

Toxocara canis är hundens spolmask och tillhör nematoderna, överfamilj Ascaridoidea. Vuxna maskar blir upp till 10-18 cm långa och lever i tunntarmen hos framför allt valpar. Ägg utsöndras i faeces och mognar i omgivningen till infektiöst stadie (L3). Dessa infektiösa ägg kläcks i tarmen och larverna vandrar i kroppen via lever till lungor, hostas upp i trachea och sväljs ned. Dessa larver är knappt en millimeter stora men utvecklas i tarmen till vuxna individer som lägger ägg. Hos äldre djur sker sällan tracheal vandring utan larver kapslar in sig i vävnaden.

Livscykel

Utvecklingen av infektiösa ägg sker utanför värdjuret och tar under optimala förutsättningar ca 6 dagar (Webster, 1958b). När äggen intas oralt av ett värdjur kläcks de i duodenum där larver kommer ut i tarmen i L2 fas och penetrerar tarmväggen för att påbörja sin vandring i kroppen. Larverna tar sig optimalt via lymfkärl och regionala lymfknotor till levern inom 24 timmar. Därifrån vandrar de vidare till lungorna där de växer till i 3-5 dagar. Från lungorna kan larver bege sig två vägar i kroppen; antingen den tracheala vandring som krävs för att fullfölja sin livscykel, eller en somatisk vandring där de migrerar ut i vävnaden genom att ta sig tillbaka till hjärtat och via cirkulationen ut i olika vävnader där de kapslar in sig. Den somatiska vandringen anses vara mer frekvent hos hunddjur än handjur, då hanar visats ha generellt högre antal vuxna maskar i tarmen än honor (Webster, 1958b; Webster, 1958a).

De larver som antar den somatiska migrationen har inget visat predilektionsställe, utan kapslar in sig där de lämnar cirkulationen. Anledningen till att larver antar en somatisk vandring är inte helt fastställd, men diskuteras bero på värdjurets utvecklingsfysiologi eftersom den tracheala vandringen framförallt sker hos individer under 6 månaders ålder (Webster, 1958b). Enligt Overgaauw *et al.* (1998) blir äldre djur inte infekterade som effekt av en utvecklad immunitet.

De larver som stannar i vävnaden, så kallad vävnadsarrest, utvecklas inte längre än till L2 stadiet (Webster, 1958a; Webster, 1958b). De har dock visat sig vara metaboliskt aktiva även i vävnadsarresten, då de utsöndrar en mängd glykoproteiner som agerar excretory/secretory (ES) antigen (Loukas *et al.*, 2000; Maizels & Page, 1990). Parasiten vill gärna producera dessa ES, varav ett har visats vara ett elastasliknande proteas som tros användas för vävnadsdestruktion vid migration (Maizels & Page, 1990).

Infektionsvägar

Vuxna hundar etablerar sällan en infektion av *T. canis*, eftersom eventuella larver som kläcks i tarmen genomgår en somatisk vandring och fastnar i vävnaden. Ändå kan tikar direkt efter partus urskilja ägg. Detta menar Sprent (1961) beror på att tikarna inte bara sväljer ägg från sina valpars faeces, utan även kan få i sig redan kläckta larver som antingen kräks upp av valparna eller inte orkar hålla sig kvar i tarmen, och därmed infekteras av dessa. En annan teori är att immunsuppressionen i samband med dräktighet och laktation tillåter larver att genomgå

tracheal vandring och kan på så sätt fullända sin livscykel även i vuxna individer (Lloyd *et al.*, 1983).

T. canis smittar till valpar nästan uteslutande intrauterint, då upp till 98% av överföringen sker denna väg jämfört med endast 2% galaktogent (Burke & Roberson, 1985b). Om tiken infekteras efter förlossning ökar den galaktogena överföringen något, upp till 10%, men den intrauterina överföringen kvarstår som den viktigaste smittvägen till valpar (Burke & Roberson, 1985a). Larver kan vandra över placenta på två sätt. Antingen hittar de över direkt under sin somatiska vandring, eller så reaktiveras larverna i honans vävnader under dräktighet och söker sig över placenta (Webster, 1958b). Studier har visat att kvantiteten larver som aktiveras i vävnaden vid dräktighet beror av tiden mellan infektion och partus. Ju kortare tid, desto kraftigare reaktivering (Burke & Roberson, 1985a).

Hos nyfödda valpar genomgår larverna tracheal vandring och blir vuxna i tarmen inom 2 veckor (Lloyd *et al.*, 1983). Det är inte helt klarlagt hur långt larverna vandrar i valpen innan födseln, men troligen inte längre än till lungorna, då intestinal infektion inte etableras förrän 4-5 dagar efter födseln (Webster, 1958b).

