



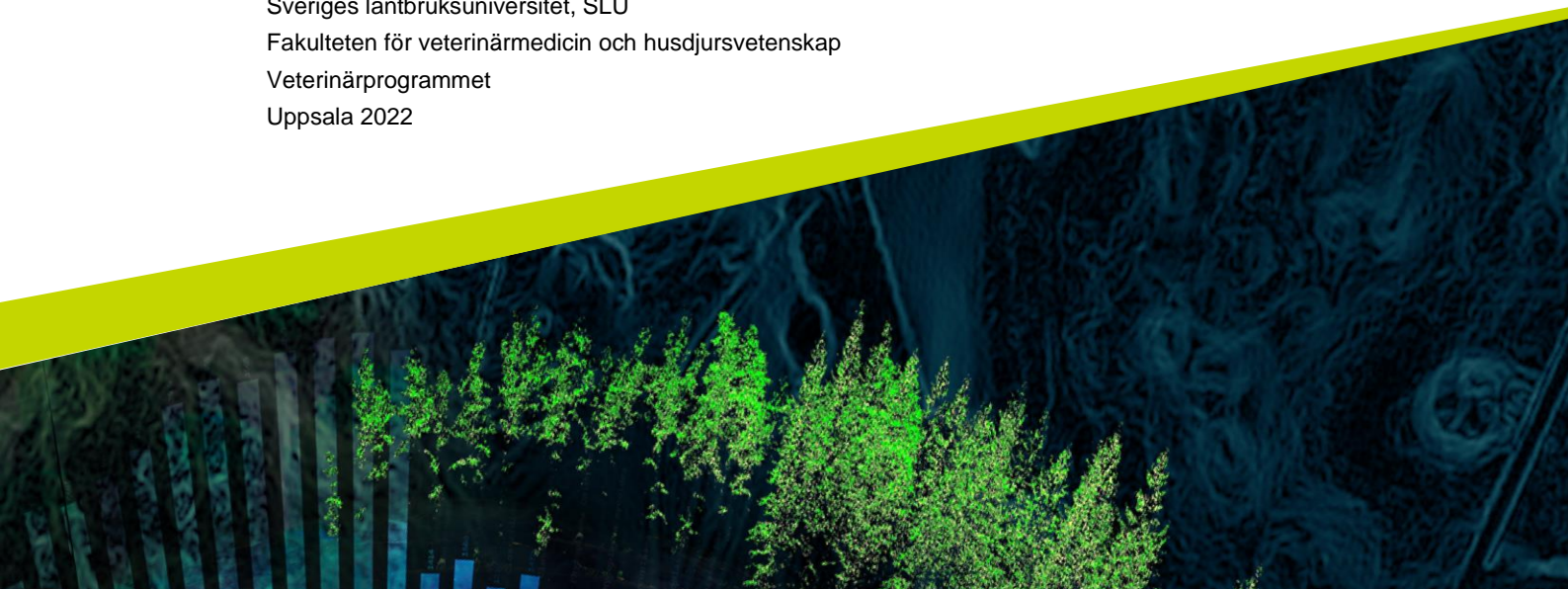
Immunitet mot bovint respiratoriskt syncytialt virus efter naturlig infektion

– antikroppskinetik efter primärinfektion samt
efter återinfektion fyra år senare

*Immunity against bovine respiratory syncytial virus after natural infection –
antibody kinetics after primary infection and re-infection four years later*

Jari Siltenius

Självständigt arbete • 30 hp
Sveriges lantbruksuniversitet, SLU
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Veterinärprogrammet
Uppsala 2022



Immunitet mot bovint respiratoriskt syncytialt virus efter naturlig infektion – antikroppskinetik efter primärinfektion samt efter återinfektion fyra år senare

Immunity against bovine respiratory syncytial virus after natural infection – antibody kinetics after primary infection and re-infection four years later

Jari Siltenius

Handledare:	Sara Hägglund, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för kliniska vetenskaper
Bitr. handledare:	Jean Francois Valarcher, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för kliniska vetenskaper
Examinator:	Anne-Lie Blomström, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för biomedicin och veterinär folkvetenskap
Omfattning:	30 hp
Nivå och fördjupning:	A2E
Kurstitel:	Självständigt arbete i veterinärmedicin
Kurskod:	EX0869
Program/utbildning:	Veterinärprogrammet
Kursansvarig inst.:	Institutionen för kliniska vetenskaper
Utgivningsort:	Uppsala
Utgivningsår:	2022
Nyckelord:	Bovint respiratoriskt syncytialt virus, immunitet, ELISA, IgG1, virusneutraliserande antikroppar

Sveriges lantbruksuniversitet

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Institutionen för kliniska vetenskaper

Publicering och arkivering

Godkända självständiga arbeten (examensarbeten) vid SLU publiceras elektroniskt. Som student äger du upphovsrätten till ditt arbete och behöver godkänna publiceringen. Om du kryssar i **JA**, så kommer fulltexten (pdf-filen) och metadata bli synliga och sökbara på internet. Om du kryssar i **NEJ**, kommer endast metadata och sammanfattning bli synliga och sökbara. Fulltexten kommer dock i samband med att dokumentet laddas upp arkiveras digitalt.

Om ni är fler än en person som skrivit arbetet så gäller krysset för alla författare, ni behöver alltså vara överens. Läs om SLU:s publiceringsavtal här:

<https://www.slu.se/site/bibliotek/publicera-och-analysera/registrera-och-publicera/avtal-for-publicering/>.

JA, jag/vi ger härmed min/vår tillåtelse till att föreliggande arbete publiceras enligt SLU:s avtal om överlåtelse av rätt att publicera verk.

NEJ, jag/vi ger inte min/vår tillåtelse att publicera fulltexten av föreliggande arbete. Arbetet laddas dock upp för arkivering och metadata och sammanfattning blir synliga och sökbara.

Sammanfattning

Bovint respiratoriskt syncytialt virus (BRSV) kan orsaka allvarlig luftvägssjukdom hos nötkreatur och är vanligt förekommande i svenska nötkreatursbesättningar. Sjukdomsförloppet kan vara subkliniskt, ge milda symptom eller orsaka svår sjukdom med dödlig utgång. En genomgången naturlig infektion verkar skydda mot allvarlig sjukdom, men exakt hur länge en individ är skyddad och vilken typ av immunitet som ger skydd har forskare ännu inte kartlagt fullständigt. Det är dessutom oklart i vilken utsträckning nötkreatur återinfekteras och om dessa utgör symptomlösa smittbärare med en viktig roll i virusets epidemiologi.

Syftet med detta examensarbete var att kartlägga antikroppssvar efter naturlig infektion med BRSV, samt att fastställa exempel på efter hur lång tid och vid vilken antikropptiter nötkreatur kan bli återinfekterade med BRSV. Examensarbetet fokuserade på att beskriva kinetiken av BRSV-specifika IgG1-antikropptitrar i serum hos nötkreatur under 2–4 år efter naturlig infektion. Därtill jämfördes titrar av BRSV-specifika IgG1-antikroppar med virusneutraliserande (VN) antikroppar i serum samt BRSV-specifika IgG1-antikropptitrar i mjölk och serum på individnivå. Återinfektioner beskrevs i en besättning och individuella BRSV-specifika serum IgG1-antikropptitrar vid återinfektion av enstaka djur fastställdes.

Resultaten indikerade att nötkreatur har serumantikroppar, både BRSV-specifika IgG1 och VN-antikroppar, i minst fyra år efter naturlig infektion av BRSV. En relativt god korrelation mellan IgG1 och VN-antikroppar fastställdes. Antikropparna verkar bidra till skydd mot allvarlig sjukdom, men inte mot infektion och virusutsöndring. Ett visst immunologiskt minne verkar kvarstå i minst fyra år, då antikropptitarna, såväl IgG1 som VN-antikroppar, blev högre vid återinfektion av BRSV än vid primärinfektion. Vid primärinfektion var den individuella variationen av antikropptitrar stor, men mängden antikroppar verkade inte ha betydelse för antikroppssvarets duration, då samtliga analyserade prover innehöll antikroppar (IgG1) fyra år efter infektion.

Mjölksproverna som analyserades visade exempel på att det även gick att påvisa IgG1 i outspädd mjölk i minst fyra år efter en primärinfektion, men mängden IgG1 kunde inte kvantifieras och således gick det inte visa på någon korrelation mellan IgG1 i serum och mjölk.

Kunskapen kan bidra till förståelse om infektionsdynamiken i stora populationer, t.ex. när besättningsimmuniteten avtar efter ett utbrott, vilket kan påverka framtida vaccinationsstrategier. Sammantaget kan dessa data indikera immunitetens duration och användbarheten för ELISA samt analys av serum och mjölk för att förutspå skydd på individnivå.

Nyckelord: Bovint respiratoriskt syncytialt virus, immunitet, ELISA, IgG1, virusneutraliserande antikroppar

Abstract

Bovine Respiratory Syncytial Virus (BRSV) can cause severe airway disease in cattle and is very common in Swedish cattle farms. The disease can be subclinical, mild or severe with lethal outcome. Natural disease seems to protect from severe clinical signs upon reinfection. Exactly for how long an individual is protected and what type of immunity is protective is not completely understood. It is also unclear to which extent animals become re-infected and if these are asymptomatic carriers, with an important role in virus epidemiology.

The purpose of this thesis was to quantify and map IgG antibody responses after a natural infection with BRSV and give examples of after how long time and at which antibody titre cattle can be re-infected with BRSV. This thesis focused on describing the kinetics of BRSV-specific serum IgG1-antibody titres in cattle during 2-4 years after a natural infection. In addition, titres of BRSV-specific IgG1 antibodies and virus neutralising antibodies (VN-antibodies) in serum were compared. Finally, BRSV-specific IgG1 antibodies in milk and serum were compared at the individual level. Re-infections in a herd and individual BRSV-specific serum IgG1 antibodies before and after re-infection of a few animals was also described.

The results showed that cattle have serum antibodies, both IgG1 and VN-antibodies, at least four years after natural infection with BRSV and that the titres of these antibodies covary fairly well. These antibodies seem to have contributed to protection against severe disease but did not protect from being infected and neither from shedding virus. A certain level of specific immunological memory seems to have persisted, as the antibody titres of both IgG1 and VN-antibodies increased more after re-infection with BRSV compared to after primary infection. After a primary infection the magnitude of antibody responses varied greatly between different animals, but the level of antibodies seems to be of less significance for the duration of responses, as all samples analyzed were positive for antibodies (IgG1) four years after primary infection.

In this work, some examples have been given, that it is possible to use ELISA to detect IgG1 in undiluted milk at least four years after a primary infection, but it was not possible to quantify the IgG1 by sample dilution. Hence, no covariation of IgG1 in serum and milk could be demonstrated.

The knowledge will contribute to the understanding about infection dynamics in large cattle populations, for example when herd immunity declines after an outbreak, which may influence future vaccination strategies. Altogether these data indicate the duration of humoral immunity and the utility of ELISA and milk analysis to predict protection against BRSV on an individual level.

Keywords: Bovine Respiratory Syncytial Virus, Immunity, ELISA, IgG1, virus neutralizing antibodies

Innehållsförteckning

Förkortningar	9
1. Inledning.....	11
2. Litteraturoversikt	13
2.1. Bovint respiratoriskt syncytialt virus	13
2.1.1. Betydelse	13
2.1.2. Egenskaper och släkte	13
2.1.3. Epidemiologi	14
2.1.4. Kliniska symptom.....	16
2.2. Immunitet – en introduktion	16
2.2.1. Medfödd och förvärdad immunitet	17
2.2.2. B-lymfocyter och antikroppsmedierad immunitet.....	18
2.2.3. Isotyper, subklasser och virusneutraliserande antikroppar	19
2.2.4. T-lymfocyter och cellmedierad immunitet	21
2.2.5. Komplementsystemet	22
2.3. Patogenes BRSV.....	23
2.4. Immunitet vid BRSV	25
2.4.1. Maternella antikroppar	25
2.4.2. Antikroppsmedierad och cellmedierad immunitet.....	26
2.4.3. Lokalt och systemiskt försvar.....	27
2.4.4. Komplement.....	28
2.5. Diagnostik.....	29
2.5.1. PCR	29
2.5.2. ELISA.....	29
2.5.3. Neutralisationstest	29
2.6. Kontroll: behandling och vaccin.....	30
3. Material och metoder	31
3.1. Projektet.....	31
3.1.1. Försöksdjur	31
3.1.2. Examensarbetets förutsättningar	33
3.2. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	33
3.3. Virusneutraliserande antikroppar	35

3.4.	Beräkning av data och statistiska metoder.....	35
4.	Resultat.....	37
4.1.	Antikroppskinetik efter primärinfektion	37
4.2.	Antikroppskinetik efter återinfektion	39
4.3.	Samvariation mellan IgG1 och virusneutraliserande antikroppar i serum....	41
4.4.	Mätning av IgG1 i mjölk och samvariation med serum-IgG1	44
5.	Diskussion.....	47
	Referenser.....	54
	Tack	59
	Populärvetenskaplig sammanfattning	60

Förkortningar

AMI	Antikroppsmedierat immunförsvar
APC	Antigenpresenterande celler
BRSV	Bovint respiratoriskt syncytialt virus
CMI	Cellmedierat immunförsvar
CTL	Cytotoxiska lymfocyter
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
HRSV	Human respiratory syncytial virus
IL	Interleukin
Ig	Immunoglobulin
LPS	Lipopolysackarid
OD	Optisk densitet
PAMP	Pathogene-associated molecular patterns
PCR	Polymerase Chain Reaction
PRR	Pattern-Recognition Receptor
SLU	Sveriges lantbruksuniversitet
Th	T-hjälparcell
TNF	Tumor Necrosis Factor
TLR	Toll-Like Receptor
VN	Virusneutraliserande antikroppar

1. Inledning

Bovint respiratoriskt syncytialt virus (BRSV) kan orsaka allvarlig luftvägssjukdom hos nötkreatur och är vanligt förekommande i svenska nötkreatursbesättningar. Infektionen kan vara subklinisk, ge milda symptom eller orsaka svår sjukdom med dödlig utgång. Utbrott med BRSV verkar gå i vågor i olika geografiska regioner, troligen delvis på grund av variation i djurens immunitet på besättningsnivå. Exakt hur länge en individ är skyddad och vilken typ av immunitet som ger skydd är ännu inte fullständigt klarlagt. Det är dessutom oklart i vilken utsträckning djur återinfekteras och om dessa kan utgöra symptomlösa smittbärare.

Detta examensarbete utgör en del av ett större forskningsprojekt vid Sveriges lantbruksuniversitet inom BRSV (Horizon 2020 SAPHIR, SEP-210177400, etiskt godkännande 5.8.18-16188/2017, härafter kallad projekt/et, för att inte blandas ihop med arbete som härrör detta examensarbete). I projektet har forskare följt ett antal nötkreatur som infekterades naturligt av BRSV i januari 2016 fram tills att samma individer blev naturligt återinfekterade, fyra år senare. Blodprover och mjölkprover från ett trettiotal individer har tagits med två månaders intervall mellan 2016 och 2018, samt från ett fåtal djur före, under och efter återinfektion 2020. Därtill har seronegativa sentineldjur (födda efter 2016) provtagits, antingen regelbundet ($n=5$) eller sporadiskt ($n=24$), för att undersöka om BRSV cirkulerade i besättningen. Syftet med detta examensarbete var att kartlägga antikroppssvar i serum efter naturlig infektion med BRSV, samt att fastställa efter hur lång tid och vid vilken antikropptiter nötkreatur kan bli återinfekterade med BRSV. Kunskapen kan bidra till förståelse om infektionsdynamiken i stora populationer, t.ex. när besättningsimmuniteten avtar efter ett utbrott (vilket även beror på rekryteringsfrekvensen, d.v.s. hur många immuna djur som slaktats ut och som ersatts med naiva djur). Arbetet kan även bidra med kunskap om vilka djurkategorier (t.ex. åldersgrupp eller immunstatus) som kan behöva vaccineras och när (i förhållande till utbrott) för att kunna kontrollera smittspridning i framtiden.

Examensarbetet fokuserar på att beskriva kinetiken av BRSV-specifika IgG1-antikropptitrat i serum hos nötkreatur under 2–4 år efter naturlig infektion. Därtill jämförs titrar av BRSV-specifika IgG1-antikroppar med virusneutraliserande antikroppar (VN) i serum (befintliga data av samma serumprover framtagna av forskare

i projektet), samt BRSV-specifika IgG-antikroppstitrar i mjölk och serum på individnivå. Återinfektioner beskrivs i en besättning och individuella BRSV-specifika serum IgG-antikroppstitrar vid återinfektion av enstaka djur fastställs. Sammantaget kan dessa data indikera immunitetens duration och användbarheten för ELISA samt analys av mjölk för att förutspå skydd på individnivå.

2. Litteraturoversikt

2.1. Bovint respiratoriskt syncytialt virus

2.1.1. Betydelse

BRSV orsakar respiratorisk sjukdom hos nötkreatur. Infektionen kan vara subklinisk, presenteras med milda eller allvarliga symtom med dödlig utgång (van der Poel *et al.* 1994). Det skapar givetvis ett stort lidande för djur som drabbas men även en stor kostnad för lantbrukaren. I ett svenskt examensarbete från 2018 estimerades kostnaden för ett mildt utbrott till 130 kr/djur vilket skulle motsvara 65.000 kr för en gård med 500 individer (Lefverman 2018). I det examensarbetet kom man fram till att de största kostnaderna var förlust av mjölk (32,5 %) och dödsfall (29 %). Vid det utbrottet var mortaliteten låg, bara 0,37 %. Rapporter finns som tyder på att dödligheten kan bli så hög som 20 % i enstaka fall (Uttenthal *et al.* 2000; Valarcher & Taylor 2007).

2.1.2. Egenskaper och släkte

Bovint respiratoriskt syncytialt virus isolerades första gången 1970 och redan då ansåg forskarna att viruset hade likheter med det humana RS-viruset (Paccaud & Jacquer 1970). BRSV ingår tillsammans med humant respiratoriskt syncytialt (HRSV) virus i genus *Orthopneumovirus*, i familjen *Pneumoviridae* (Amarasinghe *et al.* 2017). Viruset är omgivet av ett lipidhölje som innehåller ett negativt enkelsträngat RNA-genom, som kodar för 11 proteiner (Valarcher & Taylor 2007). Negativa enkelsträngade RNA-virus kallas även mononegavirales och är alltid uppbyggda enligt en liknande genomprincip (Quinn *et al.* 2011). I en reviewartikel (Valarcher & Taylor 2007) gällande virusets patogenicitet och immunologi beskriver författarna att viruset förvisso är cytopatogent, men att *in vitro*-studier visar att den cytopatogena effekten är låg i cilierat epitel, varför forskare tror att värdjurets immunsvår bidrar till patogenesen. Virusets genom är stabilt. I studier som gjorts har forskare inte hittat mer än ca 15 % variation i genomet mellan stammar och det

har föreslagits att användande av vacciner har drivit denna förändring (Valentova *et al.* 2005; Valarcher & Taylor 2007).

