

Utveckling av vaccin mot kongenital toxoplasmos hos får



Emma Freijs

Självständigt arbete i veterinärmedicin, 15 hp

Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2013:09

Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Uppsala 2013



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Utveckling av vaccin mot kongenital toxoplasmos hos får

Development of Vaccines against Ovine Congenital Toxoplasmosis

Emma Freijs

Handledare:

Elisabeth Persson, SLU, Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi

Sara Wernersson, SLU, Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi

Examinator:

Eva Tydén, SLU, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Omfattning: 15 hp

Kurstitel: Självständigt arbete i veterinärmedicin

Kurskod: EX0700

Program: Veterinärprogrammet

Nivå: Grund, G2E

Utgivningsort: SLU Uppsala

Utgivningsår: 2013

Omslagsbild: Stuteri Störtbacken

Serienamn, delnr: Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2013:09

Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, SLU

On-line publicering: <http://epsilon.slu.se>

Nyckelord: Toxoplasma gondii, får, vaccin, kongenital infektion, kastning, immunologiskt svar

Key words: Toxoplasma gondii, sheep, vaccine, congenital infection, abortion, immune response

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning	1
Summary	2
Inledning.....	3
Material och metoder	3
Litteraturoversikt.....	4
<i>Toxoplasma gondii</i> - generella aspekter	4
Livscykeln och zoonotisk potential.....	4
Toxoplasmos hos får	4
Det immunologiska svaret mot <i>Toxoplasma gondii</i>	5
Det medfödda immunförsvarets respons.....	5
Det specifika immunförsvarets respons	5
Humoral immunitet mot <i>Toxoplasma gondii</i>	5
Toxovax - ett levande attenuerat vaccin.....	6
Utvecklingen av Toxovax	6
Immunsvaret mot Toxovax	7
Nackdelar med Toxovax	8
Nya vaccinkandidater.....	8
DNA-vaccin	8
Rekombinanta vektorvaccin.....	10
Diskussion	10
Vilka immunförsvarskomponenter är inblandade vid en toxoplasmainfektion?.....	10
Hur har Toxovax utvecklats och vilka effekter har det?	10
Hur ser utvecklingen av nya vaccinkandidater mot <i>Toxoplasma gondii</i> ut?.....	11
Är vaccination en bra förebyggande åtgärd mot toxoplasmainfektion?.....	12
Litteraturförteckning	13

SAMMANFATTNING

Toxoplasma gondii är en parasit som kan infektera alla varmblodiga djur, men orsakar sällan komplikationer om den inte infekterar en dräktig eller immunosupprimerad individ. Den är ett stort problem för fårnäringen i och med de aborter, dödfödselar och neonatala dödsfall den orsakar. Då parasiten bildar vävnadscystor hos sin mellanvärd innebär infekterat fårkött en smittorisk för människa.

I försvaret mot en toxoplasmainfektion är den cellmedierade immuniteten allra viktigast med tanke på att *T. gondii* är en intracellulär patogen. De viktigaste cellerna i skyddet mot infektion är NK-celler, aktiverade makrofager och T-celler. Emellertid är humoral immunitet effektiv mot de extracellulära parasitstadierna.

Idag finns ett levande attenuerat vaccin, Toxovax, på marknaden för vaccinering av ungtackor mot kongenital toxoplasmos. Vaccinet ger en skyddande immunitet genom dess inducerande verkan på produktionen av IFN- γ och IgG. Ingen återvaccinering krävs.

Toxovax ger längre dräktighetstid hos tackorna, högre födelsevikt hos lammen och större andel levande avkomma. Det motverkar även vävnadscystbildning och därmed zoonotisk smitta. Transmission till livmodern och fostret förhindras emellertid inte, men vaccinet ger ändå minskad mortalitet hos lamm. Dock har Toxovax kort hållbarhet och det finns en risk att stammen skulle kunna återgå i virulent form. I Sverige vaccineras inte ungtackor med Toxovax, trots de många fördelarna, då det logistiskt sett är omöjligt på grund av den korta hållbarheten.

T. gondii har en komplex livscykel och olika antigen av varierande immunogenicitet uttrycks under dess olika parasitstadier. Detta medför att utvecklingen av nya vaccinkandidater försvåras. En viktig faktor vid utveckling av nya vaccin är att hitta antigen som uttrycks intracellulärt för att få lämplig immunrespons mot infektionen.

Bland de nya vaccinkandidaterna är rekombinanta vektorvaccin och DNA-vaccin de mest lovande alternativen. De ger båda cellmedierad immunitet och i musmodeller har de gett goda resultat. På får har DNA-vaccin tillsammans med adjuvans visat sig ge cellmedierad immunitet. Det saknas emellertid fortfarande fältstudier av hur dessa vaccinkandidater fungerar i praktiken och avseende rekombinanta vektorvaccin krävs det betydligt fler studier på får.

SUMMARY

The parasite *Toxoplasma gondii* can infect virtually all warm-blooded species of animals, but rarely causes any complications if not infecting a pregnant or immunosuppressed individual. It causes abortions, stillbirths and neonatal losses and is thereby a big problem for sheep farmers. In its intermediate host *T. gondii* forms tissue cysts. This makes infected sheep meat a potential route of infectious transmission to humans.

Cell-mediated immunity is the most important defence against toxoplasmosis since *T. gondii* is an intracellular pathogen. The most important immune defence cells are NK cells, activated macrophages and T cells. Antibodies are efficient against the extracellular stages of the parasite.

