

Transmisja pierwotniaków *Toxoplasma gondii* i *Neospora caninum* przez łożysko*

The transplacental transmission of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* protozoans

Henryka Długońska

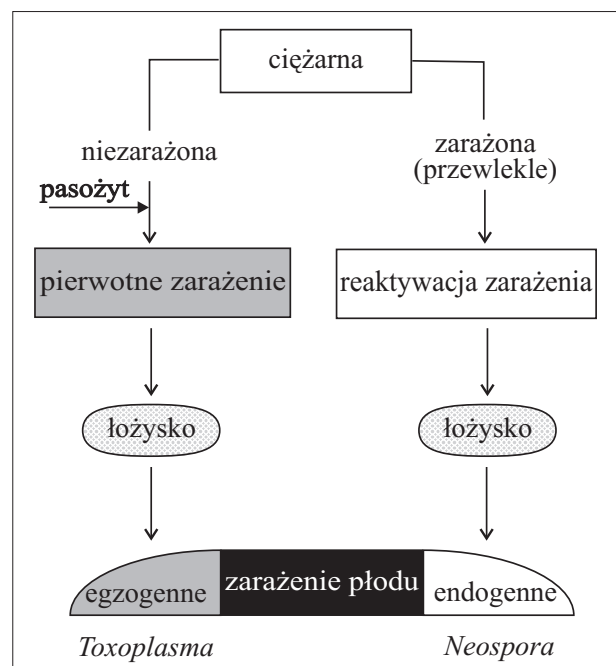
Zakład Immunoparazytologii, Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej, Uniwersytet Łódzki, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź; E-mail: hdlugo@biol.uni.lodz.pl

ABSTRACT. Apicomplexan parasites *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*, obligate intracellular pathogens, are etiological agents of congenital infections which can result in severe malformations or even death of the fetus. Whereas in *Toxoplasma* exogenous route of infection is predominant, in *Neospora* — endogenous infection occurs usually. Because these two infection routes differ in respect of epidemiologic, immunologic and prophylactic aspects, the use of terms „exogenous or endogenous transplacental infection”, proposed recently by Alexander Trees and Diana Williams, seems fully justifiable.

Key words: *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii*, transplacental infection.

Przeniesienie pasożytniczych pierwotniaków z jednego pokolenia żywicieli na drugie podczas życia płodowego określane jest mianem inwazji wrodzonej, wewnątrzmacicznej lub pionowej. Trees i Williams [1] zaproponowali ostatnio wprowadzenie terminów egzogenna i endogenna inwazja łożyskowa uzasadniając tę terminologię różnicowaniem obu form zarażenia pod względem epidemiologicznym, immunologicznym oraz metod profilaktyki. Ich argumenty wydają się przekonujące, czego dowodem jest przyjęcie zaproponowanych terminów m.in. przez Dubeya i wsp. [2]. Egzogenna (zewnątrzpochodna) inwazja jest następstwem pierwotnego zarażenia ciężarnej, a endogenna (wewnątrzpochodna) wiąże się z reaktywacją w okresie ciąży istniejącego przewlekłego zarażenia (Rys. 1).

Zarażenia wrodzone, powodowane przez dwa blisko spokrewnione pierwotniaki typu *Apicomplexa*: *Toxoplasma gondii* i *Neospora caninum*, mogą być w obu przypadkach skutkiem zarówno egzogennej, jak i endogennej inwazji, z tym, że u *T. gondii* dominuje transmisja egzogenna, podczas gdy u *Neospora caninum* — endogenna. Częstość okre-



Rys. 1. Egzogenne i endogenne inwazje łożyskowe *Toxoplasma gondii* i *Neospora caninum*

Fig. 1. Exogenous and endogenous transplacental infections of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*

*Praca została częściowo dofinansowana z projektu badawczego UŁ 505/421.

