



Sveriges lantbruksuniversitet  
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

# **Immunologiska mekanismer involverade i patogenesen vid bovin neosporos**

*Mikael Palmfjord*

---

Självständigt arbete i veterinärmedicin, 15 hp

Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2011: 49

Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Uppsala 2011

---





Sveriges lantbruksuniversitet  
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

## **Immunologiska mekanismer involverade i patogenesen vid bovin neosporos**

Immunological mechanisms involved in the pathogenesis of bovine neosporosis

*Mikael Palmfjord*

**Handledare:**

Anna Lundén, SLU, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

**Examinator:**

Mona Fredriksson, SLU, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

**Omfattning:** 15 hp

**Kurstitel:** Självständigt arbete i veterinärmedicin

**Kurskod:** EX0700

**Program:** Veterinärprogrammet

**Nivå:** Grund, G2E

**Utgivningsort:** SLU Uppsala

**Utgivningsår:** 2011

**Omslagsbild:** -

**Serienamn, delnr:** Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2011: 49  
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, SLU

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

**Nyckelord:** *Neospora caninum*, patogenes, immunologi, nötkreatur, dräktighet, abort

**Key words:** *Neospora caninum*, pathogenesis, immunology, bovine, gestation, abortion



## INNEHÅLLSFÖRTECKNING

<b>SAMMANFATTNING .....</b>	<b>1</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>2</b>
<b>MATERIAL OCH METODER .....</b>	<b>3</b>
<b>LITTERATURÖVERSIKT .....</b>	<b>3</b>
<b>BAKGRUND.....</b>	<b>3</b>
<i>Livscykel och spridning.....</i>	<i>3</i>
<i>Symptom .....</i>	<i>4</i>
<b>DRÄKTIGHETSTIDENS INVERKAN PÅ PATOGENESEN .....</b>	<b>4</b>
<b>IMMUNFÖRSVARET MOT <i>N. CANINUM</i>.....</b>	<b>5</b>
<b>IMMUNFÖRSVARET HOS DET DRÄKTIGA DJURET .....</b>	<b>5</b>
<b>FOSTRETS IMMUNFÖRSVAR MOT <i>N. CANINUM</i> .....</b>	<b>6</b>
<b>OLIKA TEORIER KRING PATOGENES .....</b>	<b>6</b>
<i>Moders immunsvaret mot <i>N. caninum</i> leder till fosterdöd.....</i>	<i>6</i>
<i>Moderns naturliga immunomodulering leder till fosterdöd.....</i>	<i>7</i>
<i>Fostrets immunokompetens skyddar mot abort.....</i>	<i>8</i>
<i>Negativa effekter av fostrets immunförsvar.....</i>	<i>9</i>
<b>DISKUSSION .....</b>	<b>9</b>
<b>LITTERATURFÖRTECKNING .....</b>	<b>12</b>

## SAMMANFATTNING

Den intracellulära protozoon *Neospora caninum* är en viktig orsak världen över till abort hos nötkreatur. De exakta bakomliggande mekanismerna till abort är omdiskuterade och sambanden verkar vara komplexa. Immunförsvar hos såväl moder som foster har en roll i patogenesen. Denna litteraturstudie syftar till att se vilken roll immunförsvaret har under dräktigheten och vid uppkomst av abort till följd av en neosporainfektion. Många olika hypoteser kring aborterna har lagts fram och merparten av dessa visar att tidpunkten för när infektion sker är avgörande för utfallet av dräktigheten. Hos ett icke dräktigt djur är skyddande immunitet mot *N. caninum* beroende av ett så kallat Th-1-svar, som bland annat karaktäriseras av produktion av cytokinet interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ). Det har emellertid visats att hos dräktiga djur kan immunsvaret av Th-1-typ vara skadligt för fostret, och normalt sker det under dräktigheten en naturlig immunomodulering hos modern mot ett dräktighetsbevarande Th-2-svar.

Kor kan abortera antingen till följd av en primärinfektion under dräktigheten eller på grund av reaktivering av en kronisk infektion. Hos kroniskt infekterade kor anses den naturliga immunmoduleringen under dräktigheten kunna ha negativa effekter. Denna leder till en kraftig nedreglering av den specifika cellproliferationen och INF- $\gamma$ -produktionen, vilket skulle ge ett minskat skydd mot *N. caninum* och skapa en mikromiljö i placenta som skulle vara till fördel för parasiten. Det minskade skyddet mot *N. caninum* anses leda till att vävnadscystor hos den kroniskt infekterade kon spricker och därmed orsakar en så kraftig parasitemi att den slutligen leder till abort.

Vid en primärinfektion under dräktigheten kan det normalt sett skyddande Th-1-svaret vara ”skadligt” för dräktigheten och därmed kunna framkalla en abort, särskilt om infektionen sker i tidig dräktighet. Om infektionen sker under senare delen av dräktigheten tros den dräktighetsbevarande immunmoduleringen kunna konkurrera ut det skadliga Th-1-svaret, som därmed inte skulle ha någon negativ effekt.

Andra hypoteser är att fostrets immunokompetens är avgörande för om abort sker. Immunokompetenta foster kan reagera på en *N. caninum*-infektion och därmed begränsa dess utbredning. Hos foster som ännu inte blivit immunokompetenta kan parasiten föröka sig ohämmat. Detta skulle kunna leda till en återinfektion av placenta, vilket i sin tur skulle kunna leda till abort. Abort har dock även observerats hos immunokompetenta foster. Teorin kring dessa aborter är att det immunokompetenta fostrets eget immunsvaret mot *N. caninum* skulle kunna vara orsaken till aborten.