Immunförsvar mot parasiten

Generellt vid maskinfektioner

Vid maskinfektioner riktas det adaptiva immunförsvaret framförallt mot ett Th2 svar. Th2 styr i huvudsak mot antikroppsproduktion och är vanligast vid extracellulära parasitinfektioner och allergi. Vid Th2 dominerar IL-4 (som motsvarande inhiberar Th1), IL-5, IL-10 och IL-13. Alternativet, Th1 svar, inducerar istället makrofager och cellsvaret i form av framför allt NK-celler och cytotoxiska T-celler och agerar i huvudsak intracellulära infektioner. Cytokinerna som dominerar vid Th1 svar är IFN- γ (som även inhiberar Th2), IL-2 samt TNF- α och β .

Komplementsystemets alla tre aktiveringsvägar kan triggas av invasiva maskar, och verkar framförallt genom att kemotaktiskt locka dit eosinofiler och mastceller. Eosinofiler aktiveras inte genom direkt bindning till nematoder, utan aktiveras indirekt av antigen, andra celler eller komplement, alternativt stimuleras av den vävnadsskada som uppkommer till följd av migrationen (De Veer *et al.*, 2007).

Lektiner är associerade med igenkänning av nematoder och kan styra mot en allergitypsreaktion. Bland annat dendritiska celler (DC) kan producera kalciumberoende lektiner (C-type lectins). Många nematoder producerar antigen som styr DC mot ett Th2 svar genom att blockera IL-12 som stimulerar differentiering av Th1. Även NK-celler reagerar framförallt genom IL-12 och inhiberas därmed i samband med detta (De Veer *et al.*, 2007).

Immunsvaret mot *T. canis*

Vid tunga infektioner av *T. canis* har framför allt inducerat Th2 svar med ökade IgE nivåer samt eosinofili rapporterats, tillsammans med höga koncentrationer av Th2 cytokiner som IL-4, IL-5 och IL-13 (Golabi *et al.*, 2016). In vitro jämnar Th svaret snabbt ut sig till en balans mellan Th1 och Th2, men antas in vivo riktas åt Th2 under en längre tid (Valli *et al.*, 2010). *T. canis*

ger ett starkt initialt IL-5 svar som inducerar framförallt eosinofilaktivering, men även höga nivåer av IL-4, som inducerar B-cellsdifferentiering och Ig-klass switch har noterats (Maizels, 2013). Antikroppar mot *T. canis* har visat sig vara av sorterna IgE, IgG och IgM, men det är oklart om alla sorterna hjälper till vid eliminering av parasiten (Maizels, 2013; Reiterova *et al.*, 2003; Barriga, 1988).

Eosinofiler, som i första hand är inblandade vid angrepp av endogena parasiter, har visat sig vara mest effektiva mot larvstadier och behöver ett samarbete med komplement eller antikroppar för att agera mot infektionen (Meeusen & Balic, 2000). Även komplementsystemet har observerats vara väldigt effektivt mot parasiter i sig självt och kan i vissa fall döda dem utan hjälp från antikroppar eller cellsvaret (Meeusen & Balic, 2000).

Utveckling av immunitet

Utveckling av immunitet är inte utbrett studerat, men verkar främst ske mot maskens utvecklingsstadier (Barriga, 1988). En studie av Fernando *et al.* (1973) visar att i immuniserade valpar som återinfekteras utvecklas larven inte förbi L2 även om den vandrar, men i valpar som infekteras för första gången kan masken fullfölja sin livscykel. Om de däremot fick i sig L4 larver så triggades inte det förvärvade immunsvaret. En studie av Barriga (1988) visar att valpar är långsamma att utveckla ett specifikt immunsvaret mot parasitinfektionen, vilket uppkommer först efter cirka en månad efter födseln. En studie föreslår att närvaro av *T. canis* antigen under utvecklingen av immunförsvaret ger ett sämre svar mot parasitantigen. Även T-cells svaret ökar med individens ålder, vilket gör unga individer mer utsatta (Reiterova *et al.*, 2003). Vidare anses kön anses påverka immuniteten, då hanar har observerats utveckla ett immunsvaret senare i livet (ca 36 månader), medan tikarnas immunsvaret kommer igång redan inom 6 till 36 månader (Webster, 1958b).

