Ocena rozpowszechnienia zarażenia *Toxoplasma gondii* w grupie rasowych kóz mlecznych z hodowli ekologicznej

DAWID JAŃCZAK, MARCIN ŚWIĄTEK*, ŻANETA SZYMAŃSKA*,
ROMAN NIŻNIKOWSKI*, ELŻBIETA GOŁĄB

Zakład Parazytologii, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego-Państwowy Zakład Higieny,
ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa

*Zakład Hodowli Owiec i Kóz, Katedra Szczegółowej Hodowli Zwierząt, Wydział Nauk o Zwierzętach,
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa

Otrzymano 01.06.2017

Zaakceptowano 20.07.2017

Jańczak D., Świątek M., Szymańska Ż., Niżnikowski R., Gołąb E.

Prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in the dairy goat population from an organic farm

Summary

Protozoal infection of *T. gondii* is a public health problem and also causes serious economic losses in livestock production in many countries. Farm animals from organic farms are more likely to be infected. The aim of the study was to determine the prevalence of *Toxoplasma gondii* among 50 dairy goats from an organic farm in the northwestern Poland region and to assess the prevalence of parasite DNA in the milk of infected animals. Serological tests performed by direct agglutination of IgG antibodies against *T. gondii* were positive in 10% of the tested animals. No parasite DNA was detected in the milk from the seropositive goats. However, the number of tested animals was too small to draw significant epidemiological conclusions.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, goats, milk, seroprevalence, nPCR, Poland

Toksoplazmoza jest zoonozą wywołaną przez pasożytniczego pierwotniaka *Toxoplasma gondii*, zdolnego do zarażania stałocieplnych kręgowców, w tym także człowieka (5). Choroba jest problemem dla zdrowia publicznego oraz przyczyną poważnych strat ekonomicznych w produkcji zwierzęcej (1). Żywicielem ostatecznym *T. gondii* są koty, wydalające w trakcie siewstwa oocysty, które w warunkach środowiska zewnętrznego stają się inwazyjne po 3-5 dniach (7). Do wywołania zarażenia zdolne są też wewnątrzkomórkowe formy rozwojowe pasożyta – tachyzoity i bradyzoity – obecne w organizmach żywicieli pośrednich (17).

Zarażenie *T. gondii* występuje często zarówno wśród ludzi, jak i zwierząt (6). Uważa się, że zarażona może być nawet 1/3 populacji światowej ludzi (17). Konsekwencje toksoplazmozy mogą być szczególnie poważne dla kobiet w ciąży i osób z immunosupresją (14). Do czynników ryzyka nabycia toksoplazmozy, oprócz braku zachowania warunków higieny, należy spożywanie nieprzetworzonych termicznie produktów zwierzęcych (6). Jako źródło toksoplazmozy dla człowieka badania wskazują nie tylko mięso czy jego produkty, ale także mleko, w którym mogą znajdować

się tachyzoity (17). W USA spożywanie niepasteryzowanego mleka koziego zidentyfikowano jako czynnik ryzyka nabycia toksoplazmozy przez kobiety ciężarne (13). Z powodu obserwowanego w krajach rozwiniętych ekonomicznie, w tym w Polsce, stałego wzrostu liczby osób wykazujących objawy alergii na składniki mleka krowiego, coraz częściej spożywane są mleko i sery kozie. Niestety, dane piśmiennictwa wskazują, że kozy oprócz owiec należą do najczęściej zarażonych *T. gondii* wśród zwierząt hodowlanych (18). W Polsce informacje na temat rozpowszechnienia toksoplazmozy wśród kóz hodowanych są nieliczne i fragmentaryczne. W 2007 r. wykryto przeciwciała IgG przeciwko *Toxoplasma gondii* w wybranych grupach zwierząt pochodzących z 49 polskich hodowli kóz (4).

