



Sveriges lantbruksuniversitet  
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin  
och husdjursvetenskap

Institutionen för biomedicin och veterinär  
folkhälsvetenskap

# Skyddande immunitet mot *Strongylus vulgaris* – en framtida möjlighet?

En studie av adjuvanset G3 samt L3 larvers inverkan på  
cytokinproduktion hos häst

*Frida Nilfors*



*Uppsala*  
*2018*

*Examensarbete 30 hp inom veterinärprogrammet*

*ISSN: 1652-8697*  
*Examensarbete 2018:09*



# Skyddande immunitet mot *Strongylus vulgaris* – en framtida möjlighet?

En studie av adjuvanset G3 samt L3 larvers  
inverkan på cytokinproduktion hos häst

**Protective immunity against *Strongylus vulgaris* – a future possibility?** Effects on cytokine induction by the adjuvant G3 and L3 larvae in the horse

*Frida Nilfors*

**Handledare:** *Caroline Fossum, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap*

**Biträdande handledare:**

*Stina Hellman, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap*

*Bernt Hjertner, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap*

**Examinator:** *Magnus Åbrink, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap*

*Examensarbete i veterinärmedicin*

*Omfattning: 30 hp*

**Nivå och fördjupning:** *Avancerad nivå, A2E*

**Kurskod:** *EX0830*

*Utgivningsort: Uppsala*

*Utgivningsår: 2018*

**Delnummer i serie:** *Examensarbete 2018:09*

*ISSN:1652-8697*

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

**Nyckelord:** *vaccin, Strongylus vulgaris, adjuvans, equin*

**Key words:** *vaccine, Strongylus vulgaris, adjuvant, equine*

**Sveriges lantbruksuniversitet**  
**Swedish University of Agricultural Sciences**

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap  
Institutionen biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap



## SAMMANFATTNING

*Strongylus vulgaris* (stor blodmask) är den mest patogena parasiten hos häst i Sverige, redan vid låg infektionsdos orsakar parasiten stor skada på blodkärlen som försörjer tarmen. Skadorna kan ge upphov till allvarliga fall av kolik och tromboser. Prevalensen av *S. vulgaris* har stigit från 3 % i slutet av 90-talet till cirka 26 % vid senaste mätningen 2016. En bidragande faktor till den här utvecklingen är att Sverige för drygt tio år sedan införde så kallad selektiv avmaskning på grund av en ökande resistensutveckling mot anthelmintika hos *Cyathostominae* (liten blodmask). Ett långsiktigt mål i ett doktorandprojekt vid Immunologiska enheten vid Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap är därför att utveckla ett vaccin mot *S. vulgaris* som alternativ till anthelmintika. I projektet studeras ett nytt adjuvans, G3, och dess effekt på cytokinproduktionen hos *equina* mononukleära blodceller (*eqMBC*).

I detta examensarbete har G3 utvärderats vidare. *EqMBC* har odlats i närvaro av G3, liksom i närvaro av G3 tillsammans med "Toll like receptor" (TLR) agonisterna Pam3SCK4 (Pam) och FliC. Cytokininduktionen analyserades med qPCR (IL-10, IL-8 och IFN- $\gamma$ ) och ELISA (IFN- $\gamma$ ). En metod att rena och stråla L3-larver i syfte att studera larvernas effekt på cytokininduktionen i kulturer av *eqMBC* har utvecklats. En första cellinduktion i *eqMBC* med dessa preparerade larver, tillsammans med G3 utföres och cytokininduktion (IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-10, IL-12 och IL-4) analyserades med qPCR.

G3 inducerade generna för IFN- $\gamma$  och IL-12 samt kunde inhibera uttrycket av generna för IL-10 och IL-4. När G3 tillsattes i kulturer av *eqMBC* tillsammans med andra inducerare, var G3's effekt på cytokinproduktionen dominant. Vid ett första cellinduktionsförsök med G3 och L3-larver observerades att L3-larverna inducerar uttryck av genen för IL-4. Närvaro av G3 hindrade det L3-inducerade uttrycket av IL-4 i *eqMBC* som istället uttryckte IFN- $\gamma$  och IL-12.

Olikt många adjuvans på marknaden tycks G3 starkt driva immunreaktionen mot TH1. Detta gör G3 till ett mycket intressant adjuvans i framtida hästvaccin. Möjligheten att använda G3 tillsammans med L3-antigen i ett vaccin mot blodmask behöver studeras vidare. Metoden som utvecklats i detta examensarbete att rena fram och stråla L3-larver, anses fungera bra och kommer tillämpas i de fortsatta studierna med *eqMBC*.

## SUMMARY

*Strongylus vulgaris* is considered to be the most pathogen parasite in Swedish horses. The parasite causes severe damage to the vessels supplying the small and large intestine. This results in arteritis, thrombosis and may cause severe colic. In Sweden, the prevalence of *S. vulgaris* was about 3% in late 1990s but has according to a new study performed at SLU in 2016 increased to 26%. Most likely, this increased prevalence is due to a selective deworming strategy imposed ten years ago because of signs of anthelmintic resistance in small strongyle (*Cyathostominae spp*). In a PhD project at the Department of Biomedical Sciences and Veterinary Public Health, SLU, the long-term goal is to develop a vaccine against *S. vulgaris* using a new adjuvant designated G3. Effects of the adjuvant are so far analysed in cultures of equine mononuclear blood cells (*eqMBC*).

In the present master project, the cytokine inducing capacity of G3 was further evaluated and a method for isolation, purification and inactivation of L3 larvae stage of *S. vulgaris* was developed. *EqMBC* were cultured in the presence of G3 and/or the TLR agonists FliC and Pam3SCK4 (Pam) and the induced cytokine profiles were determined using qPCR (IL-4, IL-8, IL-10, IL-12, IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha$ , TGF- $\beta$ ) and ELISA (IFN- $\gamma$ ). After being purified and UV-irradiated, the L3 larvae were also included in the cytokine analyses.

The adjuvant G3 alone promoted a TH1 type of response inducing IL-12 and IFN- $\gamma$  that also seemed to dominate when G3 was combined with other inducers. For instance, the expression of mRNA for IL-10 was inhibited when FliC or Pam were combined with G3. When tested in cultures of *eqMBC*, the inactivated L3 larvae preparation induced IL-4, indicative of a TH2 type of immune response. Dual exposure of *eqMBC* to both L3 larvae and G3 abrogated the IL-4 induction and only expression of mRNA for IL-12 and IFN- $\gamma$  was detected. Thus, G3 seem to be a TH1 promoting adjuvant in the horse with the potential to redirect a TH2 response towards TH1. This makes G3 very interesting as an adjuvant in future equine vaccines. To evaluate G3 as a potential adjuvant in a vaccine against *S. vulgaris* further studies are required, applying the methods for purification and irradiation of larvae outlined in this project.

## INNEHÅLL

Inledning .....	1
Litteraturoversikt.....	1
Strongylus vulgaris – patogenes, prevalens och problematik .....	1
Slemhinneimmunitet .....	2
Immunförsvar och Helminter .....	4
Att uppnå skyddande immunitet .....	5
Material och metoder .....	7
Isolering av equina mononuklära blodceller (eq MBC).....	7
Cellinduktion.....	8
Skörd av celler .....	8
RNA isolering .....	8
cDNA syntes .....	9
SYBR green qPCR.....	9
ELISA .....	9
Rening av L3 larver.....	10
Cellinduktion med G3 och L3 larver .....	10
Resultat.....	11
Diskussion .....	18
Referenser .....	22





## INLEDNING

Detta examensarbete ingår i ett större doktorandprojekt där ett nytt adjuvans, G3, utvärderas för användning i häst. Det långtgående syftet är att utveckla ett nytt vaccin mot infektion med *Strongylus vulgaris* (stor blodmask) hos häst. *S. vulgaris* är en mycket patogen *equin* inälvsparasit. På grund av risk för resistensutveckling mot anthelmintika hos *Cyathostominae* (liten blodmask) gick Sverige ifrån rutinmässig avmaskning för ca 10 år sedan. En nyligen utförd kartläggning visar tyvärr att prevalensen av infektion med stor blodmask ökat kraftigt sedan dess och ligger nu på ca 26 % på individnivå jämfört med ca 3–5 % i slutet av 1990-talet. Ett vaccin mot blodmask har potentialen att vara lösningen både när det gäller att förebygga sjukdom orsakad av stor blodmask samt att minska resistensutvecklingen mot anthelmintika.

Hittills i projektet har effekten av G3 utvärderats i kulturer av hästlymfocyter. Man har på samma sätt även testat två stycken Toll-like receptor (TLR) agonister Pam3CSK4 (Pam) och FliC's effekt på hästlymfocyter. TLR-agonisterna studeras för möjligheten att användas som komplement till adjuvans i och med sin förmåga att binda till TLR-receptorer på "antigen presenting cells" (APC's) och på så sätt påverka immunförsvarets riktning. Effekten av de olika inducerarna har utvärderats med hjälp av qPCR för att mäta vilka cytokingener som regleras vid de olika behandlingarna. Att kartlägga cytokinprofilen för ett adjuvans är ett viktigt första steg för att så småningom kunna styra det immunologiska svaret mot antigenet i vaccinet.

Syftet var att i detta examensarbete ytterligare utvärdera G3's inverkan på genuttrycket för olika cytokiner (IL-12, IL-10, IL-8, IL-4, IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha$  och TGF- $\beta$ ), ensamt och tillsammans med TLR agonisterna. För ändamålet att vidare studera hur G3 tillsammans med L3-larver från blodmask påverkar cytokinproduktionen hos häst, utvecklades även en metod att rena fram L3 larvpreparationer för att använda i cellinduktionsförsök. Metoden kontrollerades genom ett första cellinduktionsförsök med G3 och L3-larver.

## LITTERATURÖVERSIKT

### **Strongylus vulgaris – patogenes, prevalens och problematik**

*S. vulgaris* är den mest patogena inälvsparasiten hos häst i Sverige. Det är en helmint som orsakar verminös arterit hos ca 95 % av infekterade hästar (Duncan 1975). Framförallt drabbas artärer som blodförsörjer tarmen, inklusive kraniala krösroten (Duncan 1975; McCraw *et al.*, 1976). Trombosbildning och förtjockade fibrotiska kärlväggar medför kraftig påverkan på blodförsörjningen till hela tarmsegment. Ichemiska skador kan uppkomma som följd av detta med kraftiga koliksymtom och/eller endotoxinemi (Nielsen *et al.*, 2015; Clifton *et al.*, 1994; Duncan 1975; McCraw *et al.*, 1976; Nichol *et al.*, 1987). Även bakbenshältor orsakade av *arteria iliaca* trombosor har associerats med *S. vulgaris* infektioner. Andra symtom kan vara de som förekommer vid parasitinfektioner generellt: försämrad pälskvalité, viktnedgång och nedsatt prestation. Anemi kan förekomma men är ovanligt (Duncan 1975; McCraw *et al.*, 1976).

*S. vulgaris* har en prepatensperiod på ca 6 månader (McCraw *et al.*, 1976). Ägg utsöndras med träcken och utvecklas, på betet, till det infektiösa L3 stadiet under ca 14-28 dagar beroende på väder. Hästarna infekteras per oralt när de betar. L3 larven adhererar till och penetrerar mukosa och submukosa i *ileum*, *ceacum* och ventrala *colon* inom två dagar från infektion. I submukosan

mognar L3 larven till L4 stadiet inom ytterligare 2–3 dagar (McCraw *et al.*, 1976; Clifton *et al.*, 1994). Från submukosan börjar larvens migration genom artärer till den främre krösroten. Larven når *arterica mesenterica cranialis* mellan dag 14 och 19 post infektion (PI). Här stannar larven tills den mognat ut till L5 stadiet, vilket sker mellan dag 90 och 120 PI, larven är då ca 18 mm lång (McCraw *et al.*, 1976). L5 larven följer sedan blodflödet genom kärlen tillbaka till grovtarmen. Könsmognaden samt äggproduktion sker i lumen ca 150–180 dagar PI. Under denna tid suger parasiten blod genom tarmslemhinnan.