Immunförsvaret vid dräktighet

Modulering av immunförsvaret är essentiellt för att upprätthålla dräktighet och skydda fostret som ännu inte utvecklat ett kompetent immunförsvaret (Schneider *et al.*, 1996). Immunsuppressionen vid dräktighet definieras enligt Lloyd *et al.* (1983) som ett minskat svar från lymfocyter i samband med stimulering av antigen, där maximal reduktion av lymfocyter sker vid partus. Immunsuppressionen pågår från cirka 40 dagar innan partus till 40 dagar efter, vid slutet av laktationen (Lloyd *et al.*, 1983).

TGF- β under dräktighet

Ett antal cytokiner kan syntetiseras av livmodern under dräktighet, exempelvis IL-10 och TGF- β som båda verkar nedreglerande på immunförsvaret (Schneider *et al.*, 1996). TGF- β , transforming growth factor, finns i tre varianter hos däggdjur och alla förekommer i fostret under utvecklingen. TGF- β reducerar T-cells- och B-cellsproliferation genom att inducera apoptos hos dessa celltyper, och reglerar makrofagaktiviteten till ökad apoptos och minskad cytotoxicitet. T-celler i apoptos utsöndrar också TGF- β , vilket bidrar till den immunsuppressiva miljön.

I amnionsäcken finns stora mängder av TGF- β 2 som troligtvis produceras av livmodern, där mRNA nivåer för TGF- β 2 är höga. TGF- β 2 återfinns även i höga koncentrationer i tikens plasma under dräktigheten, vilket antas bero på den höga produktionen i livmodern. TGF- β 1 agerar framförallt systemiskt i kroppen medan TGF- β 2 agerar lokalt och inaktiveras genom plasmaproteinbinding om det kommer ut i serum. Det är därför inte rimligt att TGF- β 2 har någon funktion i moderns cirkulation (Schneider *et al.*, 1996). TGF- β 2 är också den dominerande typen som utsöndras i mjölk. Alveolära celler i mjölkkörteln har transkript för alla tre typer av TGF- β , men endast typ 2 syntetiseras under graviditet och laktation. Utsöndringen i mjölk tros ha ett samband med prolaktinfrisättning, då både nivåerna av prolaktin och TGF- β 2 stimuleras att stiga ju fler diande ungar som finns. Troligtvis verkar östrogen direkt stimulerande på TGF- β 2 produktionen (Schneider *et al.*, 1996).

Dräktighet och T. canis infektion

En tydlig minskning i eosinofilin har observerats vid experimentell infektion med *T. canis* hos dräktiga tikar i jämförelse med icke dräktiga. En viss ökning av eosinofilalet kunde ses i direkt anslutning till partusperioden, vilket antas bero på att somatiska larver reaktiveras i denna period och påbörjar migration till foster (Overgaauw *et al.*, 1998; Lloyd *et al.*, 1983). Även det adaptiva immunförsvaret mot parasiten är nedsatt vid dräktighet. Infekterade musmammor hade vid dräktighet ett supprimerat T-cellssvar som hastigt ökade igen efter förlossning. Anledningen till att T-cellsnivåerna hålls låga under dräktighet är att för mycket Th1 svar kan ge missfall då dessa celler reagerar på foster som något främmande. IL-5 skyddar mot detta genom att hela tiden hålla svaret riktat mot en låg nivå av Th2 under dräktigheten (Reiterova *et al.*, 2003). Det finns anledning att tro att immunsuppressionen påverkar graden av infektion även hos lakterande tikar. Detta då tikar observerats eliminera sin egen infektion inom 7 dagar efter avslutad laktation, samt att lymfocyttallet är uppe i normala nivåer inom 10 dagar (Lloyd *et al.*, 1983).

Hur parasiten undviker immunförsvaret

Ömsning av cutikula

T. canis har en extracellulär cutikula som täcker hela kroppen, med troligt ursprung i munhåla och esofagus. Utsidan av cutikulan har en så kallad "fuzzy coat", som består av utstickande molekyler och är cirka 10-20 nm tjock (Maizels & Page, 1990).

Cutikulans yta är flyktig; antikroppar som binder till den kastas snabbt av i naturlig kroppsmiljö, tillsammans med det antigen de bundit till. Parasiten kan på samma sätt skaka av sig en granulocytattack. Eosinofiler fäster till larver med hjälp av antikroppar eller komplement och induceras att degranulera, men masken ömsar då yttersta lagret av cutikula och tar sig därifrån inom några timmar utan större skador. Larverna är även duktiga på att ta sig förbi komplementsystemet på det här sättet (Maizels *et al.*, 2000; Maizels & Page, 1990).

Ytantigenen i cutikulan är samma som de ES molekyler den frisätter omkring sig. De antigen som är mest frekventa finns inte där när larven kläcks, utan utvecklas först efter något dygn (Maizels & Page, 1990).