Celem badań było określenie rozpowszechnienia *Toxoplasma gondii* wśród kóz hodowlanych w stadzie z województwa kujawsko-pomorskiego oraz ocena częstości występowania DNA pasożyta w mleku zarażonych zwierząt.

Materiał i metody

Zbadano 50 samic kóz w wieku 2-8 lat, rasy polskiej barwnej uszlachetnionej typu użytkowego mlecznego,

utrzymywanych w systemie alkiejowym. Zwierzęta pochodzący z certyfikowanego gospodarstwa ekologicznego w województwie kujawsko-pomorskim, w którym stosowane są mikroorganizmy probiotyczne, sprzyjające poprawie trawienia i naturalnej odporności u zwierząt. Materiał do badań stanowiły próbki krwi i mleka uzyskane od zwierząt w maju 2017 r. Probki krwi o objętości 4 ml pobierano z żyły szyjnej zewnętrznej do jałowych probówek bez antykoagulantu. Probki mleka o objętości 50 ml były pobierane do sterylnych probówek podczas udoju ręcznego. Bezpośrednio po pobraniu próbki przetransportowano w temp. 2-4°C do laboratorium Zakładu Parazytologii NIZP-PZH. Surowicę krwi otrzymywano przez odwirowanie krwi przy 2000 obr/min przez 10 minut, a następnie przechowywano w temperaturze -20°C do czasu wykonania badań serologicznych. 0,2 ml osadu z mleka uzyskanego po odwirowaniu próbek przy 2000 obr/min przez 10 min poddano procedurze izolacji DNA przy użyciu zestawu Tissue Genomic Extraction Mini Kit (GenoPlast Biochemicals), zgodnie z zaleceniami producenta.

W reakcji nested PCR amplifikowano fragment genu B1 *Toxoplasma gondii* wielkości 529 bp, stosując startery zewnętrzne Pml/S1, 5'-TGTTCTGTCCTATCGCAACG-3', Pml/AS1, 5'-ACGGATGCAGTTCCTTTCTG-3' i wewnętrzne Pml/S2, 5'-TCTTCCCAGACGTGGATTTC-3', Pml/AS2, 5'-CTCGACAATACGCTGCTTGA-3' (10, 11). Reakcja amplifikacji przebiegała w 25 µl mieszaniny o składzie: 12,5 µl mieszaniny PCR (GPB Prest Taq 2 × PCR Mix II, GenoPlast Biochemicals), 1,25 µl (5 µM) starterów w stężeniu, 2 µl matrycy DNA. Amplifikację przeprowadzono w termocyklerze MJ Mini™ Personal Thermal Cycler (bio-Rad) według schematu: aktywacja polimerazy w 95°C przez 5 min, a następnie 35 cykli: 95°C/30 sek, 60°C/30 sek, 72°C/60 sek oraz etap elongacji w 72°C przez 10 min. Produkty PCR dodawane do nPCR rozcieńczono 10-krotnie. Detekcję produktów amplifikacji przeprowadzono na drodze elektroforezy w 2% żelu agarozowym (Agarose BioStandard, Prona) z dodatkiem 0,5 µg/ml bromku etydyny (Ethidium bromide solution, BioReagent for molecular biology, 10 mg/mL in H₂O, Sigma) wobec wzorców masowych DNA (GPB 600bp DNA Ladder, GenoPlast Biochemicals).

Badania serologiczne wykonano z użyciem testu aglutynacji bezpośredniej wykrywającym przeciwciała IgG przeciwko *Toxoplasma gondii* w surowicy krwi (Toxo-Screen DA, Biomerieux). Surowice badano w rozcieńczeniu 1 : 20 i 1 : 2000 wg przepisu producenta testu. Do dołków na płycie nakraplano 25 µl surowicy, a następnie 25 µl 2-merkaptetanolu i 50 µl antygenu *T. gondii* szczepu RH rozcieńczonego 5-krotnie w roztworze albuminowym BABS. Płytke poddawano wytrząsaniu, zaklejano i inkubowano w temperaturze pokojowej. Wyniki odczytywano wzrokowo po 5 i 17 godz.

