

Zeitschrift: Schweizer Archiv für Tierheilkunde SAT : die Fachzeitschrift für Tierärztinnen und Tierärzte = Archives Suisses de Médecine Vétérinaire
ASMV : la revue professionnelle des vétérinaires

Herausgeber: Gesellschaft Schweizer Tierärztinnen und Tierärzte

Band: 142 (2000)

Heft: 3

Artikel: Untersuchungen zum Vorkommen von Toxoplasma gondii und Neospora caninum unter fleischhygienischen Aspekten

Autor: Wyss, R. / Sager, H. / Müller, N.

DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-590222>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. [Siehe Rechtliche Hinweise.](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. [Voir Informations légales.](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. [See Legal notice.](#)

Download PDF: 30.03.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>

Untersuchungen zum Vorkommen von *Toxoplasma gondii* und *Neospora caninum* unter fleischhygienischen Aspekten

Institut für Parasitologie der Universität Bern¹, Schlachthof Bern², Amt für Fleischuntersuchung, Courtepin³, Institut für Viruskrankheiten und Immunprophylaxe, Mittelhäusern⁴
R. Wyss¹, H. Sager¹, N. Müller¹, F. Inderbitzin², M. König³, L. Audigé⁴, B. Gottstein¹

Zusammenfassung

Die beiden Protozoen *Toxoplasma gondii* und *Neospora caninum* sind phänotypisch und phylogenetisch nahe verwandte zystenbildende Kokzidien, welche Aborte bei verschiedenen Tierarten auslösen können. Die durch *T. gondii* verursachte *Toxoplasmose* stellt zudem eine Zoonose dar, die beim Menschen insbesondere im Rahmen konataler Infektionen und Infektionsabläufe bei immungeschwächten Personen von Bedeutung sein kann. Da sich der Mensch u.a. über den Verzehr von *Toxoplasma*-zystenhaltigem Fleisch infizieren kann, ist es wichtig, die Prävalenz des Parasiten in Schlachttieren zu kennen. Obwohl *N. caninum* ein zoonotisches Potential abgesprochen wird, ist der Parasit wegen seiner grossen wirtschaftlichen Bedeutung in der Rinderzucht in die vorliegende Studie miteinbezogen worden. Um die Prävalenzen der beiden Kokzidienarten zu eruieren, wurden Muskel- und Gehirnprouben von Rindern, Schafen, Pferden und Schweinen mittels PCR untersucht. Zusätzlich wurden die Seren der untersuchten Tiere im *Toxoplasma*-P30-ELISA und im *Neospora*-SA-ELISA geprüft. Die für *T. gondii* mittels PCR eruierten Prävalenzen waren bei allen untersuchten Schlachttierarten tief: Kühe 3%, Mastbullen 2%, Jungrinder 6%, Kälber 1%, Schafe 6%, Pferde und Schweine je 0%. Die Prävalenz von *Neospora* betrug bei den Kühen 2%, bei allen anderen Tiergruppen 0%. Die erhaltenen Seroprävalenzen, die auch ältere Infektionsabläufe mit potentieller Eliminierung der Parasiten widerspiegeln können, waren für beide Parasitenarten deutlich höher, mit Ausnahme der Mastschweine. Da der Nachweis von Toxoplasmen grundsätzlich im Rind-, Kalb- und Schaffleisch gelang, müssen wir davon ausgehen, dass beim Verzehr dieser Fleischarten ein potentielles Infektionsrisiko bestehen kann. Im Gegensatz dazu scheint Pferdefleisch sowie Fleisch von Mastschweinen i.d.R. frei von *T. gondii* zu sein und so ein geringes bzw. vernachlässigbares Infektionspotential darzustellen.