Immunmodulering

T. canis verkar immunosupprimerande (Barriga, 1988) på ett antal olika sätt. En studie av Golabi *et al.* (2016) har kommit fram till att *Toxocara canis* har receptorer för morfinliknande substanser som de även kan producera. Morfin verkar smärtstillande och immunosupprimerande genom att binda in till antingen opioida μ -receptorer eller direkt till CNS. Vid bindning till CNS induceras bildning av immunosupprimerande substanser som glukokortikoider och noradrenalin som verkar genom att hämma leukocyter. Opioider kan dessutom inducera sympatiska nervsystemet och därigenom påverka lymfoida organ att bilda katekolaminer, som inhiberar NK-celler, makrofager och lymfocyter. *T. canis* kan även påverka det adaptiva immunförsvaret genom att minska framförallt T-cellsproliferation.

Larverna som befinner sig i vävnadsarrest kan undvika immunförsvaret genom att släppa ut antigen, bland annat så kallade kalicumberoende lektiner, C-type lectins (Loukas *et al.*, 1999). Värdens egna C-type lectins kan selektivt driva immunsvaret mot ett Th1 eller Th2 svar genom att till exempel binda in till endast den ena typen av T-hjälpare och inducera proliferation (Loukas *et al.*, 2000).

C-type lectins har en funktionell kolhydratbindande enhet och de flesta fungerar som cellytereceptorer inblandade i immunaktivering. Parasitens C-type lectins styrs framförallt av antigenen TES-32 och TES-70, som är bland de mest frekventa antigen parasiten producerar. TES-32 är ett lektin som binder monosackarider (Loukas *et al.*, 2000) och den kolhydratbindande delen har visats ha upp till 30% likhet med mannosreceptorer på däggdjurs makrofager. En viktig strukturell skillnad finns dock i bindningssiten. Där däggdjurs mannosbindande lektiner har en histidin har TES-32 en cystein, vilket ger TES-32 en mer öppen bindingssite (Maizels *et al.*, 2000). TES-32 liknar även lågaffinitets IgE-receptorn CD23 (Loukas *et al.*, 2000). TES-70 binder kalciumberoende till framförallt cellyteglykaner på epitelceller (Loukas *et al.*, 2000; Maizels *et al.*, 2000), men det är inte fastställt exakt vilka ligander på värdcellerna som lektinerna binder till (Loukas *et al.*, 2000).

Parasitens lektiner har mycket större likhet med däggdjurens lektiner än de hos närmare besläktade nematoder som *Caenorhabditis elegans* (Loukas *et al.*, 2000). De tros därför kunna agera kompetitivt på cellyteseletiner och på så vis blockera leukocytadhesion till kärlendotel och bromsa de första stegen av inflammation (Maizels *et al.*, 2000). De tros även kunna vara ett sätt för parasiten att styra T-cellssvaret mot Th2 (Loukas *et al.*, 2000).

En studie av Barriga (1988) föreslår att *T. canis* kan ha ytterligare en effekt på det adaptiva svaret genom att störa T-cellssvaret och ge en polyklonal stimulering av antikroppsproduktionen. Detta menar författaren inhiberar bildning av specifika antikroppar mot parasitantigenet.

Reaktivering av larver

Larver i vävnadsarrest vaknar upp och börjar migrera till foster i samband med dräktighet (Chavez-Guitron *et al.*, 2016). Då reaktivering sker i samband med dräktighet har det länge spekulerats att reaktiveringen har med hormoner eller nedsatt immunförsvaret att göra (Webster,

1958a). Det har bland annat visats att prolaktinjektioner gav en ökad utvandring av larver hos möss (Chavez-Guitron *et al.*, 2016; Overgaauw *et al.*, 1998). Även Jin *et al.* (2008) har visat att prolaktinstimuli hos möss ökar en larvmigration till framför allt mjölkkörtlar, och menar att detta kan vara relaterat till prolaktins tidigare visade immunmodulerande funktion vid ett antal parasitinfektioner. I en studie av Chavez-Guitron *et al.* (2016) har det visats in vitro att *T. canis* larver har prolaktinreceptorer som kan öka i uttryck vid stimuli av prolaktin, samt att tillväxthastigheten och aktiviteten hos larverna ökade i samband med detta. Aktiviteten och tillväxten var som högst vid de koncentrationer som normalt finns i kroppen hos en dräktig tik vid den tidpunkt som larver framförallt reaktiveras. Den ökade motiliteten antas motsvara viljan att migrera i kroppen. Författarna föreslår att larverna anpassat sig till att känna igen hundens prolaktin som signalsubstans, men signalvägarna är inte klarlagda. De poängterar även att andra hormoner än prolaktin kan vara inblandade.