Today there is only one vaccine against congenital toxoplasmosis in sheep. This vaccine is a living, attenuated vaccine named Toxovax. The protective property of Toxovax is due to the induced production of IFN- γ and IgG. There is no need for revaccination.

Naive ewes vaccinated with Toxovax have a longer mean gestation time, give birth to a higher percentage of living lambs and their lambs have a higher mean birth weight. The vaccine does not affect the transmission of *T. gondii* to the uterus and fetus, however the formation of tissue cysts and mortality is reduced. The downsides of Toxovax are its short shelf-life and the risk of reconvertng virulence. In Sweden, naive ewes are not vaccinated with Toxovax because the short shelf-life makes it practically impossible.

T. gondii has a complex life cycle with many antigens of different immunogenicity being expressed during its different life stages. This makes the search for new vaccines difficult. One of the crucial factors in the vaccine development is intracellular expression of antigen to receive an appropriate immune response to the infection.

The most promising new vaccine candidates are recombinant viral vector vaccines and DNA vaccines. Both of them induce cell-mediated immunity and have generated good results in mice studies. Studies in sheep have proved that DNA vaccines in combination with adjuvants induce cell-mediated immunity. There is a need for further research, for example field studies that show these candidates' protective capacities in real life and studies on recombinant viral vector vaccines in sheep.

INLEDNING

Toxoplasma gondii är en zoonotisk, ubikvitär parasit som kan infektera i stort sett alla varmblodiga djur (Buxton, 1993; Innes, 2009). Den orsakar stora ekonomiska förluster för gris-, get- och framför allt fårnäringen via de många aborter, dödfödslar och neonatala dödsfall den orsakar. Den utgör även en risk för gravida kvinnor och framför allt för immunosupprimerade individer. Det råder inga tvivel om att denna parasit är av stor betydelse inom både veterinär- och humanmedicin.

Då naturligt infekterade tackor visat sig vara skyddade mot ytterligare toxoplasmainfektion talar mycket för att vaccinering skulle kunna förebygga smitta effektivt (Innes, 2009). Därför tänker jag i denna uppsats utröna vilka immunförsvarskomponenter som är inblandade vid en toxoplasmainfektion, hur de vaccin och vaccinkandidater som finns har utvecklats och vilka effekter de har samt diskutera vaccinering som förebyggande åtgärd mot toxoplasmainfektion.

MATERIAL OCH METODER

Sökning efter artiklar har gjorts i Web of Knowledge och PubMed.

För att hitta artiklar om toxoplasma generellt användes sökorden: ("fetal infection" OR "congenital infection") AND toxoplasma* AND (sheep* OR ewe* OR ram* OR lamb*).

Till sökningen efter artiklar om Toxovax sökte jag på orden: vaccin* AND toxoplasma* AND (sheep* OR ewe* OR ram* OR lamb*).

För att hitta artiklar om DNA-vaccin mot toxoplasma användes sökorden: toxoplasma* AND "DNA vaccine" AND sheep.

Flertalet av de använda artiklarna har hittats via referenser från de artiklar som dykt upp vid ovan nämnda sökningar.

LITTERATURÖVERSIKT

***Toxoplasma gondii* - generella aspekter**

Livscykeln och zoonotisk potential

Toxoplasma gondii är en intracellulär protozoo som orsakar aborter och kongenital infektion hos många varmblodiga djur, däribland får (Innes *et al.*, 2009). Kattdjur är huvudvärderna för *T. gondii* och det är endast i deras tarm som sexuell förökning kan ske vilket resulterar i det diploida parasitstadiet, oocystor, som 3-10 dagar efter infektion kommer ut i kattens avföring (Hunter & Sibley, 2012). Utsöndring av oocystor i avföring kan ske i upp till 2-3 veckor. Dessa oocystor kan kontaminera beten, föda eller vatten vilket innebär att en mellanvärd kan få i sig dessa oralt vid vatten- och födointag.

Väl i mag-tarmkanalen på en mellanvärd sporulerar oocystorna till haploida sporozoiter och i mellanvärderna kan fortsatt förökning ske i asexuell form (Hunter & Sibley, 2012). Under akut infektion är det tachyzoiterna (det snabbdelande stadiet av parasiten) som invaderar värdens celler och förökar sig med hög hastighet. De tar sig sedan in i tarmkrösets lymfknutor där transport till andra organ via lymfan kan ske (Innes *et al.*, 2009).

Då mellanvärdens immunförsvar sedan reagerar mot parasiten övergår tachyzoiter till bradyzoiter (stadium av parasiten som delar sig långsamt) som innesluts i vävnadscystor (Buxton, 1993). Vävnadscystorna bildas framför allt i hjärna och muskler. Stadiet med bradyzoiter utgör en persisterande infektion utan att värden påverkas märkvärt. Den som äter kött innehållande vävnadscystor smittas och intag av otillräckligt genomstekt kött är den absolut vanligaste smittvägen för human toxoplasmos.

Lundén *et al.* (1992) undersökte 54 svenska fårflöckar och fann att seroprevalensen var 19 %. En studie av Birgisdóttir *et al.* (2006) visade att seroprevalensen i Uppsala hos människor var 23 %. Toxoplasmos utgör störst risk hos gravida kvinnor samt människor med nedsatt immunförsvar (Innes, 2010). Hos infekterade foster är det vanligt med hydrocefalus, retinochoroidit och encefalit.