En annan reviewartikel (Bueno *et al.* 2008) beskriver att humant respiratoriskt syncytialt virus (HRSV) också orsakar luftvägssjukdom, framför allt hos barn. Det är den vanligaste orsaken till viral bronkiolit och lunginflammation bland barn i världen. Cirka 70 % av världens barn har infekterats innan ett års ålder och 100 % innan två års ålder. Forskning har även visat att barn som drabbas i ung ålder har ökad sannolikhet att utveckla astma och allergier.

BRSV och HRSV är lika i sin struktur, den sjukdom de orsakar, patogenicitet och immunitet (van der Poel *et al.* 1993). Därför har forskare inom humanmedicin och veterinärmedicin kunnat dra nytta av studier från varandras forskning på respektive virus.

2.1.3. Epidemiologi

Bovint respiratoriskt syncytialt virus finns i större delen av världen. Seroprevalensen är 30–70 % (Valarcher & Taylor 2007). I Sverige skiljer sig prevalensen mellan olika regioner. I studier på 1980-talet varierade prevalensen mellan 41 % i norr och 89 %, i söder (Elander 1996). I östra Mellansverige detekterades BRSV-antikroppar i tankmjölk hos 78,5 % av gårdarna år 2006 (Ohlsons *et al.* 2010) och i en studie i Danmark påvisade man antikroppar i tankmjölk hos 54 % av undersökta gårdar år 2000 (Uttenthal *et al.* 2000). Hur ofta djuren drabbas är svårt att säga för att seroprevalensen är så hög och det har hittills varit oklart hur länge antikropparna kvarstår. Dock finns det en korrelation till populationstätheten och besättningsstorlek i området (van der Poel *et al.* 1994; Valarcher & Taylor 2007).

Smittan sprids via både direkt och indirekt väg via aerosoler från sekret (Valarcher & Taylor 2007). Studier visar att RS-viruset kan överleva upp till 6 timmar utanför sin värd (Hall *et al.* 1980) och kan således smitta även indirekt. Utbrott sker främst under vinterhalvåret (van der Poel *et al.* 1993), men hur viruset kommer till en gård är inte helt kartlagt. Data från en longitudinell studie (van der Poel *et al.* 1993) i Nederländerna där forskare följde sex gårdar över ett års tid indikerade att viruset kan finnas endemiskt på gården och blossa upp med jämna mellanrum. Gårdarna befann sig långt ifrån varandra och köpte inte in några andra nötkreatur, men ändå drabbades alla gårdarna under vinterhalvåret. Forskare misstänkte att det kunde finnas persistent infekterade djur som kunde sprida smitta, även om virusutsöndring inte kunde provoceras fram genom immunosuppression av tidigare smittade djur (Kimman *et al.* 1987a; van der Poel *et al.* 1993). I en studie från 2001 kunde man *in vitro* visa att viruset kan överleva och vara smittsamt upp till 6 månader efter

infektion (Valarcher *et al.* 2001). I studien av van der Poel *et al.* (1993) placerade forskare även ut BRSV-negativa satellitkor under sommaren, för att ta dem tillbaka till sina ordinarie gårdar inför vintern, och ingen av satellitkorna hade smittats under sommaren. Studien antydde att inte heller sättet korna hålls på har betydelse för smittan. En av gårdarna hade sina kor inomhus även under sommarhalvåret och inte heller där smittades satellitkorna, utan det måste vara andra faktorer som får smittan att blossa upp. Alternativt introduceras ny smitta i sådana besättningar varje vinter, t.ex. med människor eller andra passiva vektorer som färdas mellan gårdar.

I områden där viruset är endemiskt är det främst kalvar som utvecklar allvarlig sjukdom (van der Poel *et al.* 1994). Maternella antikroppar ger ett visst skydd men inte fullgott sådant (Kimman *et al.* 1987a). Äldre djur har dels ett mer utvecklat förvärvat immunförsvar och har med stor sannolikhet drabbats av viruset tidigare i livet (van der Poel *et al.* 1994). De vuxna djuren i endemiska områden får sällan symptom eller milda sådana. Dock kan de drabbas hårt om de stöter på det första gången i vuxen ålder.

Liknande problematik kan ses nu, hösten 2021, vad gäller RS-viruset på humansidan. En kraftig topp av antal registrerade fall har uppmärksammats stort i vanlig media¹ och av myndigheterna. På Folkhälsomyndighetens hemsida kan man läsa att den senaste toppen av antalet rapporterade respiratoriskt syncytialt virus (RSV)-fall var 2018–2019 och att antalet RSV-fall var lågt under perioden med Covid-pandemin 2020 då människor reducerat sina kontakter. Toppen av antal registrerade fall som nu (hösten 2021) ses beror på att populationsimmuniteten nu är lägre än vanligt och att samhället har öppnat upp igen efter covidpandemins restriktioner menar Folkhälsomyndigheten. Under pandemin var människor isolerade i högre grad och RSV kunde inte spridas i samma utsträckning som tidigare. Nu träffas vi igen i grupper med främmande människor, t.ex. på dagis och förskola och där har de yngsta barnen inte drabbats av RSV. Den stora mängden yngre barn (0-5år) som saknar immunitet gör att viruset kan cirkulera snabbt och många barn drabbas samtidigt, vilket leder till att utbrottet blir både extra stor och kommer tidigare än föregående år. Det i sin tur leder till en enorm belastning på sjukvården och många unga som drabbas. Barn under 6 månader är extra känsliga för infektionen (Folkhälsomyndigheten 2021). I normala fall har uppemot 100% av barnen stött på viruset redan vid 2 års ålder (Bueno *et al.* 2008), men i år utgör barn under 5 år en ny stor riskgrupp (Folkhälsomyndigheten 2021).

¹ Under hösten 2021 har RSV fått mycket mediautrymme, om än inte varje dag, så flertalet gånger i veckan uppmärksammas RSV i tidningar, på Radio och på TV. Den som är intresserad kan enkelt göra en sökning på internet. Ett ex. från aftonbladet, för att nämna någon (TT 2021).

2.1.4. Kliniska symptom

I översiktsartiklar om det bovina viruset beskrivs sjukdomsförloppet hos nötkreatur (Valarcher, 2007, Gerswin, 2012). Viruset orsakar övre eller både övre och nedre luftvägsinfektion och symptomen startar efter en inkubationstid på två till fem dagar. En övre luftvägsinfektion ger först seromuköst näs- och tårflöde och senare mukopurulent näsflöde och hosta. Vid infektion av nedre luftvägarna ses feber, nedsatt allmäntillstånd, anorexi, nedsatt mjölkproduktion och ökad andningsfrekvens till följd av bronkopneumoni eller bronkiolit. Djur kan andas med öppen mun, ha sträckt nacke med tungan hängande och saliv som rinner och stöna vid utandning. Djuren kan få varierande grad av lungödem och luftrörspluggar. Vid auskultation går ibland att höra sprakande och väsande (eng. crackles and wheezles) och några djur får subkutana emfysem som kan palperas. Viruset kan på egen hand orsaka sjukdom eller tillsammans med andra virus och bakterier, och då talas det om ett bovint respiratoriskt sjukdomskomplex (eng. bovine respiratory disease complex) (Gerswin 2012).

2.2. Immunitet – en introduktion

Kapitlet om immunitet inleds med en introduktion i grundläggande principer och processer om hur immunförsvaret är uppdelat och borde fungera (kap 2.2)². Undersökningen i det här examensarbetet är kopplat till det förvärvade immunförsvaret, varför även största fokus i litteraturöversikten nedan även kommer beröra det förvärvade immunförsvaret till största del. Dock, för att förstå BRSV:s patogenes och immunitet är det motiverat att förklara grundläggande koncept för hur immunförsvaret fungerar generellt, och då även belysa några viktiga punkter vad gäller det medfödda immunförsvaret. Forskning visar hur BRSV har utvecklat strategier för att undgå de vanligaste vägarna virus brukar elimineras av immunförsvaret och för dessa strategier redogörs i kapitlen 2.3 och 2.4. Det finns självklart fler celler och processer som ingår i immunförsvaret än de som tas upp i denna examensuppsats. De koncept och processer som jag valt att redogöra för är de delar som har relevans för dels förståelse av BRSV:s patogenes och immunologi, dels där det dessutom finns relevanta studier knutna till detta examensarbete. Jag har även valt att förlägga introduktionen i grundläggande principer för immunförsvaret innan kapitlet om patogenesen för BRSV, då forskare menar att det är värdens egna immunsvår som till stora delar står för dess patogenes. Litteraturen till introduktionen baseras främst på den kurslitteratur som är rekommenderad inom immunologikurser för veterinärstudenter vid SLU. Bakgrundsinformation för ökad för-

² Den läsare som är väl bevandrad i immunologins grunder kan hoppa över kapitel 2.2.

ståelse av vissa processer är hämtade från olika reviewartiklar, medan litteratur gällande patogenes och immunitet för BRSV baseras främst på aktuell forskning, forskningsartiklar.

2.2.1. Medfödd och förvärvad immunitet

Om en patogen tar sig igenom de fysiska barriärerna (hud, slemhinna, etc.), aktiveras det medfödda immunförsvaret³ som bl.a. består av komplementsystemet, neutrofiler, eosinofiler, basofiler, NK (natural killer) celler och monocyter som kan differentiera till makrofager (Valentova *et al.* 2005; Tizard 2013). Det aktiveras på bara några minuter. Neutrofiler och makrofager kan fagocytera patogener och infekterade celler. Det medfödda immunförsvaret kan förstärkas av minnesceller från det förvärvade immunförsvaret, men har i sig självt inget minne och är inte specifikt. Det angriper inkräktare på ett liknande sätt varje gång. Processen ger upphov till smärta och inflammation t.ex. genom utsöndring av prostaglandiner, leukotriener och pro-inflammatoriska och inflammatoriska cytokiner som ger upphov till sjukdom, sjukdomskänsla, som t.ex. feber, trötthet och anorexi.

En viktig proinflammatorisk cytokin är Tumor Necrosis Factor (TNF) - α som driver inflammation och framkallar sjukdomssymptom (Tizard, 2013). Andra exempel på centrala cytokiner är Interleukin (IL) -1, IL-6 och IL-8. Interleukin-1 inducerar bl.a. feber, påverkar blodflöde, och hjälper T-celler att bilda cytokiner. Interleukin-6 driver bl.a. inflammation och påverkar B-celler och T-celler. Interleukin-8 är ett kemokin som, jämte t.ex. leukotrien, rekryterar celler som monocyter och neutrofiler.

Sentinellceller, såsom makrofager och dendritiska celler, m.fl., cirkulerar i blodet och finns i vävnader och aktiveras när de möter inkräktare (Tizard, 2013). På cellerna finns Pattern-Recognition Receptorer, PRR, där den viktigaste är Toll-like receptor (TLR). Det finns 10–12 olika sorters TLR:s i däggdjur. Dessa är specialiserade att känna igen olika typer av patogener: bakterier, svamp, virus. Molekyler och nukleinsyror av dessa patogener kallas för pathogene-associated molecular patterns, PAMP:s. Om dessa binder till TLR på sentinellcellen börjar dessa producera olika cytokiner. Dendritiska celler, makrofager och B-celler är även så kallade antigenpresenterande celler (APC). De tar med sig det processade antigenet till lymfknutorna och presenterar detta för naiva T-celler så att det förvärvade immunförsvaret aktiveras.

NF- κ B och IRF är två transkriptionsfaktorer, som när de aktiveras ska trigga igång

³ Även kallat ospecifika immunförsvaret i en del litteratur

det medfödda immunförsvaret genom att inducera cytokiner och annan antiviral aktivitet, inklusive interferoner, TNF- α och IL-1 (Fatoumatta, 2020).

Många patogener har hittat strategier att kringgå det medfödda immunförsvaret (Tizard, 2013). Hur BRSV gör detta beskrivs i kapitel 2.3 och 2.4 (patogenes och immunitet).

Kroppen aktiverar dock även det adaptiva, förvärvade immunförsvaret⁴ som delas in i B-lymfocyter (B-celler) och T-lymfocyter (T-celler). B-lymfocyterna står för det humorala, eller antikroppsmedierade immunförsvaret (AMI). T-lymfocyterna tillhör det cellmedierade immunförsvaret (CMI). I det förvärvade systemet skapas minnesceller som vid ett nästa möte med smittämnet aktiveras och expanderar mycket snabbt. Medan det vid en s.k. primärinfektion (en första infektion) kan ta flera dagar och upp till veckor innan försvaret är utvecklat, kan smittämnet bekämpas betydligt snabbare och mer effektivt vid återinfektion.

2.2.2. B-lymfocyter och antikroppsmedierad immunitet

Det antikroppsmedierade, eller humorala, immunförsvaret utgörs av B-celler (Tizard, 2013). Dessa cirkulerar i kroppen och kan aktiveras och utvecklas till plasmaceller som bildar antikroppar. Antikropparna i sig kan fästa till mikrober och hindra dessa från att få fäste och förökas (t.ex. virusneutraliserande antikroppar). Antikropparna kan även verka opsonierande, det vill säga märka inkräktare så att neutrofiler och makrofager känner igen dem och kan fagocytera dem. Antikroppar kan även aktivera komplementssystemet.

B-celler kan, när de känner igen antigen (ett smittämne) med sina receptorer, alltid bilda IgM-antikroppar (Tizard, 2013). För att bilda andra antikroppar, IgA, IgG och IgE, behöver de aktiveras genom att få en signal av en T-cell genom produktion av specifika cytokiner. När en B-cell blivit aktiverad av ett antigen delar den sig med samma eller bättre specificitet mot detta antigen och deltar i ett effektivt skydd. När B-cellen bundit till ett antigen kan den aktiveras till en så kallad effektorcell som kan differentiera till en plasmacell som bär på massa antikroppar som den kan släppa ut vid aktivering. Andra B-celler bildar i stället minnesceller, vilka sedan finns kvar i kroppen som specifika antigen-B-celler mot just det antigenet. Om kroppen stöter på samma antigen, svarar immunsvaret snabbt och effektivt. Dessutom muterar B-cellerna och blir mer effektiva mot sitt antigen, de genomgår en affinitetsmognad.

⁴ Även kallat specifika immunförsvaret, eller förvärvade i en del litteratur.

Exakt hur det immunologiska minnet fungerar i kroppen kan forskarna ännu inte fullt förstå eller förklara (Hammarlund *et al.*, 2017). Antikroppar har olika lång halveringstid (se kap 2.2.3). Även IgG som har relativt lång halveringstid försvinner relativt snabbt ur systemet (Tizard 2013), men kroppen verkar ändå ha förmåga att mobilisera ett antigen-specifikt antikroppssvar som kan vara bestående i många år (Hammarlund *et al.*, 2017). I sin forskning visar dessa forskare att det finns långlivade plasmaceller som upprätthåller antikropps nivåerna och som kan överleva många år, upp till tio, när det inte längre finns några B-minnesceller kvar. Även Benson *et al.* (2009) har studerat hur B cellsmindet upprätthålls och kom i sin forskning fram till att minnet kan upprätthållas vid närvaro närbesläktade (eng. cognate) antigen, och de förkastar även teorin som man trott tidigare att det var ”stödjande” (eng. bystander) inflammatoriska signaler som drev B-minnesceller.

Beroende på om B-cellen blir aktiverad av en T-cell eller inte, och vilka cytokiner som produceras, kan IgM-antikroppen bytas ut (Class Switch Recombination) mot andra isotyper och subklasser (Estes & Brown 2002:1; Tizard 2013). För att bilda antikroppar behöver B-cellen bli aktiverad av en T-cell. En B-cell kan alltså switcha klass från IgM till andra klasser (Estes 2010). Exakt vilka cytokiner och faktorer som påverkar antikroppsbytet varierar från art till art och det är inte helt kartlagt för varje art. Man vet t.ex. att TGF β generellt är en viktig faktor för ett byte till isotyp IgA, men hos nötkreatur har forskare t.ex. hittat att en annan faktor, IgA-inducing protein (IGIP), spelar en viktig roll för att B-celler ska bilda IgA (Austin *et al.* 2003).

2.2.3. Isotyper, subklasser och virusneutraliserande antikroppar

Antikroppar delas in i fem klasser, även kallade isotyper. Sedan finns det även subklasser av dessa isotyper (Tizard 2013). I det här kapitlet redovisas en kort beskrivning av de fem olika klasserna, deras funktion och halveringstid, samt vilken betydelse subklasser och virusneutraliserade antikroppar har.

IgM – bildas snabbt men har också kort halveringstid och försvinner snabbt från blodet (Tizard 2013). IgM kan kroppen alltid bildas, men för att byta klass och bilda andra antikroppar behöver B-cellen aktiveras av T-celler samt att vissa andra cytokiner och faktorer inverkar i klassbytet och funktionalitet (Estes 2010; Tizard 2013). Dessutom aktiverar IgM komplementsystemet. En del nötkreatur har väldigt stora IgM, men det är ännu inte kartlagt exakt vilken betydelse det har (Tizard 2013).

IgG –har relativt lång halveringstid och finns i höga halter i plasma. Det går att mäta IgG en lång tid efter en infektion. IgG är även bra på att aktivera komplement-

systemet. IgG är en liten molekyl och kan lätt ta sig ut från blodet genom kärlväggen och blir en viktig antikropp vid en inflammation (Tizard 2013).

IgA –har kort halveringstid, men lite längre än IgM och finns i låga halter i plasma. De finns mestadels på slemhinnor och är viktigt försvar i mag-tarmkanalen och luftvägarna och aktiverar inte komplementsystemet (Tizard 2013). IgA utgör en del av kroppens första försvar i mag-tarmslemhinnan och står för 70–90 % av alla immunoglobuliner i Gut-Associated-Lymph-Tissue (GALT). IgA fungerar mest agglutinerande och neutraliserande av bakterier, virus och gifter (Austin *et al.* 2003).

IgE – har kort halveringstid och försvinner snabbt från kroppen. De aktiverar främst mastceller och drar till sig eosinofiler och ingår i allergiska reaktioner. De orsakar en lokal akut inflammation och är viktiga mot bekämpning av parasitangrepp (Tizard 2013).

IgD finns även men forskarna är ännu osäkra om dess betydelse (Tizard 2013).

