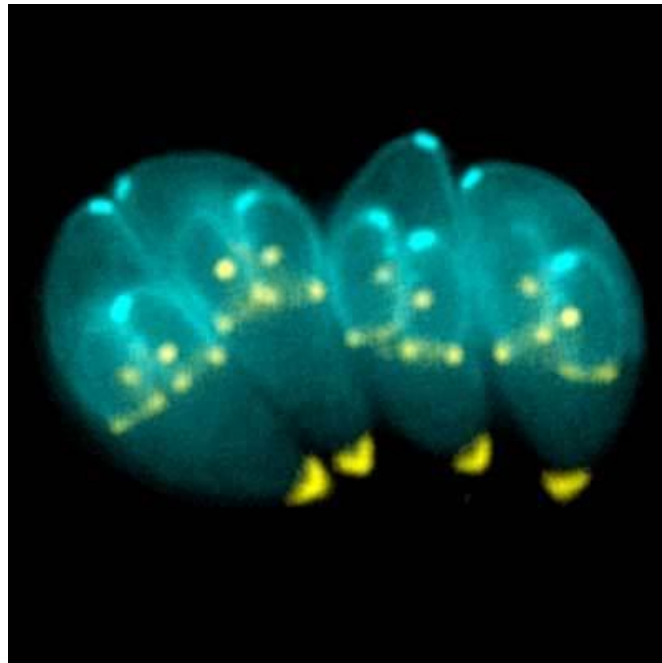




Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Nötkött som smittkälla vid human toxoplasmos

Karolina Karlsson



Självständigt arbete i veterinärmedicin, 15 hp

Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2011: 33

Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Uppsala 2011



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Nötkött som smittkälla vid human toxoplasmos

Beef as a source of infection with *Toxoplasma gondii*

Karolina Karlsson

Handledare:

Camilla Gustafsson, 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: Ke Hu och John Murray

Serienamn, delnr: Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2011: 33
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, SLU

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

Nyckelord: *Toxoplasma gondii*, toxoplasmos, nöt, nötkött, vävnadscystor, prevalens, serologi

Key words: *Toxoplasma gondii*, toxoplasmosis, cattle, beef, tissue cysts, prevalence, serology

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

SAMMANFATTNING	1
SUMMARY	2
INLEDNING.....	3
MATERIAL OCH METOD	3
LITTERATURÖVERSIKT	3
Livscykel och värdar.....	3
Human toxoplasmos	4
Serologiska testmetoder	4
Complement fixation test (CFT)	4
Sabin-Feldman dye test (DT)	5
Indirekt fluorescerande antikroppstest (IFAT).....	5
Modifierat agglutinationstest (MAT).....	5
Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	5
Metoder för detektion av vävnadscystor.....	5
Korrelation mellan vävnadscystor och serologi	6
Antikroppssvar hos nötkreatur	8
DISKUSSION.....	9
Metodik	9
Korrelation mellan serologi och PCR.....	10
Förekomst av vävnadscystor	11
Exponering för <i>Toxoplasma gondii</i>	11
Slutsats	12
REFERENSER.....	13

SAMMANFATTNING

Toxoplasma gondii är en encellig parasit som kan orsaka livshotande sjukdom vid infektion av immunsupprimerade personer och skada fostret vid infektion av gravida kvinnor. Parasiten infekterar även livsmedelsproducerande djur som t ex nötkreatur och kan då ge upphov till infektiösa vävnadscystor som förekommer i bl a skelettmuskulatur. Detta gör konsumtion av kött till en viktig smittkälla, men vilken roll just nötkött spelar är inte klarlagt. Med anledning av detta har jag gjort en litteraturstudie avseende förekomsten av *T. gondii* hos nötkreatur.

Ett flertal studier av korrelationen mellan prevalensen av vävnadscystor och seropositivitet hos nötkreatur har granskats i denna litteraturstudie. Seroprevalensen hos naturligt exponerade djur varierar mellan 0 och 91 % medan prevalensen av vävnadscystor är betydligt lägre (0 – 10 %). Dessa skillnader mellan seroprevalens och påvisade parasiter skulle kunna bero på att nötkreatur efter en akut infektion inte utvecklar vävnadscystor i betydande utsträckning. De skulle också kunna bero på brister i metoderna som används: serologiska tester, bioassay (inokulering av prover i möss och katter) och PCR (polymerase chain reaction). Dessa möjliga orsaker diskuteras och slutsatsen blir att vävnadscystor i nötkött är ovanligt men i vissa fall kan förekomma i betydande mängder. Detta stödjer epidemiologiska studier som utpekar nötkött som en riskfaktor för human toxoplasmos.

SUMMARY

Toxoplasma gondii is a unicellular parasite which is known to cause disease in immunosuppressed individuals and foetal damage in association with infection during pregnancy. The parasite also infects food-producing animals such as cattle and produces infectious tissue cysts in for example muscular tissue. This makes ingestion of meat an important route of infection, but the importance of beef in the epidemiology of the disease is yet to be assessed. For this reason my literature review concerns the prevalence of *T. gondii* in cattle.

A number of studies regarding the correlation between the prevalence of tissue cysts and seropositivity in cattle have been reviewed. The seroprevalence among naturally exposed animals vary between 0 and 91 %, while the prevalence of tissue cysts is considerably lower (0 – 10 %). The cause of these differences between seroprevalence and detection of the parasite could be that cattle don't develop tissue cysts in significant amounts. The diverging results could also be due to deficiencies in the methods used in the studies: serological tests, bioassay (inoculation of the sample into mice or cats) and PCR (polymerase chain reaction). Possible hypotheses are discussed and it is concluded that tissue cysts in beef are rarely found but could in some cases exist in significant amounts. This supports epidemiological studies pointing to beef as a risk factor for human toxoplasmosis.