Toxoplasmos hos får

Toxoplasmos orsakar aborter, dödfödslar och död hos nyfödda lamm, killingar och kulingar (Buxton, 1993). Hos får utlöses den fetala infektionen när tackan i slutet av första veckan av infektion utvecklar parasitemi. Då kan *Toxoplasma gondii* först infektera cellerna i livmodern för att sedan övergå till placentan och fostret. Ju tidigare infektion sker under dräktigheten desto större risk för fatal utgång (Innes, 2009).

Det är ovanligt att tackor som varit infekterade vid en tidigare dräktighet infekteras ytterligare en gång vilket talar för att immunisering innan betäckning kan vara en effektiv förebyggande metod (Innes, 2009). Förutom neonatal död, dödfödelse och abort orsakar inte *Toxoplasma gondii* några kliniska symptom hos immunokompetenta individer (Buxton, 1993). Parasiten förekommer framför allt i länder med stor fårpopulation och tempererat klimat såsom Nya Zeeland och Norge.

Det immunologiska svaret mot *Toxoplasma gondii*

Liksom för andra intracellulära agens är det den cellmedierade immuniteten som är viktigast i försvaret mot *Toxoplasma gondii* (Tizard, 2013). De viktigaste cellerna och immunokomponenterna anses vara makrofager, NK-celler, T-celler samt cytokiner (Filisetti & Candolfi, 2004).

Det medfödda immunförsvarets respons

Vid det tidiga stadiet av toxoplasmainfektion kommer den dendritiska cellens toll-like-receptor11 binda till toxoplasmas profilin, ett aktinbindande protein (Hunter & Sibley, 2012). Denna interaktion leder till att den dendritiska cellen producerar cytokinen IL-12. Även toxoplasmas glykosylfosfatidylinositol-ankrade protein kommer att interagera med monocyter eller makrofager vilket resulterar i produktion av TNF- α och ytterligare IL-12.

Det IL-12 som utsöndrats aktiverar NK-celler och de kommer att producera IFN- γ . IFN- γ stimulerar aktiveringen av T-celler och kommer även i synergi med TNF- α att aktivera makrofager (Bruna-Romero *et al.*, 2012). Aktiveringen av makrofagerna leder till att de ökar sin produktion av fria syreradikaler och kväveoxid vilket hjälper dem att fagocytera och avdöda toxoplasmas tachyzoiter.

IFN- γ är den cytokin som är av störst betydelse vid toxoplasmainfektion (Filisetti & Candolfi, 2004). Den produceras av NK-celler och T-lymfocyter. Förutom aktivering av makrofager och NK-celler bidrar den även till differentiering av T-hjälparcellerna. IFN- γ främjar även konvertering av tachyzoiter till bradyzoiter.

Det specifika immunförsvarets respons

Differentieringen av T-hjälparcellerna gör att de börjar producera cytokiner av Th1-typ (Bruna-Romero *et al.*, 2012). Denna cytokinprofil är nödvändig för den cellmedierade immunitet som är viktig vid den här typen av infektion. Exempel på sådana cytokiner är IL-2, IFN- γ , TNF- α och TNF- β (Tizard, 2013). Th1-svaret krävs för att främja den cytotoxiska aktiviteten hos de cytotoxiska T-cellerna, men också för aktivering av makrofager och viss IgG-produktion.

De cytotoxiska T-cellerna kan då avdöda tachyzoiter och toxoplasmainfekterade celler (Tizard, 2013). Dock kan tachyzoiterna konverteras till de långsamt delande bradyzoiter. Dessa bradyzoiter innesluts i vävnadscystor som framför allt återfinns i hjärna och muskulatur. Vävnadscystorna är väldigt svagt immunogena och inte alls inflammationsstimulerande, vilket medför att kroppens immunförsvaret ej kommer att identifiera dessa som antigen.

Humoral immunitet mot *Toxoplasma gondii*

För destruktions av extracellulära parasitstadier fyller antikroppar och komplement en viktig funktion, men för de intracellulära formerna av parasiten fyller de i stort sett ingen funktion alls (Tizard, 2013). Hur stor vikt antikroppar spelar i skyddet mot *T. gondii* är emellertid omdiskuterat.

Den första antikropp som bildas vid infektion av *T. gondii* är IgM, men antikropparna är mätbara i serum först i slutet av första veckan (Filisetti & Candolfi, 2004). IgM är den bästa antikroppen då det gäller att aktivera komplementsystemet, ger på grund av sin struktur utomordentlig agglutination och har en hög nivå av cytotoxisk aktivitet.

IgG dyker upp som andra antikropp under en toxoplasmainfektion (Filisetti & Candolfi, 2004). Hos människa finns det tre subklasser av IgG, av totalt fyra, som överväger under en toxoplasmainfektion: IgG1, G2 och G4. IgG möjliggör ADCC (antibody-dependent cytotoxicity) eller opsonisering via Fc-receptorer på monocyter, makrofager och polynukleära celler eller cytolys medierad via komplement eller av en NK-cell.

Toxovax - ett levande attenuerat vaccin

Utvecklingen av Toxovax

Toxovax är ett vaccin baserat på en levande attenuerad stam (stam 48) av tachyzoiter av *Toxoplasma gondii* (Menzies, 2012). Detta vaccin är framtaget för att förebygga aborter och kongenital infektion på får. Målen med vaccineringen är att förebygga parasitemi och kolonisering av parasiten till placenta och foster. Ett annat viktigt mål är att hindra smittspridning till människa genom att motverka bildningen av vävnadscystor. Minst tre veckor innan parning ska Toxovax administreras.