## SUMMARY

*Neospora caninum* is a major cause of abortion in cattle worldwide. The pathogenesis of abortions due to *N. caninum* is complex and only partially understood. Clearly, evidence has shown that both the maternal and fetal immune response are crucial in determining the outcome of neosporosis during gestation. In this review some of the different theories of what role the immune system has during a *N. caninum* infection during gestation are presented and discussed.

Protective immunity to *N. caninum*, similar to many other intracellular parasites, involves a Th-1-type immune response, characterized by production of the cytokine interferon-gamma (INF- $\gamma$ ). In pregnant animals this induction of a Th-1-type immune response is thought to be detrimental to the gestation. Naturally significant immunomodulation occurs during gestation. To facilitate the gestation the cytokine environment shifts to Th-2-type cytokines.

Cows may abort following a primary infection during pregnancy or due to a reactivation of a chronic infection. In chronically infected cows the natural immunomodulation is thought to trigger a recrudescence of infection. This is due to a downregulation of cell-proliferation and INF- $\gamma$ -production which are important in the protective immunity to *N. caninum* and which create a microenvironment of the placenta that would be beneficial to the parasite. This change is considered to cause an excystation of parasites contained within tissue cysts, which leads to recurrence of a parasitemia and later on to abortion.

Abortions due to primary infection during early pregnancy may be caused by the normally protective Th-1-type immune response. If the primary infection occurs during the later stages of gestation the natural immunomodulation is thought to counteract the Th-1-type immune response and consequently it has no adverse effect on pregnancy.

The immunocompetence of the foetus is also thought to influence the outcome of neosporosis during gestation. An immunocompetent foetus is able to mount a protective immune response, which is not possible for a not yet immunocompetent foetus. This difference enables the parasite to multiply massively in the not yet immunocompetent foetus and cause abortion. Abortions have also been observed in immunocompetent foetuses. The hypothesis about this observation is that the immune response in the foetus is what causes such abortions.

## INLEDNING

*Neospora caninum* är en relativt nyligen upptäckt intracellulär protozo (Bjerkas et al., 1984). Parasiten är en betydelsefull orsak i världen till abort hos nötkreatur (Dubey, 1999). Trots det är fortfarande mycket oklart kring patogenesen för aborter. Det är ett komplext samspel mellan olika faktorer, där immunförsvaret hos såväl fostret som modern påverkar utgången av en neosporainfektion (Innes et al., 2002). Med detta som utgångspunkt vill jag med denna litteraturöversikt beskriva de immunologiska mekanismer som är involverade i patogenesen vid bovin neosporos. Jag vill således se vilken roll immunförsvaret har under dräktigheten och vid uppkomst av abort till följd av en neosporainfektion. Förståelsen av det är viktig för att bringa klarhet i patogenesen samt för att kunna förhindra smittspridning och underlätta utveckling av vaccin mot *N. caninum* (Innes et al., 2002).

## MATERIAL OCH METODER

I min litteratursökning har jag framförallt använt mig av databaserna PubMed och Web of Science<sup>®</sup>. Jag inledde med sökningen "Neospora"[Mesh] AND pathology AND (cow OR cattle OR heifer) och fick många träffar. Därifrån plockade jag ut några intressanta litteraturöversiktsartiklar inom ämnesområdet. Jag var tidigt i behov av att avgränsa mina sökningar. När jag kommit fram till en preliminär frågeställning, inkluderade jag även immunologi i mina sökord och fick fram många relevanta artiklar. Jag använde även litteraturöversiktsartiklars egna referenser för att hitta relevanta originalartiklar.

I min litteraturöversikt har jag framför allt använt mig av vetenskapligt granskade originalartiklar. Jag har även i viss utsträckning använt mig av andras litteraturöversiktsartiklar för att kunna ge en bakgrund till *Neospora caninum* och för att kunna redogöra för vissa immunologiska mekanismer.

## LITTERATURÖVERSIKT

### Bakgrund

#### *Livscykel och spridning*

*N. caninum* har en indirekt livscykel, vilket innebär att parasiten behöver två värdjur för att fullfölja sin livscykel. Således finns det både en huvudvärd och en mellanvärd för parasiten. Många olika varmblodiga djur har visat sig fungera som mellanvärd, exempelvis nötkreatur, get och häst, och hund och prärievarg (koyote) har visats vara huvudvärdar. Parasiten har tre infektiösa stadier. Sporozoiter återfinns inne i motståndskraftiga oocystor i huvudvärdens träck. Dessa kan spridas horisontellt till mellanvärden via oral smitta. De andra två infektiösa stadierna, tachyzoiter och bradyzoiter, återfinns i vävnaderna hos både huvud- och mellanvärd. Tachyzoiter delar sig snabbt och kan infektera många celltyper, ex. nervceller, myocyter eller placentatrofoblaster. Bradyzoiter återfinns i vävnadcystor och förblir infektiösa under långt tid. Dessa cystor kan förekomma i ett flertal vävnader, dock vanligtvis i hjärna och ryggmärg hos foster från nötkreatur och hos kongenitalt infekterade kalvar. Det är en allmänt vedertagen teori att parasiten finns hos de vuxna nötkreaturen i bradyzoit-stadiet i



form av vävnadscystor, men dessa har inte hittats histologiskt hos naturligt infekterade nötkreatur (Dubey et al., 2006).

Spridning hos nötkreatur kan ske både horisontellt och vertikalt. Den horisontella spridningen sker då djuret infekteras via intag av sporulerade oocystor, medan den vertikala spridningen sker från moder till foster transplacentalt (Dubey et al., 2006). Det finns studier som tyder på att den vertikala överföringen är det viktigaste överföringssättet då *N. caninum* sprids inom en besättning. Davison et al. (1999) visade att risken för vertikal överföring kan vara så hög som 95,2 %, medan den horisontella överföringen inte skedde i någon större utsträckning. För att beskriva hur fostret infekteras har Trees och Williams (2005) föreslagit användandet av termerna *exogen transplacental infektion* och *endogen transplacental infektion*. Exogen transplacental infektion innebär att modern infekteras under dräktigheten och överför smittan till foster, medan endogen transplacental infektion innebär att modern har en kronisk infektion som reaktiveras och överförs till fostret.