INLEDNING

Toxoplasma gondii är en intracellulär protozo med kattdjur som huvudvärd och de flesta däggdjur och fåglar som mellanvärdar. Mellanvärdar kan smittas genom oralt intag av oocystor från kattavföring. Parasiten sprider sig därefter från tarmen ut i kroppens olika vävnader, bland annat muskulatur. Där bildas vävnadscystor innehållande infektiösa parasiter, vilka kan ge sjukdom om köttet äts av en annan mellanvärd. Även människor kan bli infekterade genom att äta vävnadscystor i otillräckligt tillagat kött. Infektionen fortlöper normalt subkliniskt men kan orsaka fosterskador eller missfall vid primärinfektion under graviditet (Pappas et al., 2009). Immunsupprimerade personer kan utveckla livshotande sjukdom (Luft et al., 1983).

Det är vida omdiskuterat huruvida nötkreatur spelar någon väsentlig roll vid smittspridning av parasiten till människa eller inte. Serologiska studier har visat en betydande prevalens (Klun et al., 2006) medan undersökningar där man tittat på förekomsten av vävnadscystor ofta erhållit motsatta resultat (Opsteegh et al., 2011). Trots att dessa undersökningar visat att nötkreatur härbärgerar vävnadscystor mer sällan än andra livsmedelsproducerande djur har konsumtion av rått nötkött tagits upp som en riskfaktor för akut toxoplasmos i epidemiologiska studier (Cook et al., 2000). I denna litteraturstudie har jag undersökt vad forskningen säger om prevalensen av *Toxoplasma* i nötkreatur, och hur väl seropositivitet fungerar som indikator för vävnadscystor.

MATERIAL OCH METOD

Databaserna PubMed, ScienceDirect och Web of Knowledge (som utgörs av databaserna Web of Science®, BIOSIS Previews®, CABI och Journal Citation Reports®) användes för att hitta vetenskapligt granskade artiklar i ämnet.

Sökbegrepp som **toxoplasm* and (serolog* or antibod*) and (cattle* or bovine or cow*)** (ScienceDirect, 33 träffar) och **(prevalence and "tissue cyst*") AND (bovine* or cattle* or cow* or calf or calves or beef) AND toxoplasm*** (Web of Knowledge, 12 träffar) användes, begränsade till titel och abstract respektive "topic". Sökningen begränsades också av tillgänglighet (de tidskrifter SLU och Uppsala universitet prenumererar på) och språk, då bara artiklar på engelska användes. Även referenser funna i andra artiklar och böcker användes i litteraturstudien.

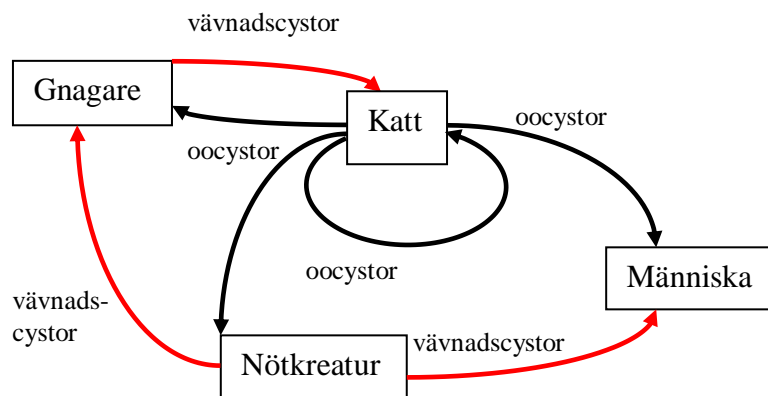
LITTERATURÖVERSIKT

Livscykel och värdar

Toxoplasma gondii kan föröka sig både asexuellt och sexuellt, men den sexuella förökningen kan bara ske i tarmen på kattdjur (*Felidae*), som är parasitens huvudvärd. I princip alla varmblodiga djur kan fungera som mellanvärdar. Den sexuella förökningen resulterar i produktion av oocystor (se Figur 1), vilka utsöndras med kattens avföring. Oocystor som kontaminerat jord eller vatten är en vanlig källa till oral infektion. I mellanvärderna sprider sig *T. gondii* från mag-tarmkanalen till de flesta av kroppens vävnader i form av snabbt delande tachyzoiter. Dessa tar sig in i celler för att replikera tills cellerna sprängs och nya tachyzoiter sprider sig vidare. Detta fortgår tills det specifika immunförsvaret aktiveras och hämmar

tachyzoiternas fortplantning. Parasiten bildar dock även vävnadscystor bestående av långsamt delande bradyzoiter, vilka tycks kunna kvarstå betydligt längre. Dubey och Thulliez (1993) infekterade fyra stycken 1-åriga stutar experimentellt och påvisade vävnadscystor upp till 1191 dagar efter inokulation.

Både huvudvärden och mellanvärdarna kan även infekteras via oralt intag av vävnadscystor (t ex vävnadscystor i råttor som äts av grisar eller nötkött som äts av människor). Bradyzoiter och oocystor är motståndskraftiga mot magsyra medan tachyzoiter är betydligt känsligare. Detta gör att tachyzoiter i nyligen infekterade djur troligen inte utgör någon viktig smittkälla (Jacobs et al., 1960). Vävnadscystor är temperaturkänsliga, och avdödas inom sekunder vid upphettning till 67° C (Dubey et al., 1990), men nötkött serveras inte alltid ordentligt upphettat, vilket ger parasiten en chans att överleva.