Prevalensen av *S. vulgaris* infektion undersöktes i ett examensarbete vid SLU senast 2016 och befanns då ligga på 26 % på individnivå och 66 % på gårdsnivå (Werell 2017). Det är en kraftig ökning sedan den senaste mätningen på sent 1990-tal, då prevalensen på individnivå enligt Statens Veterinärmedicinska Anstalt (SVA) låg på 3–5 %. En möjlig orsak till ökningen kan vara att man för ca 10 år sedan slutade avmaska rutinmässigt i Sverige och numera avmaskar efter träckprov. Detta beslut togs på grund av oro för parasitär resistensutveckling mot anthelmintika. Vid träckprov analyseras egg per gram (EPG) från både stor och liten blodmask tillsammans. Det har visat sig att de hästar med lågt EPG oftare bär på *S. vulgaris*, jämfört med de som har höga EPG värden och oftare enbart är infekterade med lilla blodmasken (Werell 2017). Det är därför viktigt att odla ut träckprover även från hästar med låga EPG för att vara säker på att individen ej är infekterad med stor blodmask.

Resistensutveckling hos hästens lilla blodmask (*Cyathostominae spp*) och spolmask (*Parascaris equorum*) mot avmaskningsmedel är ett växande problem runt om i världen (Nielsen *et al.*, 2014; Samson-Himmelstjerna 2011; Reinemeyer 2009; Lind *et al.*, 2005). Ännu har ingen resistens rapporterats hos *S. vulgaris* (Matthews 2014). Mot bakgrund av den ökande resistensutvecklingen hos helminter hos häst, är tanken på immunisering mot parasiterna med hjälp av vaccin högst intressant. Hästar utvecklar immunitet mot *P. equorum* vid mellan 6 mån och 2 års ålder (Reinemeyer 2009). Hästar som är äldre än så är mycket motståndskraftiga mot infektionen som dock kan ge allvarlig sjukdom hos föl (Clayton 1979; Reinemeyer 2009). En liknande absolut immunitet utvecklas inte mot vare sig små eller stora blodmaskar (Nielsen *et al.*, 2014; Duncan 1975; Samson Himmelstjerna 2011; Reinemeyer 2009; McCraw *et al.*, 1976) även om ett visst åldersrelaterat skydd utvecklas (Klei & Chapman 1999). Äldre hästar får generellt mildare kliniska symtom relativt infektionsbördan. De histologiska förändringarna är dock desamma oavsett ålder (Duncan 1975; McCraw *et al.*, 1976; Clifton *et al.*, 1994), vilket tyder på att hästarnas immunförsvar står tämligen handfallet inför parasiten.

## **Slemhinneimmunitet**

Immunförsvaret i tarmen består dels av en funktionell barriär i form av enterocyter täckta av ett mukuslager, dels av lymfoid vävnad. Ett enkelt lager enterocyter täcker tarmens yta mot lumen, de ligger dikt an varandra med zona occludens ("tight junctions") vilket gör det svårt för mikroorganismer och makromolekyler att ta sig in mellan cellerna (Aguilera Montilla *et al.*, 2004). Den lymfoida vävnaden i tarmen består av mesenteriska lymfknutor, peyerska plack och diffus mukosa associerad lymfoid vävnad (Aguilera Montilla *et al.*, 2004). I lamina propria finns längs med hela tarmen rikligt med Antigen Presenting Cells (APC), fram för allt Dendritiska celler (DC). Dessa har rikligt med Pattern recognition receptors (PPR) som hela tiden känner av sin omgivning och är beredda att binda in och ta upp specifika antigen, generella

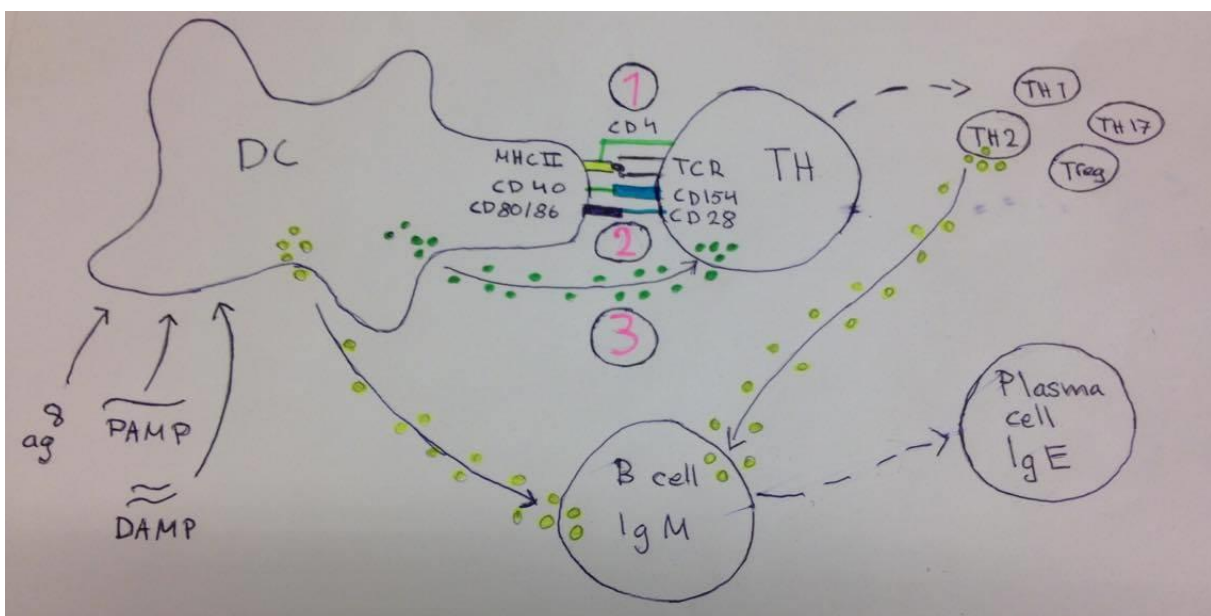
antigenstrukturer (pathogen associated molecular patterns; PAMP) eller kroppsegna alarminer (damage associated molecular patterns; DAMP) från vävnadsskador.

DC kan binda till och ta upp antigen från tarmen dels direkt via lumen, som DC kan nå med hjälp av sina cytoplasmatiska utskott, dels via M celler (Aguilera Montilla *et al.*, 2004). M celler är specialiserade enterocyter som ligger i anslutning till peyerska plack. M cellerna tar upp antigen från tarmlumen apikalt via endocytos och presenterar det för DC basalt mot lamina propria. När en DC tagit upp främmande antigen sker aktivering av immunförsvaret i tre steg.

Signal 1: DC presenterar degraderat antigen bundet till MHC II molekyler för naiva TH0 celler som känner igen MHC II-antigen komplexet med specifika receptorer (TCR). Bindningen stabiliseras av CD4 molekyler på TH0 cellen som binder till utsidan av MHC II. Inbindningen TCR-MHC II leder till ökat uttryck av CD154 på TH0 cellen.

Signal 2: Co-stimulatoriska molekyler på DC binder till TH0 cellen. Viktigast är konstitutivt uttryckta CD40 på DC som binder in till CD154 på TH0, samt CD80/86 på DC, som binder in till CD28 på TH0 cellen.

Signal 3: När MHC II bundit till TCR och de co-stimulerande receptorerna bundit varandra börjar DC producera cytokiner till TH0 cellen som nu kan stimuleras av cytokinerna och övergå till en effektor-TH cell. Vilka cytokiner som produceras av DC beror dels på det anatomiska läget men styrs framförallt av vilka pattern recognition receptors (PRR) som engagerats. Beroende på vilka cytokiner som produceras kommer TH cellen att differentiera ut till en TH1, TH2, TH17 eller T regulatorisk (Treg) cell. Vidare aktiveras B lymfocyt som via sin unika och specifika B-cells receptor (BCR) känner igen oprocesserat (naivt) antigen, av cytokiner från effektor TH cellen samt av cytokinstimulering från DC. Detta medför att B lymfocyt differentierar till plasmacell, switchar till lämplig immunoglobulinklass samt börjar sekretera antikroppar.



Figur 1. Schematisk framställning av signal 1, 2 och 3 vid antigenpresentation.

## Immunförsvar och Helminter

Skydd mot helminter som kommer i kontakt med mukosan innefattar ökad mukusproduktion och ökad tarmperistaltik samt ett generellt TH2 svar (Mulcahy *et al.*, 2004; Weinstock 2006). TH2 svar till följd av helmintinfektion associeras generellt med esinofili och höga titrar IgE antikroppar (Mulcahy *et al.*, 2004; McSorley *et al.*, 2013).

Eosinofilerna aktiveras ofta i två vågor vid en parasitinfektion. Initialt av DAMP från vävnadsskador samt av inflammationsmediatorer från degranulerade mastceller. En andra våg av aktiverade eosinofiler rekryteras från benmärg med hjälp av IL-5, en cytokin starkt associerad med ett TH2 svar. Eosinofiler har visat sig vara mycket viktiga i skyddet mot *S. vulgaris* (Klei *et al.*, 1992; Swiderski *et al.*, 1999; Klei och Chapman 1999; Dennis *et al.*, 1993). Vid *S. vulgaris* infektion anses aktiverade eosinofiler kunna uppreglera sitt uttryck av MHC II. *In vitro* har man också sett att de kan avdöda L3 larver (Klei, 2000). IL-4 är en annan viktig TH2 cytokin som tycks leda till ökning av antigen specifika IgE antikroppar och är därför mycket viktig i det immunologiska svaret mot flertalet helminter, *S. vulgaris* inkluderat (Swiderski *et al.*, 1999).

Helminter har jämfört med andra typer av agens en väl utvecklad immunmodulerande förmåga (Maizels *et al.*, 2016; Hewitson *et al.*, 2009; Weinstock 2006; McSorley *et al.*, 2013; Mulcahy *et al.*, 2004), vilket är viktigt för deras överlevnad i värden. En immunmodulerande mekanism anses vara helminternas förmåga att uppreglera regulatoriska T celler (T reg) och immunregulatoriska cytokiner som IL-10 och TGF- $\beta$  (Hewitson *et al.*, 2009; Favoretto *et al.*, 2014; McSorley *et al.*, 2013; Weinstock 2006; Maizels *et al.*, 1999; Mulcahy *et al.*, 2004).

IL-10 är en immunmodulerande cytokin som dels stimulerar T reg cellers proliferation och dels nedreglerar TH1 svar och styr det mot ett TH2 svar. (Dowling *et al.*, 2016; Burakova *et al.*, 2017). TGF- $\beta$  produktion och uppreglering av T reg celler sker *in vitro* i kombinerade DC-TH cellkulturer som exponeras för olika typer av parasiter, bland annat med *T. spiralis*, *E. multioocularis* och *S. mansoni* (McSorley *et al.*, 2013). Studier i människa visar att helmintinfektion av olika typ bland annat inducerar IL-10 produktion (Weinstock 2006). Till exempel uppvisar många patienter med *T. solium* infektioner ökade IL-10 nivåer, nedreglering av både TH1 och TH2 cytokiner samt tendenser till ökat antal T reg celler (Maizels *et al.*, 2016). *In vitro* studier visar att isolerade mononuklära immunceller från lamnina propria producerar både TH2 cytokiner (IL-4 och IL-5) och regulatoriska cytokiner (IL-10 och TGF $\beta$ ) efter helmint-exponering (Weinstock 2006). Musmodeller har visat att T reg knockout (KO) möss snabbt eliminerar GI nematoder vid experimentell infektion (Maizels *et al.*, 2016). Vidare har man sett att parasitinfekterade människor som är kroniska, asymtomatiska bärare ofta utvecklar ett TH2 svar med IL-4 produktion. IL-17 och IFN $\gamma$  inhiberas och IL-10 samt TGF $\beta$  uppregleras (Maizels *et al.*, 2016; McSorley *et al.*, 2013; Maizels *et al.*, 1999). Patienter med symptomatisk sjukdom har istället ett mer uttalat TH1/TH17 svar som medierar kraftig inflammation i infekterade vävnader (Maizels *et al.*, 2016).