Kor förblir infekterade hela livet och kan överföra smittan till sina kalvar via endogen transplacental infektion under flera på varandra följande dräktigheter. Dock har det visats att risken för endogen transplacental överföring minskar med antal förlossningar, vilket tyder på att kor över tiden utvecklar någon form av immunitet (Dubey et al., 2006).

### **Symptom**

Experimentellt infekterade kor förblir kliniskt friska, med undantag för att de kan visa en febertopp när de inokulerats med en hög dos tachyzoiter. Detsamma gäller kongenitalt infekterade kalvar, med undantag för ett fåtal djur som kan visa neurologiska symptom. Klinisk neosporos yttrar sig oftast som abort. Beroende på när aborten sker i dräktigheten kan förloppet vara olika. Det finns tre möjliga scenarier. För det första om fostret dör tidigt i dräktigheten resorberas det oftast, vilket medför att det inte alltid noteras som abort. Konsekvensen av detta blir att djuret betäcks igen och aborten oftast felaktigt tolkas som en misslyckad befruktning och således inte associeras till en *N. caninum*-infektion. För det andra om aborten sker något senare in i dräktigheten, efter ca 5 månader, kan en mumifiering ske varvid fostret hålls kvar i livmodern. För det tredje om fostret dör sent i dräktigheten, mellan 3 månader och 8 månader, stöts det oftast ut (Dubey et al., 2006). Anderson et al. (1991) visade i en epidemiologisk studie att de flesta *N. caninum*-associerade aborter som dokumenteras sker mellan 4-6 månaden, således efter ungefär halva dräktighetstiden.

### **Dräktighetstidens inverkan på patogenesen**

Då ett dräktigt djur infekteras kan konsekvenserna bli att fostret eller embryot aborteras, att en kalv med kliniska symptom föds, eller att en kliniskt frisk men kongenitalt smittad kalv föds (Innes et al., 2002). Vilket utfall det blir har visat sig vara beroende av när under dräktigheten djuret infekteras. I en studie infekterades dräktiga kor intravenöst med tachyzoiter vid olika tidpunkter i dräktigheten. Den ena gruppen infekterades i början av dräktigheten (10 veckor) och den andra gruppen i slutet av dräktigheten (30 veckor). Djur infekterade i början av dräktigheten drabbades, i fem av sex fall, av fosterdöd eller resorption av fostret. De sex kalvarna i den sent infekterade gruppen föddes asymtomatiska, men kongenitalt infekterade.

Denna studie visade således tydligt att avgörande för om djuret aborterade eller ej var vid vilken tidpunkt i dräktigheten infektionen ägde rum (Williams et al., 2000).

De exakta mekanismerna till abort vid neosporainfektion är omdiskuterade och det finns många olika teorier om detta. De flesta av teorierna inkluderar att immunförsvaret hos modern och/eller fostret har en viktig del i patogenesen.

### **Immunförsvaret mot *N. caninum***

För att förstå immunförsvaret hos det dräktiga djuret och dess betydelse för uppkomst av abort krävs en förståelse för hur nötkreatur reagerar vid en neosporainfektion. Ett flertal undersökningar har visat att *N. caninum* främst kontrolleras av ett cellmedierat immunsvaret (Bartley et al., 2004). Staska et al. (2003) visade att cytotoxiska T-lymfocyter troligen har en viktig roll i skyddet mot *N. caninum*. Studier har även visat på ett kraftigt interferon-gamma (INF- $\gamma$ )-svar mot *N. caninum* (Lunden et al., 1998). INF- $\gamma$  har i tidiga *in vitro*-studier visat sig kunna inhibera intracellulär replikation av parasiten (Innes et al., 1995). Försök på mus har visat på en kraftig induktion av interleukin-12 (IL-12) och INF- $\gamma$  efter infektion. I samma studie visades att då INF- $\gamma$  och IL-12 neutraliserades med antikroppar *in vivo*, sågs ett minskat skydd mot *N. caninum* (Khan et al., 1997). Detta resultat visar att dessa cytokiner har en roll i det naturliga skyddet mot *N. caninum*. Senare studier av naturligt infekterade dräktiga kor har visat att INF- $\gamma$ -produktion är kopplat till skydd mot abort som orsakas av *N. caninum*. Seropositiva djur, som bildade INF- $\gamma$ , tycktes vara skyddade mot abort. Dessutom visade sig risken för abort vara 15,6 gånger större hos seropositiva kor som inte producerade INF- $\gamma$ , än hos med kor som var seronegativa (Lopez-Gatius et al., 2007). Sammantaget tyder alla dessa fynd på att *N. caninum* inducerar ett Th-1-svar, med avseende på cytokiner och cellsvaret.

Det har dessutom visats att det vid en neosporainfektion bildas ett antikroppssvar (Bartley et al., 2004). Dess roll i skyddet mot parasiten är omdiskuterat, eftersom *N. caninum* är en intracellulär parasit, mot vilken framför allt ett cellmedierat immunförsvaret borde vara verksamt (Staska et al., 2003). Innes et al. (2002) hävdar dock att det är troligt att antikroppar kan neutralisera de extracellulära tachyzoit-stadiet av parasiten och på så vis minska spridningen av parasiten i värdjuret.