Figur 1. Illustration av smittvägar mellan huvudvärd och mellanvärdar.

Human toxoplasmos

Infektion med *Toxoplasma gondii* fortlöper asymtomatiskt hos de flesta människor, men en primärinfektion under graviditet kan leda till fosterskador eller missfall (Pappas et al., 2009). Immunsupprimerade personer kan få livshotande komplikationer, t ex encefalit (Luft et al., 1983).

Serologiska testmetoder

Serologiska metoder har med framgång använts för att uppskatta prevalensen av *Toxoplasma gondii* i populationer av t ex svin, då en hög korrelation visats mellan seropositivitet och förekomst av vävnadscystor (Dubey et al., 1995). En mängd olika serologiska tester har utformats för att detektera antikroppar hos livsmedelsproducerande djur, inklusive nöt. De vanligaste förklaras nedan.

Complement fixation test (CFT)

I detta test värmebehandlas det serum som ska testas för att inaktivera dess naturliga komplementproteiner (den individuella variationen i dessa skulle annars kunna störa testet).

Sedan tillsätts antigenet (*Toxoplasma*) och en bestämd mängd komplementproteiner. Om serumet innehåller de antikroppar som eftersöks reagerar komplementsystemet med dessa antikroppar och komplementproteinerna ”förbrukas”. Detta kontrolleras genom att efteråt tillsätta erythrocyter bundna till antikroppar. Om testet är negativt finns komplementproteiner kvar som lyserar erythrocyterna, eftersom de istället reagerar med detta antigen-antikroppskomplex (Tizard, 2009).

Sabin-Feldman dye test (DT)

I detta test färgas tachyzoiter med metylenblått efter exponering för serumet som ska testas. Om antikroppar finns i serumet hindrar dessa infärgningen av tachyzoiterna, medan färgade tachyzoiter innebär ett negativt resultat (Sabin & Feldman, 1948). Detta test fungerar utomordentligt på humant serum, men reagerar inte tillförlitligt på bovint serum (Dubey et al., 1985).

Indirekt fluorescerande antikroppstest (IFAT)

Vid IFAT används ett underlag täckt av antigen (*Toxoplasma*). På detta underlag tillförs det serum som ska testas, samt antikroppar (antiglobuliner) som specifikt fäster på bovina antikroppar. Antiglobulinerna är märkta med fluorescerande färgämne för att åskådliggöra vilken koncentration av bovina antikroppar mot *T. gondii* som finns i provet (Tizard, 2009)

Modifierat agglutinationstest (MAT)

Detta test bygger på antikroppars förmåga att agglutinera antigen. Man tillsätter hela tachyzoiter till det serum som ska testas och studerar huruvida komplexa formationer bildas med hjälp av antikroppar som binder till parasiterna. I ett negativt prov bildar tachyzoiterna en mörk massa på botten, medan ett positivt prov är betydligt mer transparent (Desmonts & Remington, 1980).

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Ofta använder man en indirekt ELISA, där man liksom i IFAT har ett underlag av antigen och undersöker hur mycket antikroppar som finns i serumet genom att använda antiglobuliner riktade mot bovina antikroppar. Till skillnad från IFAT är antiglobulinerna märkta med ett enzym, som ger en färgskiftning när ett visst substrat tillsätts. Mängden substrat som omvandlas mäts ibland med särskilda instrument i form av optical density (OD) (Tizard, 2009; Opsteegh et al., 2011).

Metoder för detektion av vävnadscystor

En vanlig metod för att påvisa den levande parasiten är att inokulera det aktuella provet i möss, som är känsliga för toxoplasmos. Provet kan också inokuleras i katter, vilka utsöndrar oocystor i avföringen även efter låga infektionsdoser (Dubey, 2001). Vid inokulering (bioassay) i möss injiceras ett koncentrat av den vävnad som ska undersökas i toxoplasma-fria möss, varvid man studerar tecken på infektion. Samtliga möss undersöks avseende toxoplasmos (histologi, serologi, vidare inokulation) (Čatár et al., 1969). Katter brukar istället matas med det material som ska undersökas och avföringen studeras sedan med avseende på oocystor upp till 37 dagar efter inokulationen (Dubey & Streitl, 1976).

I nyare studier har PCR (polymerase chain reaction) använts för att upptäcka parasit-DNA. Som diagnostisk metod har dock PCR haft sina begränsningar, bland annat att det endast möjliggjort analys av mycket små mängder vävnad (några mikrogram). Nyligen har dock en ny metod utvecklats, MC-PCR (Magnetic Capture PCR), med vilken man har möjlighet att analysera betydligt större mängder vävnad (100 gram) (Opsteegh et al., 2011).

Korrelation mellan vävnadscystor och serologi

Flera författare har undersökt huruvida serologisk prevalens överensstämmer med prevalensen av vävnadscystor hos nötkreatur. Resultatet återges i Tabell 1.

Tabell 1. Resultat från undersökningar av antikroppar mot, respektive vävnadscystor eller DNA från *Toxoplasma gondii* hos nötkreatur. Antal positiva djur och totalantal djur i undersökningarna anges.