Schlüsselwörter: *Toxoplasma gondii* – *Neospora caninum* – Rind – Schaf – Pferd – Schwein – PCR – ELISA

Distribution of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* under aspects of meat hygiene

Toxoplasma gondii and *Neospora caninum* are phenotypically and phylogenetically closely related cyst-forming coccidia, both of which may cause abortion in livestock animals. *T. gondii* exhibits also zoonotic potential by causing diaplacental infections in the human fetus and harmful infections in immunosuppressed individuals. Humans get infected either by consuming inappropriately prepared cyst-containing meat or by ingesting oocysts originating from cat feces. Therefore, in order to assess infection risk we need to have knowledge on the prevalence of the parasite in consumable meat and thus slaughtered animals. So far, no data indicate any zoonotic potential for *N. caninum*. Due to its high economic impact in the bovine production in Switzerland, we included this parasite in the present study as well. The prevalence of both parasite species were investigated by PCR in muscle and brain samples of slaughtered bovines, sheep, pigs and horses. Comparatively, a serum sample from each animal was simultaneously tested serologically by a *Toxoplasma*-P30-ELISA and a *Neospora*-SA-ELISA. The prevalences determined by the *T. gondii*-PCR were the followings: adult cows 3%, young bulls 2%, young cows prior to gravidity 6%, calves 1%, sheep 6%, horses and pigs each 0%. For *N. caninum*, the PCR-prevalence was 2% for adult cows and 0% for all other animal groups. Conversely, the seroprevalences were much higher for both parasite species and all animal groups, with the exception of the fattening pigs. However, as *T. gondii* was principally detectable in bovine (cows and calves) as well as in sheep meat, the consumption of this meat harbours a potential infection risk for humans. In contrast, the lack of any parasite detectability in fattening pig and horse meat allows to consider this infection source as neglectable when compared to bovine and ovine meat.

Keywords: *Toxoplasma gondii* – *Neospora caninum* – cattle – sheep – horse – pig – PCR – ELISA

Einleitung

Toxoplasma gondii ist ein weltweit verbreitetes, im Dünndarm der Endwirte parasitierendes Kokzidium. Das Spektrum der Zwischenwirte ist bedeutend grösser. Neben einigen Vogelarten finden sich Stadien des Protozoons hauptsächlich in den meisten Säugetierarten und dem Menschen. Die Toxoplasmose ist folglich eine Zoonose, die für Mensch und Tier von medizinischer und/oder ökonomischer Bedeutung ist.

Nach Artikel 2 der Lebensmittelverordnung (LMV) vom 1. März 1995 dürfen Nahrungsmittel Stoffe und Organismen nur in Mengen enthalten, welche die menschliche Gesundheit nicht gefährden können. Fleisch von Schlachttieren, welches Gewebezysten von *T. gondii* enthält, kann eine wichtige Infektionsquelle für den Konsumenten sein (Gottstein, 1995). Eine Infektion mit *T. gondii* kann unter bestimmten Umständen zu einer schwerwiegend verlaufenden Toxoplasmose führen. Da chronisch infizierte Tiere i.d.R. keine pathologisch-anatomischen Veränderungen aufweisen, können sie bei der Fleischkontrolle nicht erkannt werden, womit der oben erwähnte Grundsatz für diesen Parasiten nicht eingehalten werden kann. Um das Gefährdungspotential mit Toxoplasmen abschätzen zu können, ist es wichtig, den Durchseuchungsgrad in der Schlachttierpopulation zu kennen.