Man såg ingen skillnad i lammingsandel mellan ovaccinerade och vaccinerade tackor under de försök utvecklingen av vaccinet började på Nya Zeeland i slutet av 80-talet (Wilkins *et al.*, 1987). Detta var på grund av att man använde avdödade stammar av *Toxoplasma gondii*. På den tiden var det inte klarlagt om det var humoral eller cellmedierad immunitet som var viktigast i försvaret mot toxoplasmos. Av den studien kunde man i alla fall dra slutsatsen att immunresponsen mot *T. gondii* inte enbart berodde på antikroppstitrar utan den cellmedierade immuniteten spelade en viktig roll.

O'Connell *et al.* (1988) fortsatte dessa studier, men denna gång med ett levande attenuerat vaccin som tagits fram via passage i möss. Man hade sett att då denna stam, S48 som vaccinet innehöll, inokulerades i får och fåren sedan slaktades och gavs som föda till katter så kunde man inte hitta oocystor i kattens avföring. Detta innebar att man kunde reducera halten *Toxoplasma gondii*-infekterat lamm- och fårkött och därmed kunde man avlägsna ett viktigt stadium i parasitens livscykel. Man kunde även stilla oron för att ett levande vaccin skulle kunna resultera i muterade stammar i vaccinerade får som kan innebära en zoonosrisk för människor som äter köttet.

Deras val av intravenös regim vid den experimentella infektionen verkade dock inte ge någon skillnad i andelen kongenitalt infekterade foster (O'Connell *et al.*, 1988), troligtvis beroende på att intravenös administration ger en snabb spridning av parasiterna som kroppens försvar inte hinner ta hand om. Dock fick de vaccinerade tackorna fler levande lamm än de ovaccinerade, vilket tyder på att tackorna fick någon typ av skydd tack vare vaccinet.

Wilkins *et al.* (1988) fortsatte testa vaccin av S48-stammen, men denna gång valde man en mer naturlig form av infektionsväg: peroralt. Man kunde återigen se att S48-vaccinerade

tackor fick betydligt fler levande lamm (likt det man konstaterat i tidigare försök). Man isolerade även *T. gondii* från fetala membran i mycket lägre utsträckning vilket tyder på reducerad transmission av parasiten.

En minskad transmission av *T. gondii* innebär en minskad risk för bildning av vävnadscystor i får- och lammkött som kan vara en reservoar för smitta av människa (Wilkins *et al.*, 1988). Dock kan kongenital infektion fortfarande ske om man administrerar höga doser tachyzoiter eller bradyzoiter av *T. gondii* oralt trots vaccination. I denna studie vaccinerade man även med stam 89 som är komplett och levande. Denna stam gav ingen kongenital infektion i försöken, men är dock olämplig som vaccin då den ger vävnadscystor i köttet och innebär en zoonosrisk för konsumenter.

Buxton *et al.* (1991) visade att får vaccinerade med S48-stammen fick feber likt de ovaccinerade fåren då de utsattes för oral exponering av sporulerade oocystor. Febern hos de vaccinerade tackorna började tidigare, men var mindre allvarlig och av kortare duration. Man kunde se att de vaccinerade tackornas dräktighetsperiod var längre, födelsevikten på deras lamm var högre samt att de hade högre andel levande avkomma.

Konklusionen av studien utförd av Buxton *et al.* (1991) var att man även 24 veckor efter vaccinering hade ett motståndskraftigt immunförsvar mot infektionen trots sjunkande antikroppstitrar. Detta antog man var på grund av att den cellmedierade immuniteten är av större vikt än den humoral. Man kunde fortfarande observera fetal infektion vilket visar att S48-vaccinet ej förhindrar att parasiten når den dräktiga tackans livmoder, men trots detta var mortaliteten hos lammen reducerad.

Buxton *et al.* (1993) gjorde ytterligare en studie där de visade att skyddet som erhöles av S48-vaccinet var lika bra 18 månader efter vaccinering som skyddet 24 veckor efter. Man drog slutsatsen att på grund av att *Toxoplasma gondii* är en så pass ubikvitär parasit skulle tackorna med största sannolikhet bli exponerade för naturlig infektion inom 18 månader. Därför skulle ingen årlig återvaccinering behövas.

Immunsvaret mot Toxovax

Innes *et al.* (1995) undersökte effekten på produktion av cytokinen IFN- γ vid både primär och sekundär infektion av S48-vaccinet. Resultaten de fick visade på inducerad produktion av IFN- γ redan vid primär infektion. Vid sekundär infektion fick man en ytterligare accelererad produktion av IFN- γ , detta troligen på grund av att immunologiskt minne skapats med hjälp av vaccinet.

Wastling *et al.* (1995) undersökte i sin studie lokalt och systemiskt antikroppssvar efter primär respektive sekundär infektion med S48. IgG var den dominerade antikroppen enligt deras resultat och man såg att primär infektion inducerade en produktion av IgG som ökade ännu mer vid sekundär infektion tack vare det immunologiska minnet. Det tyder på att trots att cellmedierad immunitet är mycket viktig vid infektion med *T. gondii* så har antikroppar en roll i skyddet mot infektion (Wastling *et al.*, 1995). Antikropparna kan till exempel förhindra parasitinväsion i celler och förgöra tachyzoiter genom aktivering av komplementsystemet

eller genom ADCC, vilka alla bidrar till att förhindra parasitreplicationen i ett tidigt skede av infektion.