Isotyperna delas även in i olika subklasser som har uppstått längs evolutionens gång (Tizard 2013). De har kommit till genom genduplicering och mutationer. Dessa subklasser kan sedan ha olika egenskaper som gör att de är olika effektiva i bekämpandet mot en infektion. Det antal subklasser ett däggdjur har skiljer sig från art till art, men även fördelningen av isotyper och subklasser kan skilja sig från individ till individ. Till exempel har nötkreatur tre subtyper av IgG: IgG1, IgG2 och IgG3. IgG1 kan t.ex. agglutinera antigenpartiklar, medan IgG2 inte kan göra det (Tizard 2013). Tizard (2013) skriver att nötkreatur har ca 50 % IgG1 och fördelningen mellan de övriga två varierar från individ till individ och är genetiskt betingat. Andra författare menar dock att regleringen är mer komplex och multifaktoriell, och att de flesta stegen ännu inte kartlagda (Estes & Brown 2002). Det finns dessutom skillnader mellan hur nötkreatur bildar sina isotyper och subklasser jämfört med t.ex. musmodeller. Till exempel har *in vitro*-studier visat att beroende på vilka cytokiner som produceras och vilket svar, Th-1 eller Th-2 (se kap 2.2.4 för Th-1 resp. Th-2 svar), som uppnås, bildas det mer av t.ex. IgG1 respektive IgG2. Vid mer produktion av bovint IL-4 får nötkreaturet mer IgG1 och IgE, medan det vid produktion av bovint INF- γ bildas mer IgG2. Vilka cytokiner som bildas beror på vilket typ av patogen som ger upphov till immunsvaret samt om vi får ett Th-1 eller Th-2 svar.

Vissa antikroppar fungerar virusneutraliserande medan andra inte kan neutralisera virus (Payne 2017), utan bara fästa vid viruset, men dessa fungerar bra i serologiska tester, så att man kan påvisa om en individ stött på ett visst virus (Tizard 2013). De

virusneutraliserade antikropparna binder till viruset på ett sådant sätt att de blockerar infektion. Viktiga bindningsställen finns på virusprotein som fäster till celler (eng. attachment protein), så att virus vid neutralisering inte kan fästa vid cellen. Antikropparna kan även blockera vissa receptorer eller hindra viruset från att frigöra (eng. uncoat) sitt genom och därmed inte kunna replikera. Många virus har även utvecklat strategier för att undvika de virusneutraliserande antikropparna (Payne 2017).

Vid analys med hjälp av t.ex. ELISA (se 3.2 metod), kan man mäta mängden antikroppar (i titrar), men man kan inte skilja mellan virusneutraliserande och icke virusneutraliserande antikroppar. I detta examensarbete är testkittet framtaget för att mäta IgG1. Metoden är standardiserad och relativt enkel att utföra i lab. För att mäta de virusneutraliserande antikropparna krävs mer avancerade metoder (se kap 2.2 metod om virusneutraliserande antikroppar).

2.2.4. T-lymfocyter och cellmedierad immunitet

Det cellmedierade immunförsvaret (CMI) utgörs av T-celler (Tizard 2013). Det finns olika T-celler med olika funktion: T-hjälparceller (Th) och cytotoxiska T-celler (CTL) och $\gamma\delta$ T-celler, en form av regulatorisk T-cell (är de som tas upp i denna examensuppsats) (Guzman 2014). Cytotoxiska T-celler är programmerade att döda alla celler som uttrycker främmande antigen på sitt eget Major Histocompatibility complex I, (MHC I) (Tizard 2013). T-hjälparceller behöver först aktivera CTL genom att producera vissa cytokiner. Beroende på vilka cytokiner Th-cellerna producerar aktiveras CTL eller inte.

T-celler har olika receptorer, bland annat T-cell receptors (TCR) som cellerna behöver för att känna igen olika antigen (Tizard 2013). De har även transport- och regulatoriska receptorer som binder histaminer, antikroppar, komplement och cytokiner. Dessutom har de så kallade hjälpreceptorer, där CTL alltid har CD8-receptorer och Th alltid CD4-receptorer. Th är alltid CD4+ och kan bli Th-1, Th-2, Th-17 eller T-regulatoriska samt minnesceller, vilket avgörs av vilka typer av cytokiner som produceras när de får antigen presenterat. Samma sak gäller för CTL. En T-cell kan sedan bli en CTL eller T-minnescell. Precis som för B-minnesceller ska T-minnesceller fungera snabbare och effektivare om dessa stöter på samma antigen senare. Nyligen har forskare upptäckt att $\gamma\delta$ T-celler är viktiga hos nötkreatur som regulatoriska celler (Guzman *et al.* 2014). De uttrycker en $\gamma\delta$ -TCR och utgör 15–60 % av lymfocyterna hos nöt, jämfört med <5 % hos människa och mus. De utsöndrar hela tiden IL-10 och prolifererar som svar till IL-10, TGF β och i kontakt med APC. Dessa celler kan sedan inhibera antigenspecifik och icke

specifik proliferaion av CD4+ och CD8+ T-celler, har man sett *in vitro*. *In vivo* har man kunnat konstatera att de djur som utarmats på CD8+ hade svårt att bli av med viruset på 10 dagar (Thomas *et al.* 1996).

En naiv Th cell, Th0, kan bli en Th-1 cell eller Th-2 cell (Tizard 2013). Om APC:n producerar mer pro-inflammatoriska cytokiner som IL-1, IL-6, TNF α utvecklas Th0 till en Th-2, vilket i sin tur driver immunsvaret till att bli antikroppsmedierat, det vill säga det främjar ett immunologiskt svar med mer antikroppar och inflammation och det är mer vanligt vid bakteriella infektioner. Om cytokinerna i stället är av slaget interferoner, IFN α/β och IL-12, blir Th0 en Th-1, som i stället främjar ett cellmedierat immunsvaret av CTL, vilket är mer vanligt vid virusinfektioner. Vilka cytokiner APC producerar beror på vilken PAMP:ar som bundit till PRR.

Th-1 bildar sedan INF- γ som i sin tur aktiverar CTL, men även makrofager, vilket sålades främjar cellmedierad immunitet (Tizard 2013). Det finns även andra viktiga cytokiner som bildas som antingen driver ett Th1-svar eller Th-2 svar. T-hjälparceller utgör alltså viktigt i funktionen om det adaptiva immunsvaret ska vara av slaget antikroppsmedierat eller cellmedierat.

Nötkreatur verkar dock skilja sig lite från den generella bilden om hur ett lymfocyt svar kan bli antingen Th-1 eller Th-2 (Estes & Brown 2002). När forskare har studerat andra infektioner har man sett att Th-svaret, vid t.ex. *F. hepatica*-infektion, inte blev som man förväntat sig. De såg att Th-2 svaret blir mindre. I stället har man sett att Th0 producerar IL-4 och IL-13, som i sin tur driver ett IgG1-svar. Samtidigt var INF- γ och IgG2 nivåerna låga. Poängen författarna vill göra är att de klassiska beskrivningarna vad som driver ett Th-1-svar respektive Th-2 svar och även vilka isotyper och subclasser som bildas vid AMI skiljer sig mellan arter och att det fortfarande finns stora luckor i kunskapen.

2.2.5. Komplementsystemet

Komplementsystemet kan utgöra en del av både det medfödda och förvärvade immunförsvaret (Tizard, 2013). Dess funktion är bland annat att verka opsoniserande, signalera inflammation, städa upp bland skadade och påverkade celler. Komplementsystemet aktiveras antingen via PAMP:s eller genom antigen-bundna antikroppar. Aktiveringen kan ske på tre sätt, lektinvägen (lektin binder mannos på smittämnen), alternativa vägen (direkt aktivering via smittämne eller skadad vävnad) och den klassiska, vilken involverar antikroppar och utgör då en del i det förvärvade immunförsvaret. De två förstnämnda vägarna ingår däremot i det medfödda immunförsvaret. Det finns flera olika komplementkomponenter, men den viktigaste av dem är C3, som när den aktiveras binder till mikrobens yta och märker

den för destruktion av immunceller. Fördelen med komplementsystemet är att det aktiveras snabbt och är potent. En konsekvens vid aktivering av komplementsystemet är att vissa proinflammatoriska cytokiner bildas, $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ och IL-6 . Några komponenter i komplementsystemet utgör även kemokiner som attraherar neutrofiler. Med andra ord bidrar komplementsystemet till mer inflammation och kan leda till att inflammationen, sjukdomen, förvärras.

2.3. Patogenes BRSV

Forskare argumenterar för att RSV:s patogenicitet främst är sammankopplat till individens egna immunsvår på infektionen och inte virusets cytopatogenicitet *per se* (van der Poel *et al.* 1994; Valarcher & Taylor 2007 m.fl.). Därför blir patogenesen och immunologi vid en RSV-infektion nära sammankopplade, de går in i varandra. Gershwin (2012) använder sig av begreppet immunopatogenes.

Valarcher och Taylor (2007) sammanfattar stora delar av patogenesen för BRSV i sin reviewartikel. Replikation av viruset sker i cilierat epitel i respirationsorganen. Virusets olika proteiner står för olika delar i patogenesen. Det är främst, F-proteinet, G-proteinet, SH-proteinet och NS1 och NS2-proteinerna som bidrar till virusets förmåga att skydda sig från värdens immunförsvar och bidrar till patogenesen. I *in vitro*-studier som gjorts konstateras att viruset är cytopatogent, samtidigt har forskare sett lite effekt av det cytopatogena. Det är delvis därför forskare tror att patogenesen beror på värdens egna immunsvår på viruset i stället för virusets cytopatogena egenskaper. Viruset replikerar i cilierat respirationsepitel och typ I och II pneumocyter, där typ I går i nekros medan typ II blir hyperplastiska, hypertrofiska och står för bildandet av syncytier (Bryson *et al* 1991). Neutrofiler finns närvarande men viruset replikerar varken i neutrofiler eller makrofager.

Virusets F-protein verkar stimulera TLR4, i likhet med lipopolysackarider (LPS), som i sin tur stimulerar det medfödda immunförsvaret (Valarcher & Taylor 2007; Gershwin 2012). BRSV leder således till att pro-inflammatoriska kemokiner och cytokiner, såsom IL-1 , IL6 , IL-8 och $\text{TNF}\alpha$, som är associerade med det medfödda immunförsvaret. Dessa rekryterar neutrofiler, makrofager och lymfocyter som delvis bidrar till sjukdom. Därmed startar infektionen med kliniska tecken associerade med det medfödda immunförsvaret.

F-proteinet främsta uppgift är att binda viruset till cellen så att dessa fusionerar (Gershwin 2012). Samma protein får även friska och infekterade celler att smälta samman och bilda jätteceller, syncytier (därför namnet) i vilka viruset lätt kan förflytta sig.

När F-proteinet klyvs, vilket det måste för att binda till cellerna och bilda syncytier, frisläpps virokinin, som forskare tror bidrar till bronkokonstriktion *in vivo* (Valarcher & Taylor 2007). *In vitro* har man sett hur det orsakar kontraktioner av glatt muskulatur. Forskarna vet inte exakt virokininets funktion, men studier visar att halten virokinin är positivt korrelerad till förekomsten av eosinofiler. Eosinofiler och neutrofiler, och även andra celler, producerar extracellulära nät (eng. "extracellular traps"), som tillsammans med slem och döda celler formar luftrörspluggar. I näten finns också toxiska proteiner som kan förstöra lungvävnad. Det har visat sig att F-proteinet i sig kan aktivera frisättningen av dessa nät (Cortjens *et al.* 2016).

In vitro har man även sett att lymfocyter som varit i kontakt med F-proteinet ger mindre lymfocytproliferation, exakt hur är inte kartlagt (Schlender *et al.* 2002). Men det i sin tur skulle leda till minskad effekt av de CD8+ CTL och färre minnesceller.

G-proteinet har flera roller i patogenesen (Valarcher & Taylor 2007). Det får virionet att fastna på själva cellytan och forskare tror att utsöndrat G-protein interagerar med de neutraliserande antikropparna så de inte finns i tillräcklig mängd för att neutralisera viruset. G-proteinet verkar även vara viktigt när det kommer till att skapa nedre luftvägssymptom genom att binda till surfaktantproteiner som gör att viruset undkommer surfaktantets skyddande inverkan. G-proteinet verkar även vara involverat i att trycka tillbaka det anti-virala T-cellssvaret, men exakt hur mekanismen fungerar är ännu inte helt kartlagd.

G-proteinet är delaktigt i att inhibera NF- κ B, men exakt hur vet inte forskarna (Valarcher & Taylor 2007). När forskare har studerat HRSV har de sett att NF- κ B leder en induktion av olika inflammatoriska kemokiner och cytokiner, vilka resulterar i aktivering av det medfödda immunförsvaret. Det leder till inflammation och rekrytering av neutrofiler, makrofager och lymfocyter (Valarcher & Taylor 2007) I en ny studie (Fatoumatta *et al.* 2020) har forskarna visat hur viruset skapar så vad de kallar "virala inklusionskroppar" (författarna medger att nomenklaturen inte är korrekt i dess rätta bemärkelse) i vilka dels replikationen sker, och dels proteinet p65 låses in. Detta protein (en beståndsdel av NF- κ B) signalerar i normala fall till kärnan att cellen är infekterad. Genom att skapa inklusionskroppar kan viruset undgå det medfödda immunförsvaret och fortsätta leva inne i cellen.

NS-1 och NS-2 är delaktiga i resistens mot typ I interferoner men kan också blockera typ I interferonproduktion (Valarcher *et al.* 2003; Kotelkin *et al.* 2006). När interferoner inte frigörs som de ska, fördröjs aktiveringen av CTL. I en studie om HRSV har man kommit fram till att NS-1 hindrar produktion av interferoner som behövs för att driva ett CTL-svar. Även om BRSV och HRSV är lika i mycket,

så skiljer de sig på denna punkt. Hos BRSV är det NS2- som står för inhiberingen av interferonerna.

Vidare pekar tidigare forskning på att en RSV-infektion inte heller ger något bra immunologiskt minne, vilket forskare tror beror just på att BRSV driver ett Th-2 svar i stället för ett Th-1 svar (Bueno *et al.* 2008; Gershwin 2012). Forskare tror att det måste finnas en balans mellan Th-1 och Th-2 svar som kan driva produktionen av virusneutraliserande antikroppar, som IgA och induktion av INF- γ och sekretion av CTL (Bueno *et al.* 2008).

I sin sammanfattning beskriver Gershwin (2012) att när RSV triggat ett Th-2 svar resulterar det ibland i produktion av IgE och en allergisk reaktion i lungorna som dessutom ger ytterligare minskade nivåer av INF- γ , vilket behövs för att driva CTL. När Th-2 drivs i stället för Th-1 i blir infektionen av värre karaktär. Dessutom blockerar Th-2:s cytokinsvar i sig CTL-produktion. En korrelation mellan IgE och ökade symptom är bevisat, men tyvärr har få forskargrupper tillgång till BRSV-specifika IgE analyser och kan därför inte konfirmera resultaten. Ett överaktivt immunsvaret hos vissa individer verkar leda till överdrivet inflammatoriskt svar och infiltration av immunceller (Bueno *et al.* 2008). Det är främst neutrofilerna som står för vävnadsskadan i luftvägarna (Cortjens *et al.* 2016).

2.4. Immunitet vid BRSV

2.4.1. Maternella antikroppar

Maternella antikroppar ger ett visst skydd mot sjukdom, men det ger inte ett fullgott skydd (Kimman *et al.* 1987a). Både människor och kalvar blir sjuka och kan utsöndra virus vid återinfektion (van der Poel *et al.* 1994). I studier har forskning visat att maternella antikroppar framförallt utgörs av IgG1 (Kimman *et al.* 1987a). I en studie jämfördes kalvar som fått respektive inte fått colostrum och de som fått colostrum bildade inte det lokala antikroppssvaret (IgM och IgA) i luftvägarna som också behövs i bekämpningen av BRSV, de bildade inte IgM eller IgA. Man såg man att kalvar som var naturligt infekterade och hade maternella antikroppar utvecklade en svårare sjukdom. I praktiken är dock unga kalvar oftast skonade från svår sjukdom och det är istället äldre kalvar och BRSV-naiva vuxna djur som får svårast symptom. De maternella antikropparna har en halveringstid på 23, respektive 26,6 dagar har forskarna visat i två olika studier (Kimman *et al.* 1987a; Uttenthal *et al.* 2000). De maternella antikropparna finns kvar i kroppen i 2,5–5,5 månader.

2.4.2. Antikroppsmedierad och cellmedierad immunitet

Immunsvaret som sker är både antikroppsmedierat och cellmedierat. I en studie mätte forskare antikroppar, interferoner och lymfocytproliferation som mått på antikroppsmedierad respektive cellmedierad immunitet (Knott *et al.* 1998). Där kunde de se att alla kalvar aktiverade både det antikroppsmedierade och det cellmedierade immunförsvaret när de infekterades med BRSV. Alla kalvar i den studien bildade virusneutraliserande antikroppar och INF- γ , dock såg forskarna inte lymfocytproliferation hos alla kalvar. Den kalven med lägst nivåer av INF- γ saknade även lymfocytproliferation. Det var även den kalven som också utvecklade svårast infektion. Studien indikerar att ett CMI-svar verkar vara viktigast när det kommer till tillfrisknande.

Taylor *et al.* (1995) har visat att CD8+ T-celler, CTL, är centrala för tillfrisknande av en BRSV-infektion. I studien användes monoclonala antikroppar för att utarma (eng. deplete) olika typer av T-celler och sedan infektera kalvarna med BRSV för att kunna studera vilken funktion respektive T-cell har för ett gott tillfrisknande och hur svår sjukdomen blir utan respektive T-cell. Vid tidpunkten för eliminering av viruset, ca 8–9 dagar in i infektionen förelåg höga halter av CD8+ CTL i blodet och låga halter av antikroppar. I motsats till övriga kalvar utsöndrade kalvar utan CD8+ T-celler fortfarande virus efter tio dagar. Slutsatsen forskarna gör är att CD8+ T-celler är viktiga för ett tillfrisknande.

Vikten av CTL för tillfrisknande från RSV har även visats på humansidan. I sin sammanfattande artikel (Gaddum *et al.* 1996) hänvisar författarna till studier som gjorts på humansidan att individer med ett sämre CMI utvecklar en persistent eller svår RSV-infektion. Andra studier visar att de med milda symptom har närvaro av CTL medan individer med svår sjukdom saknar närvaro av CTL. Det gör att forskarna i studien tror att cellmedierad immunitet spelar mer roll för tillfrisknandet än sjukdomens patogenes. I diskussionen tror dock författarna att antikroppar har en funktion i utvecklingen av ett CTL-svar, även om de inte kunnat fastställa någon korrelation mellan virusneutraliserande antikroppar och CTL-svar. I ett försök på möss med ett nytt vaccin lyckades de i studien skapa ett CTL-svar men utan närvaro av virusneutraliserande antikroppar. Dessvärre gav vaccinet inte upphov till något långt minne. Forskarna tror att ett humoralt svar är viktigt för att immunförsvaret ska kunna skapa bra minnesceller och därmed ett bra försvar vid infektion och de tror att det också är nyckeln till ett effektivt vaccin.