In den meisten bisherigen Studien zur Ermittlung der *Toxoplasma*-Prävalenz wurden serologische Verfahren eingesetzt, mit denen sich zwar die Expositionsextensität ermitteln liess, nicht jedoch der Anteil von Tieren, die *Toxoplasma*-Parasiten beherbergen. Als Beispiel sei eine Arbeit aus dem Jahre 1967 erwähnt, bei der 400 Schlachtschweine aus der Ostschweiz mit dem Sabin-Feldman-Test (SFT) serologisch untersucht wurden, wovon 55% einen positiven Titer aufwiesen (Wiesmann, 1967). Weisstanner (1969) untersuchte 105 Schlachtschweine serologisch und prüfte deren Zwerchfellproben im Tierversuch auf das Vorkommen von Toxoplasmen. Die Serologie war bei 62% der Tiere positiv, die Erregerisolierung gelang aber nur bei 12% der serologisch positiven Schweine. In verschiedenen Regionen der Schweiz führte Erb (1986) Untersuchungen durch, um Vergleiche zwischen der Serologie (indirekte Immunfluoreszenz, IFAT) und dem Zystennachweis im Fleisch (Immunhistochemie) anzustellen: Von 100 untersuchten Schweinen waren 17% seropositiv, davon wiederum 20% nachgewiesene Toxoplasmenträger. Bei 100 Rindern erwiesen sich 36% als serologisch positiv und davon 5% auch als positiv in der Immunhistochemie. Zu bemerken bleibt, dass die Autoren keine Angaben zur Spezifität ihrer Immunhistologie lieferten, was

im Hinblick auf das relativ häufige Vorkommen von *Sarcocystis* und *Neospora* beim Rind wichtig gewesen wäre. Von 91 untersuchten Schafen waren 23% seropositiv, davon 35% nachgewiesene Parasitenträger. Die Untersuchung von 20 Pferden identifizierte 50% als seropositiv, wovon 55% sich als Gewebezysten Träger nachweisen liessen.

Arbeiten aus anderen Ländern wiesen – im Vergleich zu früheren Jahren – einen vergleichbar kleineren Prozentsatz positiver Schweine auf, was auf eine verbesserte Hygiene in den Schweinebeständen zurückgeführt werden könnte (Edelhofer, 1994). Beim Rind gelang der Erregernachweis in den meisten Fällen nicht (Boch et al., 1965; Doby und Deunff, 1984; Dubey, 1976). Boch (1980) bezeichnete deshalb das Rind als irrelevante Infektionsquelle für den Menschen. Direkte Parasitenisolierungen erbrachten beim Schaf oft einen recht grossen Anteil an Zystenträgern, so z.B. bei Work (1967), der eine Seroprävalenz von 58% dokumentierte, wobei ihm anschliessend der Erregernachweis bei 20% der seropositiven Schafe gelang. Über *T. gondii* beim Pferd liegen nur spärliche Daten vor (Al-Khalidi und Dubey, 1979).

Rommel et al. (1982) verfütterten Muskulatur von 1260 Kühen an Katzen und konnten darauf den Parasiten bei keinem ihrer Versuchstiere nachweisen. Im Gegensatz dazu gelang der Nachweis von *T. gondii*-DNA bei Rinderfeten im Rahmen einer kürzlich veröffentlichten Abortstudie (Gottstein et al., 1999).

Neospora caninum gilt als wichtiger Abortverursacher beim Rind. Untersuchungen in der Schweiz zeigten, dass *Neospora*-DNA bei 29% von 89 untersuchten, abortierten Rinderfeten im Hirn nachgewiesen werden konnte, wobei der *Neospora*-Nachweis in den meisten Fällen mit den entsprechenden pathologischen Veränderungen des ZNS einherging (Gottstein et al., 1998). Bezüglich des Vorkommens von *N. caninum* beim Schaf, Pferd und Schwein liegen bisher noch praktisch keine Daten vor. Der Mensch ist nach heutigem Wissensstand für die Infektion nicht empfänglich. So konnte der Parasit bei der Untersuchung von Aborten in Schweden (Petersen et al., 1999) und bei Aids-Patienten mit Verdacht auf eine zerebrale Toxoplasmose, jedoch mit negativen immunhistochemischen *Toxoplasma*-Testergebnissen (Gottstein und Müller, unpublizierte Daten), nicht nachgewiesen werden. Allerdings verlief eine experimentelle Infektion bei Primaten erfolgreich und mündete in eine diaplazentäre Passage des Parasiten (Ho et al., 1997).