Parasiters immunmodulerande förmåga bekräftas ytterligare av den nu allmänt accepterade hygienhypotesen. Hygienhypotesen innebär kortfattat att ett visst infektionstryck, av bland annat parasiter, tidigt i livet stimulerar till ett bättre reglerat immunförsvar (McSoley *et al.*, 2012). Fenomenet anses förklara det faktum att i länder med högre prevalens av

parasitinfektioner är frekvensen autoimmuna tarmsjukdomar såsom Chrons och Ulcerös Colit, allergier och astma betydligt lägre hos humanpopulationen än i exempelvis västvärlden (Maizels *et al.*, 2016; Weinstock 2006; Mulcahy *et al.*, 2004). I ett försök med gnagare har parasitinfektion med *T.muris*, *H. polygyrus* eller *S. mansoni* en skyddande effekt mot experimentellt framkallad TH1 colit (Weinstock 2006), bland annat genom att nedreglera den TH1 associerade cytokinen IFN- $\gamma$ . Även en minskad effekt av vaccination har observerats hos humana patienter med kraftiga parasitbördor. Detta har förklarats med de höga nivåer immunnedreglerande cytokiner som följer parasitinfektioner, vilka försämrar immunsvaret på vaccinet (Maizels *et al.*, 2016; Mulcahy *et al.*, 2004). Liknande observationer har gjorts i ett vaccinationsförsök på häst. Hästar med kraftig parasitbörda utvecklade både sämre antikropps- och cellulärt svar när de immuniserades med heterologa protein. Hästarna med låg parasitbörda (behandlade med moxidectin innan immunisering) utvecklade högre nivåer av IL-4 och IFN- $\gamma$  (Edmonds *et al.*, 2001). Hästar med hög parasitbörda tycks alltså vara mindre immunkompetenta. Vidare har man sett att patienter infekterade med *Ascaris*, *Onchocerca* eller *Schistosoma* utvecklar ett mindre effektivt TH1 svar vid infektion av Tetanus, diptheria eller choleratoxiner (Mulcahy *et al.*, 2004). Man har också sett att möss infekterade med *S.mansoni* producerar mindre TH1 cytokiner vid experimentella infektioner med andra antigen (Mulcahy *et al.*, 2004). Sammantaget indikerar dessa studier att parasitinfektioner av olika slag kan ha en allmänt immunsuppressiv effekt.

### **Att uppnå skyddande immunitet**

Parasiters immunmodulerande förmåga är en av utmaningarna när det gäller att ta fram ett effektivt vaccin mot helmintinfektioner (Hewitson *et al.*, 2014; Maizels *et al.*, 1999). När det gäller infektion med *S. vulgaris* har flera försök gjorts där man försökt immunisera hästar genom upprepade, ofta orala, vaccinationer med strålade försvagade L3 larver. Dessa hästar visade reducerad parasitbörda vid efterföljande experimentell infektion och var skyddade mot parasitorsakade kliniska symtom jämfört med kontrollgruppen (Hewitson *et al.*, 2014; Swiderski *et al.*, 1999; Klei 2000; Monahan *et al.*, 1994). Den skyddande effekten av vaccinationen varade upp till ca 9 månader. De vaccinerade hästarna utvecklade eosinofili i högre utsträckning (Swiderski *et al.*, 1999; Monahan *et al.*, 1994; Klei 2000) samt antikroppar mot ytantigen på L3 larver till skillnad från kontrollgruppen (Klei 2000). Enbart ökade antikroppstitrar tycks dock inte räcka som skydd mot infektion. Hästar som behandlades med hyperimmuniserad plasma visade inget tecken på skydd mot experimentell infektion av L3 larver (Klei 2000). Metoden att vaccinera djur med strålade larver har även tillämpats med framgång i andra djurslag. Några exempel är nöt som har immuniserats med av strålning försvagade larver av lungmask (*Dictyocaulus viviparus*) och hundar som har immuniserats med av strålning försvagade larver från hakmask (*Ancylostoma caninum*) (Maizels *et al.*, 1999; Hewitson *et al.*, 2014). Nackdelar med denna metod är att den är opraktisk då den kräver mycket stora mängder larver för att kunna produceras kommersiellt och vara aktuell på populationsnivå. Att identifiera parasitantigen som ger en immunreaktion och kan inkorporeras i ett subenhetsvaccin kan därför vara en lösning.

Syftet med vaccination är att uppnå en skyddande immunitet mot det agens man vaccinerar mot utan att orsaka sjukdom. Detta ställer stora krav på vaccinet. Specifika antigen måste väljas ut för att via antigenpresentation på DC ge upphov till den mest lämpliga TH profilen och

skyddande immunsvär. Immunreaktionen måste dessutom ske ”på rätt ställe”. Exempelvis så kräver skyddande immunitet mot inälvparasiter en aktivering av immunsväret i tarmslemhinnan. Adjuvans är en immunstimulerande substans som ofta tillsätts i vaccin för att förbättra dess effekt. Adjuvans kan stimulera APC och bidra till cytokinsekretion (Burakova *et al.*, 2017; Reed *et al.*, 2013). Trots svaga antigen kan man med hjälp av adjuvans uppnå tillräcklig stimulering av immunförsvaret för att uppnå immunitet (Burakova *et al.*, 2017). Adjuvans har en särskilt viktig roll i subenhetsvaccin då antigen (subenheter av mikroorganismen) kan inkorporeras i adjuvanset. Detta medför att man är mindre beroende av hela antigen, vilket är bra ur säkerhetssynpunkt. Vaccin med levande försvagat antigen eller avdödade hela antigen har högre risk både för biverkningar och för att framkalla sjukdom (Burakova *et al.*, 2017; Reed *et al.*, 2013; Dowling *et al.*, 2016).

Det finns en mångfald olika typer av adjuvans. Ett vanligt förekommande adjuvans är saponiner vars verkningsmekanism inte är helt klarlagd (Reed *et al.*, 2013). Saponiner är amfifila ämnen som återfinns i växtriket och bland annat består av hydrofila glykosidmolekyler och lipofila triterpene derivat (Burakova *et al.*, 2017). En vanlig saponin att använda som adjuvans är Quil A, som utvinns ur barken av *Quillaja saponaria*, ett inhemskt träd som odlas i Sydamerika. Renade fraktioner av Quil A utgör tillsammans med kolesterol och fosfolipider adjuvanset ISCOM som idag används i några av de vaccin som finns mot hästinfluensa och equin herpes virus (EHV) (Burakova *et al.*, 2017; Paillot 2014). ISCOM stimulerar effektivt både TH1 och TH2 svar med aktivering av Cytotoxiska T- Lymfocyter (CTL) och höga antikroppstitrar som följd (Burakova *et al.*, 2017, van de Sandt *et al.*, 2014; Paillot 2014). I Sverige används idag ISCOM i Equilis Prequensa och Equilis prequensa-TE, samt Equip F och Equip FT (FASS 2017; Paillot 2014). I Duvaxyn F och FT används i stället Carbopol (en carbomer) som adjuvans, i Proteq Flu samt Proteq Flu-Te används en annan carbomer (FASS 2017; Paillot 2014). I det i Sverige tidigare godkända vaccinet mot EHV 1-4 (Duvaxyn EHV) används också Carbopol (Gildea *et al.*, 2017). Carbomerer fungerar som adjuvans genom att bilda vesiklar som omsluter antigenet. Vissa carbomerer, exempelvis Carbopol, har även immunostimulerande egenskaper och driver immunförsvaret mot ett TH1 svar (Burakova *et al.*, 2017). Alum (aluminium fosfat) används idag till häst i BotVax som är ett vaccin mot Botulism (produktinformationen Neurogen® Vet Botvax ®B). Alum ger få vävnadsreaktioner och höga IgG titrar hos häst (Stahl *et al.*, 2009). Alum är ett vanligt förekommande, väl beprövat adjuvans till både människor och djur som inducerar ett starkt TH2 svar med IL-4 sekretion, produktion av IgG och IgE samt rekrytering av eosinofiler (Burakova *et al.*, 2017).

”Toll like receptor agonists” (TLR agonister) är molekyler vars immunstimulerande effekt hittills framförallt studerats i experimentella vaccin. Hittills kända TLR är membranbundna, antingen extracellulärt i plasmamembranet eller intracellulärt i endosomala membran. TLR liksom andra PRR finns på DC och andra APC, vissa typer av TLR återfinns även på endotel och epitelceller (Oliveira-Nascimento *et al.*, 2012). Alla TLR har en viktig roll i immunförsvarets första försvarslinje då de kan binda in till PAMPs och DAMPs (Dowling *et al.*, 2016). Beroende på vilken TLR som aktiveras produceras olika cytokinprofiler som påverkar naiva TH0 celler att mogna ut mot en viss TH profil (Dowling *et al.*, 2016; Burakova *et al.*, 2017; Reed *et al.*, 2013). Generellt tycks signalering via TLR3, TLR 4, TLR7, TLR8 och TLR9 ge ett TH1 svar medan aktivering via TLR2 och TLR5 istället bidrar till ett TH2 svar (Dowling *et al.*, 2016). På detta sätt kan man med hjälp av TLR agonister, som komplement till

andra adjuvans, lättare styra även det adaptiva immunsvaret för att uppnå skyddande immunitet mot specifika antigen.

I detta examensarbete prövades ett nytt Saponin-adjuvans, G3, tillsammans med TLR agonisterna FliC och Pam3SCK4 (Pam) i häst. G3 liknar ISCOM men saknar fosfolipider vilket gör att G3 är lättare och billigare att producera samt att det går lätt att inkorporera andra molekyler i G3 (van de Sandt *et al.*, 2014). G3 har tidigare i musförsök visat sig öka APC's förmåga att presentera antigen, stimulera mognad av DC, öka uttrycket av MHC I och II på DC samt ge höga antikroppstitrar. G3 ger även en tydlig stimulering av CTL riktade mot det inkorporerade antigenet (i det aktuella fallet influensavirus) (van de Sandt *et al.*, 2014). Även immunaktiverande molekyler kan inkorporeras i G3 (van de Sandt *et al.*, 2014). TLR5 agonisten FliC är ett rekombinant producerat flagellin protein från *Salmonella typhimurium*. Precis som de flesta TLR 5 agonister stimulerar FliC immunförsvaret generellt genom att uppreglera co-stimulerande molekyler på DC, bidra till mognad av DC, T cells proliferation och produktion av IL-10 (Dowling *et al.*, 2016; Lopez-Yglesias *et al.*, 2014). Det generas ett starkt T cells medierat antikropssvar (Lopez-Yglesias *et al.*, 2014; Camacho *et al.*, 2011), framförallt har man sett att produktion av antigenspecifika IgG och IgA antikroppar ökar (Dowling *et al.*, 2016). Det syntetiska lipoproteinet Pam är en TLR2 agonist. TLR2 agonister har tidigare använts vid vaccinfremställning (Dowling *et al.*, 2016). Pam stimulerar immunförsvaret generellt genom att uppreglera MHC II uttryck på DC (Favoretto *et al.*, 2014). Aktivering av TLR2 receptorer generellt ger ett starkare TH2 än TH1 svar, TLR2 agonister är också ofta dåliga på att inducera ökade nivåer av CTL (Dowling *et al.*, 2016). Signaleringen vid TLR2 aktivering verkar dock variera med den omgivande cytokinmiljön (Oliviera-Naccimento *et al.*, 2012). TLR2 agonisten Pam3CSK4 har i cellkulturer från möss setts ge upphov till snabb och kraftigt ökad IFN- $\gamma$  produktion som associeras med TH1 svar (Tsolmogyin *et al.*, 2013).

## **MATERIAL OCH METODER**

### **Isolering av *equina* mononukleära blodceller (eqMBC)**

Blod (40 ml) från 6 hästar tappades i heparinrör med vacutainersystem. Blodet sedimenterade under 15 minuter varefter all plasma samt vita blodkroppar pipetterades upp, lades på Ficoll (Ficoll-Paque), (Amersham, Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) och centrifugerades (1700 rpm i 25 min). Cellerna separeras då beroende på densitet och de mononukleära cellerna blir kvar på ficollens yta. Cellerna flyttades till centrifugrör som fylldes med fosfatbuffrad koksaltlösning (PBS buffert). Cellerna tvättades genom upprepade centrifugeringar (1200 rpm i 8 min), vätskan avlägsnades och ersattes med ny PBS. Centrifugeringen upprepades två gånger (1000 rpm i 10 min), och efter sista tvätten tillsattes RPMI 1640 odlingsmedium supplementerat med 2 % HEPES, 1 % PEST (Pencillin och Streptomycin), 1 % L-glutamin, 2-merkaptoetanol (2-ME 50 $\mu$ M) och 5 % fetalt kalvserum (FCS). Cellerna späddes 1:9 i Turks reagens och räknades i mikroskop. Cellkoncentrationen justerades till 5–10  $\times 10^6$  celler/ml, varefter 1 ml cellsuspension dispenserades per brunn i 6-brunns plattor. Cellerna inkuberades i 37°C, 6,5 % CO<sub>2</sub> i 30–60 min.

## Cellinduktion

Cellerna odlades i enbart medium eller i närvaro av ett rekombinant framställt flagellinprotein FliC (0.5 µg/ml VacciGrade™, InvivoGen, San Diego, CA), det syntetiskt framställda lipoproteinet Pam3CSK4 (0,1 µg/ml; VacciGrade™), adjuvanset G3 (1 µg/ml; MoreinX, Uppsala, Sweden), eller i olika kombinationer av dessa.