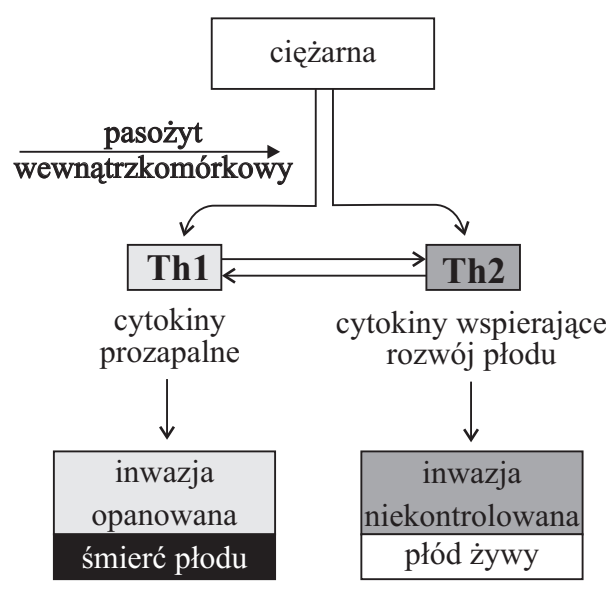
ślonej formy transmisji zależy nie tylko od gatunku, ale i genotypu (szczepu) żywiciela [1].

Okres ciąży — czas złożonej immunoreaktywności i ryzyka

Liczne dane kliniczne i doświadczalne wskazują, że okres ciąży oraz życia płodowego to czas szczególnie wysokiego zagrożenia infekcjami i inwazjami wywołanymi przez patogeny wewnątrzkomórkowe, w tym pasożytnicze pierwotniaki: *T. gondii* i *N. caninum*. Zagrożenie to jest spowodowane zmianą reaktywności immunologicznej ciężarnych i niedojrzałością immunologiczną płodu. Utrzymanie i prawidłowy rozwój płodu, będącego rodzajem semi-allogenicznego przeszczepu w organizmie matki, jest związane z preferencyjną reaktywnością limfocytów pomocniczych Th2 (hipoteza immunotrofizmu) i wytworzeniem sprzyjającego płodowi środowiska, kształtowanego głównie przez cytokiny, w tym m.in. interleukiny IL-4 i IL-5, cytokiny hematopoetyczne — CSF-1 (czynnik stymulujący tworzenie kolonii 1) oraz GM-CSF (czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów) i cytokiny regulatorowe — TGF- β (transformujący czynnik wzrostu beta) oraz IL-10 (interleukina 10) [3, 4]. Inwazja wewnątrzkomórkowych patogenów u ciężarnych indukuje silne reakcje odpornościowe z udziałem limfocytów Th1 i wytworzeniem cytokin prozapalnych, takich jak IFN- γ (interferon gamma), IL-2, IL-12 (interleukiny 2 i 12) i TNF- α (czynnik martwicy nowotworu alfa). Jeżeli ich aktywność nie zostanie dostatecznie stłumiona przez cytokiny Th2, równowaga ulega przesunięciu w stronę limfocytów Th1 — rozwój zarażenia zostaje wówczas zahamowany, ale płód może ulec obumarciu. Rys. 2 ilustruje schematycznie taką właśnie dramatyczną dychotomię — wygaszenie inwazji i śmierć płodu lub utrzymanie płodu z równoczesną utratą kontroli nad zarażeniem [5, 6].

Zarażenia *Toxoplasma gondii*

Pierwotniak zasiedla z dużą częstością komórki jądrzaste człowieka i wielu gatunków zwierząt stałocieplnych. Zarażenie następuje głównie na drodze pokarmowej, a jego źródłem jest najczęściej mięso zwierząt konsumpcyjnych (surowe, niedogotowane lub niedosmażone) zawierające cysty tkankowe *T. gondii*. Drugim, mniej istotnym źródłem, są odchody żywicieli ostatecznych — kotów, zanieczyszczone oocystami pasożyta. *Toxoplasma gondii*, jako ty-



Rys. 2. Wpływ profilu cytokinowego na rozwój inwazji *Toxoplasma gondii* i *Neospora caninum* i los płodu: Th1 i Th2 — subpopulacje limfocytów T pomocniczych Fig. 2. The influence of cytokine profile on development of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections and fetus fate

powy drobnoustrój oportunistyczny, stanowi szczególne zagrożenie dla żywicieli ze znacznie obniżoną odpornością (chorzy na AIDS, biorcy przeszczepów tkankowych, pacjenci z chorobą nowotworową lub leczeni immunosupresorami itp.) [7]. Bardzo duże zagrożenie zdrowia i życia niesie także toksoplazmoza wrodzona, która jest konsekwencją pierwotnego zarażenia w okresie ciąży lub wyjątkowo w okresie przedkoncepcyjnym (egzogenna inwazja łożyskowa). W badaniach przeprowadzonych w Wielkopolsce określono częstość tej formy toksoplazmozy jako 2 przypadki na 1000 seronegatywnych (nieuodpornionych) matek [8]. Ryzyko transmisji pasożyta przez łożysko wzrasta wraz z wiekiem ciąży, podczas gdy stopień uszkodzenia płodu — maleje. Wytworzona u zarażonej matki odporność nabyta chroni z reguły przed rozwojem zarażenia po ponownym kontakcie z toksoplazmą, wskutek czego pasożyt nie powoduje nawykowych poronień. Bardzo nieliczne dotychczas doniesienia wskazują jednakże na możliwość endogennej inwazji w następstwie reaktywacji latentnego zarażenia u ciężarnej (np. przy współistniejącym AIDS), a także reinwazji u wywołanej przez inny genotypowo szczep pasożyta [9-11]. Zarówno przypadki inwazji pierwotnych *T. gondii*, jak i reaktywacji zarażenia u ciężarnych, związane są głównie ze szczepa-