Det finns dock studier som menar att hormoner inte är den direkta nyckeln till reaktivering. En studie av Arasu (2001) har undersökt *Ancylostoma caninum*, som är hundens hakmask och liknar *Toxocara* till stor del då även den kan kapsla in sig i vävnad och vänta på framförallt laktation. Författaren har kommit fram till att hormoner i sig inte triggar reaktivering av larver, då de inte verkar ha några receptorer för steroida könshormoner. Däremot har man hittat receptorer för TGF- β i besläktade *C. elegans*, och menar därför att det är en möjlig signalväg. Då prolaktin och östrogen visats stimulera TGF- β under sen graviditet argumenterar författaren att det inte är hormonerna i sig, utan troligtvis en receptor för värdens TGF- β som stimulerar reaktivering i vävnaden. Även *T. canis* nämns som exempel på en parasit som skulle kunna använda sig av samma signalväg, då livcykeln är mycket lik den hos *A. caninum*.

En tredje möjlighet anser Torina *et al.* (2005) är att immunsuppressionen under dräktighet är medierad av ökade nivåer av IL-10 och minskade IFN- γ kring partus. Författarna diskuterar kring ifall detta kan underlätta reaktiveringen av parasiter eftersom förmågan att bilda granulom minskar vid dessa förutsättningar.

DISKUSSION

Äldre forskning och litteratur

Då mycket forskning på området är gammal (uppåt 50 år) finns en del problem kring informationssökningen. Många artiklar hänvisar exempelvis till larvernas vandrande L2 stadiet, vilket i modernare tid visat sig vara L3 stadiet. Detta kan ge en viss svårighet att upprepa försök som gjorts, men även att förstå artiklar rätt vad gäller framförallt immunreaktioner då det är oklart vilket stadiet som egentligen avses.

En intressant aspekt är att många fenomen som ifrågasätts i studier från 50- och 60-tal fortfarande inte klarats upp. Exempelvis finns fortfarande ingen förklaring till att larver överhuvudtaget vandrar somatiskt. Vissa delar som rör immunförsvaret verkar också ha lämnats orörda, exempelvis studien av Barriga (1988) gällande polyklonal stimulering av

antikroppsproduktionen som inte verkar ha följts upp med vidare studier. Detta kan tänkas bero på svårigheter att studera fenomenet.

En förklaring till detta diskuteras i (Schnieder *et al.*, 2011), som menar att många experiment för att fastställa maskens vandring i kroppen inte skulle accepteras av dagens syn på djurvälstånd och bestämmelser kring djurförsök. Eftersom det finns behandling mot spolmask finns ingen anledning annat än nyfikenhet att veta exakt vad som händer i hunden. Man kan dock fråga sig huruvida intresset för forskning inom området kommer stiga om resistensläget mot anthelmintika, som i dagsläget är gott (ESCCAP, 2010), försämras.

Mest troliga mekanismer för att undvika immunsvaret, samverkan mellan dessa

T. canis har utvecklat ett effektivt sätt att kasta av sig allt som binder till den, inklusive komplement, granulocyter och antikroppar (Loukas *et al.*, 2000; Maizels & Page, 1990). Att masken inducerar ett tidigt eosinofilsvär (Maizels, 2013), kan därmed tänkas bero på att larverna har ett väl fungerande sätt att bli av med eosinofiler, och att det därför är en gynnsam cell att inducera proliferation av. Från det adaptiva immunsvaret agerar många olika typer av antikroppar vid infektion av *T. canis* (Maizels, 2013; Reiterova *et al.*, 2003; Barriga, 1988), men frågan är om alla induceras av masken själv. Om många olika antikroppar utan fastställd funktion förekommer skulle det kunna styrka Barriga (1988) i sina resultat att ett polyklonalt svar induceras. Då fäster ingen antikropp perfekt, vilket bör underlätta för masken att kasta av sig dem.

Morfinproduktionen är en ny upptäckt och skulle kunna bidra till immunsuppressionen som redan finns vid dräktighet (Golabi *et al.*, 2016). En anledning till att maskens immunsupprimerande förmåga inte undersökts tidigare skulle kunna tänkas vara att kroppen redan supprimerat sitt eget immunförsvar, då de flesta studier gjorts på dräktiga tikar och det därmed antagits bero enbart på dräktigheten. Framförallt leukocythämningen till följd av morfinsubstanser kan styrka detta, då Lloyd *et al.* (1983) definierar immunsuppressionen vid dräktighet som ett minskat leukocytsvar.