### **Immunförsvaret hos det dräktiga djuret**

Dräktighet medför en komplex situation för ett djurs immunförsvaret. En grundläggande teori för hur immunförsvaret fungerar är att det skiljer på "själv" och "icke-själv". I och med att fostret ärver hälften av sitt genetiska material från fadern är det en paradox att inte modern reagerar på fostret och stöter bort det. Forskning på området har visat att cytokiner har en avgörande roll för att en dräktighet ska lyckas. Detta gäller både lokalt vid gränsen mellan moder och foster liksom i övriga delar av kroppen. Cytokiner associerade till ett Th-1-svar har visat sig vara skadliga, medan cytokiner typiska för ett Th-2-svar har visat sig ha en skyddande effekt för dräktighetens bevarande. De "skadliga" cytokinerna, som normalt i liten utsträckning uttrycks i placenta, är exempelvis tumörnekrosfaktor-alfa (TNF- $\alpha$ ) och INF- $\gamma$ . Bland de "skyddande" cytokinerna återfinns exempelvis interleukin-10 (IL-10). Således anses det att det naturligt under dräktighet sker en modulering i det maternella immunförsvaret mot

ett Th-2-svar. Denna modulering skulle undvika de eventuella negativa effekter som ett Th-1-svar för med sig (Entrican, 2002).

Den immunomodulering som uppstår under dräktigheten, skulle dock kunna ha en negativ inverkan vid en neosporainfektion (Innes et al., 2002). I frånvaro av ett Th-1-svar med produktion av INF- $\gamma$ , som visat sig viktig i det naturliga skyddet mot *N. caninum* (Innes et al., 1995), skulle alternativen till ett Th-2-svar underlätta parasitens förökning och således resultera i en spridning i djuret (Innes et al., 2002).

### **Fostrets immunförsvar mot *N. caninum***

Nötkreatur har en placenta som inte tillåter att antikroppar passerar över till fostret. Detta medför att om man ser ett antikroppssvar hos ett foster beror det alltid på att fostret själv reagerat mot ett antigen. Nötkreaturfostret anses bli immunokompetent efter halva dräktighetstiden, ca 100 dagar in i dräktigheten. Immunsvaret hos fostret och vilka konsekvenserna blir för dräktigheten, har visat sig vara olika för olika infektiösa agens (Osburn, 1986). Få studier har undersökt fostrets immunsvaret mot *N. caninum*. Dock har Bartley et al. (2004) kommit fram med några intressanta resultat inom området. I denna undersökning infekterades kor med tachyzoiter i mitten av dräktigheten, varefter moderns och fostrets immunsvaret mot parasiten studerades. Studien visade en antigen-specifik cellproliferation och INF- $\gamma$ -produktion hos foster 28 dagar efter infektion vid 168 dagars dräktighet. Den visade även på ett antigen-specifikt IgM- och IgG-svar i fostret 42 dagar efter infektion 182 dagar in i dräktigheten. Dessa resultat tyder på att fostret har ett tillräckligt utvecklat immunförsvar i mitten av dräktigheten för att kunna reagera på en *N. caninum*-infektion med både ett cellmedierat immunförsvar och antikroppar.

### **Olika teorier kring patogenes**

Som beskrivits ovan har vi en komplex situation, där moderns eget immunförsvar ska hantera en parasitinfektion samtidigt som det inte ska påverka utgången av dräktigheten. Dessutom har fostret ett eget immunförsvar under utveckling. Detta sammantaget innebär att det lätt uppstår problem vid en *N. caninum*-infektion.

### **Moders immunsvaret mot *N. caninum* leder till fosterdöd**

Williams et al. (2000) visade att tiden för infektion är avgörande för utgången av dräktigheten. Denna studie visade även på att infektionen ger ett antigen-specifikt INF- $\gamma$ -svar, och lymfocytproliferation oberoende av när under dräktigheten infektionen sker. Det parasitspecifika IgG<sub>2</sub> svaret visade sig dessutom vara högre än IgG<sub>1</sub> svaret. Allt detta tyder på att ett Th-1-svar utvecklas mot parasiten oberoende av när i dräktigheten infektionen sker. För den fosterdöd som uppstod hos den tidigt infekterade gruppen, lägger de fram en hypotes om att det kraftiga Th-1-svaret som uppstod, med kraftig ökning av INF- $\gamma$ , kan vara orsaken till fosterdöden. Det är i enlighet med vad som nämndes tidigare om cytokinernas roll under dräktigheten. Cytokiner från ett Th-1-svar anses kunna vara skadliga för dräktigheten (Entrican, 2002). Williams et al. (2000) understödjer hypotesen med att inga bevis på infektion i fostret hittades i studien. Vad som motsäger denna hypotes är att INF- $\gamma$ -produktionen var kraftig även hos den sent infekterade gruppen, där inget foster dog. Därför

hävdar de att denna INF- $\gamma$ -topp kanske hade skett för sent för att kunna påverka det redan väletablerade lokala Th-2-svaret i placentan, som uppstått naturligt under dräktigheten. Denna teori stärks även av resultaten från den ovan nämnda studien av naturligt infekterade kor (Lopez-Gatius et al., 2007), där det enda djur som aborterade och samtidigt hade en INF- $\gamma$ -produktion, hade denna produktion tidigt under dräktigheten. Det var en kraftig och plötslig ökning av INF- $\gamma$  som gav abort. Alla övriga djur med INF- $\gamma$ -produktion tycktes vara skyddade mot *N. caninum* och aborterade inte. Enligt en alternativ teori som Williams et al. (2000) lägger fram skulle orsaken till att de sent infekterade djuren inte aborterade kunna vara att fostren vid denna tidpunkt blivit immunokompetenta och har kunnat hantera parasitinfektionen.