Viruset har utvecklat strategier för att undvika ett cellmedierat immunsvaret, det vill säga ett Th-1 svar som driver CMI (Gershwin 2012). Istället har viruset hittat olika strategier för att driva ett Th-2-svar. De dendritiska cellerna är viktiga för bildandet av cytokiner, vilket styrs av vilken PAMP som cellerna stöter på. Cytokiner stimu-

lerar det förvärvade immunsvaret. Vid virusinfektioner vill/bör cytokinerna driva ett Th-1 svar för att driva CTL (Tizard, 2013). Det verkar som om bland annat F-proteinet i stället stimulerar TLR4 på samma sätt som LPS (gramnegativ bakterie) och stimulerar det medfödda immunförsvaret såsom neutrofiler, vilket då leder till de nätformade pluggarna som neutrofilerna skapar (Cortjens *et al.* 2016). Vi får ett Th-2 svar i stället för ett Th-1 svar. Studier visar även att interaktionen mellan dendritiska celler i lungorna och BRSV inte ger tillräckligt uttryck för IL-12 som är den cytokin som behöver för att driva ett anti-viralt svar (Bueno *et al.* 2008; Gershwin 2012).

2.4.3. Lokalt och systemiskt försvar

Även om forskning visat på att ett CTL-svar är viktigt för att tillfriskna från infektionen (Taylor *et al.* 1995), talar ändå flera studier för att antikroppar även har en roll i så väl patogenes som det immunologiska svaret. I en studie från 1989, obducerades kalvar som dött i BRSV och samtliga hade virusneutraliserande antikroppar (Kimman *et al.* 1989a). Kimman (Kimman *et al.* 1987a; b, 1989c) har studerat kinetiken av antikroppar vid en BRSV-infektion i flera studier. De har mätt (med hjälp av ELISA) olika isotyper antikroppar såväl systemiskt (serum) som lokalt (näsflöde, tårflöde, lungsköljprov och i träck) och har funnit att det bildas olika typer av antikroppar både lokalt och systemiskt och drog slutsatsen att dessa utgör en del av försvaret mot BRSV. Även Uttenthal *et al.* (2000) har studerat kinetiken av antikroppar på danska nötkreatur och kommit fram till liknande resultat som Kimman har gjort i sina studier.

I sin studie konstaterade Kimman *et al.* (1987a) att IgM och IgA nästan simultant med smittotillfället kunde mätas i serum, ögon- och nossekret och träck, medan IgG1 kunde mätas först 13–17 dagar efter smittotillfället och IgG2 i 1–3 månader efteråt. Studien visar alltså att det bildas antikroppar såväl systemiskt som lokalt. Det fanns en korrelation mellan hur snabbt IgA och IgM uppstod och hur snabbt eliminationen av virus skedde, vilket gör att forskarna antar att det har en betydelse för tillfrisknande efter infektion. Även efter en (experimentell) återinfektion kunde de visa att det fanns ett visst minne och att det lokala svaret också var viktigt, IgA-nivåerna steg snabbt och starkt vid återinfektion, vilket talar för att det finns ett lokalt minne i mukosan. Minnet däremot skyddade inte mot återinfektion som inducerats i experimentellt forskningssyfte, men verkar skydda från att bli allvarligt sjuk vid en återinfektion. IgM gick att detektera i snitt i 22,7 dagar, IgA i 20,4 dagar, IgG1 i 2-4 månader och IgG2 2-4 månader. Längre än fyra månader mätte inte forskarna i den studien (Kimman *et al.* 1987a).

Virusneutraliserande antikroppar uppkommer snabbt i tidig sjukdom. Däremot har man inte kunnat fastställa korrelation mellan IgA och virusneutraliserande antikroppar (Kimman *et al.* 1987b, 1989c). I studien drar författarna även slutsatsen att även IgM, om så i låga nivåer tillsammans med andra mekanismer, som CTL, interferoner och maternella IgG1, kan bidra till tillfrisknande. Uttenthal (2000) konstaterade att IgG1 och virusneutraliserade antikroppar försvann ur kroppen efter cirka fyra månader (Uttenthal *et al.* 2000).

2.4.4. Komplement

I en studie av Kimman (1989b) kom forskarna fram till att komplementsystemet spelade roll vid tillfrisknandet av en BRSV-infektion. Författarna tror att aktiveringen av komplementsystemet var en orsak till dyspné, då aktivering av komplement kan leda till ökad kärlpermeabilitet och kontraktion av mastceller samt aktivering av andra celler. De visade i studien att komplement 3, C3, binder i högre grad till celler som är infekterade än till friska celler och att aktiveringen av antikroppar kan förstärka C3-aktivering. Om antikroppar inte är närvarande medieras aktiveringen ganska ineffektivt, men om antikroppar är närvarande sker kraftigare aktivering och lysis är då mer effektivt. I sin artikel hänvisar forskarna även till andra studier där detta har konstaterats. Forskarna visade även att IgG1 och IgM förstärker aktiveringen medan IgG2 och IgA inte gör det. Författarna tror att aktiveringen av komplementsystemet ger ett snabbare tillfrisknande, då neutrofiler som har receptorer för komplement kan destruera infekterade celler. Det blir en viktig mekanism i början av infektionen när nivåerna av de specifika immunförsvarscellerna och antikropparna ännu är låga.

Nyare studier har dock visat att komplementsystemet i stället kan bidra till förvärrad sjukdom via bland annat C3 och C5, som kan leda till att det neutrofila svaret bli för stort och i stället orsakar en förvärrad sjukdom (Bosmann & Ward 2012). Det resulterar i destruktion och nekros av vaskulära endothelceller och ger akuta lungskador. Det uppstår cytokinstormar som i sin tur förvärrar de akuta lungskadorna. För stor aktivering av neutrofiler leder till utsöndring av luftrörspluggar och vävnadsnedbrytande proteiner, vilket är visat för både BRSV och HRSV (Cortjens *et al.* 2016).

2.5. Diagnostik

2.5.1. PCR

Polymerase Chain Reaction, PCR, kan användas för att upptäcka viralt DNA och en PCR med omvänd transkription (reverse transcriptase PCR, RT-PCR) kan mäta RNA virus (Tizard 2013). Dessa används idag vid mätning av en pågående infektion när individen fortfarande har virus i kroppen. Tekniken är den dominerande tekniken på marknaden.

2.5.2. ELISA

Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA, används för att påvisa antingen antigen eller antikropp (Tizard 2013; SANOVA 2021). Metoden för att påvisa antikroppar innebär att man har en mikrotiterplatta med brunnar som är täckt med icke infektiöst antigen och kontrollantigen. När man sedan tillför sitt testmaterial binder eventuella virus-specifika antikroppar i testmaterialet till antigen (d.v.s. virus eller viralt protein) i brunnen. Sedan tillförs ett konjugat, antikroppar riktade mot bovina immunoglobuliner Fc del (bovint IgG1 i detta fall) konjugerade med ett enzym. Överblivet material sköljs bort och man tillför ett substrat som blir blått i kontakt med enzymet. Förekomst av virus-specifika antikroppar genererar den blå färgen. Sedan stoppas den reaktionen med en stopplösning som ger ett gult färgomslag. Färgomslaget kan läsas av visuellt eller så kan man använda sig av en spektrometer för att läsa av den optiska densiteteten (OD) och mängden antikroppar mäts i förhållande ett kontrollprov, för att standardisera metoden mellan olika körningar. Det är denna metod som används i detta examensarbete, läs mer om ELISA i metod 3.2 (det finns olika varianter av ELISA).

2.5.3. Neutralisationstest

I ett virusneutraliserande test mäter man antikropparnas förmåga (oavsett isotyp) att *de facto* neutralisera viruset, *in vivo* eller *in vitro*. Det vill säga, de ska inte bara fästa vid antigen utan även neutralisera viruset (Payne 2017). I kapitel 3.3. beskrivs den metod av neutralisationstest som används inom ramen för det stora projektet av vilket detta examensarbete utgör en liten del och med vilka mina resultat av ELISA sedan har jämförts med. Virusneutraliserande tester är bättre att använda än ELISA tidigt i utbrott för att hitta smittade djur (Kimman *et al.* 1987b). Tidiga antikroppar har ännu inte uppnått affinitetsmognad och kan därför ge upphov till falskt negativa resultat vid ELISA.

2.6. Kontroll: behandling och vaccin

Det finns ingen behandling mot BRSV, utan enbart understödande behandling i form av vila, foder och värme. Svåra fall med sekundära bakteriella pneumonier behandlas med antibiotika. NSAID är febernedsättande, men publicerade data tyder inte på att inflammationen i lungan dämpas (Francoz 2012) och NSAID används inte inom humanmedicinen. Vissa NSAID kan tvärtom öka mängden leukotrien i lungan, vilket attraherar neutrofiler som kan orsaka skada (Bednarek *et al.* 2005).

Det finns idag inget vaccin mot HRSV och de som finns mot BRSV har ofta kort duration, särskilt hos unga djur med maternella antikroppar som döljer vaccinet för kroppens egna immunförsvår. Några vacciner inducerar suboptimalt Th-1 svar som behövs för tillfriskande och undvika sjukdom (Woolums *et al.* 2004). Genom åren har ett vaccin till människa (Kim *et al.* 1969) och ett till nötkreatur (Schreiber *et al.* 2000) lett till en exacerbativ inflammation. I en studie testades ett formalin-inaktiverat vaccin, men utan gott resultat (Woolums *et al.* 2004). Man jämförde två grupper kalvar, där ena gruppen fick vaccinet och andra inte. Det var ingen skillnad mellan grupperna i avseende på sjukdom, CTL-svar och de cytokiner som mättes. Forskarna tror att orsaken till att det vaccinet inte fungerade är att det inte kan driva ett CMI-svar.

Gaddum *et al.* (1996b) argumenterar för att ett humoralt svar är viktigt för att immunförsvaret ska kunna skapa bra minnesceller och därmed ett bra försvar vid infektion och de tror att det också är nyckeln till ett effektivt vaccin.

I en studie från 2021 har man testat ett helt nytt vaccin med ett pre-fusion protein, ett rekombinant DNA vaccin, PreF (Valarcher *et al.* 2021). I studien jämförde man det mot andra vacciner, ett levande attenuerat vaccin där SH-genen saknades, ett kommersiellt levande attenuerat vaccin och en placebogrupp. Kalvar med maternella antikroppar fick de olika vaccinen och infekterades 92 dagar senare med BRSV, samt avlivades 13 dagar senare. Forskargruppen kom fram till att kalvarna som fått PreF visade signifikant bäst kliniskt och virologiskt skydd mot BRSV (även vaccinet som saknade SH-genen visade på gott resultat) och forskarna tror sig ha hittat ett vaccin som åtminstone ger ett skydd i tre månader. Detta kan vara tillräckligt för att skydda de yngsta kalvarna och kan troligen bidra till att hålla BRSV under kontroll.

3. Material och metoder

3.1. Projektet

3.1.1. Försöksdjur

Det här examensarbetet utgör en del av ett större forskningsprojekt om BRSV som bedrivs på Sveriges lantbruksuniversitet (Horizon 2020 SAPHIR, SEP-210177400, etiskt godkännande 5.8.18-16188/2017). Idén till ämnet kom från mina handledare som driver/deltar i det större projektet vid SLU. Information om gården och projektet har tillhandahållits av min handledare löpande under hela examensarbetets gång, Sara Hägglund (2021, forskningsartikel under bearbetning).

Studien har genomförts på Lövsta, som är forskningscentrum där SLU bedriver undervisning och forskning inom olika områden inom lantbruk och veterinärmedicin. Vid start för projektet, januari 2016, fanns på gården 534 nötkreatur, varav 57 % av rasen SRB och 41 % Holstein. När de senaste blodproverna är tagna, i juni 2020, var antalet och fördelningen av djur liknande som vid starten. Djuren ingår i Lövstas dagliga verksamhet och lever tillsammans i grupper och utsätts därmed för eventuella andra smittor som gården kan utsättas för under hela studieperioden.

Lövsta har sedan januari 2016 drabbats av två naturliga utbrott av BRSV. Det första utbrottet skedde i januari 2016 och det andra utbrottet i mars 2020. Båda utbrotten ansågs milda, med låg grad av kliniska symptom (Lefverman 2018; Österberg 2021, personlig meddelande). Vid det första utbrottet avled två djur, varav en av individerna redan var i dåligt skick när hon smittades av BRSV. Hon befann sig vid smittotillfället redan på Lövstas sjukavdelning berättar Julia Österberg forsknings- och undervisningssamordnare vid Lövsta, SLU (2021, pers. med). Vid det andra utbrottet behandlades ett 20-tal djur med NSAID, några fick penicillin, men inga djur avled. Österberg anser, vad hon kan minnas, att det andra utbrottet, mars 2020, var mildare än utbrottet 2016.

Vid utbrottet mars 2020 var cirka 20 % av nötkreaturen i besättningen så gamla att de levde vid det första utbrottet jan 2016. (Österberg 2021, pers. med.). Det vill säga cirka 80% av nötkreaturen på Lövsta hade vid tiden för det andra utbrottet inte stött på BRSV tidigare.

Urvalet till de djur som ingick i projektet initialt var 33 hondjur i olika åldrar, om 4–8 djur i olika ålderskategorier och av rasen SRB. Ett viktigt inklusionskriterium var att djuren var vid god hälsa, för att öka sannolikheten att de kunde vara kvar på gården under hela studieperioden.

De första blodproverna togs under det första utbrottet, januari 2016, och sedan togs blodprover från utvalda djur varannan månad. Projektet fortlöpte sedan till februari 2018. När BRSV åter började cirkulera i Uppsalatrakten 2020 togs blodprover från nio av de djur som fortfarande var vid liv och var kvar på Lövsta. Cirka tre veckor senare skedde ett utbrott av BRSV i besättningen och nossvabbar och blodprov samlades ånyo in. Blodprover togs därmed från vissa individer även före, under och sedan även 2,5 månader efter ett andra utbrott av BRSV. Blodproverna har efter provtagning centrifugerats och serum har sedan sparats i -20 °C för att kunna analyseras vid senare tidpunkt/er. BRSV har påvisats i nossvabbar med RT-qPCR, samt med virusisolering och infärgning med BRSV-specifika monoklonala antikroppar.

I detta examensarbete har serumprover och mjölkprover analyserats från dessa kor. För de kor som av under tidens gång, av olika anledningar, gallrats ut eller dött, saknas blodprover. I tabell 1 redovisas de blodprover som analyserats m.h.a. ELISA och om blodprov funnits att tillgå före och efter, första respektive andra utbrottet. Totalt har 39 serumprover och 6 mjölkprover analyserats i minst tre spädningar för IgG1. Dessutom hade 33 av dessa prover tidigare analyserats för virusneutraliserande antikroppar.

Från flera kor har man även tagit mjölkprover i samband med blodprover, för att kunna studera, på individnivå, om det kan finnas samvariation med serumantikroppar och antikroppar i mjölk. En sådan ko har studerats inom ramen för examensarbetet.

Inom ramen för den stora studien har forskningsgruppen även i vissa av dessa serumprover mätt nivåer av virusneutraliserande antikroppar. I detta examensarbete undersöks om det finns samvariation till de serumantikroppar, IgG1, vilka har mätts med hjälp av ELISA. Data för de virusneutraliserande antikropparna har tillhandahållits av handledarna.

Tabell 1. Tidpunkt för blodprov för respektive individ. Rödmarkering indikerar tid för utbrott.

Tabell 1												
Individ	Ålder 1:a utbrottet	jan-16	mar/apr-16	jun-16	sep-16	jan-17	apr-17	jun-17	mar-18	feb-20	mar-20	jun-20
A Serum (S)	27 mån		x	x	x	x	x	x		x	x***	
A Mjök (M)	27 mån		x	x	x	x	x	x				
B (S)	2-4 mån*									x	x***	x
C (S)	7 mån**									x	x***	x
D (S)	7 mån**									x	x***	x
E (S)	5 mån**		x				x		x			
F (S)	5 mån**		x				x		x	x	***	
G (S)	5 mån**		x				x		x	x	x***	x
H (S)	5 mån**		x				x		x			
I (S)	2-4 mån*		x				x					
J (S)	2-4 mån*		x				x		x			
K (S)	5 mån		x									

* Påvisad infektion 2016. Saknade maternella antikroppar vid tidpunkten för utbrottet 2016, serokonverterade sedan. A och K var ej provtagna.

** Påvisad infektion 2016, baserat på höga antikroppstitrar 2 månader efter utbrottet och kvarstående antikroppstitrar vid vuxen ålder.

*** Påvisad infektion 2020. BRSV RT-PCR positivt nossekret. Milda symptom.

3.1.2. Examensarbetets förutsättningar

Innan examensarbetet inleddes hade man visat att fem regelbundet provtagna djur, vilka föddes strax efter första utbrottet, var seronegativa och förblev så vid varje provtagning fram till 2020. Dessutom var 24 ytterligare provtagna djur över tre månaders ålder och födda efter 2016 seronegativa 2018. Sammantaget indikerar detta att viruset inte cirkulerade i besättningen mellan 2016 och 2020, vilket möjliggjorde studier av immunitetens duration.

Trettio individer följdes under två års tid och prover från några av dessa individer valdes ut för antikroppstitrering i examensarbetet, för att undersöka antikroppskinetiken vid infektion och återinfektion av BRSV. Att titrera alla serum var inte möjligt p.g.a. tids- och kostnadsmissiga skäl.

Åtta individer med sparade blodprover från tiden efter första utbrottet valdes ut baserat på ålder vid första utbrott samt förekomst av provmaterial under studieperioden inklusive innan under och efter det andra utbrottet.

Testerna utfördes i maj 2021, och några analyser gjordes om i september 2021.

3.2. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

För att mäta antikroppar i serum och mjölk har tekniken Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) använts (SANOVA 2021). Samma och liknande tekniker

har beskrivits i flertalet studier, t.ex. Kimman *et al.* (1989a) m.fl. Ett färdigt testkitt användes, SANOVIR® BRSV-ab (artikelnummer 104888). Kittet består av en mikrotiterplatta med 96 brunnar som är täckt med icke infektiös BRSV antigen (d.v.s. lyserade infekterade celler) och kontrollantigen (dvs lyserade oinfekterade celler). När man sedan tillför sitt testmaterial (serum, plasma, mjölk), binder eventuella antikroppar från dessa till BRSV-antigen i brunnen. Sedan tillförs en horseradish-peroxidase (HRP)-konjugerad monoklonal antikropp mot bovint IgG1. Överblivet material sköljs bort och man tillför ett substrat som blir blå i kontakt med HRP. Förekomst av antikroppar genererar den blå färgen. Sedan stoppas den reaktionen med en stopplösning (H₂SO₄) som ger ett gult färgomslag. Färgomslaget kan läsas av visuellt eller så kan man använda sig av en spektrometer för att kvantifiera den optiska densiteten, OD, vid 450nm.

Varje prov som testas appliceras i två brunnar, en med BRSV-antigen och en kontrollantigen. Med varje kit följer även positiv och negativ kontroll. Den positiva kontrollen ska alltid ge positivt utslag när testet körs och den negativa ska helst inte ge något utslag alls.

Sedan beräknas mängden antikroppar i relation till den positiva kontrollen. Det görs i två steg.