Zur Diagnose der Toxoplasmose und der Neosporose können serologische, histologische/immunhistochemische oder (molekular)-biologische Methoden sowie tierexperimentelle Verfahren (z.B.

Katzenfütterungstest) eingesetzt werden. Zum Nachweis von *Toxoplasma*-DNA mittels PCR wird z.Z. von den meisten diagnostisch tätigen Labors eine von Bretagne et al. (1993) entwickelte PCR eingesetzt, die auf der Amplifikation des spezifischen B1-Genes beruht. Für den Nachweis von *Neospora*-DNA hat sich die von Müller et al. (1996) entwickelte PCR bewährt (Gottstein et al., 1998). Serologisch werden für beide Parasiten diverse artspezifische Tests angeboten (für *T. gondii*: Carmichael, 1975; Ljungstrom et al., 1994; Zhang et al., 1995; Björkman und Lunden, 1998; Redlich und Muller, 1998; Gottstein et al., 1998; für *N. caninum*: Björkman et al., 1994; Gottstein et al., 1998).

Im Rahmen der oben aufgeführten Problematik von Konsumfleisch als potentielle Infektionsquelle für den Menschen setzten wir uns zum Ziel, die Prävalenzen von *T. gondii* im Fleisch von Schlachttieren sowie deren Beziehung zur Seropositivität zu bestimmen. Zur Feststellung des Durchseuchungsgrades verwendeten wir primär die PCR, die den direkten Parasiten-DNA-Nachweis im Untersuchungsgut ermöglicht, und sekundär serologische Verfahren. Ein weiterer wichtiger Aspekt der Arbeit war zudem die Erprobung der Praxistauglichkeit der eingesetzten PCRs.

Tiere, Material und Methoden

Proben, Probenentnahme und Stichprobenumfang

Untersuchungsmaterial wurde von Schlachttieren gesammelt, die von den Schlachthöfen der Stadt Bern (Prof. Dr. F. Inderbitzin) und der Micarna Courtepin (Dr. M. König) sowie für die Pferde von der Metzgerei Horisberger in Burgdorf und dem Tierspital Bern zur Verfügung gestellt wurden.

In der vorliegenden Studie wurden Blut-, Gehirn- und Muskelproben von Kühen/Rindern/Jungbullen/Kälbern, Pferden, Schafen/Lämmern sowie von Mast- und Mutterschweinen untersucht.

Zur Bestimmung des Stichprobenumfangs wurde für jede Tierart aufgrund von Literaturdaten eine mittlere angenommene Befallsextenstivität (Parasitennachweis) errechnet, wobei das Schwergewicht der dafür berücksichtigten Publikationen auf bereits vorliegende Daten aus der Schweiz gelegt wurde. Grundlagen für die weiteren Berechnungen waren die folgenden: Schwein 4%, Rind 2%, Schaf 11%, Pferd 12%. Diese Daten wurden mit dem Softwarepaket EpiInfo® zur Berechnung unserer Stichprobenumfänge (für eine Messpräzision von 95%, ohne Berücksichtigung eines potentiellen Cluster-Effektes) eingesetzt (genaue Stichprobenumfänge siehe «Resultate»). Bei den Kühen, Kälbern, weiblichen Junggrindern und Pferden stamm-

ten sämtliche Tiere aus verschiedenen Betrieben. Bei den Jungbullen stammten maximal neun, bei den Schafen/Lämmern maximal zwei sowie bei den Mast- und Mutterschweinen maximal fünf Tiere aus demselben Betrieb.

Für jede Tierart wurden pro Schlachtkörper ca. 10 ml Vollblut direkt beim Entbluten entnommen. Das anschliessend gewonnene Serum wurde bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

Am Ende der Schlachtkette wurden am abgetrennten Kopf des – der jeweiligen Blutprobe entsprechenden – Tieres mit einer (für jede Probe) neuen Einweg-Skalpellklinge zwei Muskelstücke aus dem Masseter entnommen. Die beiden Muskelstücke wurden je in Plastikbehälter verschlossen. Einer der Plastikbehälter war mit gepuffertem Formalin (4%) versetzt und wurde bei 4 °C eingelagert. Der andere Behälter wurde ohne Zusatz bei -20 °C bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren.