Tidiga försök på möss indikerar också att djur som infekterats i början av dräktigheten, eller innan dräktigheten, inte fick någon synlig infiltration i placenta eller fostervävnad. Däremot fick djur som infekterades senare i dräktighet en invasion av parasiter i placenta och även till viss del i fostret. De möss som infekterats i början av dräktigheten drabbades av en ökad fosterdödlighet, medan de möss som infekterats sent inte visade några reproduktionsförluster. Detta resultat skulle även kunna understödja hypotesen om att det kan vara moderns kraftiga Th-1-svar som leder till abort och inte parasitemin i sig (Long & Baszler, 1996).

I en annan studie jämfördes två grupper av nötkreatur som inokulerats via olika administrationssätt, intravenöst och subkutant. Båda grupperna inokulerades under tidig dräktighet (10 veckor) och man fann att i båda fallen blev resultatet en snabb fosterdöd. Man kunde konstatera parasitassocierade skador i placenta och foster. Tjugoåtta dagar efter inokuleringen var fosterdöden 100 % för den grupp med åtta djur som injicerats intravenöst respektive 50 % för de åtta djur som administrerats subkutant. Den intravenöst administrerade gruppen hade en kraftig inflammatorisk reaktion i de maternella karunklerna, relativt lite påverkan på fostervävnad, om än viss nekros, samt en snabb fränstötning efter fosterdöden. Allt detta stärker hypotesen om att aborten är kopplad till den kraftiga inflammationen och det proinflammatoriska Th-1-svaret i placentan. Modern försöker att undvika fortsatt parasitinfektion, men cytokinmiljön i placenta orsakar en abort. Ytterligare ett viktigt fynd i denna undersökning är att den subkutana administreringen inte gav en lika snabb fosterdöd som den intravenösa. Detta tyder på att även antalet parasiter som når placenta under tidig dräktighet, kan vara avgörande för om och hur snabbt kon aborterar (Macaldowie et al., 2004).

### **Moderns naturliga immunomodulering leder till fosterdöd**

Hos kroniskt infekterade djur, som överför smittan via endogen transplacental överföring till fostret, uppstår en annan situation än den ovan beskrivna. Det finns studier som visar att kroniska *N. caninum*-infektioner som uppstått innan dräktigheten inte påverkar den tidiga delen av fosterperioden. De leder dock i större utsträckning till abort 90 dagar in i dräktigheten. Forskarnas teorier om detta fenomen är att antalet tachyzoiter inte varit tillräckligt stort i början av dräktigheten för att påverka placenta eller foster och skada dessa. Lite senare in i dräktigheten uppnår de ett tillräckligt antal för att skada foster och/eller placenta (Lopez-Gatius et al., 2004). Detta är i enlighet med andra studier som visar att en

kraftig migration av parasiten ut i blodet äger rum under dräktighetstidens mellersta del. Persistent infekterade djur som aborterar har nämligen visats få en markant höjning av specifika antikroppar efter ungefär halva dräktighetstiden. Denna höjning kan användas för att indikera en återaktivering av infektion. I denna studie visades även att infekterade kor, som födde oinfekterade kalvar, inte heller visade en antikroppshöjning under dräktigheten (Guy et al., 2001). Migration av parasiter sker troligtvis till följd av att det maternella immunförsvaret kraftigt förändras efter halva dräktighetstiden. Det sker en kraftig nedreglering av den specifika cellproliferationen och INF- $\gamma$ -produktionen. Denna modulering skulle göra det svårare för modern att hantera den persistenta *N. caninum*-infektionen och därför leda till att parasitemin återkommer (Innes et al., 2001). Detta resonemang stämmer överens med vad som nämdes tidigare om att det naturligt under dräktighet sker en förändring av det maternella immunförsvaret mot ett Th-2-svar och således en nedreglering av cytokiner kopplade till ett Th-1-svar. IL-10 som är kopplat till ett Th-2-svar har visat sig leda till en nedreglering av INF- $\gamma$ -produktion (Entrican, 2002). Denna alternering skulle då ge ett minskat skydd mot *N. caninum* och skapa en mikromiljö i placenta som skulle vara till fördel för parasiten (Innes et al., 2002). Hypotesen säger att immunomoduleringen orsakar att vävnadscystor innehållande bradyzoiter spricker och på så sätt orsakar en kraftig parasitemi.

### **Fostrets immunokompetens skyddar mot abort**

Gibney et al. (2008) har lagt fram en annan teori om varför djur aborterar i tidig dräktighet. I denna studie jämfördes djur infekterade i tidig dräktighet (10 veckor) och sen dräktighet (30 veckor) med avseende på spridningen av parasiter samt skador i placenta och foster. Fosterdöd uppstod hos alla (8 st.) djur infekterade i tidig dräktighet, medan inga foster (8 st.) från djur infekterade i sen dräktighet var döda vid avlivningstillfället, 20 till 22 dagar efter inokulering. Hos båda grupperna hade parasitmultiplikation skett i de maternella karunklerna, vilket tyder på att parasiterna kan passera över via placenta och infiltrera fostervävnad (Gibney et al., 2008). Macaldowie et al. (2004) har visat att samtidigt som placentainfektion uppstår passerar parasiten över i fostrets blodomlopp. Båda grupperna hos Gibney et al. (2008) hade dessutom en lymfocytddominerad mononukleär placentainfiltration, vilket tyder på att det maternella immunförsvaret varit aktivt och reagerat på parasiten. Placantan hos de tidigt infekterade djuren hade en mycket kraftigare parasitinfiltration jämfört med de sent infekterade djuren. Det var dessutom mycket kraftigare nekros i placenta hos de tidigt infekterade djuren. Tecken på utbredd parasitreplication i fostervävnad sågs endast hos den tidigt infekterade gruppen, där man fann nekros i samtliga undersökta vävnader hos fostren (hjärna, ryggmärg och lever). Däremot fann man inga tecken på infiltration av inflammatoriska celler hos dessa foster. Hos den sent infekterade gruppen var fosterskadorna mycket begränsade och *N. caninum* hittades inte i samma utsträckning. Dessutom, till skillnad från den tidigt infekterade gruppen, fann man en inflammatorisk reaktion i fostervävnad med infiltration av mononukleära celler. Detta tyder på att äldre foster har ett tillräckligt utvecklat immunförsvaret för att kunna reagera på parasiten och bilda ett lymfocytddominerat immunsvaret mot den. Författarna lägger fram hypotesen att det är fostrets immunokompetens som är den viktigaste faktorn som avgör om djuret aborterar eller inte.