Källa	Serologisk undersökning			Undersökning avseende parasit/DNA		
	antal positiva	total	prevalens	antal positiva	total	prevalens
Čatár et al., 1969	16	85	19 %	8	85	9 %
Dubey, 1976	0	186	0 %	0	352	0 %
Costa et al., 1977	5	5	100 %	5	5	100 %
Dubey, 1992	3	59	5 %	1	1	100 %
Dubey & Thulliez, 1993	3	4	75 %	3	4	75 %
Dubey et al., 2005	0	2094	0 %	0	2094	0 %
Moré et al., 2008	82	90	91 %	2	20	10 %
Santos et al., 2010	26	100	26 %	2	100	2 %
Opsteegh et al., 2011	32	98	33 %	2	98	2 %

1969 publicerades en studie utförd i dåvarande Tjeckoslovakien där hjärna och diafragma (totalt 100 g per djur) från 85 nötkreatur analyserades genom inokulering i möss samt mikroskopering. Sera analyserades med CFT. Levande *Toxoplasma gondii* påträffades i ett av två djur som hade positiv titer 1:4, samt alla sju som hade en titer inom intervallet 1:8 – 1:32. Parasiten påvisades inte i något av de åtta djur som uppvisade den lägsta titern, 1:2, eller något seronegativt djur. Detta tolkas av författaren som en god korrelation mellan CFT och bioassay (Čatár et al., 1969).

1975-76 samlades vävnad från hjärta och diafragma (ca 1/25 av hjärtat och 1/10 av diafragman) in från 352 nötkreatur på ett slakteri i USA. Även sera samlades in från 186 av dessa djur. Totalt 32 kg vävnad utfodrades till katter, vars feces och kroppar sedan undersöktes avseende oocystor respektive vävnadscystor. Sabin-Feldman dye test användes för att analysera serumet (Dubey, 1976).

Costa et al. (1977) infekterade fyra stycken kalvar oralt med oocystor och vävnadscystor, och en kalv inokulerades subkutant med vävnadscystor. Man använde även ett kontrolldjur som inte exponerades för parasiten. Doseringen varierade mellan 1 000 och 3 500 000 cystor eller oocystor och kalvarna slaktades 69, 80, 90, 100 respektive 107 dagar efter inokulering. Sera analyserades genom Sabin-Feldman dye test och IFAT, men gränsvärde angavs endast för det

sistnämnda, varför endast detta tas upp i Tabell 1. 40-50 g vävnad (från bland annat hjärta, skelettmuskulatur, lymfknotor och hjärna) från varje kalv koncentrerades till en suspension som inokulerades i möss och de flesta organ undersöktes dessutom histologiskt. Man fann vävnadscystor i alla djur utom kontrollen. IFAT-titern ökade betydligt från 0 - 1:16 på inokulationsdagen till 1:512 – 1: 65 536, vilket uppmättes 24 dagar efter inokulationen. Djuret som inokulerats med 3 500 000 oocystor uppvisade den högsta titern, djuret som inokulerats subkutant med 1 000 vävnadscystor näst högst och djuret som inokulerats oralt med 1 000 vävnadscystor hade lägst titer. Den kalv som inokulerats med 100 000 oocystor hade dock något lägre titrar än den som inokulerats med 10 000 oocystor.

Dubey (1992) rapporterade att man undersökt 59 stycken nötkreatur serologiskt med hjälp av MAT. En ko hade betydligt högre titer än de övriga seropositiva djuren och undersöktes därför vidare. Efter upprepade blodprover under 62 dagar som visade på antikroppar i titer 1:1 600 avlivades kon och man undersökte flertalet vävnader (bland annat lever, hjärta, hjärna och tunga) med avseende på vävnadscystor. 12 katter utfodrades med de aktuella vävnaderna men ingen utsöndrade oocystor eller utvecklade antikroppar mot *T. gondii*. Ytterligare ett flertal vävnader inokulerades subkutant i möss. I detta försök påvisades levande *T. gondii* i kons tunntarm.

Dubey och Thulliez (1993) inokulerade fyra stycken ettåriga stutar med 10 000 oocystor. Djuren avlivades 350, 539, 1 191 respektive 1 201 dagar efter inokulation och 500 g av varje organ som undersöktes (tunga, hjärta, skelettmuskulatur, hjärna, lever, njurar och tunntarm) utfodrades till katter. Det organ som hos flest stutar innehöll vävnadscystor var hjärtat (3 st), följt av lever och tunga. En stut hade vävnadscystor i skelettmuskulatur. Man inokulerade även möss med mindre än 100 g av blandade vävnader (bland annat hjärta, hjärna och lever), men utan positiva svar. Blodprover togs från stutarna med en veckas till två månaders mellanrum för serologisk undersökning med Sabin-Feldman dye test och två typer av agglutinationstest, varav det ena var MAT. Inga gränsvärden angavs i studien men en tydlig skillnad sågs mellan den stut i vilken man inte fann några vävnadscystor (kallas fortsättningsvis ”den negativa stuten”) och de övriga tre. Den negativa stuten hade vid avlivningen 1 201 dagar efter inokulering en MAT-titer på 1:20 och odetekterbara titrar i de andra testerna, och hade som mest uppmätt titer 1:8 000, när de övriga hade det dubbla eller fyra gånger så höga titrar. De tre övriga stutarna hade vid sina respektive avlivningstillfällen MAT-titrar på 1:4 000 eller 1:8 000, men 350 dagar efter inokulering, samma dag som den första stuten avlivades, hade den negativa stutens titer redan sjunkit till 1:160.