mi genotypu II, które charakteryzują się silną aktywnością wytwarzania cyst tkankowych, przy stosunkowo niskiej zjadliwości [12]. Nie dziwi zatem zdecydowanie dominujący udział tego właśnie genotypu w badaniach Nowakowskiej i wsp. [13], wykonanych ostatnio na 19 przypadkach toksoplazmozy wrodzonej, przy użyciu metody multiplex PCR i serotypowania. Warto jednak za autorami nadmienić, że szczepy genotypu II mogą powodować zarażenia nie tylko bezobjawowe, ale i objawowe, o poważnym przebiegu i skutkach, co zależy przede wszystkim od nasilenia parazytemii.

Uważa się, że toksoplazmoza wrodzona u owiec, podobnie jak u ludzi, jest skutkiem pierwotnej egzogennej inwazji, której źródłem są oocysty, wydalone do środowiska wraz z kałem zarażonych kotów i zanieczyszczające pokarm lub wodę. Wiele danych epizootologicznych, m.in. obserwacji dotyczących wzrostu ekstensywności zarażenia wraz z wiekiem owiec, przemawia za słuszością tego poglądu [14]. W ostatnich latach pojawiły się jednak doniesienia wskazujące na znacznie częstszą, niż sądzono wcześniej, transmisję toksoplazmy przez łożysko, co świadczyłoby, że reaktywacja latentnego zarażenia nie jest zjawiskiem rzadkim [15].

Ciekawe wyniki przyniosły badania przeprowadzone na myszach outbred i inbred. Owen i wsp. [16] przy użyciu metody PCR do wykrywania genu B1 *T. gondii* stwierdzili bardzo wysoką częstość transmisji łożyskowej u hodowanych w niewoli dwóch gatunków myszy: domowej (*Mus musculus*) i polnej (*Apodemus sylvaticus*), podczas gdy u szczepu wsobnego BALB/c myszy laboratoryjnych (*Mus musculus*) transmisja zdarzała się tylko wówczas, gdy ciężarne samice uległy pierwotnemu zarażeniu [17]. Chociaż częstość toksoplazmozy wrodzonej w naturze jest zapewne niższa niż ta używana u myszy outbred w warunkach doświadczalnych, to i tak endogenne zarażenia u gryzoni mogą stanowić potężny rezerwuar *T. gondii* dla mięsożernych kotowatych (*Felidae*), umożliwiając szerokie rozprzestrzenienie pasożyta w środowisku. Kluczowym czynnikiem decydującym o częstości transmisji łożyskowej pasożyta i jej następstwach dla płodu jest wiek ciąży. Jeżeli do zarażenia dojdzie w I trymestrze ciąży, częstość transmisji jest niska, ale ryzyko poronienia wysokie. I odwrotnie, jeżeli zarażenie zdarzy się w III trymestrze, to częstość transmisji jest stosunkowo wysoka, ale ryzyko śmierci płodu stosunkowo małe. Słuszne wydaje się więc wyjaśnienie tych zależności, oparte na zmiennym poziomie hormonów ciążowych i profilu cytokino-

wym [18]. Wysoki poziom progesteronu w zaawansowanej ciąży, silna reaktywność limfocytów Th2 oraz obniżona aktywność makrofagów, komórek NK (natural killer) i swoistych limfocytów cytotoksycznych CD8+ sprzyjają replikacji pasożyta i zwiększają częstość jego transmisji przez łożysko.