Utifrån upptäckten att den tidigt infekterade gruppen uppvisade en mycket kraftigare parasitinfiltration i placenta och foster, men däremot ingen inflammatorisk reaktion i fostervävnad, lägger författarna fram följande teori. Hos de tidigt infekterade djuren invaderar parasiten det ännu ej immunokompetenta fostret och förökar sig kraftigt i fostervävnaden. Den kraftiga uppförökningen möjliggörs av att fostret inte kan reagera mot parasiten. Därefter återinvaderar parasiterna placenta, via fostrets cirkulation, vilket leder till omfattande nekroser. De skador som då uppstår kan orsaka abort. I fostren från de sent infekterade djuren, där få parasiter hittades i fostervävnaden, hävdar man däremot att fostret blivit immunkompetent och kunnat reagera mot parasiten. Därmed har en kraftig replikation av parasiten förhindrats. Detta har i sin tur gjort att få parasiter, alternativt inga parasiter, återinvaderat placenta från fostervävnaden hos de sent infekterade djuren (Gibney et al., 2008).

Man anser att moderns tidiga immunsvaret kan begränsa påverkan på placenta i det tidiga skedet av infektionen. Dock, vid den kraftiga återinvaderingen med parasiter som replikerats i fostret, blir belastningen för stor för det maternella immunförsvaret. Det blir utbredda parasitassocierade nekroser i placenta som kan leda till abort (Gibney et al., 2008).

### **Negativa effekter av fostrets immunförsvaret**

I en intressant nypublicerad studie observerades att kor infekterade något senare i dräktigheten (ca 16 veckor) kan drabbas av fosterdöd (Almeria et al., 2010). Detta har varit omdiskuterat eftersom studier har visat att infektion senare under dräktigheten resulterar i första hand i friska men kongenitalt infekterade kalvar. Detta har exempelvis visats av Williams et al. (2000). I studien gjord av Almeria et al. (2010) infekterades nio djur vid 110 dagars dräktighet och avlivades tre i taget vid tre veckor, sex veckor och nio veckor efter infektionstillfället. Det var endast ett av nio djur som hade ett dött foster vid avlivning. Kon med dött foster avlivades sex veckor efter infektion. Den aborterande kon hade den kraftigaste skadan på placenta, med störst antal tachyzoiter. Detta foster visade också en hög INF- $\gamma$ -produktion, vilket inga andra foster gjorde i sex-veckorsgruppen. Även foster avlivade vid tre veckor visade ökad INF- $\gamma$ -produktion, medan inga foster avlivade vid nio veckor visade detta. Forskarna tror därför att det starka INF- $\gamma$ -svaret, troligtvis till följd av en kraftig parasitemi hos fostret, kan vara skadligt och vara orsak till fosterdöden. Eftersom inga andra foster i den grupp som avlivades vid sex veckor visade en INF- $\gamma$ -produktion har man föreslagit att om INF- $\gamma$ -produktionen är effektiv i början efter infektion och fostret snabbt kan hantera parasiten ger det inga problem. Om produktionen av INF- $\gamma$  fortgår, eller är väldigt kraftig, kan det däremot ha negativ inverkan på dräktigheten. I studien påvisades också DNA från *N. caninum* i alla foster, vilket tyder på att alla foster infekterats vertikalt även om det inte förorsakat fosterdöd (Almeria et al., 2010).

## **DISKUSSION**

Utifrån de studier som jag har överblickat i min litteraturöversikt förstår man att patogenesen för *N. caninum*-orsakad abort hos nötkreatur är ett komplext samspel mellan olika faktorer. De exakta mekanismerna bakom aborterna är omdiskuterade och utfallet verkar vara kopplat till när under dräktigheten överföring sker.

Om den fosterdöd som uppkommer i tidig dräktigheten finns olika teorier. En teori är att modern framkallar ett kraftigt Th-1-svar i syfte att skydda sig själv mot parasitinfektionen. Detta Th-1-svar med tillhörande cytokinproduktion verkar vara skadligt för dräktigheten. Det är framför allt INF- $\gamma$  som har denna negativa effekt (Entrican, 2002). Att denna INF- $\gamma$ -produktion inte skulle vara skadlig senare i dräktigheten tror forskarna beror på att modern vid denna tidpunkt i dräktigheten mobiliserat ett starkt Th-2-svar som verkar dräktighetsbevarande. Detta Th-2-svar skulle medföra att Th-1-svaret inte har någon större effekt, utan konkurreras ut av det etablerade Th-2-svaret (Williams et al., 2000). Ett problem med denna teori är att INF- $\gamma$ -produktion även visat sig vara viktig i det naturliga skyddet mot *N. caninum*. Slutsatsen är att det är den kraftiga och plötsliga ökningen av INF- $\gamma$  som är skadlig och kan orsaka abort (Lopez-Gatius et al., 2007). Jag anser att vidare studier av INF- $\gamma$  krävs. Dessa studier bör göras med avseende på när under dräktigheten och i vilken utsträckning INF- $\gamma$  produceras, samt vilket utfall det får för dräktigheten.