I en stor undersökning av *Toxoplasma gondii* i köttprodukter i USA testade Dubey et al. (2005) 2094 köttstycken (skelettmuskulatur) om minst 1 kg. 100 g från varje köttprov utfodrades till katter, vars avföring kontrollerades för oocystor. Köttsaft erhöles från varje prov genom att frysa och tina det, och analyserades sedan i ett kommersiellt ELISA-test. Alla prover var negativa enligt både det serologiska testet och bioassay, men författarna poängterar att det skulle kunna finnas cystor i nivåer som inte var detekterbara med deras metod, och att levande cystor möjligtvis avdödats i hanteringen av proverna.

More et al. (2008) undersökte 90 nötkreatur från två slakterier i Argentina med avseende på *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* och *Sarcocystis cruzi*. Sera testades med IFAT och

MAT. För 20 av de djur som hade positiva titrar i IFAT analyserades vävnadsprover från hjärtmuskulaturen genom immunohistokemi och PCR (25-50 µg per djur). Inga cystor påvisades genom immunohistokemi, men hos två djur detekterades toxoplasma-DNA. Det ena djuret var en ko med den lägsta MAT-titer som ansågs positiv och det andra en stut med negativt MAT. Ett flertal andra fynd, som saminfektion mellan de tre parasiterna, diskuterades av författarna, men inte den bristande korrelationen mellan MAT och PCR.

I Brasilien utfördes en liknande undersökning avseende prevalensen av *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* och *Hammondia* sp. (Santos et al., 2010). På ett slakteri samlades prover in från 100 djur. För detektion av parasit-DNA i vävnad från hjärna och hjärta användes PCR och sera analyserades med hjälp av IFAT. Parasit-DNA återfanns endast i hjärnvävnad från två djur, och båda individerna var seronegativa. Inte heller i denna rapport diskuteras diskrepansen mellan resultaten av PCR och serologi.

I en holländsk studie (Opsteegh et al., 2011) var frågeställningen huruvida serologiska tester har ett prediktivt värde för förekomst av vävnadscystor i nötkött. Man använde MC-PCR för att detektera toxoplasma-DNA i hjärtvävnad från 98 djur, och serologiska tester utfördes med hjälp av ELISA och MAT. De två prover som innehöll parasit-DNA var negativa i de serologiska testerna. Man diskuterar de olika resultaten i PCR och serologi och erbjuder möjliga förklaringar som återges i diskussionen nedan.

Antikroppssvar hos nötkreatur

I en serbisk studie från 2006 visade Klun et al. att antikroppstitrarna mot *Toxoplasma gondii* var lägre bland nötkreatur än hos får och svin. Man analyserade sera från över 500 djur av varje art med MAT och över 80 % av de undersökta nötkreaturen hade en titer på 1:50 eller lägre. Den högsta uppmätta titern hos nöt var 1:400, medan titrarna hos svin uppgick till 1:12 800 och hos får 1:25 600. Författarna ser de betydligt lägre titrarna hos nöt som överensstämmande med en experimentell studie av Dubey et al. (1985) som enligt Klun et al. (2006) ska visa på en snabb sänkning av koncentrationen antikroppar hos nötkreatur. Dubey et al. (1985) talar dock om ”the persistence of MAT antibody” och att titern förblir förhöjd flera månader efter infektionstillfället. I denna studie inokulerades sex kalvar och sex kor med 100 (2 kalvar) eller 100 000 oocystor (4 kalvar och samtliga kor). Två kor utvecklade en MAT-titer på 1:25 600, kalvarnas högsta värde var 1:32 000 och samtliga djur hade en titer på minst 1:2 000, vilket visar att nötkreatur kan utveckla höga serotitrar. Samtliga djur avlivades inom 267 dagar från inokulationstillfället och endast två djur hade uppmätt MAT-titrar under 1:100 efter den akuta infektionen. Man fann även att inokulerade kor generellt fick lägre antikroppstitrar än inokulerade kalvar.

Även Opsteegh et al. (2011) fick oväntat liten spridning (dvs generellt låga titrar) i nötpopulationen då man i ovan nämnda studie kvantifierade optical density (OD) i ELISA-testet. Detta tolkade man som att vuxna djur antingen har exponerats så långt tidigare att antikropsproduktionen minskat, eller har uppnått en ålder då en infektion med *Toxoplasma gondii* inte ger en hög antikropsproduktion. Författarna spekulerar om att detta skulle kunna ha att göra med en åldersrelaterad ökning av interferon- γ (IFN- γ), en cytokin som spelar en

central roll i utvecklandet av immunitet mot *Toxoplasma* hos möss och får (Opsteegh et al., 2011). Någon sådan studie på nöt har dock inte erhållits i denna litteratursökning.

DISKUSSION

I alla granskade undersökningar av naturligt exponerade nötkreatur, med avseende på parasitförekomst (påvisade genom bioassay eller PCR), har man funnit en låg prevalens av *Toxoplasma gondii* (0 - 10 %). De flesta av dessa undersökningar har funnit betydligt högre serologisk prevalens och några har även isolerat DNA från parasiten hos seronegativa individer. Nedan diskuteras möjliga förklaringar till dessa skillnader i testresultat.