Zarażenia *Neospora caninum*

Pierwotniak *Neospora caninum*, opisany w 1984 r. u psów, jest pasożytem kosmopolitycznym o dość szerokim kręgu żywicielskim wśród zwierząt — ssaków domowych i wolno żyjących. Żywicielami ostatecznymi są psy i kojoty, wydalające oocysty będące przyczyną skażenia środowiska. Z weterynaryjnego punktu widzenia najważniejsza jest neosporoza bydła, ponieważ to ona jest w skali światowej główną przyczyną ronienia u krów. U dorosłych zwierząt zarażenie przebiega subklinicznie i ronienie jest jego jedynym objawem. Badania, w większości polowe, wskazują, że transmisja łożyskowa ma charakter nawrotowy, a źródłem pasożyta jest najczęściej endogenna infekcja, która ulega reaktywacji podczas ciąży. Prawdopodobieństwo transmisji pasożyta jest bardzo wysokie i może osiągać w niektórych stadach bydła wartość 0,95, chociaż podczas kolejnych ciąż ulega obniżaniu [19, 20], co świadczy o stopniowym rozwoju odporności swoistej (adaptacyjnej). Los zarażonego płodu zależy głównie od jego dojrzałości immunologicznej, która wzrasta wraz z wiekiem płodowym, stąd zarażenie w I trymestrze jest z reguły śmiertelne (resorpcja zarodka lub poronienie), natomiast w III trymestrze — prowadzi do wykształcenia skutecznej odporności ochronnej, która umożliwia przeżycie płodu. Doświadczalne inwazje *Neospora* u bydła, indukowane przy użyciu tachyzoitów i oocyst, potwierdzają możliwość zarażenia wewnątrzmacicznego także w następstwie egzogennej inwazji pasożyta, ale taka forma jest raczej drugorzędna [2, 5, 19]. Relacja pasożyta *Neospora caninum* i żywiciela wydaje się w przypadku bydła stanem wyjątkowo delikatnej równowagi. Pasożyt wykorzystuje stan zmienionej reaktywności immunologicznej podczas ciąży i przenosi się na następne pokolenie zwierząt, w większości przypadków łagodnie i bezobjawowo [5]. Badania doświadczalne wykonane na modelu mysim potwierdzają, że zarówno transmisja pasożyta przez łożysko, jak i poronienie mają podłoże immunologiczne [18, 21]. Ciekawy i nowy wątek badawczy może stanowić w przyszłości określenie udziału prolaktyny w rozchwianiu równowagi Th1-

Th2 podczas ciąży oraz zbadanie relacji: prolaktyna a neosporoza [22]. Jak zauważyli ostatnio Dubey i wsp. [2], na pytanie o przyczyny i mechanizm poronień w neosporozie, nie można nadal udzielić jednej prostej odpowiedzi. Wniknięcie i kolonizacja łożyska przez *Neospora caninum* może być bezpośrednią przyczyną upośledzenia jego funkcji. Intensywna replikacja pasożyta powoduje niedotlenienie i niedożywienie płodu, a w konsekwencji śmierć. Inwazja pasożyta może także zaburzać równowagę Th1/Th2 poprzez indukcję syntezy cytokin prozapalnych oraz prostaglandyn, które indukują poronienie. Śmierć płodu może być również skutkiem jego bezpośredniego uszkodzenia przez namnażające się wewnątrzkomórkowo pasożyty.

Badania nad neosporozą w Polsce, prowadzone intensywnie w ostatnich kilku latach przez pracowników Instytutu Parazytologii PAN w Warszawie, a zapoczątkowane w 2000 r. wykryciem swoistych przeciwciał u 22% krów rasy polskiej czarno-białej, zostały syntetycznie przedstawione w materiałach z konferencji „*Neospora* and neosporosis: achievements and perspectives” [23]. Badania te potwierdziły bardzo wysoką (92,5%) częstość transmisji pionowej pasożyta [24]. Zwróciły też uwagę na m.in. dużą zdolność przeżywania *N. caninum* poza komórkami żywiciela oraz możliwość zarażenia na drodze pokarmowej przez mleko i siarę [23].