I en brunn tillsattes G3 direkt tillsammans med FliC och inkuberades i 18h. I en brunn tillsattes G3 efter 6h och inkuberades sedan ihop med FliC i ytterligare 12h. I en brunn tillsattes G3 efter 12h och inkuberades i ytterligare 6h tillsammans med FliC. På motsvarande sätt tillsattes G3 tillsammans med Pam3CSK4 (Pam) och inkuberades i 18h. I en annan brunn tillsattes G3 efter 6h och inkuberades sedan ihop med Pam i ytterligare 12h. I en brunn tillsattes G3 efter 12h och inkuberades i ytterligare 6h tillsammans med Pam. I en kontrollbrunn inkuberades celler i enbart medium i 18h. All inkubering skedde i 37°C med 6,5 % CO<sub>2</sub> i luft. Efter inkubationstiden som är totalt 18h för alla brunnar skördades cellerna.

## Skörd av celler

Cellsuspensionerna från varje brunn överfördes till centrifugrör, de centrifugerades vid 500g i 5 min och supernatanten avlägsnades. 1 ml Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) tillsattes i varje rör. Rören frystes in i -80°C. Som kontroll skördades också celler utan tillsats av FliC, Pam eller G3 direkt efter cellisoleringen.

## RNA isolering

Samtliga prover från varje häst (totalt 8 rör per individ) preparerades samtidigt: Rören tinades, innehållet blandades genom pipettering ca 10 gånger och inkuberades 5 min i rumstemp. Kloroform tillsattes (200 µl), blandningen vortexades 15s, inkuberades 2 min och centrifugerades (12000g, i 15 min, vid +4°C). Kloroformfasen pipetterades upp och överfördes till ett eppendorfrör tillsammans med lika mängd 70 % etanol. 600 µl av blandningen överfördes till en RNAeasy kolonn (Qiagen) i ett samlingsrör som centrifugerades (10000 RCF i 60s) varefter vätskan avlägsnades. Resterande kloroform/etanolblandning överfördes till RNAeasy kolonnen och centrifugerades (10000g i 60s). Kolonnen placerades därefter i ett nytt samlingsrör och 500 µl RNA wash buffer I adderades, röret centrifugerades (10000g i 60s) varefter supernatanten avlägsnades. 500µl RNA wash buffer II adderades, röret centrifugerades (10000g i 60s) och supernatanten avlägsnades. Denna process upprepades ytterligare en gång. Kolonnen flyttades till ett nytt samlingsrör som centrifugerades (14000g i 2 min). Kolonnen flyttades till ett eppendorfrör, 25µl DEPC vatten tillsattes, röret inkuberades i 2 min i rumstemperatur och centrifugerades sedan (14000g i 2 min). Kolonnen avlägsnades. Koncentrationen av RNA samt förekomst av kontaminanter som eluerats från kolonnen mättes sedan med hjälp av en spektrofotometer (NanoDrop, NanoDrop Technologies, Montchann, DE) där koncentration av DNA och RNA (A<sub>260</sub>), protein (A<sub>280</sub>) eller andra kontaminanter (A<sub>230</sub>) bestämdes med hjälp UV ljus.



## **cDNA syntes**

Prover från en häst åt gången preparerades: RNA tinades och 0,5µg överfördes till 8 stripsrör (märkta RT+) där de inkuberades i 30 min i 37°C tillsammans med 10xRxnbuffert, Dnase och DEPC vatten. Därefter tillsattes DNAs Stop vilket följdes av ytterligare en inkubering (10 min i 65 °C). Dessa steg gjordes för att avlägsna eventuellt genomiskt DNA som kan ha kommit med vid RNA isoleringen. Därefter tillsattes primern Oligo DT och blandningen inkuberades igen (5 min 70°C sedan 5 min på is). Från varje RT+ rör flyttades 0,0083 µg RNA till nya 8stripsrör märkta RT-. En cDNA mastermix innehållande Goscript 5x Reaktionsbuffert, RNAsinhibitorn RNAsin, PCR nukleotid mix, nukleasfritt vatten och Goscript reverse transkriptas tillsattes RT+ rören. En liknande cDNA mastermix men utan reverse transkriptas tillsattes i RT- rören. Båda 8 stripsrören inkuberades i rumstemp i 5 min, sedan 60 min i 42°C, därefter 15 min i 70°C och till sist 5 min på is varefter de frystes in.

För att kontrollera att allt genomiskt DNA avlägsnats genomfördes en qPCR körning för genen IFN- $\alpha$  på RT- proverna. Genen för IFN- $\alpha$  saknar introner. Om inget uttryck av IFN- $\alpha$  kan påvisas i frånvaro av enzymet reverse transkriptas (RT-) vid syntesen av komplementärt DNA (cDNA) bör alltså provet vara fritt från genomiskt DNA.

## **SYBR green qPCR**

Cellernas genuttryck av referensgenerna SDHA och RPL32 samt generna för de olika cytokinerna (IL-10, IFN $\gamma$ , IL-8, IL-12, IL-4, TGF- $\beta$  och IFN- $\alpha$ ) bestämdes med hjälp av SYBR green qPCR. Prover av cDNA späddes till 1:5 (8µl cDNA + 32 µl nukleasfritt vatten). En PCR mix bestående av Sybrgreen PCR mix, nukleasfritt vatten samt forward och reverse primers för den gen man är intresserad av, blandades. En totalvolym på 25 µl av Mix och utspädd cDNA prov per brunn tillsattes i en 96 brunnsplatta. Vid alla PCR körningar kördes duplikat av varje prov. Proverna kördes sedan i PCR maskinen som regelbundet höjer och sänker temperaturen i ca 40 cykler för maximal replikation. DNA strängarna öppnas vid ca 95°C, sedan sänks temperaturen och primrarna kan binda in (exakt temperatur då primrarna binder in varierar beroende på vilken gen som undersöks, endast gener där primrarna har samma smältpunkt kan undersökas samtidigt). Temperaturen höjdes därefter till ca 72°C, varvid polymeraset binder till primrarna och replikationen påbörjas. SYBR green är ett färgämne (cyanin) som binder in till dubbelsträngat DNA och då fluorescerar, fluorescensen mäts i PCR maskinen. För varje cykel dubblas replikaten. Ju mer uppreglerad genen är, desto fler replikat bildas. Fluorescenssignalen blir starkare och starkare ju fler replikat som bildas. PCR maskinen anger värdet för den cykel då en positiv fluorescenssignal genereras som quantification cycle (Cq värde). Cq värdet från genen som undersöks jämförs med Cq värden för referensgenerna SDHA och RPL32 samt med Cq värden för mediumproverna. Utifrån detta beräknas fold change (FC) värden. FC värdet anger hur mycket mer en gen uttrycks jämfört med mediumprovet.  $FC \geq 2$  anger att genuttrycket har inducerats,  $FC \leq 0,5$  anger att genuttrycket inhiberas.

## **ELISA**

*EqMBC* från fyra hästar isolerades och ytterligare en cellinduktion utfördes med G3 och Pam likt den som beskrivits ovan. Som ett tillägg tillsattes även G3 som första inducerare vid 0h i två brunnrader, följt av att Pam tillsattes efter 6h eller 12h. Cellinduktionen utfördes parallellt

i två 96 brunnspplattor, varav den ena inkuberades i 18 h och den andra i 48 h. Efter inkuberingstiden samlades supernatanten från brunnarna och frystes ner.

ELISA (Mabtech AB, Solna) användes sedan för att mäta mängden IFN- $\gamma$  i supernatanterna, detta gjordes med hjälp av 2 st monoklonala antikroppar mot ekvint IFN- $\gamma$ . Proverna späddes 1:20. Den ekvina IFN- $\gamma$  standarden späddes i en spädningsserie 1:2. Plattorna "coatades" i kylskåp över natten med antikroppen MT166 spädd i inkubationsbuffer. Därefter tvättades plattan 5 gånger, proverna samt standarden tillsattes och inkuberades i 60 min i rumstemp. Plattan tvättades därefter igen (5 gånger), den andra antikroppen tillsattes (MT13-biotin) och plattan inkuberades ytterligare 60 min. Plattan tvättades därefter igen (5 gånger), sedan tillsattes Streptavidin-HRP och plattan inkuberades ytterligare 60 min. Plattan tvättades sedan igen (5 gånger). Därefter tillsattes substratlösning, efter ca 4 min stoppades reaktionen med 10 % HCl lösning. Den optiska densiteten mättes sedan vid 450nm. Utifrån värdena från IFN- $\gamma$  standardens spädningsserie gjordes en standardkurva i PRISM 5 (Graph Pad software), med hjälp av denna beräknades mängden producerad IFN- $\gamma$  från *eqMBC*. Detektionsnivån togs fram med hjälp av standardkurvan och låg mellan 78 och 5000 pg/ml.

### **Rening och strålning av L3 larver**

Innan cellinduktion med L3 larver från stor och liten blodmask har larverna renats på följande sätt: L3 larver isolerades från träckprov och förvarades i vatten i kylskåp. Med hjälp av pipettering under mikroskop plockades ca 100 larver och tillsattes i 10 ml RPMI 1640 cellodlingsmedium supplementerat med 2 % HEPES, 1 % PEST, 1 % L-glutamin, 2-ME (50 $\mu$ M) samt polymixin B 50mg/ml (63  $\mu$ l per 100ml). Larverna inkuberades i mediet i 24 h (37°C i 6,5 % CO<sub>2</sub> i luft), därefter centrifugerades de (5min, 500g). Prov för bakterieodling togs från supernatanten, övrig supernatant avlägsnades. Larverna i pelleten analyserades i mikroskop med avseende på antal och rörlighet innan de återigen inkuberades i cellodlingsmedium med Polymixin B 24 h (37°C i 6,5 % CO<sub>2</sub> i luft). Processen upprepades ytterligare en gång, totalt inkuberades larverna 72h (3x 24h). Metoden utvärderades med avseende på bakterieväxt, eventuell L3 förlust och minskad rörlighet hos larverna. Bakterierproverna (ca 200  $\mu$ l från supernatanten/prov) odlades på nötblodagar samt anaerobt på Fastidious anaerobic agar (FAA).

De renade larverna strålades i UV ljus. Ca 25 larver strålades åt gången vid olika styrkor och i olika tidsintervall. Metoden utvärderades sedan i syfte att hitta kortast strålningstid och lägst styrka där larverna slutar röra sig och därmed kan anses kraftigt försvagade.

### **Cellinduktion med G3 och L3 larver**

*EqMBC* från 4 olika hästar isolerades enligt ovan. Cellerna odlades i 6 brunnspplattor (5–10 miljoner celler/platta) i 37°C och 6,5 % CO<sub>2</sub>. De odlades i följande kombinationer: enbart medium; i närvaro av enbart ca 5 st L3 larver; i närvaro av enbart G3; i närvaro av G3 samt ca 5 st L3 larver eller i närvaro av ca 5 st L3 larver samt polymyxin B.

Larverna som användes bestod av en blandning av L3 larvstadiet från liten och stor blodmask som utvunnits från hästräck. Samtliga larver som använts har renats som beskrivet ovan. Därefter har de strålats i UV ljus, 50 MJ i 5 minuter.

Efter 18h skördas cellerna enligt tidigare beskrivning. RNA isolering och cDNA syntes utförs som beskrivet ovan. Cellernas cytokinproduktion utvärderas sedan med hjälp av SYBR green qPCR som beskrivet tidigare i texten.