Steg 1: Ett korrigerat OD värde (OD_{corr}) räknas ut för varje prov/spädning av prov genom att subtrahera OD-värdet som genererats i brunn med kontrollantigen från OD-värdet som genererats i brunn med BRSV-antigen.

$$OD_{\text{BRSV}} - OD_{\text{control}} = OD_{\text{corr}}$$

Steg 2: Alla korrigerade OD-värden relateras till korrigerat OD värde för den positiva kontrollen genom formeln:

$$PP = OD_{\text{corr}} (\text{prov eller negativ kontroll}) / OD_{\text{corr}} (\text{positiv kontroll}) * 100.$$

Innan ELISA utfördes spädades varje prov i serier om 1:50, 1:100, 1:200 och 1:400. Företaget bakom kittet har satt $PP \geq 10\%$ som gräns för detektion av BRSV-specifika IgG1 antikroppar. Varje spädning med PP över 10% av positiv kontroll innehöll således antikroppar mot BRSV.

Mjölksproverna analyserades ospädda efter det att försök att detektera antikroppar i spädda prover (1:10, 1:20, 1:40 och 1:80) misslyckats.

Metoden användes i enlighet med instruktionsmanualen till testkittet (SANOVA 2021).

3.3. Virusneutraliserande antikroppar

Totalt har 33 prover analyserats avseende virusneutraliserande antikroppar. Individ K är ej medtagen då det bara finns ett prov. Data för individ J saknas helt och data för april-17 saknas för individ G och mars 20 för individ F.

Metoden var framtagen och mätning av de virusneutraliserande antikropparna hade utförts innan detta examensarbete påbörjades av forskare i det stora projektet. Metodbeskrivningen har tillhandahållits av Sara Hägglund (2021a), handledare, på engelska och översatts till svenska.

BRSV-neutraliserande antikroppar (seroneutraliserande, SN) påvisades genom att använda veroceller och BRSV (Strain ATUE51909), som innehöll en gen som kodade för grönt fluorescerande protein (GFP) (Hägglund 2021a). I korthet såddes veroceller i 96-brunnsplattor, 15 000 celler per brunn i ett cellmedium (DMEM, Lonza, Belgien) som innehöll 10 % fetalt kalvserum (FCS). Dagen efter späddes serumprover i DMEM utan FCS, och mixades med 300 plackformande enheter (plaque forming units, pfu) av GFP-BRSV och inkuberades i rumstemperatur i en timme. Verocellerna sköljdes en gång med DMEM utan FCS och inokulerades därefter med serum-virusproverna och inkuberades i 37 grader och 5 % CO₂ i en timme. Efter det, adderades DMEM med FCS för att nå en slutgiltig FCS-koncentration på 2 %. Cellerna inkuberades i 37 °C och 5 % CO₂ i tre dagar och undersöktes sedan med fluorescensmikroskop (Nikon Eclipse Ts2R). Varje serum testades i åtta spädningar och SN-titern (definierad som den högsta serumspädning som inhiberar 300 pfu) beräknades med linjär regression.

3.4. Beräkning av data och statistiska metoder

För att räkna fram mängd antikroppar/prov användes en linjär regression, där X-axeln motsvarade spädningen för det enskilda provet och Y-axeln det korrigerade OD värdet uttryckt i procent av den positiva kontrollen i ELISA. Matematiskt beräknades vid vilken spädning PP-värdet var 10 % av positiv kontroll. Den spädningen anges i titer. Om till exempel 10 % uppnås vid spädning 345 är antikroppstitern 345. Titern användes sedan för att jämföra antikropps nivåerna på individnivå och över tid.

Ett fåtal spädningar av prover (fyra st.) hade ett enskilt värde som ansågs extrem outlier och ströks därför, men då flera spädningar gjorts för varje prov, fungerade de övriga i spädningsserien för att titern ändå kunde räknas ut. Enbart två prover fick köras om med en lägre spädningsserie, då provet innehöll för lite antikroppar så att den angivna grundspädningen blev för stor och för få värden kunde mätas och ingen titer kunde beräknas. Även mjölkproverna visade på för lite antikroppar efter spädning, så att ingen titer kunde erhållas. De analyserades ytterligare en gång i utspädd form.

Virusneutraliserande antikroppar hade beräknats med linjär regression på samma sätt som mätning av titern av IgG-antikroppar i ELISA. För att undersöka om det förelåg någon samvariation mellan IgG1 och VN-antikroppar plottades data för de punkter där det fanns både IgG1 och VN-antikroppar ut i ett diagram och visuellt undersöktes om data verkade samvariera. För att beräkna statistisk signifikans för mängden titrar efter första, respektive andra utbrottet användes konfidensintervallsberäkningar.

4. Resultat

4.1. Antikroppskinetik efter primärinfektion

Kalvar visar stor variation av antikropstitrar efter en primärinfektion

BRSV-specifikt IgG1 analyserades i serum taget 2–3 månader efter utbrottet 2016 från sju kalvar (E-K) som var 2–5 månader gamla vid utbrottets början. Antikropstitrarna varierade mellan titern 174 och 645, medeltiter 373, mediantiter 383 och med en standardavvikelse på 167. Bland femmånaders kalvar hade individ F 3.7 gånger så höga titrar jämfört med individ H (fig. 1). Det statistiska underlaget för att dra slutsatser om antikropssvarets magnitud mellan de båda åldersgrupperna två till fyra månader och fem månader var för låg.

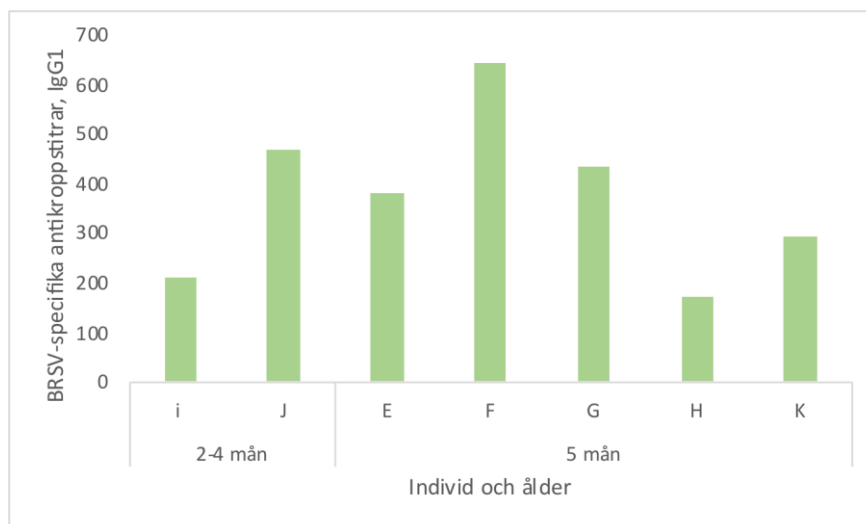


Fig 1. BRSV-specifika IgG1 antikroppar i serum 2–3 månader efter primär BRSV-infektion hos kalvar, vilka var 2–4 månader (I, J) eller 5 månader (E-H, K) när de infekterades.

Antikroppar (IgG1) kan påvisas upp till fyra år efter primärinfektion

Antikroppskinetiken efter infektion varierade på individnivå. Individ A (27 mån gammal vid utbrott 2016) fick inte höga titrar efter utbrottet, men hade detekterbara nivåer av antikroppar under fyra års tid, med en kvarstående antikroppstiter på ca 200 (fig. 2). Fyra individer fick betydligt högre titrar än A efter infektion, cirka 400–650 titrar. Individerna G och E (5 mån gammal vid utbrott 2016) hade ett år efter utbrottet detekterbara titrar men på en längre nivå än individ A. Ett år efter utbrottet sjönk individ G:s titrer från 433 till 120 och den hade sedan en kvarstående titer på ca 100, fyra år efter första utbrottet, att jämföra med A som låg konstant på en titer kring 200. Medan individ G och E hade en snarlik utveckling i sina titrar så hade individ F en mer långsamt sjunkande titernivå. Den började högt, och avtog inte lika snabbt som för individ G, men efter fyra år låg F och G på nästan samma titrer, ca 100. Individ H, I och J hade alla en titer på ca 200 ett år efter första utbrottet (fig. 2). Efter ett år hade individ F:s titrar sjunkit från 645 till 450. Fyra individer hade en titer på 219–248 och två individer på 116–120. Efter två år (mars-18) hade F:s titrar sjunkit till 260, medan två individer låg kvar på samma nivå som året innan (titer 209–222) och de två som hade titrer 116–120 året innan låg kvar på samma låga nivå. Efter fyra år hade F:s titrar sjunkit till 100 (fig. 2).

Resultatet visade att samtliga kor vars serum analyserats (n=6) hade mätbara antikroppsnivåer två år efter ett naturligt utbrott av BRSV. Tre av dessa hade en antikroppstiter på ca 200, och två hade en antikroppstiter på ca 120. Samtliga individer som fortsatt studerats (n=3) hade detekterbara antikroppsnivåer i serum även fyra år efter genomgången BRSV-infektion.

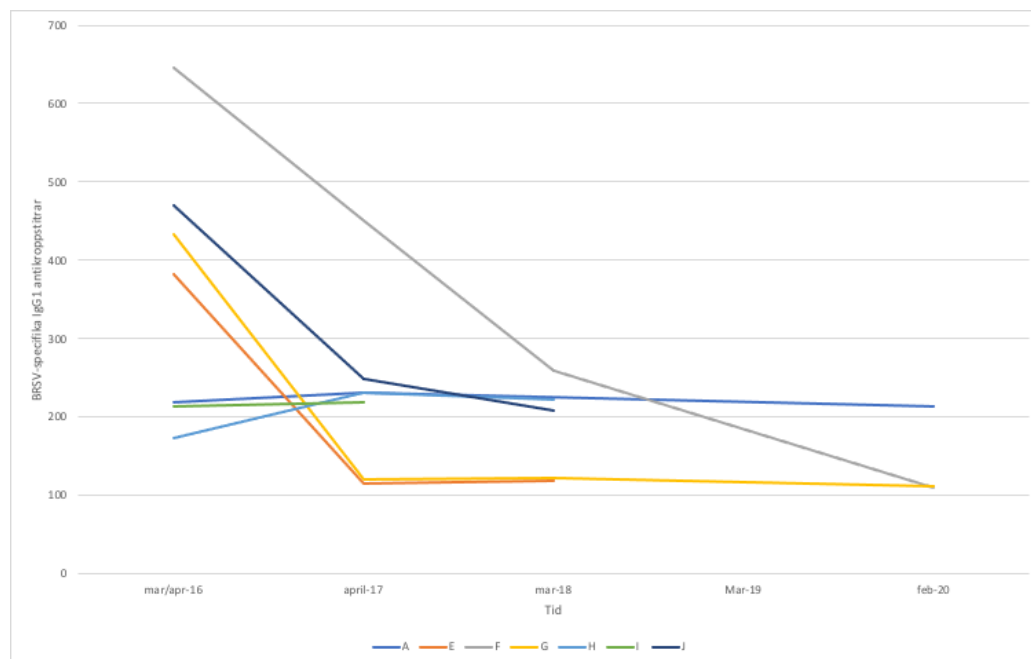


Fig 2. BRSV-specifika IgG1-antikroppar i serum från nötkreatur (A, E-J) under fyra års tid efter ett BRSV utbrott i januari 2016.

Longitudinella data saknas från tre individer (individ B, C och D), men de provtogs precis innan det andra utbrottet. Även dessa tre hade BRSV-specifika IgG1 antikroppar innan andra utbrottet, och hade således även de genomgått en primärinfektion 2016 (fig. 3). Sammantaget hade samtliga sex individer som provtogs tre veckor innan andra utbrottet BRSV-specifika antikroppar. Data från dessa sex individer indikerar att durationen av BRSV-specifik IgG1 i serum är minst fyra år. Det gick även att påvisa VN-antikroppar i serum hos fem av sex kor precis innan det andra utbrottet. Individ B saknade VN-antikroppar och hade även lägst nivåer av IgG1, med en titer på ca 100.-

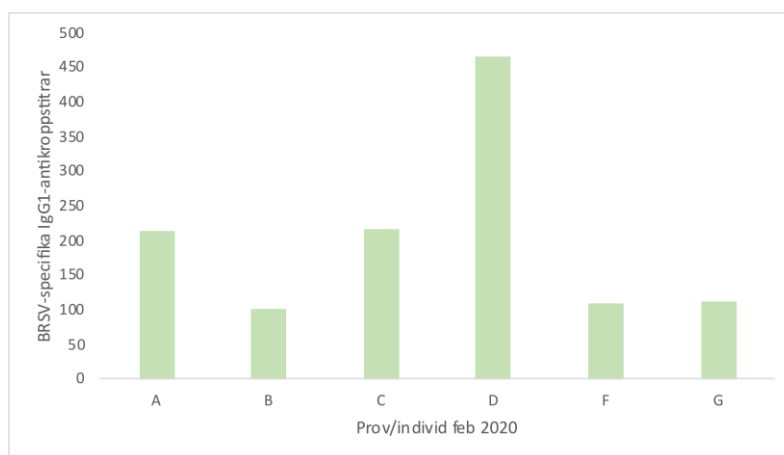


Fig 3. Diagrammet illustrerar BRSV-specifika serum IgG1 titrar hos sex nötkreatur (A-G), ca tre veckor innan en andra BRSV infektion.

4.2. Antikroppskinetik efter återinfektion

För tre av fyra individer som provtogs före, under och efter det andra utbrottet (individ B, C och D) titrerades inte antikropparna efter det första utbrottet. Analyser av enskilda spädningar hade dock visat att de infekterats och kvarstående antikroppstitrar före det andra utbrottet konfirmerade att de redan hade genomgått en första infektion.

Vid återinfektion stiger IgG1 kraftigt

Före utbrottet 2020 var de BRSV-specifika IgG1 antikroppstitrarna runt 100–200 för tre individer (B, C och G, vilka var två, sju och fem månader vid sin första infektion) och titer 467 för en individ (D vilken var sju månader vid första infektion, fig. 4).

Genomsnittstitrarna precis innan återinfektionen låg på 222 (median titer 163, standardavvikelse 173). Genomsnittstitem under den pågående andra infektionen

var 498 (mediantiter 580, standardavvikelse 273) och efter den andra infektionen var medeltitern 614 (mediantitern 630, standardavvikelse 95). Genomsnittet var 2,8 gånger högre efter återinfektion jämfört med innan (3,8 för median). Vid tidpunkten för utbrottet, då BRSV detekterades hos individ B, C, F och G hade titrarna börjat stiga för tre av fyra individer (B, C och D), medan en individ utvecklade antikrops-svar något senare (G, fig. 4).

För individ A, B, C, F och G togs nössvabbar och virus påvisades (D provtogs inte för påvisade av virus).

Två och en halv månad efter återinfektion 2020 hade samtliga provtagna individer, inklusive individ G, höga antikropstitrar. Individ B, C och D hade fortsatt höga antikropps-nivåer, även om tendensen var att dessa började avta (fig. 4).

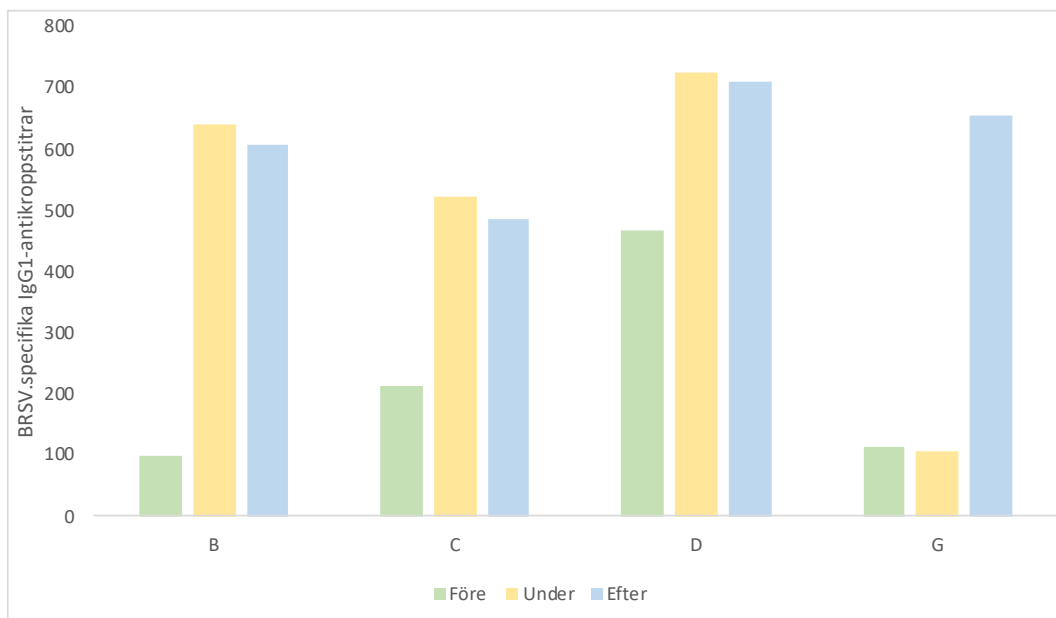


Fig 4. Visar BRSV-specifika IgG1-antikropstitrar per individ (nötkreatur B-D, G) före (feb 2020), under (mar 2020) och 2,5 månader efter (jun 2020) återinfektion med BRSV, fyra år efter det att djuren först infekterats.

Högre antikropstitrar och mindre individuell variation efter återinfektion än vid en primärinfektion

Två till tre månader efter primärinfektion 2016, vid 2–5 månaders ålder, hade kalvar en genomsnittstiter på 373, jämfört med en genomsnittstiter på 614 två månader efter återinfektion 2020. Det innebär att kalvarna utvecklade 64,6 % högre antikropstitrar vid en återinfektion jämfört med vid primärinfektion. Individvariationen i antikropstitrar vid återinfektion var mindre än vid en primärinfektion, standardavvikelsen efter primärinfektion var 167 och vid återinfektion

97. Skillnaden var däremot inte statistiskt signifikant ($p < 0,05$). Det går inte att dra för stora slutsatser på dessa data, då variationen (standardavvikelsen) mellan grupperna efter primär-, respektive återinfektion är för stor, vilket sannolikt beror på att underlaget var för litet.

Individ G var den individ med data från både efter en första och efter en andra infektion, som inkluderades i detta examensarbete. Denna individ hade en titer på 433 två månader efter primärinfektion, dessa sjönk under ett år för att stagnera på en titer strax över 100 i nästan fyra år. Sedan steg titern till 665 två månader efter återinfektion. I G:s fall såg vi att titrarna var 53 % högre vid återinfektion än vid primärinfektion, samt att G hade detekterbara IgG1-nivåer under fyra års tid. En titer på 107 skyddade inte individ G från återinfektion och virusutsöndring, eftersom virus påvisades i nossekret från detta djur under utbrottet 2020.