Nackdelar med Toxovax

Det finns dock två stora nackdelar med S48-vaccinet: kort hållbarhet och risk för infektion för de människor som hanterar vaccinet då den levande S48-stammen skulle kunna mutera (Menzies, 2012). Kort hållbarhet är en vanlig nackdel med levande vaccin (Tizard, 2013) och S48-vaccinet måste förbrukas två till tre veckor efter produktion (Buxton, 1993). Detta har lett till att man forskar på att hitta en ny vaccinkandidat som ska ge samma immunitet utan zoonosrisk eller begränsad hållbarhet (Menzies, 2012).

Nya vaccinkandidater

En generell svårighet med att utveckla nya vaccin mot *T. gondii* är att den uttrycker tusentals olika proteiner och andra sorters molekyler som kan vara möjliga vaccinkandidater (Bruna-Romero *et al.*, 2012). Det faktum att olika antigen uttrycks under olika parasitstadier av varierande immunogenicitet gör att man måste utveckla ett vaccin som har effekt på alla livscykelstadier. Det finns även olika stammar av *T. gondii* vilket innebär att skydd mot en stam inte behöver betyda skydd mot alla stammar. Det krävs också att antigenet går in intracellulärt för att uttryckas av MHC klass I vilket krävs för att få det Th1-svar man vill ha. Detta kräver antingen en vektor eller ett adjuvans som hjälp.

Mycket forskning görs på olika vaccintyper och antigen i musmodeller och i några få fall på stordjursmodeller (Bruna-Romero *et al.*, 2012). Målet är i de flesta fall att utveckla humana vacciner, men även veterinärmedicinska vacciner är av stort intresse att utveckla. Jag har valt ut de mest lovande för beskrivning i de följande styckena.

DNA-vaccin

DNA-vaccin bygger på en metod där man injicerar DNA som kodar för främmande antigen (Tizard, 2013). Vanligen har man en bakteriell plasmid (cirkulärt DNA) som vektor för DNA-sekvensen som kodar för antigenet. Dock är det inte endast antigenkodande DNA man måste ha i sin plasmid utan även andra komponenter, till exempel enhancer/promotor och introner, behövs för att DNA:t ska kunna transkriberas och uttryckas i värdcellerna (Smooker, 2004).

Fördelar

En av de största fördelarna med DNA-vaccin är att de inducerar både humoral och cellmedierad immunitet (Smooker, 2004). Jämfört med subenhetsvaccin är de bättre på induktion av cellmedierad immunitet - något som är av stor betydelse mot just toxoplasmainfektion. Man riskerar inte någon mutation som skulle leda till ökad virulens, vilket kan vara en fara med avdödat, eller framför allt attenuerat, vaccin.

Stabiliteten hos plasmid-DNA är en klar fördel. Det kräver endast torr förvaring och temperaturskillnader spelar inte någon roll (Smooker, 2004). En annan positiv aspekt är att de är enklare att tillverka jämfört med subenhetsvaccinen. Immunisering med DNA-vaccin leder också till att konformationen av antigenets epitoper bibehålls. Man får även uttryck av det

kodade proteinet inuti cellen vilket ger upphov till antigenpresentation av MHC klass I som krävs för utveckling av den cellmedierade immuniteten.

Nackdelar

Man har haft en del farhågor gällande säkerheten (Smooker, 2004), till exempel att plasmid-DNA:t skulle kunna integreras i värdens arvsmassa som i sin tur skulle kunna ge somatiska mutationer i supressor- och onkogener vilket skulle kunna leda till cancer. En annan eventuell risk man såg var att utveckling av anti-DNA-antikroppar skulle ske och därmed leda till autoimmuna sjukdomar. Dock har dessa orosmoln avtagit rejält efter att lyckad testning av human malaria- och HIV-vaccin skett utan några indikationer på att dessa risker skulle vara befintliga.

En faktisk nackdel har däremot varit att man trots lyckade resultat i musstudier inte alltid lyckats få lika bra respons på stora djur utan att riktigt veta varför (Smooker, 2004). Därför har man gjort försök med olika adjuvans och andra immunomodulerande molekyler för att försöka höja potensen hos DNA-vaccinen (Hiszczynska-Sawicka *et al.*, 2010, 2011a, b).

Utveckling och försök av DNA-vaccin mot Toxoplasma gondii på får

Som tidigare nämnt har de flesta försöken avseende DNA-vaccin gjorts på möss (Smooker, 2004). Dock finns det några studier gjorda på får där man undersökt lämpliga antigen och adjuvans och vilken immunologisk effekt dessa har på produktion av IFN- γ , IgG1 och IgG2 (Li *et al.*, 2010; Hiszczynska-Sawicka *et al.*, 2010, 2011a, b). Inga fältstudier har gjorts än emellertid. Exempel på antigen som utvärderats är SAG (surface antigen), ROP (rhoptry protein) och GRA (dense granules). Alla dessa antigen uttrycks under tachyzoitstadiet (Bruna-Romero *et al.*, 2012).