## Statistik

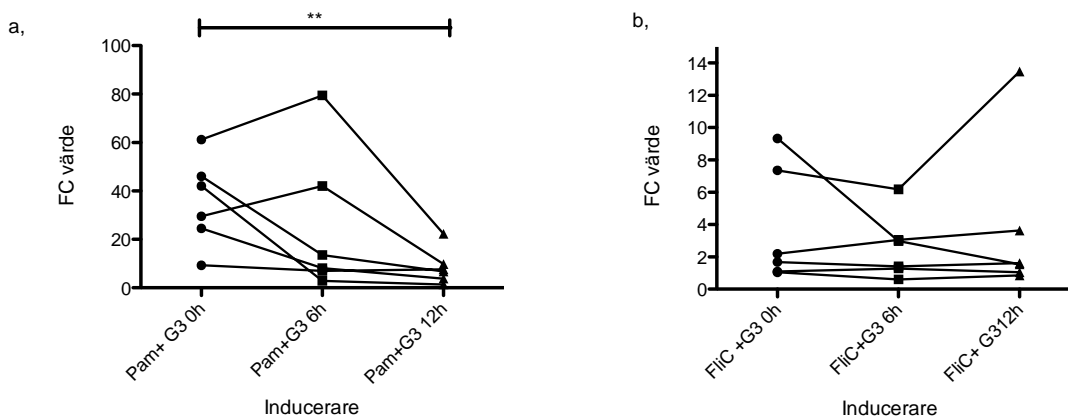
Med hjälp av statistikfunktionen i Graphpad Prism (Graphpad Software, California, USA) beräknas om de skillnader i FC värden som de olika inducerarna i kombination gett upphov till, är statistiskt signifikanta. Metoden som används är parat t-test, där FC värden från olika behandlade cellkulturer, från samma häst, jämförs med varandra. Nollhypotesen i detta fall innebär att det inte finns någon signifikant skillnad i FC värden från de olika behandlade cellkulturerna. Nollhypotesen förkastas om p värdet < 0,05. P värden < 0,05 innebär således att vi kan se en effekt av de försök vi gjort. I resultatdelen anges statistisk signifikans på följande sätt. \*= p värde < 0,05, \*\*=p värde < 0,01

## RESULTAT

### Tidsstudie av genuttryck för IFN- $\gamma$ , IL-10 och IL-8 i eqMBC odlade i olika kombinationer av G3, FliC och Pam

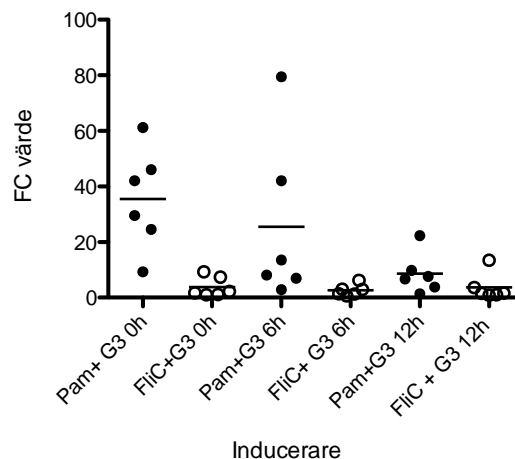
Med hjälp av qPCR mättes nivån av geninduktion för IFN- $\gamma$ , IL-10 och IL-8 i en tidsstudie med eqMBC från sex hästar som inducerats med G3, FliC och Pam i olika kombinationer. Pam eller FliC sattes till vid 0h, G3 har sedan antingen tillsatts tillsammans med Pam eller FliC vid 0h alternativt har G3 tillsatts efter 6 eller 12 timmars induktion. Cellerna i samtliga kombinationer skördades efter 18h. För varje häst skördades samtidigt ett kontrollprov där celler odlats i enbart cellodlingsmedium.

IFN- $\gamma$  inducerades i eqMBC från samtliga hästar som inkuberats i närvaro av både Pam och G3. Detta gällde alla kombinationer med ett undantag: Häst nr 2 när G3 tillsattes efter 12h. FC-värdena när Pam och G3 tillsattes tillsammans vid 0h var signifikant högre ( $p < 0,01$ ) jämfört med när Pam tillsattes först och G3 tillsattes efter 12h. Hos fyra av hästarna var skillnaden i FC-värden mer än fördubblad. För två av hästarna var FC-värdena högst när Pam tillsattes först och G3 tillsattes efter 6 timmar. När G3 kombineras med FliC sågs inga samband mellan tidpunkten för tillsatts av G3 och höga eller låga FC-värden. Hos tre av hästarna inducerades inte IFN- $\gamma$  alls i närvaro av FliC och G3.



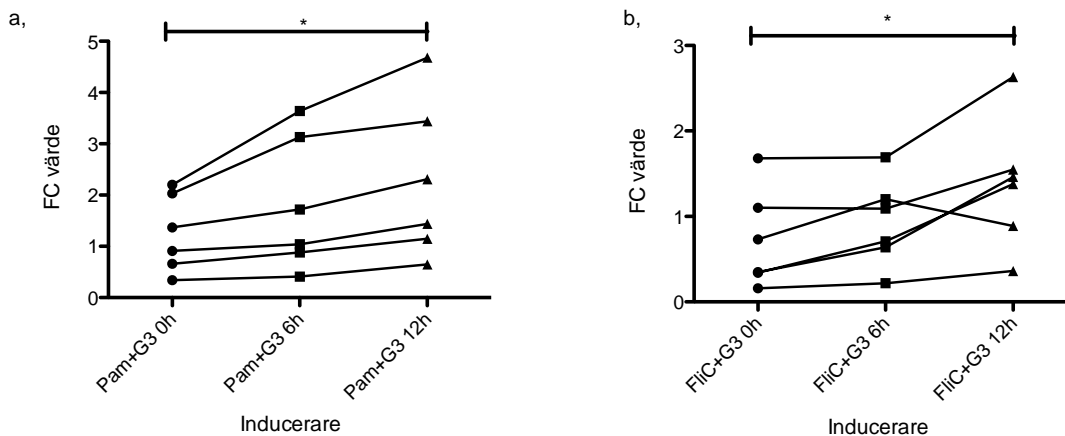
Figur 1: Induktion av genen för IFN- $\gamma$  i eqMBC som inducerats med Pam (a) eller FliC (b) och G3 har tillsatts vid 0, 6 eller 12h. Fold Change värde,  $FC \geq 2$  innebär att genen har inducerats. På X-axeln anges hur de olika inducerarna kombinerats. \*\*= $p < 0,01$

När Pam och G3 kombinerades uppnåddes alltid högre FC värden jämfört med när FliC och G3 kombinerades, oavsett tidpunkt.



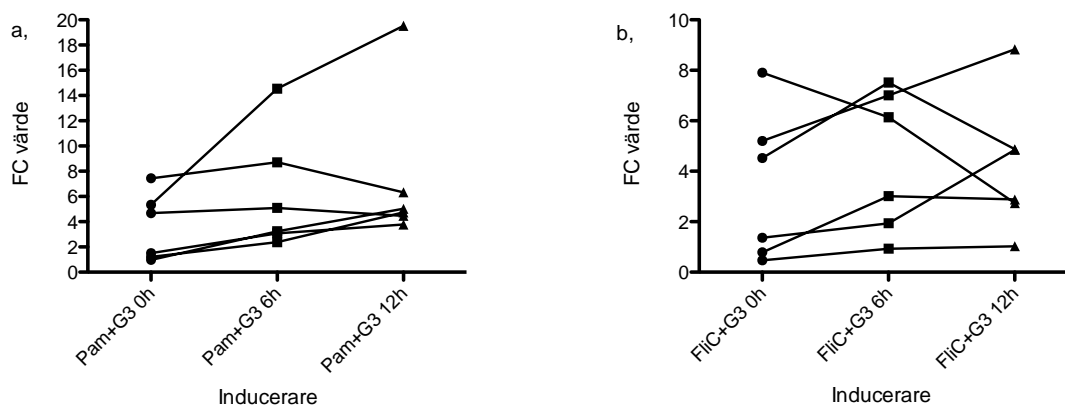
Figur 2. Jämförelse av induktion av genen för IFN- $\gamma$  i eqMBC när Pam och G3 kombineras eller FliC och G3 kombineras. På Y-axeln anges Fold Change värde,  $FC \geq 2$  innebär att genen inducerats. På X-axeln anges hur de olika inducerarna kombinerats.

Nivåerna av genuttrycket för IL-10 när Pam och G3 kombinerades, ökade ju senare G3 tillsattes. Detta gällde för samtliga hästar. Skillnaden mellan när G3 tillsattes vid 0h och 12h var signifikant ( $p < 0,05$ ). En liknande effekt observerades när FliC kombinerades med G3, FC-värdena ökade ju senare G3 tillsattes, även här var skillnaden signifikant ( $p < 0,05$ ).



Figur 3. Induktion av genen för IL-10 i eqMBC som inducerats med Pam (a) eller FliC (b) och G3 har tillsatts vid 0, 6 eller 12h. Fold Change värden,  $FC \geq 2$  innebär att genen inducerats. På X-axeln anges hur inducerarna kombinerats. \*=  $p < 0,05$

Genen för IL-8 inducerades i eqMBC hos hälften av hästarna när Pam och G3 tillsattes tillsammans vid 0h. När Pam tillsattes vid 0h och G3 tillsattes vid 6 eller 12 timmar inducerades genen för IL-8 i alla hästar. Hos fyra av de sex hästarna sågs en trend att FC-värdena ökade ju senare G3 tillsattes, ökningen var dock inte signifikant. FliC och G3 inducerade genen för IL-8 i tre av de sex hästarna när de tillsattes ihop vid 0h. Hos fyra av sex hästar inducerades genen för IL-8 när G3 tillsattes vid 6h och hos fem av sex hästar inducerades genen för IL-8 när G3 tillsattes efter 12h. Vilken kombination av FliC och G3 som gav högst FC-värden varierade dock mellan de hästar som uttryckte genen för IL-8.



Figur 4. Induktion av genen för IL-8 i eqMBC som inducerats med Pam (a) eller FliC (b) och G3 har tillsatts vid 0, 6 eller 12h. Fold Change värden,  $FC \geq 2$  innebär att genen inducerats. På X-axeln anges hur inducerarna kombinerats.

Sammanfattningsvis visar resultaten att G3 inducerar genen för IFN- $\gamma$  men inhiberar uttrycket av genen för IL-10. Pam bidrar till G3's induktion av IFN- $\gamma$  medan viss indikation finns att FliC inhiberar densamma. Genen för IL-8 har inducerats i dessa försök, men det går inte att säga vilken av inducerarna som drivit induktionen.

### Tidsstudie av IFN- $\gamma$ produktionen hos eqMBC från häst odlade i närvaro av G3 och Pam

Mängden IFN- $\gamma$  som producerats av eqMBC från fyra hästar mättes med ELISA. EqMBC odlades i närvaro av G3 och Pam, var för sig och i olika kombinationer. Som kontroll odlades även eqMBC från varje häst i enbart cellodlingsmedium. Försöket utfördes i två 96 brunnspeltor som inkuberades parallellt, en skördades efter 18h och den andra efter 48h. Detektionsnivån för producerad IFN- $\gamma$  låg mellan 78 pg/ml och 5000 pg/ml.

Efter 18 h hade IFN- $\gamma$  producerats av eqMBC i samtliga kombinationer för häst 2. Högst värden för häst 2 uppnåddes när G3 och Pam tillsattes samtidigt vid 0h, värdet var då mer än fördubblat jämfört med när Pam eller G3 tillsattes var för sig. EqMBC från Häst 1 producerade inga mätbara nivåer av IFN- $\gamma$  i någon kombination. EqMBC från Häst 3 producerade IFN- $\gamma$  när enbart G3 tillsattes, i övriga brunnar kunde ingen detekterbar produktion påvisas. EqMBC från Häst 4 producerade IFN- $\gamma$  när enbart Pam tillsattes, i övriga brunnar kunde ingen produktion påvisas.

Efter 48h kunde IFN- $\gamma$  produktion påvisas i samtliga kombinationer från häst 2 och 4. Båda dessa hästar uppnådde högst värden när G3 och Pam tillsattes tillsammans vid 0h. EqMBC från Häst 1 producerade inga mätbara nivåer av IFN- $\gamma$ . För Häst 3 producerades IFN- $\gamma$  i alla kombinationer, utom de där Pam tillsattes vid 0h och G3 adderades efter 6 eller 12 timmar varvid ingen detekterbar produktion kunde påvisas. Däremot producerades IFN- $\gamma$  när G3 tillsätts vid 0h och Pam adderades efter 6 eller 12 timmar. De högsta värdena för häst 3 uppnåddes när G3 tillsattes ensamt.

Tabell 1. Koncentration IFN- $\gamma$  som producerats efter 48h

<b>48h</b>	<b>Pam</b>	<b>G3</b>	<b>Pam + G3 0h</b>	<b>Pam 0h +G3 6h</b>	<b>Pam 0h +G3 12h</b>	<b>G3 0h+ Pam 6h</b>	<b>G3 0h+ Pam 12h</b>
<b>Häst 1</b>	<	<	<	<	<	<	<
<b>Häst 2</b>	10 346	11 990	<b>15 018</b>	13 583	3435	5901	2318
<b>Häst 3</b>	304	<b>2392</b>	698	<	<	474	751
<b>Häst 4</b>	1502	3956	<b>7476</b>	1652	975	2156	3458

< = under detektionsnivå 78 pg/ml

När värdena för häst 2 vid 18 och 48 timmar jämförs, observeras att när Pam och G3 tillsattes var för sig ökade nivån producerad IFN- $\gamma$  från 18h till 48h. Det höga värdet producerad IFN- $\gamma$  som fås vid 18h när G3 och Pam tillsattes samtidigt vid 0h, tycks ha sjunkit efter 48 timmar inkubation.