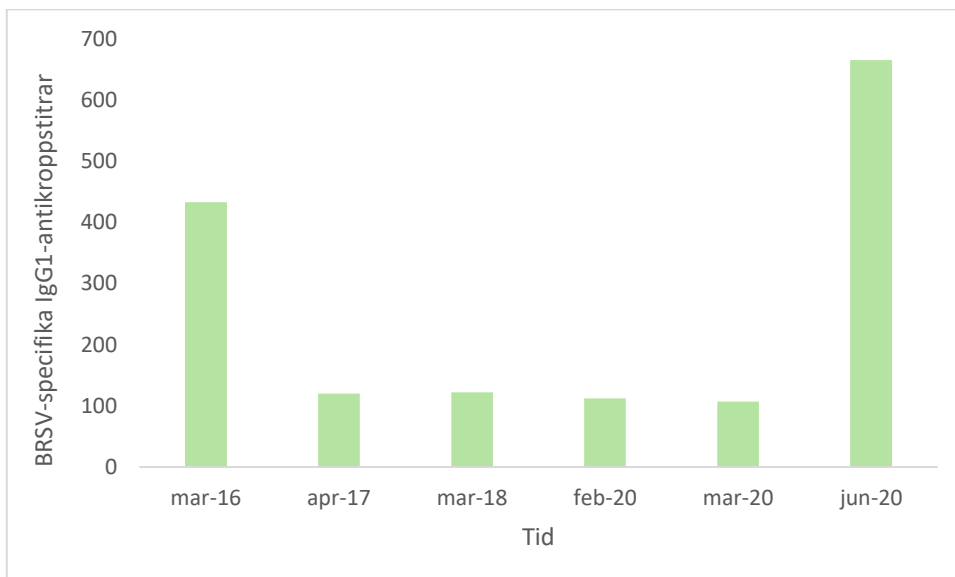


Fig 5. BRSV-specifika IgG1-antikroppstitrar hos individ G över tid. Individens infekterades i januari 2016 samt i mars 2020.

4.3. Samvariation mellan IgG1 och virusneutraliserande antikroppar i serum

Virusneutraliserande antikroppar beräknades fram av forskargruppen enligt beskrivning under kapitel 3.3 i metodavsnittet. Forskarna mätte i titrar hur mycket VN-antikroppar det fanns i varje serum. Data för VN-antikroppar jämfördes med IgG1-data som mättes med ELISA, framtaget i detta examensarbete. Några prover där det fanns data för IgG1 saknade motsvarande VN-antikroppar och inkluderas därför inte. Individ J utslöts, då det saknades VN-antikroppar data och Individ K utslöts då enbart ett prov fanns att tillgå. Sedan har data för de punkter där det

finns både IgG1 och VN-antikroppar plottats ut i ett diagram för att visuellt undersöka om data verkar samvariera.

Virusneutraliserande antikroppar korrelerar positivt med IgG1

Virusneutraliserande antikroppar gick att påvisa i nästan samtliga prover, så när som hos individ B, feb-20, precis innan andra utbrottet. Även i serum från individ I uppmättes inga VN-antikroppar efter det första utbrottet, i apr-16, trots att virus isolerats från denna individ. I sju fall av nio verkar VN-antikroppar och IgG1 samvariera positivt. Datakurvorna följer varandra väl.

Individ A (fig. 6a) låg på en konstant låg nivå IgG1 under fyra års tid. VN-antikroppar följde egentligen IgG1, men sjönk i mätningarna april och juni 2017, för att sedan gå upp igen och ligga nära IgG1 nivåerna igen. Bortsett från två mätpunkter i VN-antikroppar, verkar ändå VN-antikroppar och IgG1 följa varandras kurvor.

För individ B (fig. 6b) kunde inte VN-antikroppar påvisas innan återinfektion men B hade IgG1, en titer på 100, vilket är ett av de lägsta som mättes. Det gick att se en hög ökning av VN-antikroppar till titer 2667 vid tiden för andra utbrottet. Bara tre månader senare sjönk VN-antikroppstiteren med 73%, till 708.

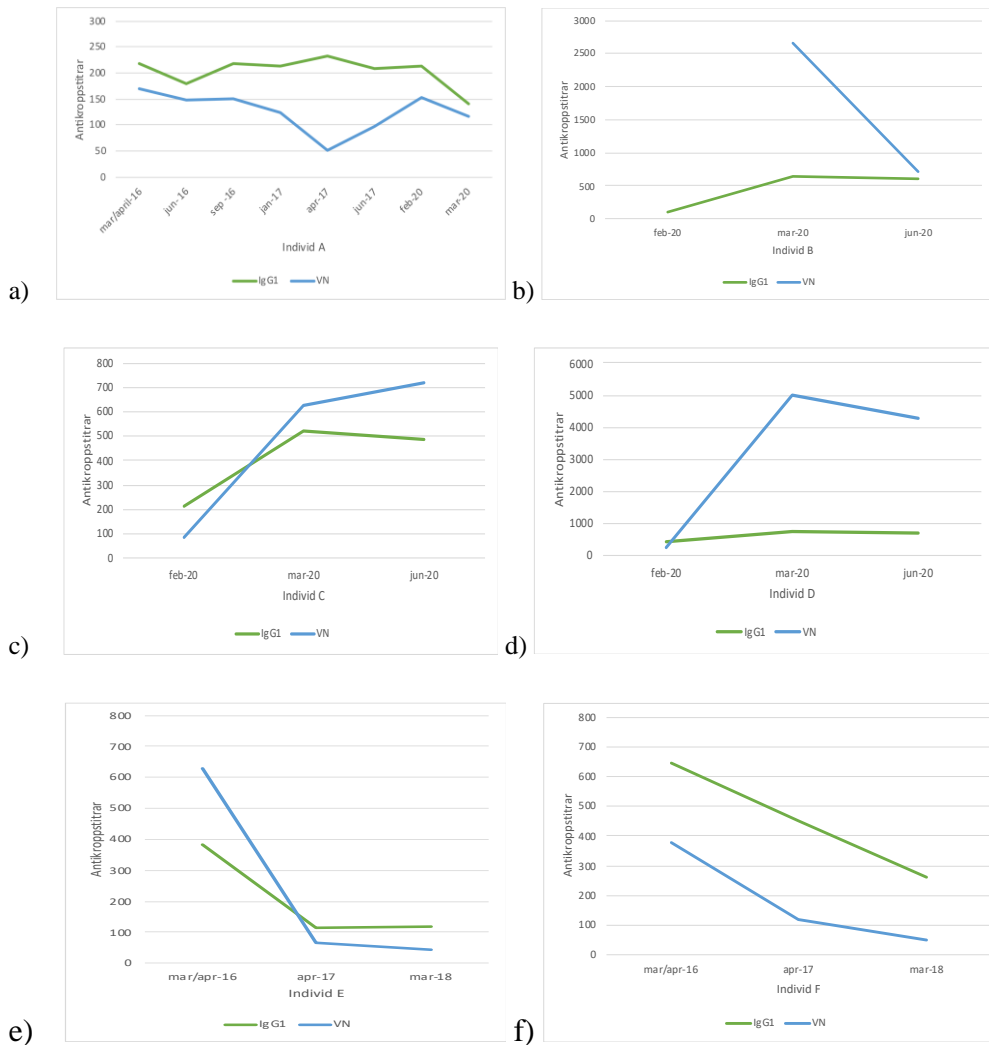
Individ C och D (fig. 6 c och d) hade såväl IgG1 som VN-antikroppar vid återinfektion. Båda fick ökning av VN-antikroppar och IgG1 efter infektion. Individ D nådde en VN-antikroppstiter på 5000 vid tiden för återinfektion, den sjönk till en titer på 4299 tre månader senare, vilket fortsatt var högt men lägre.

Individ E och F (fig. 6 e och f) som det fanns data på från första utbrottet, visade på höga nivåer av såväl IgG1 som VN-antikroppar 2-3 månader efter utbrottet 2016, och att dessa sjönk ganska snabbt. Individ E sjönk till en titer på 116 för IgG1 och 65 för VN-antikroppar efter bara ett år. Individ F låg på högre nivåer efter ett år, med en IgG1-titer på 450 titrar och en VN-antikroppstiter på 118 titrar, vilka sjönk till 260 respektive 49 två år efter primärinfektion.

Individ G är individen som det fanns data på både före och efter primär- och återinfektion. Även här ser data ut att samvariera väl. Efter primärinfektionen gick det att se att nivåerna av såväl IgG1 som VN-antikroppar sjönk och var låga redan ett år efter primärinfektionen. Båda steg kraftigt efter återinfektionen och var högre än de var 2 månader efter primärinfektionen (fig 6g). IgG1 blev 53 % högre och VN-antikroppar 544 % högre.

Individ H (fig. 6h) hade låga nivåer av såväl IgG1 som VN-antikroppar efter sin primärinfektion. VN-antikropparna är lägre än IgG och sjönk något snabbare än IgG1 (från låga nivåer till lägre) och IgG1 låg kvar stabilt på en högre nivå.

Individ I (fig. 6i) som vid insjuknandet bara var fyra månader, saknade vid tillfället maternella antikroppar, lyckas inte mobilisera ett bra immunsvår. Två månader efter primärinfektionen låg IgG1 på en titer på 200 titrar och inga VN-antikroppar kunde detekteras. Ett år senare mättes VN-antikroppar till en titer på 24 (strax över detektionsnivån på 20) och IgG1 låg stabilt.



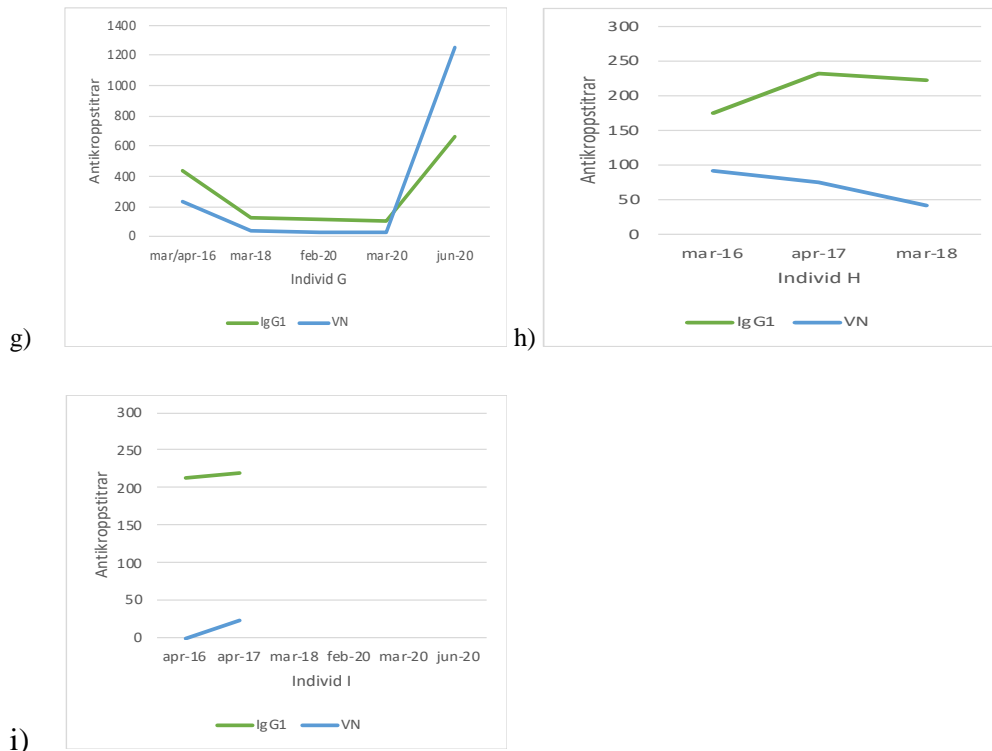


Fig. 6 a-i. Samvariation av BRSV-specifika serum IgG1-antikroppar (IgG1) och virusneutraliserande antikroppar (VN) i serum, för individ A-I (graf a-i). Observera att graferna har olika skalor.

4.4. Mätning av IgG1 i mjölk och samvariation med serum-IgG1

Syftet med att undersöka IgG1 i mjölk var att se om det på individnivå går att fastslå antikropptitrat baserat på mjölkprover, vilket inte är invasivt och något lantbrukaren själv skulle kunna ta prov för och skicka in till laboratorium för analys. Sex mjölkprover från individ A, som tagits i samband med serumprover analyserades.

Vid ett första tillfälle spädes mjölken 1:10, 1:20, 1:40 och 1:80 för att sedan med linjär regression kunna beräkna titer. Dessvärre innehöll ingen av proverna tillräckliga nivåer av antikroppar för att räkna fram en titer. Inte ens på spädning 1:10. Vid samma tillfälle analyserades även tre mjölkprover med utspädd mjölk. I september 2021 analyserades dessa tre proverna som analyserats i maj om, samt att resterande mjölkprover för individ A analyserades utspädd. Resultatet på mjölk redovisas nedan inte i titer, utan i procent av positiv kontroll enligt testkitet för ELISA BRSV.

IgG1 går att påvisa i frusen mjölk men verkar inte gå att kvantifiera

Det fanns inget tydligt mönster i data. Vid omanalys (sept-21) av de tre outspädda mjölkproverna, erhöles inte samma resultat i september 2021 som vid första försöket i maj 2021. Till exempel, gällande mjölkprovet från jun-16, blev resultatet 93 % av positiv kontroll vid analys som genomfördes i maj och 56 % av positiv kontroll vid omanalystillfället i september (fig.7).

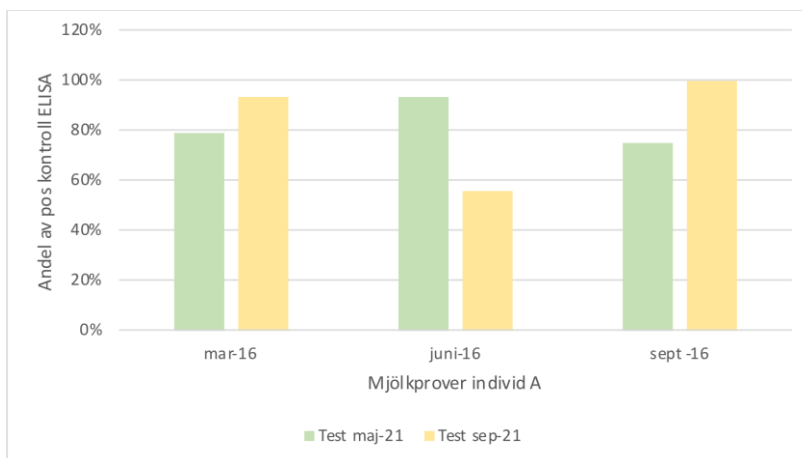


Fig. 7. Variation i testresultat för samma mjölkprov som testats med avseende på IgG1 m.h.a. ELISA vid två olika tillfällen.

Samtliga analyserade prover (n=8) på outspädd mjölk visade dock på positivt resultat, och serumproverna var även positiva för IgG1 (fig. 8), vilket gör att testkittet med stor sannolikhet går att använda för att påvisa att det finns antikroppar i mjölk, men inte att i detalj kvantifiera mängden.

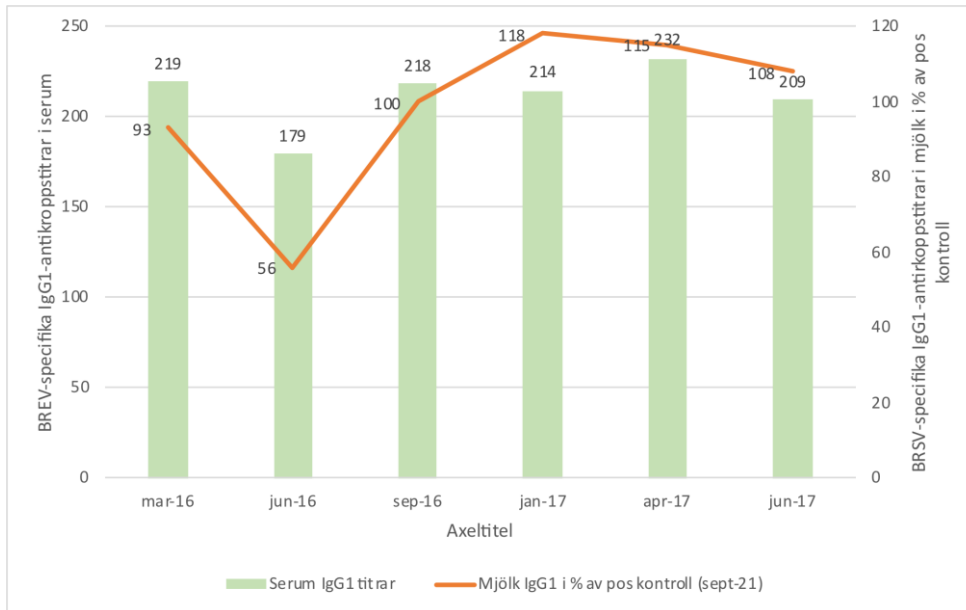


Fig. 8. Jämförelse av BRSV-specifika IgG1-antikroppar i serum och mjök hos samma individ över tid. Diagrammet illustrerar IgG1 i serum i titrar (grönstapel, vänster y-axel) samt IgG1 i mjök som andel av positiv kontroll av ELISA (orange linje, sekundäraxel)

5. Diskussion

Samtliga djur utvecklade IgG1-antikroppar efter sin primärinfektion med BRSV. Fyra av sju studerade djur utvecklade relativt höga antikropptitrar men redan ett år senare hade titrarna hos tre av dessa djur sjunkit till ca 200, som i sammanhanget får betraktas som relativt låga. Vid mätningen två år efter primärinfektionen hade samtliga djur (n=6) IgG1-antikroppar på låga nivåer, med titrar på ca 100-200 hos fem av sex av djuren. Alla djur (n=6) som provtogs precis innan återinfektion fyra år efter primärinfektionen hade IgG1-antikroppar. Sju av nio djur hade även påvisbara VN under hela försöksperioden.

De tre kor som det finns longitudinella data på under fyra års tid, hade samtliga såväl IgG1-antikroppar som VN-antikroppar under hela försöksperioden. De tre kor med data bara före andra utbrottet hade alla IgG1 och två stycken hade även VN-antikroppar. Det indikerar att djur har såväl IgG1 som VN-antikroppar under lång tid, troligen oftast i minst fyra år efter en primärinfektion, även om nivåerna är låga och inte alltid skyddar mot virusutsöndring vid återinfektion. Det innebär att nötkreatur som infekterats som kalv eller ungdjur skulle ha detekterbara nivåer av såväl IgG1 som VN-antikroppar under minst 78 % av sin förväntade livslängd, vilket är 61 månader (Husdjursstatistik 2021).

Samtliga kalvar hade IgG1-antikroppar men visade stor variation av BRSV-specifika IgG1 antikropptitrar och sex av sju hade även VN-antikroppar efter en primärinfektion. Efter återinfektionen var antikropptittrarna högre och hade mindre individuell variation. Skillnaden var dock inte statistiskt signifikant ($p < 0,05$), vilket sannolikt beror på för få observationer och för hög standardavvikelse.