Wyniki i omówienie

W wyniku przeprowadzonych badań serologicznych w 5 (10%) spośród 50 próbek zbadanych surowic wykryto przeciwciała IgG przeciw *Toxoplasma gondii*. W zbadanych próbkach mleka od seropozytywnych zwierząt nie znaleziono DNA *T. gondii*.

Odsetek osobników zarażonych wśród zbadanych kóz był niższy niż stwierdzony przez innych autorów (4, 16, 22). Nieliczne badania przeprowadzone dotychczas w naszym kraju w stadach hodowlanych wykazały 30,2%-100% zarażonych *T. gondii* kóz (4). Natomiast w gospodarstwach domowych w rejonie Lublina wykryto zarażenie u 4 z 7 zbadanych kóz (22). W gospodarstwie z rejonu Olsztyna, w którym u kóz występowały poronienia i zaburzenia rozrodu, odsetek zwierząt zarażonych *T. gondii* wyniósł 61,9% (16). Dotychczas nie opracowano standardów badań laboratoryjnych mleka ssaków w kierunku DNA *T. gondii*. Dostępne w piśmiennictwie wyniki są uzyskiwane w badaniach wykonanych testami „in-house”. Różna metodyka tych badań może wpływać na uzyskiwane wyniki, co uniemożliwia ich porównanie. Według danych zebranych w innych krajach europejskich, odsetek kóz zarażonych *T. gondii* w zależności od regionu waha się w granicach 19-77% (23). We Włoszech badania przesiewowe z początku lat 2000 wykazały obecność przeciwciał klasy IgG u 12,3% kóz, natomiast w badaniach Mancianti i wsp. (15) przeprowadzonych na terenie Toskanii w 2012 r. odsetek zarażonych kóz, wśród 127 zbadanych z 6 farm, był istotnie wyższy i wynosił 60,6%.

W badaniach eksperymentalnych stwierdzono, że zarażone oocystami kozy, które nie wykazywały objawów klinicznych, wydalały z mlekiem żywotne toksoplazmy. W zależności od dawki zakaźnej okres wydalenia pasożyta trwał od 8-13 do 27-30 dni po zarażeniu (8).

Spożywanie niepasteryzowanego mleka koziego może być przyczyną toksoplazmozy u ludzi, na co wskazują doniesienia z różnych krajów. W Stanach Zjednoczonych Ameryki w stanie Tennessee odnotowano śmiertelny przypadek toksoplazmozy wrodzonej, który między innymi powiązano epidemiologicznie z piciem przez kobietę ciężarną mleka zarażonych zwierząt z własnej farmy (18). W Anglii wykryto toksoplazmozę u bliźniąt karmionych mlekiem kóz, z którego udało się wyizolować żywotne *T. gondii* (21). W dostępnym piśmiennictwie znaleziono niewiele wyników badań przesiewowych określających częstość występowania *T. gondii* w mleku kóz zarażonych drogą naturalną. W badaniach własnych nie wykryto DNA pasożyta w próbkach mleka 50 kóz hodowlanych, w tym u 5, u których stwierdzono występowanie przeciwciał IgG przeciwko *T. gondii*. Wynik dodatni w jednej z 29 próbek mleka kóz z Lubelszczyzny uzyskali Cisak i wsp. (2). W innych krajach wykazano obecność DNA *T. gondii* w 6% (1) do 23% zbadanych (18) próbek mleka kóz naturalnie zarażonych. Tak jak w przypadku badań serologicznych, zastosowane w pracach badania molekularne różnią się metodyką. W badaniach próbek mleka na obecność DNA pasożyta wykorzystywano różne techniki badawcze, w tym metody izolacji DNA oraz markery genetyczne *Toxoplasma gondii*. Wobec powyższego rozbieżność

wyników może wynikać nie tylko z uwarunkowań biologicznych, predysponujących niektóre rasy kóz do częstszego zarażenia *T. gondii*, co sugerują niektórzy autorzy (20). W Brazylii stwierdzono, że toksoplazmoza występuje częściej w stadach kóz ras mieszanych i ras egzotycznych (20).