Antigenet SAG1 är ett membranassocierat ytantigen (Smooker, 2004) som inte stimulerade produktionen av IFN- γ , IgG1 eller IgG2 vilket man sett i gnagarstudier (Li *et al.*, 2010). Då Li *et al.* (2010) däremot testade antigenet ROP1 fick man signifikant höjda nivåer av IFN- γ , IgG1 och IgG2. ROP1 är ett protein som ingår i en organell hos parasiten som är viktig vid cellinvasion (Hunter & Sibley, 2012). Li *et al.* (2010) kunde då dra slutsatsen att ROP1 kan vara en potentiell vaccinkandidat. Hiszczynska-Sawicka *et al.* (2011a) kunde sedan visa att om man utifrån ROP1-antigenet och den co-stimulatoriska molekylen CD154 (som har betydelse för om vi får ett Th1- eller Th2-svar) skapade ett fusionsprotein fick man högre IgG1-nivåer jämfört med vaccination med ROP1 utan adjuvans. Man kunde se högre nivåer av IFN- γ under vissa veckor då försöket fortlöpte, men ingen skillnad på IgG2-produktionen.

GRA-antigen är protein med ursprung i *T. gondii*s kompakta granula som Hiszczynska-Sawicka *et al.* (2010, 2011b) har gjort studier på. De kom fram till att av de olika typer av GRA-antigen som finns var GRA7 den som gav bäst immunsvaret avseende IFN- γ , IgG1 och IgG2 (Hiszczynska-Sawicka *et al.*, 2011b). Man studerade även vilka adjuvans som lämpade sig bäst till vaccin innehållandes GRA7 (Hiszczynska-Sawicka *et al.*, 2010). Resultatet av den studien visade att liposomer (ett adjuvans som stimulerar antigenprocessning) hade bäst effekt på produktion av IFN- γ , IgG1 och IgG2.

Rekombinanta vektorvaccin

Rekombinanta vektorvaccin bygger på att man använder attenuerade bakterier eller virus som vektorer för *T. gondii*-DNA (Tizard, 2013). Dessa vektorer kan sedan via naturlig infektion låta *T. gondii*-antigenet uttryckas i värden. I och med den låga immunogeniciteten man fått av DNA-vaccin i större djurmodeller har jakten på humana vacciner mot *T. gondii* förskjutits mot denna typ av vaccin (Bruna-Romero *et al.*, 2012). Dock har studier på rekombinanta bakteriella vektorvaccin visat sig endast ge partiell immunitet mot *T. gondii* och därför har man fokuserat på virala vektorer istället.

Fördelarna med virala vektorer är att de invaderar värdceller vilket leder till att antigenen uttrycks intracellulärt (Bruna-Romero *et al.*, 2012). Detta ger ett starkt Th1-svar och den virala vektorn blir som ett adjuvans i sig självt. Influensa- och adenovirus har man undersökt som vektorer tillsammans med gener som kodar för olika typer av SAG (surface antigen) i vaccin på möss med goda resultat (Caetano *et al.*, 2006). Dock fick man inget skydd mot en av de mer virulenta stammarna av *T. gondii*. Mycket tyder dock på att dessa resultat är reproducerbara på stordjursmodeller, men det finns även här utrymme för mer forskning.

DISKUSSION

I denna uppsats har konstaterats att *Toxoplasma gondii* är en viktig parasit som kan infektera alla varmblodiga djur, men orsakar sällan komplikationer om den inte infekterar en dräktig eller immunosupprimerad individ. Den står för stora årliga förluster för fårnäringen i och med alla aborter, dödfödslar och neonatala dödsfall den orsakar. Infekterat fårkött innebär även en smittorisk för människa då parasiten bildar vävnadscystor hos sin mellanvärd.

Vilka immunförsvarskomponenter är inblandade vid en toxoplasmainfektion?

I försvaret mot en toxoplasmainfektion är den cellmedierade immuniteten allra viktigast med tanke på att *T. gondii* är en intracellulär patogen, men även humoral immunitet verkar vara av betydelse (dock omdebatterad sådan). Efter att dendritiska celler eller makrofager i vävnaden kommit i kontakt med parasitens antigen kan de producera cytokiner, däribland IL-12. IL-12 är viktig för aktivering av NK-celler som verkar cytotoxiskt under tidig infektion och de kommer även att producera IFN- γ .

IFN- γ är den viktigaste cytokinen under denna infektion som kommer att aktivera makrofager och bidra till differentieringen av T-hjälparceller. Differentieringen leder till att T-hjälparcellerna utsöndrar cytokiner av Th1-typ, vilket krävs för att aktivera cytotoxiska T-celler. Kortfattat krävs IFN- γ för att få den cellmedierade immuniteten som man behöver för att avdöda de intracellulära stadierna av *T. gondii*.

T. gondii är en parasit som även har extracellulära stadier och därför är också antikroppar viktiga i bekämpning mot infektion. IgG är den viktigaste immunoglobulinen som möjliggör ADCC, opsonisering eller cytolys med diverse andra immunförsvarskomponenter inblandade.

Hur har Toxovax utvecklats och vilka effekter har det?

Toxovax är ett levande, attenuerat vaccin som utvecklades i slutet av 80-talet på Nya Zeeland. Det är idag det enda vaccinet som finns på marknaden för får mot kongenital toxoplasmos.

Vaccinet är baserat på stam 48 som man tagit fram via passage i möss och därmed attenuerats. Med vaccineringen vill man förebygga parasitemi, att parasiten koloniserar placenta och foster samt motverka bildning av vävnadscystor.