Metodik

I de flesta undersökningar avseende vävnadscystor har 50-100 g av en kropp som väger flera hundra kg använts för inokulation i katter och möss. Detta är en mycket liten del av djuret, och resultatet skulle lätt kunna bli ett falskt negativt på grund av att fel del av djuret testats. Att storleken på vävnadsprovet kan ha betydelse belyses av Dubey och Thulliez (1993), som utförde bioassay i både katter, som utfodrades med 500 g vävnad, och möss, som injicerades med ett koncentrat av mindre än 100 g vävnad. Medan flera av katterna utsöndrade oocystor visade ingen av mössen några tecken på toxoplasmos, och detta misstänks av författarna bero på en låg koncentration av parasiten i vävnaderna. Sannolikheten att 100 g skulle innehålla vävnadscystor är då inte tillräckligt hög för att vävnaden ska kunna representera hela djuret.

Med undantag för Dubey (2005), som undersökte kött från handeln, har man dock undersökt de organ där vävnadscystor oftast har påvisats och antas finnas i högst densitet: hjärta och hjärna. Dubey och Thulliez konstaterade i sin experimentella studie från 1993 att *Toxoplasma gondii* oftare påträffades i hjärta, tunga och lever än i övriga organ. Det var dock ett litet urval (endast fyra kalvar) som användes i denna studie. Centrala nervsystemet innehöll vävnadscystor i ett av dessa djur, men tycks enligt andra studier vara predilektionsställe för parasiten. Čatár et al. (1969) testade endast diafragma och hjärna, bland annat av ekonomiska skäl, och fann vävnadscystor i hjärnan hos sex av de åtta djur som var positiva. Santos et al. (2010) undersökte både hjärta och hjärna men fann endast parasit-DNA i hjärnan.

Även om man väljer de oftast utsatta organen är det inte säkert att analys av en del av detta organ ger ett korrekt resultat. Det finns alltid en risk för falskt negativa resultat så länge inte hela djuret analyseras. Detta belyser nyttan av en serologisk metod vars resultat korrelerar väl med den reella förekomsten av vävnadscystor. Någon sådan har dock inte beskrivits och validerats för nöt ännu, vilket åskådliggörs i den stora skillnaden mellan seroprevalens och frekvens av påvisade vävnadscystor i Tabell 1. Den undersökning som visat störst korrelation mellan seropositivitet och vävnadscystor är den som utfördes av Čatár et al. (1969). I denna studie använde man CFT och fann vävnadscystor i alla djur som hade en titer från 1:8, men inte i djur med titer upp till 1:2. Detta tyder på en hög korrelation mellan CFT och bioassay, jämfört med de andra serologiska testmetoder som demonstrerats på naturligt exponerade nötkreatur (se Tabell 1). Endast 85 djur har dock testats i denna studie, så en omfattande verifiering skulle behövas för vidare utvärdering av CFT som screening-metod.

Alla PCR-undersökningar har utförts på hjärtmuskulatur, och i en av undersökningarna även hjärnvävnad (Santos et al., 2010). Moré et al. (2008) använde 25-50 µg hjärnvävnad medan Santos et al. (2010) inte anger exakt hur mycket provmaterial som har testats, men det tycks röra sig om en liknande kvantitet. Opsteegh et al. (2011) analyserade hela 100 g per djur med MC-PCR, och alla tre undersökningar fann endast ett fåtal positiva djur. Man kan frestas att tolka dessa resultat som att de båda PCR-metoderna är lika känsliga trots att en betydligt större mängd analyseras vid MC-PCR, men det är endast korrekt om populationerna har samma prevalens av *Toxoplasma gondii*. Eftersom undersökningen av Opsteegh et al. utfördes i Nederländerna medan de övriga utfördes i Sydamerika, kan dock den reella prevalensen mycket väl skilja mellan de olika populationerna.

Korrelation mellan serologi och PCR

I alla de PCR-baserade studierna (Moré et al., 2008; Santos et al., 2010; Opsteegh et al., 2011) har man funnit både seropositiva djur med negativa PCR-resultat och seronegativa djur med positiva PCR-resultat. En förklaring till dessa skillnader i förekomst av parasit-DNA och seroprevalens skulle enligt Opsteegh et al. (2011) kunna vara att detekterbara mängder av *Toxoplasma gondii* bara uppstår i nyligen infekterade djur som inte hunnit utveckla antikroppar mot parasiten. När immunförsvaret aktiveras och antikroppar produceras skulle parasiten enligt denna teori snabbt elimineras (eller kraftigt minska i koncentration) medan antikropparna kvarstår en period, vilket skulle förklara att de seropositiva djuren var negativa enligt PCR.

I äldre studier, som använt bioassay istället för PCR, har inga seronegativa djur med påvisade parasiter rapporterats. En skillnad mellan PCR och bioassay är att PCR detekterar toxoplasma-DNA oavsett om det kommer från en tachyzoit eller en bradyzoit, medan tachyzoiter inte brukar ge något positivt utslag i bioassay (Opsteegh et al., 2011). Detta beror på att tachyzoiter avdödas under en bioassay då de utsätts för magsyra (Jacobs et al., 1960; Opsteegh et al., 2011). Att man endast detekterat *Toxoplasma* i seronegativa djur i samband med PCR-undersökningar stödjer Opsteeghs teori, eftersom tachyzoiter dominerar i början av infektionen (Opsteegh et al., 2011). Tachyzoiter innebär dock ingen relevant risk ur livsmedelssynpunkt eftersom de avdödas av magsyran även hos människor och andra mellanvärdar (Jacobs et al., 1960). Alltså skulle bioassay kunna ge mer relevanta svar avseende infektionsrisk än PCR gör. Man föredrar dock ofta PCR eftersom många möss och katter dör pga bioassay och detta är svårt att försvara etiskt, och det är även dyrt att hålla djur för dessa tester (Opsteegh et al., 2011).