Inwazje łożyskowe — aspekty epidemiologii i profilaktyki

Zarażenie wewnątrzmaciczne pochodzenia egzogenne jest skutkiem przypadkowego kontaktu nieudpornionej ciężarnej z pasożytem. Prawdopodobieństwo jego wystąpienia, chociaż zależne od częstości ciąży, ich długości, czasu życia danego gatunku żywiciela oraz natężenia transmisji pasożyta w danym środowisku, jest stosunkowo małe. Pierwotne zarażenie prowadzi bowiem do wytworzenia silnej swoistej odporności, która z reguły chroni przed rozwojem zarażenia w przypadku ponownego wniknięcia pasożyta. Częstość inwazji płodowych i fetopatii może być więc skorelowana ujemnie z częstością zarażenia w populacji żywicieli, jeżeli występuje tylko egzogenna transmisja pasożyta, a dodatkowo skorelowana z ekstensywnością, gdy dominuje transmisja endogenna [15]. Długofalowa profilaktyka inwazji łożyskowych egzogennych powinna przede wszystkim polegać na unikaniu ekspozycji na pasożyta (oocysty, cysty tkankowe) i wytworzeniu silnej ochronnej odporności przez zasto-

sowanie szczepionek. O skuteczności immunoprofilaktyki świadczy kilkunastoletnie doświadczenie z jedyną obecnie komercyjną szczepionką przeciw toksoplazmozie „Toxovac”. Materiał szczepionkowy stanowią atenuowane tachyzoity *T. gondii* szczepu S48, który nie tworzy cyst tkankowych, a więc nie ma zdolności przewlekłego zasiedlania żywiciela. Szczepionka „Toxovac” obniża znacząco częstość poronień u owiec, ale nie ma dowodów, że jest skuteczna w przypadku endogennej inwazji. Z badań doświadczalnych wynika, że wcześniejsze naturalne zarażenie bydła *Neospora caninum* indukuje odporność ochronną na egzogenną, ale nie na endogenną inwazję [25]. Dotychczasowe próby z zastosowaniem szczepionek w postaci inaktywowanych tachyzoitów *N. caninum* z dodatkiem różnych adiuwantów nie są satysfakcjonujące; szczepionki okazały się wprawdzie immunogenne, ale nie chroniły bydła przed reaktywacją latentnego zarażenia [26]. Tak więc w przypadku neosporozy u bydła, w której dominuje endogenna droga transmisji pasożyta, profilaktyka ekspozycyjna powinna polegać przede wszystkim na wykrywaniu, eliminowaniu i niedopuszczaniu do rozrodu zarażonych osobników, aż do osiągnięcia stanu zerowej ekstensywności [15]. Dużym wyzwaniem i oczekiwaniem pozostaje nadal immunoprofilaktyka neosporozy. Zanim jednak zostaną opracowane skuteczne metody uodparniania, trzeba odpowiedzieć na wiele pytań związanych z odpornością w zarażeniach *N. caninum*, m.in. jaką odpowiedź immunologiczną wzbudza inwazja prenatalna, a jaką postnatalna, dlaczego zarażenie oocystami nie prowadzi do infekcji przewlekłej, czy zarażenie płodu indukuje stan swoistej tolerancji immunologicznej itd. [27, 28].

Literatura

- [1] Trees A.J., Williams D.J.L. 2005. Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Trends in Parasitology* 21: 558–561.
- [2] Dubey J.P., Buxton D., Wouda W. 2006. Pathogenesis of bovine neosporosis. *Journal of Comparative Pathology* 134: 267–289.
- [3] Entrican G. 2002. Immune regulation during pregnancy and host-pathogen interactions in infectious abortion. *Journal of Comparative Pathology* 126: 79–94.
- [4] Krakowski L., Kostro K., Krakowska I., Wrona Z. 2004. Rola cytokin w rozwoju i utrzymaniu ciąży. *Medycyna Weterynaryjna* 60: 1034–1038.
- [5] Buxton D., McAllister M.M., Dubey J.P. 2002. The comparative pathogenesis of neosporosis. *Trends in*