Det är ett vaccin som hos experimentellt infekterade tackor ger längre dräktighetstid, högre födelsevikter, större andel levande avkomma samt motverkar vävnadscystbildning (och därmed zoonotisk smitta). Vaccinet förhindrar inte spridning till livmodern och fostret, men reducerar mortaliteten hos lammen. Detta är relaterat till den signifikant förhöjda produktionen av IFN- γ och IgG som vaccinet ger. Vaccinet har bevisad skyddande effekt upp till 18 månader efter vaccinering vilket gör återvaccinering onödig då tackor med stor sannolikhet blivit naturligt infekterade innan dess.

Nackdelarna med Toxovax är kort hållbarhet och risk att stammen skulle återgå i virulent form (vilket innebär hanteringsrisker för djurhälsopersonal). Dessa nackdelar är vanligt förekommande hos levande vaccin. I Sverige vaccineras inte ungtackor med Toxovax då det är logistiskt sett omöjligt att inom 10 dagar efter produktion i England få hit vaccinet och vaccinera de aktuella djuren (König, U., Svenska Djurhälsovården, pers. medd., 2013-03-04). Trots att detta är ett vaccin som har stora fördelar och att *T. gondii* innebär stora förluster är det inget alternativ för den svenska fårnäringen. Svenska djurhälsovården rekommenderar istället att man håller kattpopulationen under kontroll och skyddar foder från kattavföring.

Hur ser utvecklingen av nya vaccinkandidater mot *Toxoplasma gondii* ut?

Utveckling av nya vaccinalternativ kräver enorma arbetsinsatser på grund av den komplexa livscykel som *T. gondii* har - vilket medför att olika antigen uttrycks under olika stadier och även har olika immunogenicitet. Utöver de många olika antigenen finns olika stammar som behöver skyddas mot. På grund av att cellmedierad immunitet är av sådan betydelse så krävs det att antigen uttrycks intracellulärt för att få lämplig immunrespons mot infektionen.

Idag görs den absoluta majoriteten av forskningen i musmodeller, men ett fåtal studier har gjorts på får. De flesta studierna har utveckling av humanvaccin som mål. Dock är även veterinärmedicinska vaccin av forskningsintresse på grund av den zoonotiska potentialen.

DNA-vaccin är bra för att inducera humoral och framför allt cellmedierad immunitet. De har mycket god stabilitet om de bara förvaras torrt. Jämfört med subenhetsvaccin är DNA-vaccin både enklare att tillverka och ger bättre cellmedierad immunitet. Det är också ett säkert vaccin med ingen risk för återgång till virulent form.

Nackdelen med DNA-vaccin är att man ej fått bra respons på stordjur, trots lyckade resultat på möss. Därför behöver vaccinet administreras tillsammans med adjuvans eller immunstimulerande molekyler. En forskargrupp har fått flera positiva resultat i studier på får där de undersökt olika antigen ihop med vissa typer av adjuvans och immunostimulerande molekyler. Detta är mycket lovande, men fortfarande krävs riktiga fältstudier på får där man undersöker om DNA-vaccin ger skydd i praktiken och inte bara undersöker nivån av IFN- γ och olika subklasser av IgG.

Rekombinanta vektorvaccin har humanforskningen riktat in sig på eftersom DNA-vaccin ej gett så stor framgång i stordjursmodeller. Virala vektorer som invaderar värdcellerna intracellulärt behövs för att få uttryck av antigen intracellulärt. Därmed blir den virala vektorn som ett adjuvans i sig självt. Dock är ännu mindre stordjursforskning gjort på rekombinanta vektorvaccin jämfört med DNA-vaccin, men de resultat man fått på möss verkar vara reproducerbara på stordjursmodeller.

Är vaccination en bra förebyggande åtgärd mot toxoplasmainfektion?

Då naturlig infektion innebär ett bra skydd mot ytterligare infektion och då det befintliga vaccinet Toxovax ger god immunitet samt innebär minskad zoonotisk potential skulle jag påstå att vaccinering är en bra förebyggande åtgärd.

Trots att den svenska fårnäringen är av ringa storlek är infektionen av betydelse för de svenska fårhallarna. Parasiten trivs dessutom i tempererade klimat vilket Sverige erbjuder. Fårhallarna vill även låta vaccinera sina får, men Toxovax begränsade hållbarhet omöjliggör detta.