Sammanfattningsvis kan man se att *T. canis* använder sig av immunsuppression med morfinsubstanser, immunmodulering av cellsvär och en möjlighet att kasta av sig alla delar av immunförsvaret som binder till den, vilket tillsammans kan bidra till den nästintill perfekta evasion av immunförsvaret som sker.

Oklarheter kring immunreaktionen inkluderar bland annat köns- och ålderskillnader (Webster, 1958a). Kan larverna känna av könet hos sin värd, och i så fall med vilka receptorer? Samtidigt kan ifrågasättas hur det kommer sig att honor utvecklar ett immunsvär tidigare, ifall larverna har med sig antigen som honor reagerar tidigare på, eller om larverna tidigare börjar migrera ut i vävnaden. Skulle detta vara hormonellt betingat kan den tidigare somatiska migrationen hos honor styrka idéerna om att masken har receptorer för steroida könshormoner. Om så är fallet bör masken ha ett avancerat sätt att mäta hormonnivåer för att veta när den ska kapsla in sig i vävnaden och återigen vakna.

Reaktivering och vad det beror på

Det finns fortfarande inget fastställt svar på exakt vad reaktiveringen beror på. Prolaktin verkar onekligen ha en effekt på larver i vävnadsarrest (Chavez-Guitron *et al.*, 2016; Jin *et al.*, 2008; Overgaauw *et al.*, 1998), men frågan är ifall prolaktin verkar som direkt effektor på larverna, eller om en annan signalsubstans, förslagsvis TGF- β , aktiveras av prolaktin och påverkar larverna. Då *T. canis* nyligen visats ha receptorer för prolaktin (Chavez-Guitron *et al.*, 2016) kan resultaten rörande TGF- β receptorer från Arasu (2001) ifrågasättas med tanke på tidsaspekten. Arasus forskning är dessutom gjord på besläktade maskar, *A. caninum* och *C. elegans*, inte *T. canis*. Den naturliga diskussionen blir då varför just *T. canis* utvecklat receptorer för könshormoner, alternativt varför ingen annan undersökt art har gjort det. Det kan också ifrågasättas ifall det trots detta finns ett samband mellan prolaktin och TGF- β receptorer och att det eventuellt krävs en viss nivå av båda signalämnena för en reaktivering.

En intressant studie är Burke and Roberson (1985a) som visar att antalet larver som reaktiveras i vävnaden ökar ju tätare in på partus infektionen sker. Det kan diskuteras vad detta beror på, ifall det tyder på en ökad känslighet för prolaktin om stimulering av maskens receptorer sker redan vid infektion, eller om det beror på något helt annat. Ytterligare studier på området skulle vara intressant.

Studien av Torina *et al.* (2005) diskuterar immunsuppression med ökat IL-10 som ett sätt för masken att utnyttja det svaga immunförsvaret för reaktivering. Frågan är då vilka receptorer som används för att känna av detta, eller om masken hela tiden försöker reaktiveras men lyckas först vid tillräcklig immunsuppression. Detta kan ifrågasättas då masken har så många sätt att suppressera immunförsvaret att den borde kunna stimulera rätt miljö på egen hand.

Möjlighet att eliminera infektion innan spridning till valpar

Det är svårt att komma åt maskarna då de i stort sett bara smittar till valpar intrauterint (Burke & Roberson, 1985b). Behandlingsrekommendationerna för dräktiga tikar med konstaterad smitta är daglig fenbendazol från dag 40 av dräktighet till 14 dagar efter partus. Denna avmaskning gör att valparna inte behöver behandlas efter födsel om det inte finns ägg i miljön. Anledningen till tidsintervallet är att behandling innan dag 40 kan ge missbildningar hos fostret och därför ska undvikas (Läkemedelsverket, 2014). Larverna reaktiveras efter cirka 40 dagar av dräktighet och därefter kan behandling av tiken påbörjas. Avmaskning av valpar ska ske inom 20 dagar för att maskarna inte ska hinna bli äggutskiljande, men ändå vara mottagliga för läkemedlet (Höglund, 2014). Valpar i kennel avmaskas rutinmässigt 14-20 dagar efter födsel och därefter varannan (pyrantel) eller var fjärde vecka (fenbendazol) upp till 3 månaders ålder (SVA, 2016).

Frågan är om dessa rekommendationer är optimala. Valpar vars infekterade mamma behandlades med fenbendazol under dräktigheten visade inga tecken på infektion, men hade avsevärt sämre tillväxt jämfört med en oinfekterad kontrollgrupp (Schneider *et al.*, 2011). Det kan också ifrågasättas hur många djurägare som är beredda att behandla sin tik varje dag i flera veckor, respektive hur många som testar sin avelstik för spolmask. Troligen är det enklare alternativet att avmaska valpar och tik efter partus.