En annan skillnad mellan bioassay och PCR är att PCR detekterar DNA även om parasiten är död (Opsteegh et al., 2011). Parasit-DNA i vävnader hos seronegativa djur skulle alltså istället kunna bero på att DNA från parasiten finns kvar även då antikroppstiter sjunkit efter att parasiten avdödats. En väsentlig fråga blir då om, hur och när parasiten och dess DNA bryts ned och elimineras, samt hur eventuellt kvarvarande DNA skulle påverka immunsystemet. I denna litteraturstudie har inga undersökningar angående detta påträffats. Det har dock föreslagits att en teknik för att detektera mRNA skulle kunna skilja levande organismer från DNA från eventuellt döda organismer (Opsteegh et al., 2011). Som nämnts är inte alla stadier

av parasiten infektiösa via oralt intag, så denna metod skulle fortfarande inte förutse den reella risken att bli infekterad vid konsumtion av köttet i fråga.

Förekomst av vävnadscystor

I olika studier har man dragit slutsatsen att nötkreatur endast hyser låga koncentrationer, om några, av vävnadscystor (Dubey & Thulliez, 1993; Dubey et al., 2005). Endast ett litet antal djur har dock använts i de experimentella undersökningar som försökt kartlägga utvecklingen av vävnadscystor i nötkreatur och oftast har ett enda djur avlivats vid varje tidpunkt, vilket ger stort utrymme för osäkerhet i resultaten. Säkert är dock att man har hittat vävnadscystor i nötkreatur flera år efter inokulering, så risken finns att djur hyser infektiösa stadier av *Toxoplasma* vid slakt.

Efter alla osäkerheter angående påvisande av vävnadscystor tycks nötkreatur fortfarande utveckla en lägre koncentration av vävnadscystor och svara med lägre antikroppstitrar än många andra djurslag. Mycket få artiklar har påträffats angående immunsvaret hos nötkreatur, och detta är förvånande eftersom sådana studier skulle kunna förklara deras framgång i att kontrollera infektionen. Kanske får de helt enkelt en snabbare och/eller effektivare styrning mot ett cellmedierat immunsvaret (som skulle kunna hjälpa till att begränsa replikationen i värdceller) eller fagocyterande celler som enklare övervinner och bryter ned parasiten. Interferon- γ har diskuterats av vissa som en viktig del i immunförsvarets kamp mot parasiten, men jag har inte hittat några bevis för att nötkreatur skulle uttrycka denna cytokin i högre grad än andra djurslag.

Exponering för *Toxoplasma gondii*

Man har visat att nötkreatur kan infekteras genom inokulation med t ex 10 000 oocystor, och även att de kan utveckla höga antikroppstitrar som består i flera månader. Dessa fakta kontrasterar mot de studier som endast funnit låga antikroppstitrar hos nötkreatur utanför den experimentella miljön. Kanske är förklaringen till dessa låga titrar att nötkreatur under naturliga förhållanden kommer i kontakt med parasiten mer sällan än andra djur, eller under andra omständigheter.

Frigående nötkreatur betar inte lågt gräs på marken, utan i första hand höga grässtrån som de kan linda runt sin tunga. Detta borde ge en betydande distans till avföring från katt som lämnas på marken. I inomhussystem finns naturligtvis risken att kattavföring har kontaminerat hö eller halm, och detta skulle kunna ge en helt annan risk hos nötkreatur på stall, jämfört med extensiva uppfödningssystem. Dock talar den kartläggning av riskfaktorer som utförts i Serbien (Klun et al., 2006) mot denna teori, då den lägsta seroprevalensen verkade finnas bland nötkreatur som gick både inomhus och i en cementbelagd hage. I denna miljö antas djuren utfodras med hö och katter borde ha möjlighet att komma in i åtminstone hagen. Däremot nämner Santos et al. (2010) att extensivt uppfödda nötkreatur ska exponeras för oocystor i lägre grad än intensivt uppfödda, vilket skulle kunna stödja teorin om betessätt. Mindre exponering bör ge en lägre seroprevalens. Om serotitrarna dessutom är dosberoende, vilket den experimentella studien av Costa et al. (1977) ger utrymme för, skulle detta också stödja teorin. Detta eftersom de betande nötkreatur som blir infekterade bör få i sig en mindre dos oocystor, vilket skulle kunna ge en lägre antikroppstitrarna. Det kan därför vara intressant att

vidare utforska huruvida utfodringssätt har betydelse för prevalensen av *Toxoplasma gondii* hos nötkreatur. Detta skulle kunna ge en fingervisning om huruvida det är graden av exponering som ger låga antikroppstitrar hos nötkreatur.

Slutsats

Serologi har inte utmärkt sig som en tillförlitlig metod för detektion av *Toxoplasma gondii* hos nötkreatur. Det är även oklart hur infektionen hanteras och huruvida nötkreatur helt eller delvis lyckas eliminera parasiten, eller om den låga prevalensen av vävnadscystor bara beror på dagens testmetoder och deras otillräckliga sensitivitet. Detta gör det ännu svårare att utvärdera riskerna med nötkött för spridning av *T. gondii* till människa, och mer forskning behövs för att ge bra svar.

Den stora frågan är vilken risk det innebär att äta nötkött i form av de vanligaste styckningsdetaljerna. Ett preliminärt svar kan uttolkas ur den undersökning som studerat ett stort antal köttstycken av nöt och erhållit en prevalens på 0 % i bioassay och serologi (Dubey et al., 2005). Den reella prevalensen av infektiösa vävnadscystor verkar alltså vara mycket låg hos nötkreatur, men bättre metoder för att utvärdera mer vävnad skulle behövas för att säkrare uppskatta risken för smitta via intag av nötkött.