- Parasitology* 18: 546–552.
- [6] Quinn H.E., Ellis J.T., Smith N.C. 2002. *Neospora caninum*: a cause of immune-mediated failure of pregnancy. *Trends in Parasitology* 18: 391–394.
- [7] Tenter A.M., Heckeroth A.R., Weiss L.M. 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International Journal for Parasitology* 30: 1217–1258.
- [8] Paul M., Petersen E., Szczapa J. 2001. Prevalence of congenital *Toxoplasma gondii* infection among newborns from the Poznań region of Poland: validation of new combined enzyme immunoassay for *Toxoplasma gondii*-specific immunoglobulin A and immunoglobulin M antibodies. *Journal of Clinical Microbiology* 39: 1912–1916.
- [9] Ajzenberg D., Thulliez P., Dumetre A., Romand S., Sallet N., Elbez A., Dardé M.L., CRB ToxoBS. 2005. Disseminated congenital toxoplasmosis transmitted by pre-conceptionally immune woman: strain characterization and experimental re-infection. *Eight International Congress on Toxoplasmosis*. Porticcio — Corsica, 2005, [Materiały Zjazdowe], Abstract 26.
- [10] Bachmeyer C., Mouchnino G., Thulliez P., Blum L. Congenital toxoplasmosis from an HIV-infected woman as a result of reactivation. *Journal of Infection* 52: e55–57.
- [11] Minkoff H., Remington J.S., Holman S., Ramirez R., Goodwin S., Landesman S. 1997. Vertical transmission of toxoplasma by human immunodeficiency virus-infected women. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 176: 555–559.
- [12] Howe D.K., Sibley L.D. 1995. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *Journal of Infectious Diseases* 172: 1561–1566.
- [13] Nowakowska D., Colon I., Remington J.S., Grigg M., Golab E., Wilczynski J., Sibley L.D. 2006. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multiplex PCR and peptide-based serological testing of samples from infants in Poland diagnosed with congenital toxoplasmosis. *Journal of Clinical Microbiology* 44: 1382–1389.
- [14] Figliuolo L.P.C., Kasai N., Ragozo A.M.A., de Paula V.S.O., Dias R.A., Souza S.L.P., Gennari S.M. 2004. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in ovine from Sao Paulo State. *Brazilian Veterinary Parasitology* 123: 161–166.
- [15] Williams R.H., Morley E.K., Hughes J.M., Duncan P., Terry R.S., Smith J.E., Hide G. 2005. High levels of congenital transmission of *Toxoplasma gondii* in longitudinal and cross-sectional studies on sheep farms provides evidence of vertical transmission in ovine hosts. *Parasitology* 130: 1–7.
- [16] Owen M.R., Trees A.J. 1997. Vertical transmission of *Toxoplasma gondii* from chronically infected house (*Mus musculus*) and field (*Apodemus sylvaticus*) mice determined by polymerase chain reaction. *Parasitology* 116: 299–304.
- [17] Roberts C.W., Alexander J. 1992. Studies on a murine model of congenital toxoplasmosis: vertical disease transmission only occurs in BALB/c mice infected for the first time during pregnancy. *Parasitology* 104: 19–23.
- [18] Roberts C.W., Walker W., Alexander J. 2001. Sex-associated hormones and immunity to protozoan parasites. *Clinical Microbiology Reviews* 14: 476–488.
- [19] Dubey J. P. 2003. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *The Korean Journal of Parasitology* 41: 1–16.
- [20] Dijkstra T., Barkema H.W., Eysker M., Beyboer M.L., Wouda W. 2003. Evaluation of a single serological screening of dairy herds for *Neospora caninum* antibodies. *Veterinary Parasitology* 110: 161–169.
- [21] Long M.T., Baszler T.V. 2000. Neutralization of maternal IL-4 modulates congenital protozoal transmission: comparison of innate versus acquired immune responses. *Journal of Immunology* 164: 4768–4774.
- [22] Pearson R.D. 2003. *Neospora caninum*: pregnancy, parasites and prolactin. *Trends in Parasitology* 19: 18.
- [23] Moskwa B., Cabaj W., Pastusiak K., Bień J. 2005. Current studies on neosporosis in Poland. *Wiadomości Parazytologiczne* 51 (Supl.): 65–67.
- [24] Moskwa B., Cabaj W. 2003. *Neospora caninum*: nowy czynnik spontanicznego ronienia u krów w Polsce. *Medycyna Weterynaryjna* 59: 23–26.
- [25] Williams D.J.L., Guy C.S., Smith R.F., Guy F., McGarry J.W., McKay J.S., Trees A.J. 2003. First demonstration of protective immunity against foetopathy in cattle with latent *Neospora caninum* infection. *International Journal for Parasitology* 33: 1059–1065.
- [26] Adrianarivo A.G., Andersen M.L., Rowe J.D., Gardner I.A., Reynolds J.P., Choromanski L., Conrad P.A. 2005. Immune responses during pregnancy in heifers naturally infected with *Neospora caninum* with and without immunization. *Parasitology Research* 96: 24–31.
- [27] Innes E.A., Andrianarivo A.G., Björkman C., Williams D.J.L., Conrad P.A. 2002. Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. *Trends in Parasitology* 18: 497–504.
- [28] Williams D.J.L., Trees A.J. 2006. Protecting babies: vaccine strategies to prevent foetopathy in *Neospora caninum*-infected cattle. *Parasite Immunology* 28: 61–67.

Wpłynęło 10 lipca 2006

Zaakceptowano 17 lipca 2006