Forskning pågår på molekylnivå för att möjligen hitta ett vaccin mot toxocaraantigen som kommer åt alla stadier i utvecklingen (Maizels, 2013). Detta vore ett effektivt sätt att slippa avmaskningen och förhoppningsvis komma åt larver redan i vävnadsarrest.

Slutsats

T. canis använder en kombination av immunmodulerande mekanismer för att hålla sig kvar i vävnaden. Ömsning av cutikula och produktion av C-type lectins samt morfinliknande substanser tros vara de mest effektiva. Det finns forskning som tyder på en köns- och åldersskillnad vad gäller utveckling av immunitet, vilket vore intressant att undersöka vidare.

Det är fortfarande oklart varför larver i vävnadsarrest reaktiveras under dräktighet, men tros i grunden bero på en ökning av hormoner i kroppen, med eller utan molekyler som TGF- β . Det är därför svårt att avgöra om intrauterin spridning till valpar kan undvikas på annat sätt än genom långvarig behandling med fenbendazol av tiken under dräktighet. Forskning på området har sikte på möjligheten att skapa funktionella vaccin mot alla *Toxocara canis* utvecklingsstadier.

REFERENSLISTA

- Arasu, P. (2001). In vitro reactivation of *Ancylostoma caninum* tissue-arrested third-stage larvae by transforming growth factor-beta. *Journal of Parasitology*, 87(4), ss. 733-738.
- Barriga, O.O. (1988). A CRITICAL-LOOK AT THE IMPORTANCE, PREVALENCE AND CONTROL OF TOXOCARIASIS AND THE POSSIBILITIES OF IMMUNOLOGICAL CONTROL. *Veterinary Parasitology*, 29(2-3), ss. 195-234.
- Burke, T.M. & Roberson, E.L. (1985a). PRENATAL AND LACTATIONAL TRANSMISSION OF TOXOCARA-CANIS AND ANCYLOSTOMA-CANINUM - EXPERIMENTAL-INFECTION OF THE BITCH AT MIDPREGNANCY AND AT PARTURITION. *International Journal for Parasitology*, 15(5), ss. 485-490.
- Burke, T.M. & Roberson, E.L. (1985b). PRENATAL AND LACTATIONAL TRANSMISSION OF TOXOCARA-CANIS AND ANCYLOSTOMA-CANINUM - EXPERIMENTAL-INFECTION OF THE BITCH BEFORE PREGNANCY. *International Journal for Parasitology*, 15(1), ss. 71-75.
- Chavez-Guitron, L.E., Morales-Montor, J., Munoz-Guzman, M.A., Nava-Castro, K.E., Ramirez-Alvarez, H., Moreno-Mendoza, N.A., Hernandez-Cervantes, R. & Alba-Hurtado, F. (2016). The in vitro effect of prolactin on the growth, motility and expression of prolactin receptors in larvae of *Toxocara canis*. *Veterinary Parasitology*, 224, ss. 33-38.
- De Veer, M.J., Kemp, J.M. & Meeusen, E.N.T. (2007). The innate host defence against nematode parasites. *Parasite Immunology*, 29(1), ss. 1-9.
- ESCCAP (2010-09-01). *Worm Control in Dogs and Cats*. Tillgänglig: http://www.esccap.org/uploads/docs/nkzqmxn_esccap11endoguidelines.pdf [2017-03-14].
- Fernando, S.T., Vasudevan, B., Jegatheeswaran, T. & Sooriyamoorthi, T. (1973). NATURE OF RESISTANCE OF IMMUNE PUPPIES TO SUPERINFECTION WITH TOXOCARA-CANIS - EVIDENCE THAT IMMUNITY AFFECTS SECOND-STAGE BUT NOT FOURTH-STAGE LARVAE. *Parasitology*, 66(JUN), ss. 415-422.
- Golabi, M., Naem, S., Imani, M. & Dalirez, N. (2016). Evidence of morphine like substance and mu-opioid receptor expression in *Toxocara canis* (Nematoda: Ascaridae). *Veterinary research forum : an international quarterly journal*, 7(4), ss. 335-339.
- Höglund, J. (2014-11-07). *Spolmask hos hund och katt: förekomst, klinik, terapi och zoonosrisk*. Tillgänglig: https://lakemedelsverket.se/upload/halso-och-sjukvard/behandlingsrek-vet/Ekto_och_endoparasiter_hos_hund_och_katt_bakgrundsdokumentation.pdf [2017-03-14].
- Jin, Z., Akao, N. & Ohta, N. (2008). Prolactin evokes lactational transmission of larvae in mice infected with *Toxocara canis*. *Parasitology International*, 57(4), ss. 495-498.
- Lloyd, S., Amerasinghe, P.H. & Soulsby, E.J.L. (1983). PERIPARTURIENT IMMUNOSUPPRESSION IN THE BITCH AND ITS INFLUENCE ON INFECTION WITH TOXOCARA-CANIS. *Journal of Small Animal Practice*, 24(4), ss. 237-247.
- Loukas, A., Doedens, A., Hintz, M. & Maizels, R.M. (2000). Identification of a new C-type lectin, TES-70, secreted by infective larvae of *Toxocara canis*, which binds to host ligands. *Parasitology*, 121, ss. 545-554.
- Loukas, A., Mullin, N.P., Tetteh, K.K.A., Moens, L. & Maizels, R.M. (1999). A novel C-type lectin secreted by a tissue-dwelling parasitic nematode. *Current Biology*, 9(15), ss. 825-828.
- Läkemedelsverket (2014-11-07). *Ekto- och endoparasiter hos hund och katt - Behandlingsrekommendation*. Tillgänglig: https://lakemedelsverket.se/upload/om-lakemedelsverket/publikationer/information-fran-lakemedelsverket/2014/Information_fran_Lakemedelsverket_supplement_2014_webb.pdf [2017-03-14].
- Maizels, R.M. (2013). *Toxocara canis*: Molecular basis of immune recognition and evasion. *Veterinary Parasitology*, 193(4), ss. 365-374.
- Maizels, R.M. & Page, A.P. (1990). SURFACE ASSOCIATED GLYCOPROTEINS FROM TOXOCARA-CANIS LARVAL PARASITES. *Acta Tropica*, 47(5-6), ss. 355-364.
- Maizels, R.M., Tetteh, K.K.A. & Loukas, A. (2000). *Toxocara canis*: genes expressed by the arrested infective larval stage of a parasitic nematode. *International Journal for Parasitology*, 30(4), ss. 495-508.