Tabell 2. Koncentration producerad IFN- $\gamma$  hos häst 2, en jämförelse av nivån vid 18h och 48h

Häst 2	Pam	G3	Pam+ G3 0h	Pam 0h +G3 6h	Pam 0h +G3 12h	G3 0h+ Pam 6h	G3 0h+ Pam12h
18h	4050	4966	<b>22 469</b>	6718	9711	<	3329
48h	10 346	11 990	<b>15 018</b>	13 583	3435	5901	2318

< = under detektionsnivå 78 pg/ml

På proteinnivå ses liknande resultat som på mRNA-nivå, dvs. både G3 och Pam inducerar IFN- $\gamma$  produktion i *eqMBC*. Högst produktion uppnåddes när de tillsattes tillsammans vid induktionens början. För häst 2 sågs en synergieffekt i IFN- $\gamma$  produktionen när G3 och Pam tillsattes samtidigt vid 0h till *eqMBC* som skördades efter 18h.

### Larvrening inför cellinduktion

En metod för att rena L3 larver från blodmask som utvunnits ur hästräck har utvecklats i detta försök. Detta för att använda larverna i kommande cellinduktionsförsök. Larverna renades genom att inkuberas i värmeskåp 37°C (3 x 24h) i cellodlingsmedium med tillsatt av Polymixin B. Proverna med larver i cellodlingsmediet (Prov 1 och 2) jämfördes med ett kontrollprov från larverna som förvarats i vatten i kylskåp.

I kontrollprovet sågs lindrig bakterieväxt både vid aerob och anaerob odling. Redan efter 24h i mediet var proverna negativa på bakteriologisk odling. Proverna var fortfarande negativa efter 48h, varför ingen ytterligare odling gjordes efter 72h. Innan första 24h inkuberingen rörde sig ca 95 % av larverna. Antal larver som rörde sig nära halverades under den totala inkuberingstiden på 72h. Rörligheten för larverna sjönk mellan 10 % och 30 % mellan varje inkubering. I prov 1 fanns från början ca 100 st larver, i prov 2 fanns från början ca 50 st. Larvförlusten var totalt mellan 20 % och 30 % för hela inkuberingstiden. Resultaten visar att 24 h tvätt i cellodlingsmediet kan vara tillräckligt för att förhindra bakterieväxt. Vidare kan man se att rörligheten minskar och larvförlusten ökar med varje 24-timmars inkubering.

### UV-strålning av L3 larver

I detta försök UV strålades L3 larver från blodmask i syfte att hitta den mildaste strålningsdosen som under kortast tid kraftigt försvagar larverna. Detta för att i senare försök kunna använda försvagade larver i cellinduktionsförsök.

Ca 25 st larver strålades åt gången, i ca 1-2 ml cellodlingsmedium i petriskålar. Rörligheten innan larverna utsattes för strålningen var ca 90 % i samtliga försök.

Initialt testades att stråla larverna 2x15 min i 50 MJ + 2x15 min i 125 MJ. Redan efter första 15 minuterna i 50 MJ strålning var rörligheten 0, inga larver låg ihoprullade och ca 40 % av larverna låg helt raka, resterande lätt böjda. Larvernas form förändrades inte nämnvärt under resterande strålningar. Vidare testades att stråla larverna med 50 MJ några minuter i taget för att se när rörligheten avtar. Även strålning i 30 MJ 2 minuter i taget testades för att se om lägre strålningsstyrka räcker för att kraftigt försvaga larverna.

Tabell 3. Strålningsstyrkans och strålningstidens effekt på L3 larver

50 MJ		30 MJ	
<b>50 MJ i 2 min</b>	Ca 5% av larverna rör sig långsamt	<b>30 MJ i 2 min</b>	30% av larverna rör sig.
<b>50 MJ i ytterligare 1 min</b>	2 stycken larver i kanterna av vattendroppen rör sig mycket långsamt. Ingen larv ligger ihoprullad	<b>30 MJ i ytterligare 2 min</b>	Endast 10 % rör sig
<b>50 MJ i ytterligare 2min</b>	Ingen rörelse ses, ingen larv ligger ihoprullad. De flesta ligger mycket lätt böjda.	<b>30 MJ i ytterligare 2 min</b>	Enstaka larver rör sig långsamt
		<b>30 MJ i ytterligare 6 min</b>	Ingen rörelse kan ses, ingen larv ligger ihoprullad, de flesta ligger mycket lätt böjda.

Resultaten visar att efter 50 MJ strålning i totalt 5 min (2+1+2 min) försvann rörligheten hos larverna, majoriteten av larverna låg utsträckta, lätt böjda och ingen larv låg ihoprullad. Detta konfirmerades i ytterligare ett försök där larverna strålades i 50 MJ i 5 minuter. Längre tid och högre strålning ändrade inte den mikroskopiska bilden nämnvärt, med undantag av att omkring hälften av larverna låg helt raka istället för lätt böjda. Lägre strålningsintensitet krävde längre tid för att rörligheten skulle sjunka till nära noll. Största andelen larver vid 30 MJ strålningsintensitet var stilla redan efter 2 min, men enstaka larver rörde sig fortfarande efter 6 min.

### Cellinduktion med L3 larver och G3 – ett pilotförsök

*EqMBC* från fyra hästar inkuberades tillsammans med G3, L3 larver, G3 och L3 larver kombinerat eller med L3 larver och Polymixin B kombinerat. Som kontroll användes även ett prov från varje häst där *eqMBC* inkuberades i enbart cellodlingsmedium. Cellerna i samtliga cellkulturer skördades efter 18h. Efter mRNA isolering och cDNA syntes analyserades cellernas genuttryck för IL-4, IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-10 och IL-12 med hjälp av qPCR.

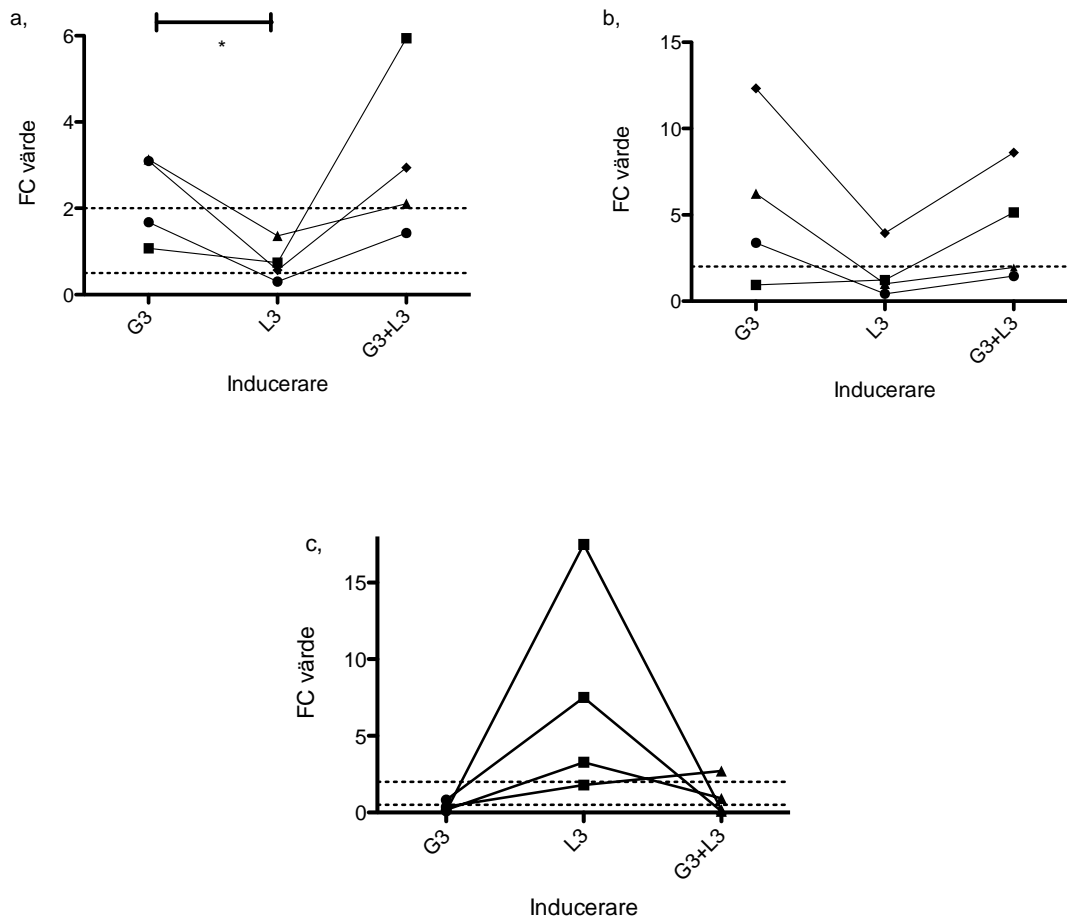
Innan cellerna skördades mikroskopades samtliga brunnar med celler. I de brunnar där det skulle finnas L3 larver bekräftades minst tre L3 larver per brunn, celler sågs ligga dikt an till samtliga synliga L3 larver. Cellerna i alla brunnar med medium, G3, L3 samt G3 och L3 kombinerat såg vitala ut. I brunnarna med L3 larver och Polymixin B fanns en hög andel cellaggregat med döda celler, detta gällde samtliga hästar. Resultaten från dessa brunnar kan därför inte anses tillförlitliga och redovisas ej.

G3 inducerade ökat genuttryck av IFN- $\gamma$  hos samtliga hästar. FC värdena när G3 användes som inducerare var signifikant högre jämfört med när L3 användes som inducerare. G3 inducerade även IL-12 hos tre av fyra hästar. Vidare observerades trenden att G3 hämmade IL-4 uttryck (FC-värdet för IL-4 <0,5 i tre av fyra hästar). G3 påverkade inte genuttrycket för IL-10, TGF- $\beta$  eller IFN- $\alpha$ .



L3 inducerade IL-4 i tre av fyra hästar. L3 var den induceraren som gav upphov till högst FC-värden för IL-4. L3 var också den av inducerarna som gav lägst FC-värden för IL-12 och IFN- $\gamma$ . I detta försök påverkade inte L3 genuttrycket för IL-10, TGF- $\beta$  eller IFN- $\alpha$ .

När inducerarna L3 och G3 kombinerades, inducerades IL-12 och IFN- $\gamma$  medan FC-värdet för IL-4 sjönk jämfört med när L3 användes som ensam inducerare. Ingen geninduktion observerades för IL-10, TGF- $\beta$  eller IFN- $\alpha$ .



Figur 5. Induktion av generna IFN- $\gamma$  (a), IL-12 (b) och IL-4 (c) när eqMBC induceras med G3, L3 eller G3 och L3 i kombination. Fold Change värden,  $FC \geq 2$  innebär att genen inducerats. På X-axeln anges hur inducerarna kombinerats.

Sammanfattningsvis observerades att G3 som ensam inducerare driver mot ett TH1 svar med IFN- $\gamma$  och IL-12 produktion medan L3 som ensam inducerare ger upphov till ett TH2 svar med IL-4. Vidare observerades att när G3 och L3 kombineras tycks G3 dominera över L3's effekt på genuttrycket och driver reaktionen mot ett TH1 svar.

## DISKUSSION

En metod att preparera L3 stadiet av *Strongylus vulgaris* från hästräck så att larverna kan användas för att inducera cytokiner i kulturer av *eqMBC* har utvecklats. Cellinduktioner visade att L3 inducerar uttryck av genen för IL-4. Cellinduktioner har också gjorts med det nya adjuvanset G3 som inducerade generna för IFN- $\gamma$  och IL-12 men inte IL-10, IL-4, TGF- $\beta$  eller IFN- $\alpha$ . Preliminära data visar också att när G3 tillsätts tillsammans med andra inducerare är dess effekt på cytokinproduktionen dominant och G3 tycks kunna driva om det L3 inducerade TH2 svaret mot TH1.