Eine Gehirnprobe pro Tier wurde mittels eines scharfen Löffels (Provet, Lyssach) durch das *Foramen occipitale* entnommen. Für jedes Hirn wurde ein separater Löffel verwendet. Zur Verminderung der Kontaminationsgefahr mit DNA wurden die Löffel jeweils nach der Probenentnahme gut gewaschen und über dem Bunsenbrenner bis zur Rotglut erhitzt. Die ZNS-Proben wurden ebenfalls sowohl in Formalin bei 4 °C als auch nativ bei -20 °C gelagert.

Für eine weiterführende Untersuchung der Seroprävalenz der Toxoplasmose beim Schwein stand uns die im Rahmen des Schwein'99-Projektes (Huber et al., zur Publ. eingereicht; Audigé et al., zur Publ. eingereicht) erarbeitete Serothek von Mutter- und Mastschweinen zur Verfügung. Hierbei handelte es sich um Seren von 1689 Mutterschweinen (aus 82 Zuchtbetrieben stammend; mittlere Anzahl Tiere pro Betrieb: 19; S.D. 2.3) sowie 2249 Seren von Mastschweinen (aus 117 Mastbetrieben stammend; mittlere Anzahl Tiere pro Betrieb: 21; S.D. 7.9).

DNA-Aufarbeitung für PCR

Die DNA-Extraktion aus den Gewebeproben erfolgte mittels des *High Pure-PCR-Template Preparation Kit* der Firma Boehringer Mannheim (Mannheim, Deutschland). Das Protokoll der Hersteller wurde für unsere Zwecke leicht modifiziert. Die angetauten Gewebeproben wurden mit einem Skalpell zerkleinert. Davon wurde ein Volumen von 0.2–0.3 ml mittels 40 µl Proteinase K-Lösung (90 mg Proteinase K in 4.5 ml H₂O) in Gegenwart eines Lysispuffers (4 M Harnstoff, 200 mM Tris, 100 mM NaCl, 200 mM EDTA, pH 7.4) bei 37 °C über Nacht verdaut. Danach wurden 200 µl Bindungspuffer (6M Guanidinium-HCl, 10 mM Harnstoff,

10mM Tris-HCl, 20% Triton® X-100 v/v, pH 4.4) zugegeben und während 10 Minuten bei 72 °C inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl Isopropanol wurden 500 µl des Gemisches zur Bindung der DNA in Säulen mit Glasfaservlies pipettiert und bei 8000 rpm während zwei Minuten und bei 14000 rpm während zehn Sekunden in einer Eppendorfzentrifuge (Model 5415 C) sedimentiert. Danach wurden die Proben zweimal mit je 500 µl Waschlösung (20 mM NaCl, 2mM Tris-HCl, pH 7.5 in 80 ml Ethanol p.A.) gewaschen. Zur Elution der DNA wurde zweimal je 100 µl Elutionspuffer (10 mM Tris, pH 8.5; auf 72°C vorgewärmt) zugegeben und jeweils während einer Minute bei 8000 rpm zentrifugiert. Zum Denaturieren der DNA wurden die Proben während fünf Minuten bei 95 °C erhitzt und anschliessend bis zur Verwendung in der PCR bei -20 °C eingefroren.