Ytterligare en teori kring fosterdöd i tidig dräktighet är att fostrets immunkompetens är avgörande för om djuret aborterar eller ej (Gibney et al., 2008). I tidig dräktighet har fostret inte utvecklat sitt immunförsvar och kan således inte reagera på *N. caninum* (Osburn, 1986). Det medför att parasiten kan invadera fostervävnad från modern via placenta och där föröka sig ohämmat. Därefter kan parasiterna återinvadera placenta och orsaka så stor skada att det leder till abort. Hos äldre foster, som är immunokompetenta, kan inte denna ohämmade delning i fostervävnad äga rum. Det sker inte samma kraftiga återinvadering av placenta från fostret och därmed blir skadorna i placenta mindre allvarliga, vilket medför mindre risk för abort (Gibney et al., 2008).

Abort som uppstår i mitten av dräktigheten hos kroniskt infekterade kor tros vara orsakad av den kraftiga immunomodulering som sker naturligt hos modern under dräktigheten. Denna modulering, med en nedreglering av den specifika cellproliferation och INF- $\gamma$ -produktion, tros leda till att modern får svårare att hantera en persistent *N. caninum*-infektion (Innes et al., 2001). Det sker en återkomst av en parasitemi i kon (Guy et al., 2001), troligen till följd av att vävnadscystor, innehållande bradyzoiter, spricker. Det Th-2-svar som naturligt uppstår i gränsen mellan foster och moder (Entrican, 2002) skulle kunna främja en parasitinvasjon av placenta och fostervävnad (Innes et al., 2001). Denna parasitinfiltration kan orsaka skada och i sin tur leda till abort (Lopez-Gatius et al., 2004).

Senare studier har även visat att abort kan ske senare i dräktigheten även hos kor som inte är kroniskt infekterade. Hypotesen kring dessa aborter är att det immunokompetenta fostret producerat mycket INF- $\gamma$  mot *N. caninum*. Denna kraftiga INF- $\gamma$ -produktion skulle vara skadlig och orsaka abort (Almeria et al., 2010). Den sistnämnda studie ger dock svagt stöd till sin tes eftersom endast ett av nio djur aborterade i den sena delen av dräktigheten.

Att de olika studierna har olika teorier kring varför abort sker betyder inte nödvändigtvis att någon har fel. Jag tror, i likhet med många andra studier, exempelvis Innes et al. (2001), att orsakerna till aborterna är multifaktoriella. De faktorer som sammantaget tycks påverka utgången av en *N. caninum*-infektion under dräktigheten är:

- Effektiviteten hos moderns immunförsvar mot *N. caninum*-infektionen och moderns naturliga immunomodulering under dräktigheten
- Fostrets immunokompetens och immunsvar mot *N. caninum*
- Tidpunkten under dräktigheten då parasitemin uppkommer och mängden parasiter som invaderar placenta och foster

Något som jag tycker understryker komplexiteten för patogenesen vid bovin neosporos är skillnaderna i fynd mellan Gibney et al. (2008) och Williams et al. (2000). Trots det faktum att djuren infekterades vid samma tidpunkt i dräktigheten (10 veckor), påvisade Gibney et al. (2008) parasiter i fostervävnaden, medan Williams et al. (2000) inte gjorde det. Studierna visade olika resultat och författarna lägger således fram olika hypoteser kring varför aborterna uppstått.

De flesta observerade fallen av *N. caninum*-orsakad abort hos nötkreatur rapporteras mellan fjärde och sjätte månaden i dräktigheten. Detta har bland annat observerats av Anderson et al. (1991). Siffrorna tror jag dock ska tolkas med försiktighet, med tanke på att flera studier visat att abort kan ske i andra stadier av dräktigheten (Williams et al., 2000; Macaldowie et al., 2004). Jag tror att abort i tidig dräktighet troligen underrapporteras och att de ofta feltolkas som andra dräktighetsproblem hos kon. Därmed anser jag att det är viktigt att undersöka *N. caninum*-infektion i alla stadier av dräktigheten och att det är viktigt att hitta verktyg för att korrekt kunna fastställa om abort i tidig dräktighet är orsakad av *N. caninum*-infektion.

Ett problem med de studier som jag har jämfört är att deras utformning skiljer sig en del sinsemellan. De har olika infallsvinklar på problemet och undersöker inte alltid direkta parametrar för immunförsvarets roll vid en *N. caninum*-infektion. Det medför att det blir svårt att göra en bra jämförelse mellan studierna eftersom inte alla tagit hänsyn till de parametrar jag har varit intresserad av. Vissa teorier som författarna presenterat är inte alltid helt bevisade i deras egna resultat, eftersom författarna inte har undersökt alla nödvändiga parametrar. De har ändå gjort intressanta iakttagelser i sina studier, som de har kopplat till resultat från andra studier.

Kunskap om immunförsvarets roll vid *N. caninum*-infektion kan användas till att förstå och förhindra smittspridning samt för att utveckla vaccin mot *N. caninum*. Med anledning av detta behövs definitivt mer forskning inom området. Min slutsats är att cytokiner visat sig ha stor betydelse för patogenesen. Fokus borde därför, enligt min åsikt, ligga på att vidare analysera genuttrycket för olika regulatoriska cytokiner hos neosporainfekterade dräktiga kor. Analyserna borde göras vid olika tidpunkter under dräktigheten och regulatoriska cytokiner hos både moder och foster borde undersökas. Det skulle hjälpa till att klargöra vilken immunrespons som är kopplat till abort och vilket som är kopplat till födsel av friska, men kongenitalt infekterade kalvar. Därmed skulle stora delar av patogenesen för *N. caninum*-infektion hos nötkreatur vara belysta.