Walsh i wsp. wykazali eksperymentalnie, że w temperaturze 4°C tachyzoity mogą pozostać żywotne w mleku kozim przez 3-7 dni (24). W innych badaniach eksperymentalnych wykazano, że pasożyt może przetrwać enzymatyczny proces wytwarzania sera z mleka koziego (8). Natomiast autorzy badający żywotność toksoplazm w mleku krowim stwierdzili, że ser wytworzony z mleka, do którego dodano wyizolowane cysty, mógł być źródłem *T. gondii* dla myszy w czasie dziesięciodniowego okresu przechowywania w temperaturze 4°C (8, 12).

W wielośrodkowych badaniach kobiet ciężarnych przeprowadzonych w kilku krajach europejskich oceniono, iż 14% przypadków zarażenia *T. gondii* było z dużym prawdopodobieństwem spowodowane spożywaniem niepasteryzowanego mleka i wytworzonych z niego serów (3). Badania przeprowadzone w Egipcie wśród kobiet ciężarnych z grupy o wysokiej seroprewalencji *T. gondii* (67%) wskazały spożywanie niepasteryzowanego mleka kóz i owiec oraz domowych serów długo dojrzewających jako istotny czynnik ryzyka zarażenia *T. gondii* (9).

W badaniach własnych nie wykryto *T. gondii* w mleku zarażonych kóz, jednak liczba tych zwierząt była zbyt mała, aby wysunąć wnioski istotne epidemiologicznie. Natomiast w oparciu o wyniki dostępne w piśmiennictwie światowym należy uznać, że spożywanie surowego mleka i wytworzonych z niego serów stanowi ryzyko nabycia toksoplazmozy, co w świetle wzrastającego zapotrzebowania na mleko kóz jest informacją istotną dla zdrowia publicznego.