PCR

Grundsätzlich verwendeten wir die bereits früher (Gottstein et al., 1999) beschriebene PCR zum Nachweis von *Toxoplasma*- und *Neospora*-DNA. Bei dieser PCR kommt das UDG-System (Uracil-DNA-Glycosylase) zur Verhinderung falsch positiver Resultate, die durch *carry-over* Kontaminationen vorangegangener PCR's entstehen können, zum Einsatz (Müller et al., 1996). Probenaufarbeitung, Pipettieren des Reaktionsgemisches und Analyse der PCR-Produkte wurden räumlich strikt getrennt. Die Amplifikationsprodukte der *T.gondii*-PCR wurden auf 3% Agarosegelen (NuSieve® 3:1 Agarose) aufgetrennt. Die Amplifikationsprodukte der *Neospora*-PCR wurden auf 2% Agarosegelen (SeaKem® GTG® Agarose) analysiert.

Als zusätzliche Methode zur Analyse der PCR-Produkte kam ein DNA *Hybridization Immunoassay* (DIA) zum Einsatz, der sich durch erhöhte Spezifität gegenüber dem Gel auszeichnete (Müller et al., 1996). Der DIA wurde dann eingesetzt, wenn im initialen PCR-Produkt-Nachweistest (Gelelektrophorese) entweder DNA-Produkte im erwarteten Grössenbereich oder auch Produkte anderer Grössen nachgewiesen worden waren. Dazu wurde der Gen-eti-k DEIA kit (Sorin Biomedica, Saluggia, Italien) nach dem Protokoll des Herstellers unter genauer Berücksichtigung der von Müller et al. (1996) beschriebenen Modifikationen eingesetzt. Die Durchführung des DIA sowie die Messung und Interpretation der Ergebnisse erfolgten gemäss früheren Berichten (Gottstein et al., 1999).

Serologie

Die Untersuchung der Seren auf *T.gondii*-Antikörper erfolgte mittels eines *Toxoplasma*-P30-ELISA

(ELISA-Platten beschichtet mit affinitätsgereinigtem P30 Oberflächenantigen, SR2B, Arville, F). Sämtliche ELISA-Schritte erfolgten gemäss einer bereits früher publizierten ELISA-Methode (Gottstein et al., 1998). Konjugate waren für den Rinder-ELISA ein mit alkalischer Phosphatase (AP)-konjugierter Kaninchen-anti-Rind-IgG-Antikörper (Sigma Immunochem., Cat.Nr. A0705), für die Pferde ein AP-konjugierter Ziegen-anti-Pferd-IgG-Antikörper (Kirkegaard-Perry-Lab. USA, Lot. Nr. UK030), für die Schafe ein AP-konjugiertes Esel-anti-Schaf IgG (Sigma Immunochem., Cat. Nr. A5187) und für die Schweine ein AP-konjugierter Kaninchen-anti-Schwein-IgG-Antikörper (Sigma, cat. Nr. A1192). Die Absorption wurde photometrisch bei 404 nm abgelesen. Als Nullwert (*cut-off*) für den *Toxoplasma*-P30-ELISA wurde der A_{404nm} -Mittelwert von 100 «negativen» Kontrollseren plus drei Standardabweichungen genommen. A_{404nm} -Werte über dem *cut-off* wurden als positiv, A_{404nm} -Werte darunter als negativ gewertet. Die Selektion negativer Kontrollseren erfolgte aufgrund einer Voruntersuchung mittels indirektem Fluoreszenzantikörpertest (IFAT) und ELISA, wobei die Seren in beiden Tests keine Antikörperbindungsaktivität aufweisen durften.

Für die Untersuchung der Seren auf Antikörper von *N. caninum* wurde der von Gottstein et al. (1998) beschriebene *Neospora*-SA-ELISA verwendet. Dabei basierte das Antigen, das für die Beschichtung der ELISA-Platten eingesetzt wurde, auf einem Rohextrakt von Tachyzoiten aus einer Zellkultur. Als Konjugate kamen die oben für den *Toxoplasma*-P30-ELISA beschriebenen Reagentien zum Einsatz. Die *cut-off*-Berechnungen erfolgten grundsätzlich gleich wie beim *Toxoplasma*-P30-ELISA.