## LITTERATURFÖRTECKNING

- Almeria, S., Araujo, R., Tuo, W., Lopez-Gatius, F., Dubey, J.P. & Gasbarre, L.C. (2010). Fetal death in cows experimentally infected with *Neospora caninum* at 110 days of gestation. *Veterinary Parasitology*, 169, 304-311.
- Anderson, M.L., Blanchard, P.C., Barr, B.C., Dubey, J.P., Hoffman, R.L. & Conrad, P.A. (1991). Neospora-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 198, 241-244.
- Bartley, P.M., Kirvar, E., Wright, S., Swales, C., Esteban-Redondo, I., Buxton, D., Maley, S.W., Schock, A., Rae, A.G., Hamilton, C. & Innes, E.A. (2004). Maternal and fetal immune responses of cattle inoculated with *Neospora caninum* at mid-gestation. *Journal of the Comparative Pathology*, 130, 91-91.
- Bjerkas, I., Mohn, S.F. & Presthus, J. (1984). Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 70, 271-274.
- Davison, H.C., Otter, A. & Trees, A.J. (1999). Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infections in dairy cattle. *International Journal for Parasitology*, 29, 1683-1689.
- Dubey, J.P. (1999). Neosporosis in cattle: biology and economic impact. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 214, 1160-1163.
- Dubey, J.P., Buxton, D. & Wouda, W. (2006). Pathogenesis of bovine neosporosis. *Journal of Comparative Pathology*, 134, 267-289.
- Entrican, G. (2002). Immune regulation during pregnancy and host-pathogen interactions in infectious abortion. *Journal of Comparative Pathology*, 126, 79-94.
- Gibney, E.H., Kipar, A., Rosbottom, A., Guy, C.S., Smith, R.F., Hetzel, U., Trees, A.J. & Williams, D.J. (2008). The extent of parasite-associated necrosis in the placenta and foetal tissues of cattle following *Neospora caninum* infection in early and late gestation correlates with foetal death. *International Journal for Parasitology*, 38, 579-588.
- Guy, C.S., Williams, D.J.L., Kelly, D.F., McGarry, J.W., Guy, F., Bjorkman, C., Smith, R.F. & Trees, A.J. (2001). *Neospora caninum* in persistently infected, pregnant cows: spontaneous transplacental infection is associated with an acute increase in maternal antibody. *Veterinary Records*, 149, 443-449.
- Innes, E.A., Panton, W.R., Marks, J., Trees, A.J., Holmdahl, J. & Buxton, D. (1995). Interferon gamma inhibits the intracellular multiplication of *Neospora caninum*, as shown by incorporation of 3H uracil. *Journal of Comparative Pathology*, 113, 95-100.
- Innes, E.A., Wright, S.E., Maley, S., Rae, A., Schock, A., Kirvar, E., Bartley, P., Hamilton, C., Carey, I.M. & Buxton, D. (2001). Protection against vertical transmission in bovine neosporosis. *International Journal for Parasitology*, 31, 1523-1534.
- 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.
- Khan, I.A., Schwartzman, J.D., Fonseka, S. & Kasper, L.H. (1997). *Neospora caninum*: role for immune cytokines in host immunity. *Experimental Parasitology*, 85, 24-34.
- Long, M.T. & Baszler, T.V. (1996). Fetal loss in BALB/C mice infected with *Neospora caninum*. *The Journal of Parasitology*, 82, 608-11.
- Lopez-Gatius, F., Pabon, M. & Almeria, S. (2004). *Neospora caninum* infection does not affect early pregnancy in dairy cattle. *Theriogenology*, 62, 606-613.
- Lopez-Gatius, F., Almeria, S., Donofrio, G., Nogareda, C., Garcia-Ispuerto, I., Bech-Sabat, G., Santolaria, P., Yaniz, J.L., Pabon, M., De Sousa, N.M. & Beckers, J.F. (2007). Protection against

abortion linked to gamma interferon production in pregnant dairy cows naturally infected with *Neospora caninum*. *Theriogenology*, 68, 1067-1073.

- Lunden, A., Marks, J., Maley, S.W. & Innes, E.A. (1998). Cellular immune responses in cattle experimentally infected with *Neospora caninum*. *Parasite Immunology*, 20, 519-526.
- Macaldowie, C., Maley, S.W., Wright, S., Bartley, P., Esteban-Redondo, I., Buxton, D. & Innes, E.A. (2004). Placental pathology associated with fetal death in cattle inoculated with *Neospora caninum* by two different routes in early pregnancy. *Journal of Comparative Pathology*, 131, 142-156.
- Osburn, B.I. (1986). Ontogeny of immune responses in cattle. I: W.I. Morrison, ed. *The ruminant immune system in health and disease*. Cambridge. Cambridge University Press. Kap 14.
- Staska, L.M., Mcguire, T.C., Davies, C.J., Lewin, H.A. & Baszler, T.V. (2003). *Neospora caninum*-infected cattle develop parasite-specific CD4<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocytes. *Infection and Immunity*, 71, 3272-3279.
- Trees, A.J. & Williams, D.J. (2005). Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Trends in Parasitology*, 21, 558-561.
- Williams, D.J., Guy, C.S., McGarry, J.W., Guy, F., Tasker, L., Smith, R.F., Maceachern, K., Cripps, P.J., Kelly, D.F. & Trees, A.J. (2000). *Neospora caninum*-associated abortion in cattle: the time of experimentally-induced parasitaemia during gestation determines foetal survival. *Parasitology*, 121, 347-358.