Piśmiennictwo

1. Bezerra M. J. G., Kim P. C. P., Moraes E. P. B. X., Sa S. G., Albuquerque P. P. F., Silva J. G., Alves B. H. L. S., Mota R. A.: Detection of *Toxoplasma gondii* in the milk of naturally infected goats in the Northeast of Brazil. *Transboundary Emerg. Dis.* 2015, 62, 421-424.
2. Cisak E., Zajac V., Sroka J., Sawczyn A., Kloc A., Dutkiewicz J., Wójcik-Fatla A.: Presence of pathogenic Rickettsiae and protozoa in samples of raw milk from cows, goats, and sheep. *Foodborne Pathog. Dis.* 2017, 14, 1-6.
3. Cook A. J. C., Gilbert R. E., Buffolano W., Petersen E., Jenum P. A., Foulon W., Semprini A. E., Dunn D. T.: Sources of *Toxoplasma* infection in pregnant women: European multicentre case-control study. *BMJ* 2000, 321, 142-147.
4. Czapowicz M., Kaba J., Szaluś-Jordanow O., Nowicki M., Witkowski L., Frymus T.: Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in goats in Poland. *Vet. Parasitol.* 2011, 178, 339-341.
5. Dubey J. P.: *Toxoplasmosis – a waterborne zoonosis*. *Vet. Parasitol.* 2004, 126, 57-72.
6. Dubey J. P.: *Toxoplasmosis in Animals and Humans*, CRC Press, New York 2010.
7. Dubey J. P., Frenkel J. K.: Cyst – induced toxoplasmosis in cats. *J. Parasitol.* 1972, 19, 155-177.
8. Dubey J. P., Verma S. K., Ferreira L. R., Oliveira S., Cassinelli A. B., Ying Y., Kwok O. C. H., Tuo W., Chiesa O. A., Jones J. L.: Detection and survival of *Toxoplasma gondii* in milk and cheese from experimentally infected goats. *J. Food Protect.* 2014, 77, 1747-1753.
9. El Deeb H. K., Salah-Eldin H., Khodeer S., Allah A. A.: Prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in antenatal population in Menoufia governorate, Egypt. *Acta Trop.* 2012, 124, 185-191.
10. Grigg M. E., Boothroyd J. C.: Rapid identification of virulent type I strains of the protozoan pathogen *Toxoplasma gondii* by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism analysis at the B1 gene. *J. Clin. Microbiol.* 2001, 39, 398-400.
11. Grigg M. E., Ganatra J., Boothroyd J. C., Margolis T. P.: Unusual abundance of atypical strains associated with human ocular toxoplasmosis. *J. Infect. Dis.* 2001, 184, 633-639.
12. Hiramoto R. M., Mayrbaur-Borges M., Galisteo Jr A. J., Meireles L. R., Macre M. S., Andrade Jr H. F.: Infectivity of cysts of the ME-49 *Toxoplasma gondii* strain in bovine milk and homemade cheese. *Rev. Saude Public.* 2001, 35, 113-118.
13. Jones J. L., Dargelas V., Roberts J., Press C., Remington J. S., Montoya J. G.: Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in the United States. *Clin. Infect. Dis.* 2009, 49, 878-884.
14. Karczewski G., Golab E.: Diagnostic problems with congenital toxoplasmosis. *Przegl. Epidemiol.* 2011, 65, 451-454.
15. Mancianti F., Nardoni S., D'Ascenzi C., Pedonese F., Mugnaini L., Franco F., Papini R.: Seroprevalence, detection of DNA in blood and milk, and genotyping of *Toxoplasma gondii* in a goat population in Italy. *BioMed Res. Int.* 2013, Article ID 905326, 1-6.
16. Michalski M., Platt-Samoraj A.: Extent of *Toxoplasma gondii* invasion in goat and sheep from the Olsztyn region. *Med. Weter.* 2004, 60, 70-71.
17. Robert Gangneux F., Darde M. L.: Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 2012, 25, 264-296.
18. Sacks J. J., Roberto R. R., Brooks N. F.: Toxoplasmosis infection associated with raw goat's milk. *JAMA* 1982, 248, 1728-1732.
19. Sadek O. A., Abdel-Hameed Z. M., Kuraa H. M.: Molecular detection of *Toxoplasma gondii* DNA in raw goat and sheep milk with discussion of its public health importance in Assiut Governorate. *Assiut Vet. Med. J.* 2015, 61, 166-177.
20. Silva da J. G., Alves B. H. L. S., Melo R. P. B., Kim P. C. P., Neto O. L. S., Bezerra M. J. G., Sa S. G., Mota R. A.: Occurrence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies and parasite DNA in raw milk of sheep and goats of local breed reared in Northeastern Brazil. *Acta Trop.* 2015, 142, 145-148.
21. Skinner L. J., Timperley A. C., Wightman D., Chatterton J. M., Ho-Yen D. O.: Simultaneous diagnosis of toxoplasmosis in goats and goatowner's family. *Scand. J. Infect. Dis.* 1990, 22, 359-361.
22. Sroka J., Szymańska J.: Analysis of prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in selected rural households in the Lublin region. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 2012, 56, 529-534.
23. Tenter A. M.: *Toxoplasma gondii* in animals used for human consumption. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2009, 104, 364-369.
24. Walsh C. P., Hammond S. E., Zajac A. M., Lindsay D. S.: Survival of *Toxoplasma gondii* tachyzoites in goat milk: potential source of human toxoplasmosis. *J. Eukaryot. Microbiol.* 1999, 46, 73S-74S.

Adres autora: lek. wet. Dawid Jańczak, ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa; e-mail: djanczak@pzh.gov.pl