REFERENSER

- Čatár, G., Bergendi, L. & Holková, R. (1969). Isolation of *Toxoplasma gondii* from Swine and Cattle. *The Journal of Parasitology*, 55, 952-955.
- Cook, A. J. C., Gilbert, R. E., Buffolano, W., Zufferey, J., Petersen, E., Jenum, P. A., Foulon, W., Semprini, A. E. & Dunn, D. T. (2000). Sources Of *Toxoplasma* Infection In Pregnant Women: European Multicentre Case-Control Study. *British Medical Journal*, 321, 142-147.
- Cost, A. J., Araujo, F. G., Costa, J. O., Lima, J. D. & Nascimento, E. (1977). Experimental Infection of Bovines with Oocysts of *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Parasitology*, 63, 212-218.
- Desmonts, G. & Remington, J. S. (1980). Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection: method for increasing sensitivity and specificity. *Journal of Clinical Microbiology*, 11, 562-568.
- Dubey, J. P. (2001). Oocyst Shedding by Cats Fed Isolated Bradyzoites and Comparison of Infectivity of Bradyzoites of the VEG Strain *Toxoplasma gondii* to Cats and Mice. *Journal of Parasitology*, 87, 215-219.
- Dubey, J. P., Desmonts, G., McDonald, C. & Walls, K. W. (1985). Serologic evaluation of cattle inoculated with *Toxoplasma gondii*: Comparison of Sabin-Feldman dye test and other agglutination tests. *American Journal of Veterinary Research*, 46, 1085-1088.
- Dubey, J. P., Hills, D. E., Jones, J. L., Hightower, A. W., Kirkland, E., Roberts, J. M., Marcet, P. L., Lehmann, T., Vianna, M. C. B., Miska, K., Sreekumar, C., Kwok, O. C. H., Shen, S. K. & Gamble, H. R. (2005). Prevalence of viable *Toxoplasma gondii* in beef, chicken, and pork from retail meat stores in the United States: Risk assessment to consumers. *Journal of Parasitology*, 91, 1082-1093.
- Dubey, J. P., Kotula, A. W., Sharar, A., Andrews, C. D. & Lindsay, D. S. (1990). Effect of High Temperature on Infectivity of *Toxoplasma gondii* Tissue Cysts in Pork. *The Journal of Parasitology*, 76, 201-204.
- Dubey, J. P. & Streitl, R. H. (1976). Prevalence of *Toxoplasma* Infection in Cattle Slaughtered at an Ohio Abattoir. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 169, 1197-1199.
- Dubey, J. P. & Thulliez, P. (1993). Persistence of tissue cysts in edible tissues of cattle fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *American Journal of Veterinary Research*, 54, 270-273.
- Dubey, J. P., Thulliez, P. & Powell, E. C. (1995). *Toxoplasma gondii* in Iowa Sows: Comparison of Antibody Titers to Isolation of *T. gondii* by Bioassays in Mice and Cats. *The Journal of Parasitology*, 81, 48-53.
- Jacobs, L., Remington, J. S. & Melton, M. L. (1960). The Resistance of the Encysted Form of *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Parasitology*, 46, 11-21.
- Klun, I., Djurković-Djaković, O., Katić-Radivojević, S. & Nikolić, A. (2006). Cross-sectional survey on *Toxoplasma gondii* infection in cattle, sheep and pigs in Serbia: Seroprevalence and risk factors. *Veterinary Parasitology*, 135, 121-131.
- Luft, B., Conley, F., Remington, J., Laverdiere, M., Levine, J., Strandberg, D., Wagner, K., Craven, P., File, T., Rice, N. & Meunier-Carpentier, F. (1983). Outbreak of central-nervous-system toxoplasmosis in Western Europe and North America. *The Lancet*, 321, 781-784.

- Moré, G., Basso, W., Bacigalupe, D., Venturini, M. C. & Venturini, L. (2008). Diagnosis of *Sarcocystis cruzi*, *Neospora caninum*, and *Toxoplasma gondii* infections in cattle. *Parasitology Research*, 102, 671-675.
- Opsteegh, M., Teunis, P., Züchner, L., Koets, A., Langelaar, M. & van der Giessen, J. (2011). Low predictive value of seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in cattle for detection of parasite DNA. *International Journal for Parasitology*, 41, 343-354.
- Pappas, G., Roussos, N. & Falagas, M. E. (2009). Toxoplasmosis snapshots: Global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. *International Journal for Parasitology*, 39, 1385-1394.
- Sabin, A. B. & Feldman, H. A. (1948). Dyes as Microchemical Indicators of a New Immunity Phenomenon Affecting a Protozoon Parasite (*Toxoplasma*). *Science*, 108, 660-663.
- Santos, S. L., de Souza Costa, K., Gondim, L. Q., DA SILVA, M. S. A., Uzêda, R. S., Abe-Sandes, K. & Gondim, L. F. P. (2010). Investigation of *Neospora caninum*, *Hammondia sp.*, and *Toxoplasma gondii* in tissues from slaughtered beef cattle in Bahia, Brazil. *Parasitology Research*, 106, 457-461.
- Tizard, I. R. (2009). Immunodiagnostic Techniques. I: *Veterinary Immunology*. 8 uppl. St. Louis, Mo. Saunders Elsevier. Kap. 38