Utvecklingen av nya vaccinkandidater har gått framåt där rekombinanta vektorvaccin och DNA-vaccin är de mest lovande alternativen. Båda ger cellmedierad immunitet och har gett goda resultat i musmodeller. DNA-vaccin har även tillsammans med adjuvans visat sig ge cellmedierad immunitet på får. Det saknas fortfarande studier på hur dessa vaccinkandidater fungerar i fält och rekombinanta vektorvaccin behöver man överhuvudtaget undersöka vidare på får.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Birgisdóttir, A., Asbjörnsdóttir, H., Cook, E., Gíslason, D., Jansson, C., Ólafsson, I., Gíslason, T., Jogi, R. & Thjodleifsson, B. (2006). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in Sweden, Estonia and Iceland. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 38, 625-631.
- Bruna-Romero, O., Mayrink de Oliveria, D. & Ferreira de Andrade-Neto, V. (2012). Toxoplasmosis: Advances and Vaccine Perspectives, Current Topics in Tropical Medicine, Dr. Alfonso Rodriguez-Morales (Ed.), ISBN: 978-953-51-0274-8, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/current-topics-in-tropical-medicine/toxoplasmosis-advances-and-vaccineperspectives>
- Buxton, D., Thomson, K., Maley, S., Wright, S. & Bos, H. J. (1991). Vaccination of sheep with a live incomplete strain (S48) of *Toxoplasma gondii* and their immunity to challenge when pregnant. *The Veterinary Record*, 129, 89-93.
- Buxton, D., Thomson, K., Maley, S., Wright, S. & Bos, H. J. (1993). Experimental challenge of sheep 18 months after vaccination with a live (S48) *Toxoplasma gondii* vaccine. *The Veterinary Record*, 133, 310-312.
- Buxton, D. (1993). Toxoplasmosis: the first commercial vaccine. *Parasitology Today*, 9, 335-337.
- Caetano, B. C., Bruna-Romero, O., Fux, B., Mendes, E. A., Penido, M. L.O. & Gazzinelli, R.T. (2006). Vaccination with replication-deficient recombinant adenoviruses encoding the main surface antigens of *Toxoplasma gondii* induces immune response and protection against infection in mice. *Human Gene Therapy*, 17, 415-426.
- Filisetti, D. & Candolfi, E. (2004). Immune response to *Toxoplasma gondii*. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanita*, 40, 71-80.
- Hiszczynska-Sawicka, E., Hong, L., Boyu Xu, J., Oledzka, G., Kur, J. L., Bickerstaffe, R. & Stankiewicz, M. (2010). Comparison of immune response in sheep immunized with DNA vaccine *Toxoplasma gondii* GRA7 antigen - in different adjuvant formulations. *Experimental Parasitology*, 124, 365-372.
- Hiszczynska-Sawicka, E., Li, H., Boyu Xu, J., Holec-Gasior, L., Kur, J., Sedcole, R., Bickerstaffe, R. & Stankiewicz, M. (2011a). Modulation of immune response to *Toxoplasma gondii* in sheep by immunization with a DNA vaccine encoding ROP1 antigen as a fusion protein with ovine CD154. *Veterinary Parasitology*, 183, 72-78.
- Hiszczynska-Sawicka, E., Oledzka, G., Holec-Gasior, L., Li, H., Boyu Xu, J., Sedcole, R., Kur, J., Bickerstaffe, R. & Stankiewicz, M. (2011b). Evaluation of immune responses in sheep induced by DNA immunization with genes encoding GRA1, GRA4, GRA and GRA7 antigens of *Toxoplasma gondii*. *Veterinary Parasitology*, 177, 281-289.
- Hunter, C. A. & Sibley, L. D. (2012). Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. *Nature Reviews Microbiology*, 10, 766-778.
- Innes, E. A. (2010). A brief history and overview of *Toxoplasma gondii*. *Zoonoses Public Health*, 57, 1-7.
- Innes, E. A., Bartley, P. M., Buxton, D. & Katzer, F. (2009). Ovine toxoplasmosis. *Parasitology*, 136, 1887-1894.

- Innes, E. A., Panton, W. R. M., Thomson, K. M., Maley, S. & Buxton, D. (1995). Kinetics of interferon gamma production *in vivo* during infection with the S48 vaccine strain of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Comparative Pathology*, 113, 89-94.
- Li, B., Oledzka, G., McFarlane, R. G., Spellerberg, M. B., Smith, S. M., Gelder, F. B., Kur, J. & Stankiewicz, M. (2010). Immunological response of sheep to injections of plasmids encoding *Toxoplasma gondii* SAG1 and ROP1 genes. *Parasite Immunology*, 32, 671-683.
- Lundén, A., Carlsson, U. & Näslund, K. (1992). Toxoplasmosis and border disease in 54 Swedish sheep flocks. Seroprevalence and incidence during one gestation period. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 33, 175-184.
- Menzies, P. I. (2012). Vaccination programs for reproductive disorders of small ruminants. *Animal Reproduction Science*, 130, 162–172.
- O’Connell, E. O., Wilkins, M. F. & Te Punga, W. A. (1988). Toxoplasmosis in sheep II. The ability of a live vaccine to prevent lamb losses after an intravenous challenge with *Toxoplasma gondii*. *New Zealand Veterinary Journal*, 36, 1-4.
- Smooker, P. M., Rainczuk, A., Kennedy, N. & Spithill, T. W. (2004). DNA vaccines and their application against parasites - promise, limitations and potential solutions. *Biotechnology Annual Review*, 10, 189-236.
- Tizard, I. R. (2013). *Veterinary Immunology*. 9. uppl. St Louis, MO. Elsevier. Kap. 14. Sid. 141-145. Kap. 23. Sid. 261 & 266. Kap. 27. Sid. 313.
- Wastling, J. M., Harkins, D., Maley, S., Innes, E., Panton, W., Thomson, K. & Buxton, D. (1995). Kinetics of the local and systemic antibody response to primary and secondary infection with S48 *Toxoplasma gondii* in sheep. *Journal of Comparative Pathology*, 112, 53-62.
- Wilkins, M. F., O’Connell, E. O. & Te Punga, W. A. (1987). Toxoplasmosis in sheep I. Effect of a killed vaccine on lambing losses caused by experimental challenge with *Toxoplasma gondii*. *New Zealand Veterinary Journal*, 35, 31-34.
- Wilkins, M. F., O’Connell, E. O. & Te Punga, W. A. (1988). Toxoplasmosis in sheep III. Further evaluation of the ability of a live *Toxoplasma gondii* vaccine to prevent lamb losses and reduce congenital infection following experimental oral challenge. *New Zealand Veterinary Journal*, 36, 86-89.