- Meeusen, E.N.T. & Balic, A. (2000). Do eosinophils have a role in the killing of helminth parasites? *Parasitology Today*, 16(3), ss. 95-101.
- Overgaauw, P.A.M., Okkens, A.C., Bevers, M.M. & Kortbeek, L.M. (1998). Incidence of patent *Toxocara canis* infection in bitches during the oestrous cycle. *Veterinary Quarterly*, 20(3), ss. 104-107.
- Reiterova, K., Tomasovicova, O. & Dubinsky, P. (2003). Influence of maternal infection on offspring immune response in murine larval toxocariasis. *Parasite Immunology*, 25(7), ss. 361-368.
- Schneider, S.L., Gollnick, S.O., Grande, C., Pazik, J.E. & Tomasi, T.B. (1996). Differential regulation of TGF-beta 2 by hormones in rat uterus and mammary gland. *Journal of Reproductive Immunology*, 32(2), ss. 125-144.
- Schnieder, T., Laabs, E.-M. & Welz, C. (2011). Larval development of *Toxocara canis* in dogs. *Veterinary Parasitology*, 175(3-4), ss. 193-206.
- Sprent, J.F.A. (1961). Post-parturient infection of the bitch with *Toxocara canis*. *Journal of Parasitology*, 47(284).
- SVA (2016-05-04). *Avmaskning av hund - Rekommendationer*. Tillgänglig: <http://www.sva.se/djurhalsa/hund/parasiter-hos-hund/avmaskning-hund> [2017-03-14].
- Torina, A., Caracappa, S., Barera, A., Dieli, F., Sireci, G., Genchi, C., Deplazes, P. & Salerno, A. (2005). *Toxocara canis* infection induces antigen-specific IL-10 and IFN gamma production in pregnant dogs and their puppies. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 108(1-2), ss. 247-251.
- Valli, J.L., Williamson, A., Sharif, S., Rice, J. & Shewen, P.E. (2010). In vitro cytokine responses of peripheral blood mononuclear cells from healthy dogs to distemper virus, *Malassezia* and *Toxocara*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 134(3-4), ss. 218-229.
- Webster, G.A. (1958a). On prenatal infection and the migration of *Toxocara canis* Werner, 1782 in dogs. *Canadian Journal of Zoology*, 36, ss. 435-440.
- Webster, G.A. (1958b). A Report On *Toxocara Canis* Werner, 1782. *Canadian journal of comparative medicine and veterinary science*, 22(8), ss. 272-9.