Die positiven und negativen Kontrollseren für die Rinder-ELISAs (*Toxoplasma* und *Neospora*) wurden aus der Serothek des Institutes für Parasitologie der Universität Bern zusammengestellt. Bei den *Neospora*-Seren handelte es sich um Seren aus experimentell infizierten Rindern aus einer früheren Studie (Gottstein et al., 1999), wobei das Präinfektionsserum die negative, das Postinfektionsserum die positive Kontrolle darstellten. Die *Toxoplasma*-Seren, die aus der Instituts-eigenen Serothek stammten, waren vorgängig gegenüber Referenzseren, die aus experimentell infizierten Rindern stammten (Geschenk von Dr. D. Buxton, Edinburgh), geeicht worden. Für die Schafe wurden uns die *Toxoplasma*-Positivkontrollen sowie die *Toxoplasma*- und *Neospora*-Negativkontrollen vom Institut für Parasitologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover (PD Dr. A. Tenter) zur Verfügung gestellt (die Seren stammten alle von experimentell infizierten Tieren). Ein *Neospora*-positives Schafse-

rum erhielten wir von einem experimentell infizierten Schaf aus den USA (Dr. M. McAllister, Urbana). Für den Pferde-*Toxoplasma*-ELISA konnten wir auf Kontrollseren von Dr. J.P. Dubey zurückgreifen (Dubey, 1987). Um ein *Neospora*-positives Pferdeserum zu erhalten, wurde an unserem Institut ein Pferd mittels durch Tiefgefrieren abgetötete *Neospora*-Tachyzoiten hyperimmunisiert. Pro Injektionsdosis wurden 10⁷ gereinigte (Gottstein et al., 1998) *Neospora*-Tachyzoiten in 1.0 ml PBS suspendiert und mit 1.0 ml Aluminiumhydroxyd (Sigma Chem. Co.) vermischt. Es erfolgten drei Injektionen im Abstand von je drei Wochen, die Verabreichung war s.c. am Hals. Als negatives Kontrollserum verwendeten wir das Präimmunsrum desselben Pferdes. Die Kontrollseren für den Schweine-*Toxoplasma*-ELISA wurden uns von Dr. P. Lind (Kopenhagen, Dänemark) überlassen, die Seren waren bereits in einer früheren Studie eingesetzt und dementsprechend validiert worden (Lind, et al., 1997). Dr. J.P. Dubey überliess uns die Schweine-Kontrollseren für den *Neospora*-SA-ELISA, auch diese Seren stammten von experimentellen Infektionen ab.

Histologische und immunhistochemische Untersuchungsmethoden

Von den in 4%-Formalin fixierten Proben wurden am Institut für Tierpathologie der Universität Bern Schnitte für histologische Untersuchung angefertigt (Pro Organprobe fünf Schnitte aus verschiedenen Regionen). Paraffinschnitte wurden Hämatoxylin-Eosin gefärbt und unter dem Mikroskop nach Läsionen untersucht, welche von protozoären Erregern stammen könnten.

Histologisch nachgewiesene *Toxoplasma*-Gewebezysten wurden mit entsprechenden Paraffinschnitten nach der von Fuchs et al. (1998) beschriebenen Methode nachträglich immunhistologisch untersucht. Dazu wurde das Paraffin zuerst mit Xylol von den Objektträgern entfernt. Anschliessend wurden die Schnitte während je fünf Minuten schrittweise mit 100%, 90%, 70%, 50% und 30% Methanol rehydriert, mit dest. Wasser gewaschen und während zehn Minuten in PBS (pH 7.5) inkubiert. Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wurden