Virusneutraliserande antikroppar verkar samvariera positivt med IgG1 över tid. För sju av nio djur förelåg det en samvariation. Hos ett par djur samvarierade inte data helt. Hos de två individerna där data inte verkar samvariera måste det poängteras att titrarna var låga. En titerförändring på 50–100 påverkar variationen när titrarna är låga. I sammanhanget är inte 50–100 titrar speciellt höga titrar med tanke på att VN-titrar kan stiga upp till 5000, vilket vi kunde se vid återinfektion av andra individer. Slutsatsen blir att det verkar finnas en positiv samvariation mellan VN

och IgG1, åtminstone för sju av nio individer. För att dra generella slutsatser skulle det statistiska underlaget behöva vara större.

Det höga antal antikroppar, både IgG1 och VN-antikroppar, som bildades vid återinfektion och att individvariationen var lägre talar för att det finns någon form av minne. Generellt för immunförsvaret är att det vid en återinfektion ska svara starkare när B-cellerna uppnått affinitetsmognad (Tizard 2013), och vi kan se i denna mätning att vid återinfektion av BRSV verkar det stämma överens med litteraturen. Kalvarna som drabbades av primärinfektionen, hade heller inga maternella antikroppar kvar utan de antikroppar som bildades var de som deras egna immunförsvaret lyckats mobilisera. Maternella antikroppar finns kvar i kroppen 2,5-5,5 månader (Kimman *et al.* 1987b, 1989c). Eftersom det var första gången de träffade på viruset, saknade de minne, vilket troligtvis förklarar att variationen av antikropps nivåer vid primärinfektionen var stor och lägre än vid återinfektion.

Varken IgG1 eller VN-antikroppar verkar skydda mot återinfektion men möjligen mot allvarlig sjukdom, även om bara fyra djur studerats. Antagandet baseras på det faktum att dessa kor hade milda respiratoriska symtom 2020, medan kor med måttliga till allvarliga respiratoriska symtom 2020 var födda senare än 2016. Vid återinfektionen 2020 påvisade man virusutsöndring hos individerna och IgG1-antikropparna låg på en titer på ca 100-200. En individ provtogs inte för virusutsöndring, men även hon fick sedan förhöjda nivåer av såväl IgG1 som VN-antikroppar, vilket bevisar att även hon blev återinfekterad. Den individen hade dock en IgG1 titer på 409 före återinfektion. Med andra ord, titrar på 100–200 verkar inte vara tillräckligt för att skydda mot återinfektion eller virusutsöndring fyra år efter en primärinfektion. Inte ens en titer på 409 verkar skydda mot att kunna bli återinfekterad, men vi vet inte om den kon utsöndrade virus. Alla djur fick bara lindriga symptom, vilket även andra forskare beskrivit vid återinfektion (Kimman *et al.* 1987a). Fyra individer som med IgG-antikroppar innan infektion utsöndrade virus, och bidrog troligen således till vidare smittspridning.

Resultatet indikerar att nötkreatur kanske kan bli återinfekterade redan efter ett år eller ännu tidigare. Eftersom denna studie visar att IgG1-titrar runt 100–200 inte skyddar från att bli återinfekterad eller utsöndra virus efter fyra år, är det möjligt att nötkreatur kan bli återinfekterade redan ett år efter genomgången primärinfektion baserat på enbart nivåer av antikroppar. Sedan kan det finnas andra immunologiska processer som kan medföra att individerna skulle ha haft ett bättre immunologiskt minne efter ett år, trots långa antikropps nivåer. Tre av sju kalvar lyckas inte mobilisera ett bra immunsvaret alls efter primärinfektion, utan ligger mellan 174 och 219 i IgG1-titer bara 2–3 månader efter primärinfektion. Tre andra individer fick ett bättre svar och låg på titrar mellan 383–470, 2–3 månader efter primärinfektion,

men dessa sjönk till att ligga mellan 219–248 efter bara ett år. Det är bara en av sju som lyckas bibehålla en relativt hög titer ett år efter primärinfektion.

Det går alltså inte att säga hur länge djuren är skyddade mot återinfektion efter en naturlig infektion baserat enbart på IgG1 titrar. Det är relativt säkert att gården inte haft virus som cirkulerat eftersom man regelbundet provtagit sentineldjur som under hela perioden varit seronegativa. Fördelen med denna studie är att det har gått att påvisa att djuren har antikroppar, både IgG1 och VN, under lång tid efter en primärinfektion, då vi vet att de inte blivit återinfekterade under försöksperioden. Det kraftigare antikroppssvaret efter återinfektion, och att symptomen blev milda efter återinfektion, talar för att det finns ett immunologiskt minne som verkar skydda mot allvarlig sjukdom. Om de även skulle skydda under en viss tid mot återinfektion och utsöndring av virus går inte att säga eftersom djuren inte blivit exponerade för viruset under fyra års tid. För optimerade vaccinationsstrategin är detta något som man behöver studera vidare.

I denna studie har vi bara studerat nivåer av IgG1 och VN-antikroppar i serum. Men forskning (Kimman *et al.* 1987a) har visat att även det lokala antikroppssvaret, IgA, är av vikt vid bekämpning av viruset vid återinfektion. I studien såg de även att nivåerna av IgA steg snabbt och starkt vid återinfektion, som talar för att det även finns ett lokalt minne i mukosan. I andra studier har Kimmat *et al.* (1987b, 1987c) visat att VN-antikroppar uppkommer snabbt vid i tidig sjukdom, men att det saknas korrelation till IgA och att IgM även är viktigt vid bekämpning av viruset.

Andra forskare (Taylor 1995) har visat att vikten CD8+ T-celler och cytotoxiska t-celler är centrala för tillfrisknande av en BRSV-infektion. Vid tidpunkten av eliminering av viruset, åtta till nio dagar, var halterna av CTL höga i blodet, medan kalvar som saknade CTL fortfarande utsöndrade virus. Även Knott *et al.* (1998) har visat att immunsvaret mot BRSV består av såväl antikroppsmedierad som cellmedierad immunitet, men att cellmedierad immunitet verkar vara det viktiga svaret för tillfrisknande. Viruset har egenskaper att driva ett Th-2 svar som primärt driver antikroppsmedierad immunitet (Gershwin 2012), vilket kanske skulle förklara att det finns antikroppsminne kvar under så lång tid som upp till fyra år efter en primärinfektion. Det kan vara så att det även kvarstår ett B-cellsminne som blir det bättre minnet istället för T-cellsminne, så vid en återinfektion mobiliseras primärt en antikroppsmedierad och inte en cellmedierad immunitet med cytotoxiska T-celler, vilket gör att djuren kan bli infekterade och utsöndra virus. Att antikroppssvaret av både IgG1 och VN-antikroppar vid återinfektion blir starkt kan vara en bidragande faktor till att djuren inte blir allvarligt sjuka vid en återinfektion. Alternativt att det så klart kan finnas ett visst T-cellsminne kvar som mobiliseras, men inte så snabbt att det förhindrar infektion med virusspridning men

allvarlig sjukdom. I Gaddum *et al.* (1996a) har de även teorier om att antikroppar har en funktion i utvecklingen av CTL-svar, men att man inte kunnat fastställa någon korrelation mellan VN-antikroppar och CTL-svar.

Mot bakgrund av att även andra immunologiska processer är av betydelse för ett immunologiskt svar och tillfrisknande vid sjukdom, verkar inte nivåerna av antikroppar vara det viktigaste, utan bara det faktum att det finns antikroppar verkar vara det som är avgörande för att få ett bra immunologiskt svar vid återinfektion och skydd mot allvarlig sjukdom vid återinfektion.

Immuniteten i besättningen verkar inte heller vara en viktig faktor för hur allvarligt ett utbrott blir. Båda utbrotten bedömdes som relativt milda, med låg dödlighet, trots att ca 80 % av djuren var naiva vid det andra utbrottet. I och med denna studie vet vi även att djur kan återinfekteras och sprida virus. Den generella besättningsimmuniteten mot BRSV vid tiden för det andra utbrottet får anses vara låg, med så stor andel naiva djur och att de som hade antikroppar inte var skyddade mot återinfektion. Trots det utvecklades inte utbrottet till något allvarligt utbrott med hög dödlighet. Vi vet att viruset är stabilt och inte muterar och att det inte är virusets cytopatogenicitet som orsakar sjukdom (Valentova *et al.* 2005; Valarcher & Taylor 2007), utan forskare har argumenterat för att det är individens immunsvaret som står för det cytopatogena. Vad som då orsakar ett allvarligt utbrott med hög dödlighet borde förklaras av andra faktorer, t.ex. genetik eller miljömässiga. Rent genetiskt kan man tänka att individer som kan driva ett Th-1 svar och CTL (Taylor *et al.* 1995) troligtvis klarar av att hantera viruset bättre utan att bli allvarligt sjuka. Det vore även intressant att studera ett allvarligt utbrott där man även ser till miljömässiga faktorer och hur andra sjukdomar påverkar djurens immunstatus. Till exempel hur välmående (hull, kvalitet på foder, vatten, ventilation, stressnivå, andra smittor) är dessa djur jämfört med djur från ett mildt utbrott. Det samma gäller eventuella andra smittor som kan ha medfört att djur vid ett allvarligt utbrott redan är nedsatta när de drabbas av BRSV, och därmed inte kan bekämpa RS-viruset. Österberg (2021, pers. med) förklarade t.ex. att ett av de två djur som avled vid det första utbrottet redan var mager, i dåligt skick och befann sig i sjukstallet när hon kom i kontakt med RS-viruset.

Det blir således svårt att dra några slutsatser kring besättningsimmuniteten, då vi inte vet hur scenariot skulle bli vid återinfektion låt oss säga efter bara ett år. Antikropparna, IgG1 och VN, var låga redan efter ett år, i så låga nivåer där de borde kunna ha blivit infekterade redan då. Givet att det inte är andra delar i immunförsvaret som skyddar mot att bli infekterad och sprida virus, t.ex. T-minnesceller, eller andra immunologiska processer, och att dessa kanske kan ha avtagit så mycket att de kan bli infekterade igen. För att få svar på det behövs studier

i en besättning som får in smittan årligen för att se om det bara är de naiva djuren som drabbas då, eller om de som hade viruset året innan har skydd och hur det i så fall ser ut. Det vore intressant att veta om ett nötkreatur kan bli återinfekterad redan ett år efter naturlig infektion och om den i så fall sprider virus eller inte.

I den bästa av världar vore ett vaccin som skyddar både mot sjukdom och infektion optimalt. De vaccin som finns på marknaden nu ger bara ett kortvarigt skydd. Ett nytt vaccin (PreF) verkar ge ett bra skydd även efter en dos, men skyddet har inte studerats senare än tre månader efter vaccination (Valarcher *et al.* 2021). I och med denna studie finns det större belägg för att nötkreatur som genomgått en naturlig infektion verkar ha ett skydd mot allvarlig sjukdom, men inte mot att bli infekterad eller sprida virus. Det indikerar även att nötkreatur skulle kunna bli återinfekterade redan efter bara ett år baserat på IgG1 och VN-titrar. Det gör att årliga vaccinationer krävs för att hålla nere smittan, givet att man inte kan forska fram ett vaccin som ger livslångt virologiskt skydd (d.v.s. bättre än naturlig infektion). Det svåra är även kalvarna, vars maternella antikroppar gör att vaccinet fungerar sämre, ger ett sämre skydd (Kimman *et al.* 1987a). Eftersom andra studier visar att lokalt immunförsvar är viktigt och att CTL-svar är det centrala för tillfrisknande (Taylor *et al.* 1995), verkar det vara svårt att hitta ett sådant vaccin. Att framställa ett vaccin som bara ger IgG och/eller VN-antikroppar verkar inte vara tillräckligt. Priset för ett sådant vaccin får heller inte överstiga ett snittpris på ca 130kr/individ/år, vilket motsvarar kostnaden/individ för ett mildt utbrott av BRSV (Lefverman 2018).

Flera studier för att mäta prevalens görs på tankmjölk. Till exempel kom Ohlsson *et al.* (2000) fram till att gårdar i Mellansverige hade en prevalens på 78,5 % i tankmjölk och Uttenthal *et al.* (2000) kom fram till 54 % prevalens på besättningsnivå i Danmark. På individnivå kunde jag visa att ett djur som stött på viruset som kalv, hade kvarstående antikroppar i minst fyra år efter infektion. Om resultaten gäller de flesta eller alla djur blir antikroppsnivåerna i tankmjölk påvisbara många år efter ett utbrott. Eftersom viruset cirkulerar ofta på gårdarna, i synnerhet i de gårdar som ligger i områden med hög djurtäthet (van der Poel *et al.* 1994) blir det svårt att säga något om när gården smittats och om djuren nu är skyddade mot smitta och virusutsöndring genom att analysera antikroppar i tankmjölk.

Syftet med detta examenarbete var även att kvantifiera IgG1 i mjölk på individnivå och för att se om det finns en korrelation till antikroppstitrar i serum taget från samma individ. Det skulle kunna medföra att bonden själv kan ta mjölkprov från sina djur, vilket skulle vara enklare, billigare och inte invasivt. Dessvärre misslyckades försöken att räkna fram titrar, ens på låga spädningar. Analys av outspädd mjölk visade dock på positivt resultat vid alla tillfällen (n=8). Det gick heller inte att upprepa försöket och få samma resultat av som vid tidigare analyser och resul-

tateten varierar mellan proverna och saknade helt ett logiskt mönster. Slutsatsen blir att frusen mjölk, troligtvis inte går att använda för att kvantifiera mängden antikroppar, utan enbart för att påvisa antikroppar. En del resultat av outspädd mjölk visar på 100 % eller t.o.m. lite över, vilket kan bero på att antikropparna i provet är mättade och/eller att det t.ex. var svårare att skölja ur brunnarna med mjölkprov jämfört med serum, trots att instruktionerna följdes. Eftersom motsvarande prover för IgG1 i serum dessutom är tämligen stabil över tid för individen (titrar runt 200), var förväntningarna ett mer stabilt IgG1-resultat även i mjölk om det funnits en korrelation mellan IgG1 i serum och mjölk.

Eftersom mjölkanalyserna misslyckades går det att ifrågasätta min kompetens att analysera med hjälp av ELISA, men enbart 3,9 % (6 av 152) serumprover (inkl. spädningar) visade på ett ologiskt resultat. Det gick lätt att göra spädningar och regressionsanalyserna stämde väl, i alla fall utom i sex, som då analyserades om. Samtidigt som samtliga mjölkprover visar på icke eller ologiskt resultat när det kommer till kvantifiering. Det gör att jag mer tror på att det är (den frusna) mjölkens egenskaper och dess kanske mindre mängd antikroppar som medför svårigheten i att kunna kvantifiera mängden antikroppar. Även efter kraftig omskakning (m.h.a. en vortex-mixer) av mjölk är mjölken/vätskan flockig och innehåller klumpar, medan serum, visuellt, ser homogent ut. Jag misstänker att de antikroppar som finns i mjölk inte är jämnt fördelade i mjölken. Eventuellt kan frusen mjölk fått andra egenskaper. Kanske kan det även vara så att mjölk innehåller för lite antikroppar för att kunna analyseras kvantitativt. Intressant vore att prova analysera färsk mjölk för att se om det går att uppnå annat resultat då. Dessutom är det enbart en individs mjölk som har analyserats, så någon generell slutsats går inte att göra baserat på en individ. En tanke var att upprepa försöken igen, men inom ramen för detta examensarbete, tror jag inte att jag skulle komma fram till något annat resultat genom att analysera samma individs mjölk fler gånger.

De stora slutsatserna jag kommer fram till i det här examensarbetet är att nötkreatur verkar ha antikroppar, både IgG1 och virusneutraliserande, ofta i minst fyra år efter naturlig infektion av BRSV. Det finns även samvariation mellan IgG1 och VN-antikroppar, men nivåerna av dessa verkar inte ge ett skydd mot att bli infekterad och utsöndra virus fyra år efter en primärinfektion, däremot verkar de kunna bidra till skydd mot allvarlig sjukdom. Ett visst immunologiskt minne verkar finnas i minst fyra år, då antikropparna, såväl IgG1 som VN, blev högre vid återinfektion av BRSV än vid primärinfektion, även om det inte var statistiskt signifikant. Vid primärinfektion var även den individuella variationen av antikroppar stor, men mängden antikroppar verkar inte ha betydelse för det immunologiska minnet, då samtliga analyserade prover påvisade antikroppar (IgG1) fyra år efter infektion. Jag har även visat exempel på att det går att påvisa IgG1 i outspädd mjölk upp till fyra

år efter en primärinfektion, men att det inte har gått att kvantifiera mängden IgG1 och således heller inte kunnat visa på någon samvariation mellan IgG1 i serum och mjölk.