Undersökningarna av cytokinproduktionen när G3 och Pam tillsatts i olika kombinationer vid olika tider visade att G3 är den av de två inducerarna som är viktigast för induktion av genen för IFN- $\gamma$  liksom för produktionen av proteinet. Dock bidrar även Pam till uppreglerat genuttryck för IFN- $\gamma$ . När Pam och G3 tillsätts till *eqMBC* tillsammans ökar nivåerna av inducerat IFN- $\gamma$ , jämfört med när Pam och G3 tillsätts var för sig. I en av tidsstudierna med G3, Pam och TLR5 agonisten FliC ökade uttrycket av genen för IL-10 ju senare G3 tillsattes, vilket visar att G3 inhiberar uttryck av genen för IL-10. När G3 kombineras med FliC eller Pam är G3's inverkan på cytokinproduktionen av IFN- $\gamma$  och IL-10 dominant över de andra inducerarna. Utifrån dessa försök går det inte att dra någon slutsats om vilken av inducerarna som driver induktion av genen för IL-8. Induktion av generna för IL-12 och IFN- $\gamma$  gör G3 till ett TH1 drivande adjuvans. Att G3 dessutom inhiberar IL-10 styrker detta då IL-10 är en cytokin som framförallt associeras med Treg celler (Leavings *et al.*, 2002; Dowling *et al.*, 2016; Burakova *et al.*, 2017).

Ett viktigt syfte med detta examensarbete har varit att hitta sätt att rena och försvaga L3 larver för att sedan kunna använda dem i induktionsförsök med *eqMBC*. Detta medför utmaningar eftersom L3 larver är stora agens med många olika antigen, både ytantigen och exkretoriska-sekretoriska proteiner (Caffrey *et al.*, 1994). Vidare utvinns L3 larverna från hästräck, som innehåller en massiv bakterieflora och LPS. När L3 larver renades i medium innehållande antibiotika kunde man se att proverna redan efter 24 h var negativa på anaerob och aerob bakterieodling. Antibiotikainnehållet i mediumet, streptomycin, penicillin och Polymixin B, har effektivt avdödat de bakterier som fanns i kontrollprovet. Eftersom bakteriologisk odling var negativ redan efter 24h kan man med anseende på bakterieförekomst inte anses behöva tvätta cellerna mer än 1 gång. Färre tvättar är också en fördel med tanke på den ökande larvförlusten när larverna flyttades mellan tvättarna. Även larvernas rörlighet minskade med antalet tvättar, detta är dock ett mindre problem eftersom larverna ändå ska strålas till orörlighet. L3 larverna blev kraftigt försvagade vid 50Mj UV strålning under 5 minuter. Det är svårt att säga om L3 larverna helt avdödades med denna strålning. För att vara säker på att de dör skulle man kunna ståla dom under med högre energi under längre tid. Riskerna med ökad strålning är att ytproteiner börjar denatureras eller att ytantigenet förändras. Detta kan ge upphov till nya antigenstrukturer vilket gör att det är svårare att förutse antigenpresentationen samt dra slutsatser av försökens resultat. Vid mikroskopering efter 18h av de L3 larver som ingått i L3 induktionen sågs inga rörelser hos larverna alls, vilket tyder på att de avdödats. Som kontroll för kontaminanter i cellkulturerna eller cDNA.t undersöktes uttryck av genen för IFN- $\alpha$  i *eqMBC*. IFN- $\alpha$ , som har en antiviral effekt kan vid cellodling induceras om cellkulturerna

kontaminerats med nukleinsyra från kontaminerande mikroorganismer. Genen för IFN- $\alpha$  uttrycktes inte alls i *eqMBC* varken när G3 eller L3 larver används som inducerare. Det visar att reningsprocessen samt strålningen fungerat men också att strålningen heller inte varit för kraftig då L3 larverna förblivit intakta. För att ytterligare utvärdera reningsprocessen bör man även titta på eventuell Lipopolysaccharid (LPS) förekomst hos de tvättade larverna. Den studien har inte rymts i det här examensarbetet men bör göras innan ytterligare cellinduktioner med L3 eftersom LPS förekomst kraftigt kan påverka cellernas cytokinproduktion (Bonin *et al.*, 2013). Dock fanns en cellkultur med L3 larver kombinerat med Polymixin B med som en kontroll för varje häst vid L3 induktionen. Den koncentration Polymixin B som användes tycks dock ha haft negativ inverkan på cellerna, mycket cellaggregat sågs vid mikroskopering vilket tyder på att cellerna dött. Ska försöket upprepas bör man testa andra metoder att späda den Polymixin B som används vid cellinduktionen. Även om larverna anses rena från bakterier och förhoppningsvis även från LPS följer en del ”mekaniskt” smuts med vid reningsprocessen som kan ses som partiklar vid mikroskopering. Någon typ av filtrering måste därför läggas till i reningsprocessen så att så lite som möjligt, förutom L3 larverna, ska påverka resultaten.

L3 stadiet av larver från en blandning av liten och stor blodmask har använts i induktionsförsöket. Orsaken till detta är att det är svårt att få tag på *S.vulgaris* L3 larver i renkultur, detta bör dock ändå vara målet vid fortsatta försök. Antal larver som användes (3-5 stycken) kan också med fördel ökas vid upprepade försök eftersom man vid mikroskopering kunde se att väldigt många celler ej hade kontakt med larverna och således inte exponerades för L3 larvernas ytantigen.

I ett första pilotförsök undersöktes om L3 larver inducerade några och i så fall vilka cytokiner, samt hur cytokinproduktionen påverkades när G3 och L3 larver kombinerades. Eftersom parasiter generellt ger upphov till ett TH2 svar kan man förvänta sig en stegring av IL-4 som är en typisk TH2 cytokin (Mulcahy *et al.*, 2004; McSorley *et al.*, 2013). Den trenden kunde också mycket riktigt ses hos alla fyra hästar när L3 tillsattes till *eqMBC*. För IL-4 var FC > 2 i tre av fyra hästar medan den fjärde låg mycket nära 2, därför kan man säga att genen för IL-4 faktiskt inducerats av L3. När L3 kombinerades med G3 sjönk FC värdena i tre av fyra hästar, vilket tyder på att G3 inhiberar IL-4 uttryck. Vidare observerades att för tre av fyra hästar låg FC-värdet för IL-4 under 0,5 i proverna med enbart G3. Även detta resultat indikerar att G3 inhiberar IL-4 uttryck. G3 inducerade generna för IL-12 och IFN- $\gamma$ , både när G3 var ensam inducerare och när G3 kombinerades med L3. När L3 och G3 kombinerades inducerades med andra ord cytokiner associerade med ett TH1 svar medan den TH2 associerade IL-4 inhiberades. G3 kan alltså, i detta försök, anses dominant över L3 som inducerare och styr cytokinproduktionen mot ett TH1 svar. Detta stämmer överens med resultat från G3 i musstudier som van der Sant *et al.*, publicerat 2014. Varken generna för IL-10 eller TGF- $\beta$  inducerades av L3 larver. I litteraturen anges att helminter ofta uppreglerar regulatoriska cytokiner som IL-10 och TGF- $\beta$  (McSorley *et al.*, 2013; Weinstock 2006; Maizels *et al.*, 1999; Mulcahy *et al.*, 2004), men det kan vi inte visa här. Det kan vid fortsatta försök vara intressant att odla cellerna under en längre tid med L3 larver, då det är möjligt att Treg induktion följt av ökat uttryck av regulatoriska cytokiner sker i ett senare stadium (Leavings *et al.*, 2002; McSorley *et al.*, 2013). Den största andelen Treg celler finns i lymfoid vävnad i tarmen (Sun *et al.*, 2007) och endast ca 5 % av de cirkulerande lymfocyterna utgörs av Treg celler. Med bakgrund av detta kan man

kanske inte heller förvänta sig induktion av generna IL-10 och TGF- $\beta$  i detta försök, där vi inducerar L3 larver i lymfocyter isolerade från blod. Det vore därför intressant att vid fortsatta försök tillsätta L3 larver till cellkulturer av lymfoida celler från tarmen.

I cellinduktionsförsöken har varje häst varit sin egen kontroll. *EqMBC* från varje häst har delats upp i olika cellkulturer där de olika inducerarna tillsatts. Cytokinuttrycket från kulturerna har sedan jämförts med varandra och även relaterats till referensgenerna *SDHA* och *RPL32*. På så sätt kan antalet hästar minskas men resultaten ändå vara tillförlitliga. Att varje häst varit sin egen kontroll är också fördelaktigt eftersom det visat sig att hästarna sinsemellan varierar mycket. Därför är det viktigt att se om hästarna ökar eller minskar sitt genuttryck snarare än att mäta exakta mängden genuttryck. Att de varierar så mycket sinsemellan kan bero på olika saker. Hästarna som används är undervisningshästar från institutionen för kliniska vetenskaper och även om det är en jämförelsevis isolerad population kan de inte anses vara helt skyddade från yttre stimuli. Det är möjligt att de träffat på agens utifrån som triggat igång deras immunförsvar även om de inte är kliniskt påverkade. Man vet också att immunrespons och nivån av cytokinproduktion varierar mellan individer, det finns så kallade ”high and low responders” (Schnabel *et al.*, 2015). Ett eventuellt framtida vaccin kommer behöva kunna användas på hela den kliniskt friska hästpopulationen med den variation i immunsvaret det innebär. Det är därför en fördel att variation förekommer även bland hästarna som deltar i studien. I pilotstudien där L3 larver för första gången använts som inducerare, användes endast fyra hästar. Trots att trender kan ses är det svårt att få fram statistiskt signifikanta värden med endast fyra individer. För fortsatta studier med L3 induktioner måste antalet hästar ökas väsentligt.

Att hålla nere smittrycket och samtidigt minska resistens-utvecklingen mot anthelmintika är en av utmaningarna för dagens och framtidens veterinärer. Idag kombineras riktad avmaskning med förebyggande åtgärder som betesrotering, betesplanering och att avlägsna träck från hagar. Dessa typer av åtgärder är dock inte möjliga vid all hästverksamhet och på alla ytor där hästar idag hålls. Vi vet att när det gäller *S. vulgaris* räcker en låg infektionsdos för att orsaka allvarlig klinisk sjukdom, subklinisk ohälsa eller nedsatt prestation (Clifton *et al.*, 1994; Duncan 1975; McCraw *et al.*, 1976; Nichol *et al.*, 1987). De åtgärder som gjorts hittills med krav på träckprov innan avmaskning har sannolikt bromsat resistensutvecklingen men har också uppenbarligen ökat prevalensen av en mycket patogen parasit. I många länder där regelbunden avmaskning förekommer är prevalensen av *S. vulgaris* nära noll, här ligger den runt 26 % på individnivå och 66 % (!) på gårdsnivå (Werell 2017). Det kan inte anses acceptabelt ur ett djurvälståndsperspektiv, framförallt inte i Sverige som anser sig vara ett föregångsland när det gäller djurskydd och djurhälsa. Med de höga prestationskrav som ställs på många hästar idag finns heller inget utrymme ens för nedsatt prestation orsakad av parasiter, än mindre fullt utvecklade sjukdomstillstånd som exempelvis kolik. Att fortsätta med rutinmässig avmaskning är heller inget alternativ i längden. Det skulle innebära att den resistensutveckling som redan setts hos liten blodmask (Nielsen *et al.*, 2014; Samson-Himmelstjärna 2011; Lind *et al.*, 2005), riskerar att öka eftersom samma preparat används mot både liten och stor blodmask. Dessutom finns risken att även *S. vulgaris* med tiden utvecklar resistens mot anthelmintika. Ett fungerande vaccin kan minska sjukdomsförekomst hos enskilda hästar samt minska smittrycket i populationen. Det skulle därför kunna vara en möjlig lösning på resistensproblematiken. Att ta fram vaccin mot parasiter är en mycket stor utmaning och det finns få lyckade exempel (Hewitson *et al.*, 2014). Det är inte helt säkert att G3 är det bästa adjuvanset att använda