Referenser

- Amarasinghe, G.K., Bào, Y., Basler, C.F., Bavari, S., Beer, M., Bejerman, N., Blasdel, K.R., Bochnowski, A., Briese, T., Bukreyev, A., Calisher, C.H., Chandran, K., Collins, P.L., Dietzgen, R.G., Dolnik, O., Dürrwald, R., Dye, J.M., Easton, A.J., Ebihara, H., Fang, Q., Formenty, P., Fouchier, R.A.M., Ghedin, E., Harding, R.M., Hewson, R., Higgins, C.M., Hong, J., Horie, M., James, A.P., Jiāng, D., Kobinger, G.P., Kondo, H., Kurath, G., Lamb, R.A., Lee, B., Leroy, E.M., Li, M., Maisner, A., Mühlberger, E., Netesov, S.V., Nowotny, N., Patterson, J.L., Payne, S.L., Paweska, J.T., Pearson, M.N., Randall, R.E., Revill, P.A., Rima, B.K., Rota, P., Rubbenstroth, D., Schwemmler, M., Smither, S.J., Song, Q., Stone, D.M., Takada, A., Terregino, C., Tesh, R.B., Tomonaga, K., Tordo, N., Towner, J.S., Vasilakis, N., Volchkov, V.E., Wahl-Jensen, V., Walker, P.J., Wang, B., Wang, D., Wang, F., Wang, L.-F., Werren, J.H., Whitfield, A.E., Yan, Z., Ye, G. & Kuhn, J.H. (2017). Taxonomy of the order Mononegavirales: Update 2017. *Archives of Virology*, 162 (8), 2493–2504. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3311-7>
- Austin, A.S., Haas, K.M., Naugler, S.M., Bajer, A.A., Garcia-Tapia, D. & Estes, D.M. (2003). Identification and characterization of a novel regulatory factor: IgA-inducing protein. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 171 (3), 1336–1342. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.3.1336>
- Benson, M.J., Elgueta, R., Schpero, W., Malloy, M., Zhang, W., Usherwood, W., Noelle, R.J. (2009). Distinction of the memory B cell response to cognate antigen versus bystander inflammatory signals. *Journal of Experimental Medicine*, 206 (9): 2013–2025. <https://doi.org/10.1084/jem.20090667>
- Bednarek, D., Kondracki, M., Friton, G., Trela, T., Niemczuk, K. (2005). Effect of steroidal and non-steroidal anti-inflammatory drug on inflammatory markers in calves with experimentally-induced bronchopneumonia. *Berlin und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, 118, (7/8):305-308
- Bosmann, M. & Ward, Pa. (2012). Role of C3, C5 and anaphylatoxin receptors in acute lung injury and in sepsis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 946. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0106-3_9
- Bryson D.G, McConnell S, McAliskey M, McNulty MS (1991). Ultrastructural features of alveolar lesions in induced respiratory syncytial virus pneumonia of calves. *Veterinary Pathology*, 28:286-292. <https://doi.org/10.1177/030098589102800404>
- Bueno, S.M., González, P.A., Pacheco, R., Leiva, E.D., Cautivo, K.M., Tobar, H.E., Mora, J.E., Prado, C.E., Zúñiga, J.P., Jiménez, J., Riedel, C.A. & Kalergis, A.M. (2008). Host immunity during RSV pathogenesis. *International Immunopharmacology*, 8 (10), 1320–1329. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2008.03.012>

- Cortjens, B., de Boer, O.J., de Jong, R., Antonis, A.F., Sabogal Piñeros, Y.S., Lutter, R., van Woensel, J.B. & Bem, R.A. (2016). Neutrophil extracellular traps cause airway obstruction during respiratory syncytial virus disease. *The Journal of Pathology*, 238 (3), 401–411. <https://doi.org/10.1002/path.4660>
- Elander M. (1996). Severe respiratory disease infections in dairy cows cause by bovine respiratory syncytial virus. *The Veterinary Record* 138 (5):101-105. <https://doi.org/10.1136/vr.138.5.101>
- Estes, D.M. (2010). Regulation of IgA responses in cattle, humans and mice. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 138 (4):312–317. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2010.10.009>
- Estes, D.M. & Brown, W.C. (2002). Type 1 and type 2 responses in regulation of Ig isotype expression in cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 90 (1–2), 1–10. [https://doi.org/10.1016/s0165-2427\(02\)00201-5](https://doi.org/10.1016/s0165-2427(02)00201-5)
- Fatoumatta Jobe, Simpson, J., Hawes, P., Guzman, E. & Bailey, D. (2020). Respiratory syncytial virus sequesters NF- κ B subunit p65 to cytoplasmic inclusion bodies to inhibit innate immune signaling. *Journal of Virology*, 94 (22): e01380-20. <https://doi.org/10.1128/JVI.01380-20>
- Folkhälsomyndigheten (2021). *Intensiv och tidig start för RS-virus — Folkhälsomyndigheten*. <http://www.folkhalsomyndigheten.se/nyheter-och-press/nyhetsarkiv/2021/oktober/intensiv-och-tidig-start-for-rs-virus/> [2021-10-23]
- Francoz, D., Buczinski, S., Apley, M. (2012) Evidence related to the use of ancillary drugs in bovine respiratory disease (anti-inflammatory and others): are they justified or not? *Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice*, 28, (1):23-38. doi:10.1016/j.cvfa.2011.12.003.
- Gaddum, R.M., Cook, R.S., Thomas, L.H. & Taylor, G. (1996). Primary cytotoxic T-cell responses to bovine respiratory syncytial virus in calves. *Immunology*, 88 (3):421–427. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.1996.d01-667.x>
- Gershwin, L.J. (2012). Immunology of bovine respiratory syncytial virus infection of cattle. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 35 (3):253–257. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2012.01.005>
- Guzman, E., Hope, J., Taylor, G., Smith, A.L., Cubillos-Zapata, C. & Charleston, B. (2014). Bovine $\gamma\delta$ T cells are a major regulatory T cell subset. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 193 (1):208–222. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1303398>
- Hall, C.B., Douglas, R.G. & Geiman, J.M. (1980). Possible transmission by fomites of respiratory syncytial virus. *The Journal of Infectious Diseases*, 141 (1):98–102. <https://doi.org/10.1093/infdis/141.1.98>
- Hammarlund, E., Thomas, A., Amanna, I.J., Holden, L.A., Slayden, O., Park, B., Gao, L., Slifka, M.K. (2017). Plasma cell survival in the absence of B cell memory. *Nature Communications*, 8 (1):1781. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01901-w>
- Hägglund, S. (2021a). Metod för virutneutraliseringstest, personligt meddelande, e-post, 2021-09-24
- Hägglund, S. (2021b). Forskningsartikel under bearbetning, Löpande information om det stora forskningsprojektet för BRSV vid SLU, personligt meddelande, flera möten och e-post-meddelande, våren-hösten 2021.

- Kim, H.W., Canchola, J.G., Brandt, C.D., Pyles, G., Chanock, R.M., Jensen, K. & Parrott, R.H. (1969). Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. *American Journal of Epidemiology*, 89 (4):422–434. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a120955>
- Kimman, T.G., Straver, P.J. & Zimmer, G.M. (1989a). Pathogenesis of naturally acquired bovine respiratory syncytial virus infection in calves: morphologic and serologic findings. *American Journal of Veterinary Research*, 50 (5):684–693
- Kimman, T.G., Daha, M.R., Binkhof, J.M.A., Westenbrin, F. (1989b) Activation of complement by bovine respiratory syncytial virus-infected cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 21, (3-4):311-325. [https://doi.org/10.1016/0165-2427\(89\)90039-1](https://doi.org/10.1016/0165-2427(89)90039-1)
- Kimman, T.G., Westenbrink, F., Schreuder, B.E. & Straver, P.J. (1987a). Local and systemic antibody response to bovine respiratory syncytial virus infection and reinfection in calves with and without maternal antibodies. *Journal of Clinical Microbiology*, 25 (6):1097–1106. <https://doi.org/10.1128/jcm.25.6.1097-1106.1987>
- Kimman, T.G., Westenbrink, F. & Straver, P.J. (1989c). Priming for local and systemic antibody memory responses to bovine respiratory syncytial virus: effect of amount of virus, virus replication, route of administration and maternal antibodies. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 22 (2):145–160. [https://doi.org/10.1016/0165-2427\(89\)90057-3](https://doi.org/10.1016/0165-2427(89)90057-3)
- Kimman, T.G., Westenbrink, F., Straver, P.J., Van Zaane, D. & Schreuder, B.E. (1987b). Isotype-specific ELISAs for the detection of antibodies to bovine respiratory syncytial virus. *Research in Veterinary Science*, 43 (2):180–187. [https://doi.org/10.1016/50034-5288\(18\)30770-7](https://doi.org/10.1016/50034-5288(18)30770-7)
- Knott, I., Weynants, V., Walravens, K., van der Poel, W.H.M., Kramps, J.A. & Letesson, J.J. (1998). Immune response of calves experimentally infected with non-cell-culture-passaged bovine respiratory syncytial virus. *Archives of Virology*, 143 (6):1119–1128. <https://doi.org/10.1007/s007050050360>
- Kotelkin, A., Belyakov, I.M., Yang, L., Berzofsky, J.A., Collins, P.L. & Bukreyev, A. (2006). The NS2 protein of human respiratory syncytial virus suppresses the cytotoxic T-cell response as a consequence of suppressing the type I interferon response. *Journal of Virology*, 80 (12):5958-67. <https://doi.org/10.1128/JVI.00181-06>
- Lefverman, C. (2018). *Evaluation of the economic impact and description of a BRSV-outbreak in a dairy herd*. (Avancerad nivå, A2E, 2018:54). Sveriges lantbruksuniversitet. Veterinärprogrammet. <http://urn.kb.se/resolve?urn=urn:nbn:se:slu:epsilon-s-9633> [2021-11-09]
- Paccaud, M. & Jacquer, C. (1970). A respiratory syncytial virus of bovine origin. *Archiv für die gesamte Virusforschung*, 30, 327–342. <https://doi.org/10.1007/BF01258363>
- Payne, S. (2017). Chapter 6 - Immunity and resistance to viruses. I: Payne, S. (red.) *Viruses*. Academic Press, 61–71. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803109-4.00006-4>
- Quinn, P.J., Marey, B.K., Leonard, F.C., FitzPatrick, E.S., Fanning S & Hartigan, P. (2011). *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. 2nd ed. Singapore: Wiley-Blackwell.
- SANOVA (2021). Bovine Respiratory Syncytial Virus Antibody Test, SAVOVIR BRSV-Ab ELISA kit: Article number 104888. Boehringer Ingelheim SANOVA

- Schlender, J., Walliser, G., Fricke, J., Conzelmann, K. (2002). Respiratory syncytial virus fusion protein mediates inhibition of mitogen-induced T-cell proliferation by contact. *Journal of Virology*, 76 (3):1163-1170. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.3.1163-1170.2002>
- Schreiber, P., Matheise, J.P., Dessy, F., Heimann, M., Letesson, J.J., Coppe, P. & Collard, A. (2000). High mortality rate associated with bovine respiratory syncytial virus (BRSV) infection in Belgian white blue calves previously vaccinated with an inactivated BRSV vaccine. *Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, 47 (7):535–550. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0450.2000.00380.x>
- Taylor, G., Thomas, L.H., Wyld, S.G., Furze, J., Sopp, P. & Howard, C.J. (1995). Role of T-lymphocyte subsets in recovery from respiratory syncytial virus infection in calves. *Journal of Virology*, 69 (11):6658-64. <https://doi.org/10.1128/jvi.69.11.6658-6664.1995>
- Thomas, L.H., Cook, R.S., Howard C.J., Gaddum, R.M., Taylor, G. (1996). Influence of selective T-lymphocyte depletion on the lung pathology of gnotobiotic calves and the distribution of different T-lymphocyte subsets following challenge with bovine respiratory syncytial virus. *Research in Veterinary Science*, 61 (1):38-44. [https://doi.org/10.1016/50034-5288\(96\)90108-3](https://doi.org/10.1016/50034-5288(96)90108-3)
- Tizard, I.R. (2013). *Veterinary Immunology*. 9th ed. St. Louis, Missouri, USA: Saunders, an imprint of Elsevier Inc.
- TT, A. (2021). *Ovanligt tidigt utbrott av RS-virus*. <https://www.aftonbladet.se/a/rE8xE3> [2021-10-23]
- Uttenthal, A., Larsen, L.E., Philipsen, J.S., Tjørnehøj, K., Viuff, B., Nielsen, K.H. & Nielsen, T.K. (2000). Antibody dynamics in BRSV-infected Danish dairy herds as determined by isotype-specific immunoglobulins. *Veterinary Microbiology*, 76 (4):329–341. [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(00\)00261-3](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(00)00261-3)
- Valarcher J.F., Bourhy, H., Lavenry, A., Bourges-Abella, N., Roth, M., Andreoletti, O., Ave, P., Schelcher, F., Persistent infection of B lymphocytes by bovine respiratory syncytial virus. (2001). *Virology*, 291 (1): 55-67. <https://doi.org/10.1006/vivo.2001.1083>
- Valarcher, J.-F., Furze, J., Wyld, S., Cook, R., Conzelmann, K.-K. & Taylor, G. (2003). Role of alpha/beta interferons in the attenuation and immunogenicity of recombinant bovine respiratory syncytial viruses lacking NS proteins. *Journal of Virology*, 77 (15):8426–8439. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.15.8426-8439.2003>
- Valarcher, J.-F. & Taylor, G. (2007). Bovine respiratory syncytial virus infection. *Veterinary Research*, 38 (2):153–180. <https://doi.org/10.1051/vetres:2006053>
- Valarcher, J-F., Hägglund, S., Näslund K., Jouneau L., Malmström, E., Boulesteix, O., Pinard A., Leguéré D., Deslis A., Gauthier, D., Dubuquoy, C., Pietralunge, V., Rémot, A., Falk, A., Shevchenko, G., Bergström Lind, S., Von Brömssen, C., Vargmar, K., Zhang, B., Kwong P.D., Rodriguez, M-J, Garcia Duran, M., Schwartz-Cornil, I., Taylor, G., Riffault, S. (2021) Single-shot vaccines against bovine respiratory syncytial virus (BRSV): Comparative evaluation of long-term protection after immunization in the presence of BRSV-specific maternal antibodies. *Vaccines*, 9:236. <https://doi.org/10.3390/vaccines9030236>

- Valentova, V., Antonis, A.F.G. & Kovarcik, K. (2005). Restriction enzyme analysis of RT-PCR amplicons as a rapid method for detection of genetic diversity among bovine respiratory syncytial virus isolates. *Veterinary Microbiology*, 108 (1–2):1–12. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.02.008>
- van der Poel, W.H., Brand, A., Kramps, J.A. & Van Oirschot, J.T. (1994). Respiratory syncytial virus infections in human beings and in cattle. *The Journal of Infection*, 29 (2):215–228. [https://doi.org/10.1016/s0163-4453\(94\)90866-4](https://doi.org/10.1016/s0163-4453(94)90866-4)
- van der Poel, W.H., Kramps, J.A., Middel, W.G., Van Oirschot, J.T. & Brand, A. (1993). Dynamics of bovine respiratory syncytial virus infections: a longitudinal epidemiological study in dairy herds. *Archives of Virology*, 133 (3–4):309–321. <https://doi.org/10.1007/BF01313771>
- Woolums, A.R., Gunther, R.A., McArthur-Vaughan, K., Anderson, M.L., Omlor, A., Boyle, G.A., Friebertshausen, K.E., McInturff, P.S. & Gershwin, L.J. (2004). Cytotoxic T lymphocyte activity and cytokine expression in calves vaccinated with formalin-inactivated bovine respiratory syncytial virus prior to challenge. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 27 (1):57–74. [https://doi.org/10.1016/S0147-9571\(03\)00036-5](https://doi.org/10.1016/S0147-9571(03)00036-5)
- Österberg Julia, Forsknings och Utbildningssamordnare, SLU, Lövsta, (2021), personligt meddelande (både via telefon och e-post), 2021-11-03

Tack

Den person jag vill tacka allra mest är min pojkvän och livskamrat Arnold Bergman, som har funnits vid min sida och stått ut med att jag valt att studera till veterinär mitt i livet. Tack för att jag fått göra genomföra det här. Tack för att du har orkat. Tack för allt stöd, support och markservice. Jag vet att det har varit svårt med alla helger, helgdagar och semesterdagar som du fått tillbringa på egen hand när jag varit tvungen att studera. Nu när denna period är över, ser jag fram emot nya och ljusare tider tillsammans. Jag älskar dig!

Ett stort tack till Katarina Näslund som mätt de virusneutraliserande antikropparna. Samt ett stort tack till KV-labb för att jag fick utföra mina tester där.

Jag tackar Nils Håkansson för stöd i statistiska frågor. Samt Lars Holmertz för att jag fått låna hans källarförråd där jag kunna arbeta med examensarbetet ostört.

Jag vill även tacka mina fantastiska handledare som varit otroliga, som ställt upp och svarat snabbt på kommunikation, så att genomförandet av detta examensarbete för mig har gått otroligt smidigt. Tack!

Populärvetenskaplig sammanfattning

Bovint respiratoriskt syncytialt virus (BRSV) orsakar luftvägssjukdom hos kalvar, men även hos vuxna nötkreatur. Sjukdomen kan vara mild eller orsaka allvarlig sjukdom. Den orsakar ett lidande för den som drabbas och stora kostnader för bonden.

Viruset är nära släkt med RS-virus hos människan (humant respiratoriskt syncytialt virus, HRSV), men nötkreatur kan inte smitta människor eller vice versa. Fördelen med att virusen är lika är att forskarna inom BRSV och HRSV kan hjälpa varandra och dra nytta av varandras forskning.

Idag saknas det botemedel mot RSV för såväl nötkreatur som människor. Behandlingen består i understödande behandling, smärtstillande, febernedsättande, hjälp att andas, bra omsorg, etc. Antibiotika kan vara aktuellt om individen även drabbas av en bakteriell infektion till följd av viruset. Det saknas helt vaccin mot RS för människa och de vaccin som finns för nötkreatur ger inte ett långvarigt skydd. Nästan alla barn drabbas av RS-virus innan två års ålder. Efter genomgången infektion kan man bli smittad igen, men då brukar det bara yttra sig som lättare förkylning hos vuxna människor. Man tror att det är likadant för nötkreatur.

Viruset har egenskaper att det kan undgå kroppens egna immunförsvar, vilket ofta ger ett utdraget sjukdomsförlopp med risk för komplikationer och sekundära bakteriella infektion som leder till lunginflammationer. Forskare menar att det är individens egna immunförsvar som avgör hur allvarlig sjukdomen blir. De individer som lyckas mobilisera ett bättre immunförsvar klarar sig med lindrigare symptom. Några komponenter i försvaret kan dock förvärra situationen.

Syftet med detta examensarbete var att undersöka hur länge nötkreatur har kvar antikroppar mot BRSV i blodet, eftersom den kunskapen inte riktigt är kartlagd. Författaren ville också undersöka om dessa antikroppar kan ge ett skydd emot att kunna bli återinfekterad och utsöndra virus, samt undersöka möjligheten att kunna kvantifiera antikroppar i ko-mjölk, så att bonden kan ta ett mjölkprov i stället för att en veterinär behöver åka ut till gården för att ta ett blodprov.

Resultatet av studien visade att nötkreatur har antikroppar kvar i blodet upp till fyra år efter en genomgången sjukdom, vilket motsvarar 78 % av deras förväntade livslängd. Antikropps nivåerna sjönk dock ganska snabbt och var låga redan efter ca ett år. Denna låga nivå av antikroppar skyddade inte korna från att bli återinfekterade och utsöndra virus, men precis som hos människan, orsakade inte återinfektionen en allvarlig sjukdom hos de vuxna djuren som ingick i denna studie. De fick bara milda förkylningssymptom när de återinfekterades. Inga djur dog vid återinfektion, trots att det finns beskrivet att dödligheten vid BRSV kan bli så hög som 20 %. Undersökningen baseras på bara sju individer, därför går det inte att dra några generella slutsatser eller slutsatser med statistisk signifikans, men data antyder ändå att det skulle kunna vara på det här sättet. Forskare har tidigare talat om att det kan vara så att djur inte kan återinfekteras, eller att de bara får milda symptom om de återinfekteras. Nu vet vi att de kan återinfekteras trots antikroppar, vi vet att individer kan ha antikroppar under lång tid och att de individer vi undersökte bara fick milda symptom.

Även i de frysta mjölkproverna kunde antikroppar påvisas. Det gick däremot inte att precis kvantifiera dessa, vilket gör att bonden inte kan använda mjölkprover för att mäta mängden antikroppar i mjölk utan bara för att påvisa att korna har antikroppar. Alla prover som undersöktes visade att det går att påvisa antikroppar i mjölk upp till fyra år efter en genomgången infektion.

Sammanfattningsvis bidrar kunskapen från detta examensarbete till en ökad förståelse för hur antikroppsskyddet hos nötkreatur ser ut efter en naturlig infektion av BRSV. Förhoppningen är att denna kunskap skulle kunna bidra till förbättrad vaccinationsstrategi för nötkreatur, för att helt kunna undvika smittspridning.