tillsammans med parasitantigen. G3 har visat sig vara en mycket stark inducerare av TH1 svar, det återstår att kartlägga om det är det bästa för att uppnå skyddande immunitet mot *S. vulgaris*. Att G3 är intressant som adjuvans i sig står dock klart, detta på grund av att det oliket många andra adjuvans på marknaden just driver mot ett TH1 svar. Detta gör det högst intressant som adjuvans i vaccin mot en mängd virus och intracellulära mikroorganismer. Man vet att många parasiter uppreglerar immunmodulerande cytokiner som IL-10 och TGF- $\beta$  som en del i sin överlevnadsstrategi (McSorley *et al.*, 2013; Weinstock 2006; Maizels *et al.*, 1999; Mulcahy *et al.*, 2004). Parasiternas förmåga att inducera Treg celler och immunmodulerande cytokiner när de infekterar värden, anses vara en av utmaningarna med att ta fram vaccin mot helminter (Hewitson *et al.*, 2014). Med bakgrund av detta är inhibering av genen för IL-10 något som talar för G3 som möjligt adjuvans även mot helminter. Helminter som inducerar IL-10 skulle möjligtvis lättare kunna bekämpas av immunförsvaret om IL-10 induceringen hämmades. Det vore intressant att i framtiden testa hur immunsvaret ser ut om man i G3 inkorporerar ett parasitantigen, exempelvis från *S. vulgaris*. Vilket eller vilka av L3 larvens antigen som i så fall bör användas är ytterligare en fråga för framtidens forskning. De olika antigen och dess immunogena effekt bör kartläggas, då de kan skilja mellan hur ytantigen och exkretoriska-sekretoriska (ES) produkter stimulerar immunförsvaret. Många ES produkter kan dessutom ha en immunmodulerande förmåga (Hewitson *et al.*, 2009). Ett eventuellt framtida vaccin mot *S. vulgaris* bör vara inriktat på att oskadliggöra helminterna tidigt, helst i L3 stadiet innan de penetrerat mukosan. Detta för att orsaka så lite skada som möjligt. Vilken typ av immunsvaret som är önskvärd när det gäller att uppnå ett långvarigt skydd mot just *S. vulgaris* är ännu inte fastställt och behöver undersökas mer. Hittills har man associerat skydd mot *S. vulgaris* infektion med eosinofili samt en stegring av IgE antikroppar (Klei *et al.*, 1992; Swiderski *et al.*, 1999; Klei & Chapman 1999; Dennis *et al.*, 1993). En cytokin som vore intressant att undersöka närmare vid framtida L3 induktioner är IL-5, eftersom cytokinen rekryterar eosinofiler. Man vet att helminter, *S. vulgaris* inkluderat, ofta ger upphov till ett TH2 svar (Hewitson *et al.*, 2014; Mulcahy *et al.*, 2004; McSorley *et al.*, 2013). Om ett TH2 svar verkligen är det mest effektiva sättet för immunförsvaret att oskadliggöra parasiterna eller om parasiterna själva styr immunförsvaret i den riktning de bäst kan hantera, är heller inte helt klarlagt.

Sammanfattningsvis visar de försök som gjorts i detta examensarbete att G3 har stora möjligheter att bli ett användbart framtida vaccinadjuvans till häst. För att med hjälp av vaccination uppnå en skyddande immunitet mot *S. vulgaris* krävs stora mängder av fortsatta studier. Detta kommer förenklas av de metoder som introducerats i detta examensarbete, att preparera L3 larver så att de kan användas vid cellinduktioner.

## **Acknowledgements**

Tack till Stiftelsen Hästforskning som varit med och finansierat projektet. Tack också till Lise-Lotte Fernström, Bakteriologen BVF, för hjälp med bakteriologiska odlingar och Tack till Eva Tyden, Parasitologen (BVF), som gett oss isolerade L3 larver från blodmask. Tack till Marie Wallbring och stallpersonalen på KV som hjälpt till med blodtappning samt KV's undervisningshästar som bistått med lite av sitt blod till projektet. Slutligen ett stort tack till min handledare Caroline Fossum samt mina biträdande handledare Stina Hellman och Bernt Hjertner för fantastisk handledning, hjälp och glada tillrop!

## REFERENSER

- Aguilera Montilla N, Pérez Blas M, López Santalla M, Martín Villa JM (2004). Mucosal immune system: A brief review. *Inmunología*, 23:207-216.
- Bonin CP, Baccarin RY, Nostell K, Nahum LA, Fossum C, de Camargo MM (2013). Lipopolysaccharide-induced inhibition of transcription of TLR4 in vitro is reversed by dexamethasone and correlates with presence of conserved NF $\kappa$ B binding sites. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 432:256–261.
- Burakova Y, Madera R, McVey S, Schlup JR, Shi J (2017). Adjuvants for animal vaccines. *Viral Immunology*, 31:11-22.
- Caffrey CR, Ryan MF (1994). Characterisation of proteolytic activity of excretory-secretory products from adult *Strongylus vulgaris*. *Veterinary Parasitology*, 52:285-296.
- Camacho AG, Teixeira LH, Bargieri DY, Boscardin SB, Soares IS, Nussenzweig RS, Nussenzweig V, Rodrigues MM (2011). TLR5-dependent immunogenicity of recombinant fusion protein containing immunodominant epitope of malarial circumsporozoite protein and the FliC flagellin of *Salmonella typhimurium*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106:167-171.
- Clayton HM, Duncan JL (1979). The development of immunity to *Parascaris equorum* infection in the foal. *Research in Veterinary Science*, 26:383-384.
- Dennis VA, Klei TR, Chapman MR (1993). Generation and partial characterization of an eosinophil chemotactic cytokine produced by sensitized equine mononuclear cells stimulated with *Strongylus vulgaris* antigen. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 37:135-149.
- Dowling JK, Mansell A (2016). Toll-like receptors: the Swiss army knife of immunity and vaccine development. *Clinical & Translational Immunology*, doi:10.1038/cti.2016.22.
- Duncan JL (1975). Immunity to *Strongylus vulgaris* in the horse. *Equine Veterinary Journal*, 7:192-197.
- Edmonds JD, Horohov DW, Chapmat MR, Pourciau SS, Antoku K, Snedden K, Klei TR (2001). Altered immune responses to a heterologous protein in ponies with heavy gastrointestinal parasite burdens. *Equine Veterinary Journal*, 33:658-663.
- Favoretto BC, Silva SR, Jacysyn JF, Câmara NO, Faquim-Mauro EL. (2014). TLR-2 and 4-independent immunomodulatory effect of high molecular weight components from *Ascaris suum*. *Molecular Immunology*, 58:17-26.
- Hewitson JP, Maizels RM (2014). Vaccination against helminth parasite infections. *Vaccines*, 4:473-487.
- Hewitson JP, Grainger JR, Maizels RM (2009). Helminth immunoregulation: The role of parasite secreted proteins in modulating host immunity. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 167:1-11.
- Gildea S, Sanchez Higgins MJ, Johnson G, Walsh C, Cullinane A (2016). Concurrent vaccination against equine influenza and equine herpesvirus – a practical approach. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 10:433-437.
- Klei TR (2000). Equine immunity to parasites. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 16:69-78.
- Klei TR, Chapman MR (1999). Immunity in equine cyathostome infections, *Veterinary Parasitology*, 85:123-136.

- Klei TR, Chapman MR, Dennis VA (1992). Role of the eosinophil in serum-mediated adherence of equine leukocytes to infective larvae of *Strongylus vulgaris*, *The Journal of Parasitology*, 78:477-484.
- Levings MK, Bacchetta R, Schulz U, Roncarolo MG (2002). The role of IL-10 and TGF- $\beta$  in the differentiation and effector function of T regulatory cells. *International Archives of Allergy and Immunology*, 129:263–276.
- Lind EO, Uggla A, Waller P, Höglund J (2005). Larval development assay for detection of anthelmintic resistance in cyathostomins of Swedish horses. *Veterinary Parasitology*, 128:261-269.
- López-Yglesias AH, Zhao X, Quarles EK, Lai MA, VandenBos T, Strong RK, Smith KD (2014). Flagellin induces antibody responses through a TLR5- and inflammasome-independent pathway. *Journal of Immunology*, 4:1587-1596.
- Maizels RM, McSorley HJ (2016). Regulation of the host immune system by helminth parasites, *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 138:666-675.
- Maizels RM, Holland MJ, Falcone FH, Zang XX, Yazdanbakhsh M (1999). Vaccination against helminth parasites – the ultimate challenge for vaccinologists? *Immunological Reviews*, 171:125-147.
- Matthews JB (2014). Anthelmintic resistance in equine nematodes. *International Journal of Parasitology Drugs and Drug Resistance*, 3:310-315.
- McSorley HJ, Hewitson JP, Maizels. RM (2013). Immunomodulation by helminth parasites: Defining mechanism and mediators. *International Journal for Parasitology*, 43:301-310.
- McCraw BM, Slocombe JO. (1976). *Strongylus vulgaris* in the horse: a review. *Canadian Veterinary Journal*, 17:150-157.
- Monahan CM, Taylor HW, Chapman MR, Klei TR (1994). Experimental immunization of ponies with *Strongylus vulgaris* radiation-attenuated larvae or crude soluble somatic extracts from larval or adult stages. *The Journal of Parasitology*, 80:911-923.
- Mulcahy G, O’Neill S, Donnelly S, Dalton JP (2004). Helminths at mucosal barriers-interaction with the immune system. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56:853-868.
- Nichol C, Masterson WJ (1987). Characterisation of surface antigens of *Strongylus vulgaris* of potential immunodiagnostic importance. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 25:29-38.
- Nielsen MK, Jacobsen S, Olsen SN, Bousquet E, Pihl T (2016). Nonstrangulating intestinal infarction associated with *Strongylus vulgaris* in referred Danish equine cases, *Equine Veterinary Journal*, 48:376-379.
- Nielsen MK, Scare J, Gravatte HS, Bellaw JL, Prado JC, Reinemeyer CR (2015). Changes in serum *Strongylus vulgaris*- specific antibody concentrations in response to anthelmintic treatment of experimented infected foals. *Frontiers in Veterinary Science*, doi: 10.3389/fvets.2015.00017.
- Nielsen MK, Reinemeyer CR, Donecker JM, Leathwick DM, Marchiondo AA, Kaplan RM (2014). Anthelmintic resistance in equine parasites – Current evidence and knowledge gaps. *Veterinary Parasitology*, 204:55-63.
- Oliveira-Nascimento L, Massari P, Wetzler LM (2012). The role of TLR2 in infection and immunity. *Frontiers in Immunology*, doi: 10.3389/2012.00079.
- Paillet R (2014). A systemic review of recent advances in equine influenza vaccination. *Vaccines*, 2:797-831.

- Reed SG, Orr MT, Fox CB (2013). Key roles of adjuvants in modern vaccines. *Nature Medicine*, 19:1597-1608.
- Reinemeyer CR (2009). Diagnosis and control of antihelminthic-resistant *Parascaris equorum*. *Parasites & Vectors*, doi:10.1186/1756-3305-2-S2-S8
- Samson-Himmelstjerna G von (2012). Anthelmintic resistance in equine parasites – detection, potential clinical relevance and implications for control. *Veterinary Parasitology*, 185:2–8.
- Schnabel CL, Steinig P, Schuberth HJ, Koy M, Wagner B, Wittig B, Juhls C, Willenbrock S, Murua Escobar H, Jaehnig P, Feige K, Cavalleri JM (2015). Influences of age and sex on leukocytes of healthy horses and their ex vivo cytokine release. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 165:64-74.
- Stahl C, Unger L, Mazuet C, Popoff M, Straub R, Frey J (2009). Immune response of horses to vaccination with the recombinant Hc domain of botulinum neurotoxin types C and D. *Vaccine*, 27:5661-5666.
- Sun CM, Hall JA, Blank RB, Bouladoux N, Oukka M, Mora JR, Belkaid Y (2007). Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *The Journal of Experimental Medicine*, 204:1775-1785.
- Tsolmogyn B, Koide N, Jambalganiin U, Odkhuu E, Naiki Y, Komatsu T, Yoshida T, Yokochi T (2013). A Toll-like receptor 2 ligand, Pam3CSK4, augments interferon- $\gamma$  induced nitric oxide production via a physical association between MyD88 and Interferon- $\gamma$  receptor in vascular endothelial cells. *Immunology*, 140:352-361.
- van de Sandt CE, Kreijtz JH, Geelhoed-Mieras MM, Vogelzang-van Trierum SE, Nieuwkoop NJ, van de Vijver DA, Fouchier RA, Osterhaus AD, Morein B, Rimmelzwaan GF (2014). Novel G3/DT adjuvant promotes the induction of protective T cell responses after vaccination with seasonal trivalent inactivated split-virion influenza vaccine. *Vaccine*, 32:5614-5623.
- Weinstock JV (2006). Helminths and mucosal immune modulation. *Annals New York Academy of Science*, 1072:356-364.
- Werell E (2017). Prevalens hos *Strongylus vulgaris*, Sveriges lantbruksuniversitet, Veterinärprogrammet (Examensarbete 2017:49).