die Objektträger danach mit 100 µl Blockpuffer (PBS; 1.5% bovines Serumalbumin; Glycin 50 mM) beschichtet und während zwei Stunden in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach einem Waschschritt mit PBS erfolgte eine Inkubation mit dem ersten, *Toxoplasma*- oder *Neospora*-spezifischen Antikörper (Kaninchen-anti-*Toxoplasma*- oder anti-*Neospora*-Serum, in Blockpuffer 1:200 verdünnt; Hemphill et al., 1996; Gottstein et al., 1999) während einer Stunde. Danach wurde erneut mit PBS gewaschen und die Proben mit dem zweiten Antikörper (Ziege anti-Kaninchen-FITC) während 45 Minuten inkubiert. Nach einem weiteren Waschvorgang erfolgte eine DNA-Färbung mit Hoechst 23558 (1:400 in PBS) während zwei bis drei Minuten. Die Proben wurden erneut gewaschen und anschliessend mit Fluoprep (Bio Merieux AG, Genf) eingebettet. Die Beurteilung der Schnitte erfolgte mittels eines Leitz Laborlux S Immunfluoreszenzmikroskops.

Statistische Berechnung

Die 95% Konfidenz-Intervalle wurden mit dem Softwarepaket Stata 5.0 (Stata Corporation, Texas, USA) berechnet.

Resultate

Kühe

Von 100 untersuchten Kühen waren drei Tiere in der *T. gondii*-PCR positiv. Bei zwei Tieren konnte Parasiten-DNA im Gehirn nachgewiesen werden, beim dritten in der Massetermuskulatur. Das Alter der drei PCR-positiven Tiere war vier, fünf und 14 Jahre. Bei 32 Kühe war eine positive anti-*Toxoplasma*-Antikörperreaktion nachweisbar, darunter waren keine der PCR-positiven Tiere. Die *Neospora*-PCR ermöglichte den DNA-Nachweis bei einer vier- und einer siebenjährigen Kuh, wobei bei einem Tier die Gehirnprobe sowie bei einem anderen Tier die Muskelprobe positiv waren. Im *Neospora*-SA-ELISA wiesen sieben Tiere eine positive Antikörperreaktion auf (Tab. 3), wobei keines dieser Tiere in der *N. caninum*-PCR positiv war. Drei der untersuchten Seren waren gleichzeitig im

Tabelle 1: Ausgewählte *Toxoplasma*-PCR-positiv Fälle aus der ersten 1. Testserie zur Untersuchung weiterer Muskelproben bezüglich Grobverteilungshäufigkeit im Masseter. Abkürzungen: WAS = Weisses Alpenschaf; SB = Schwarz-braunes Fleischschaf. A-E: Proben von fünf verschiedenen Stellen im Masseter.

Nr.	Alter	Geschl.	Rasse	Muskel		ZNS		A	B	C	D	E
				Toxo	Neo	Toxo	Neo					
1392	Adult	weibl.	WAS	+	-	+	-	+	+	-	-	+
1394	Adult	weibl.	WAS	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1406	Lamm	männl.	SB	+	-	+	-	+	+	+	+	+
1410	Lamm	weibl.	WAS	+	-	-	-	+	+	+	-	+

Toxoplasma-P30-ELISA und im *Neospora*-SA-ELISA positiv.

Weibliche Jungrinder («Gusti»)

In dieser Altersgruppe (14–30 Monate alt) waren die Gehirne von drei aus 50 untersuchten Rindern *Toxoplasma*-PCR positiv. Bei 16 Seren konnte im *Toxoplasma*-P30-ELISA eine positive Antikörper-

reaktion nachgewiesen werden, dabei stammten zwei Seren aus der Gruppe der drei PCR-positiven Tiere. Bei allen 50 Tieren ergaben sowohl *Neospora*-PCR als auch *Neospora*-SA-ELISA negative Ergebnisse.

Jungbullen («Mastmuni»)

In zwei Muskelproben von 100 untersuchten Mastbullen (12–15 Monate alte Tiere) konnten Amplifikationsprodukte von *T. gondii* nachgewiesen werden. Beide Bullen stammten, zusammen mit sieben weiteren, negativ getesteten Tieren, aus demselben Mastbetrieb. Bei 21 Seren konnte eine anti-*Toxoplasma*-Antikörperreaktion nachgewiesen werden, wobei alle dazugehörenden Tiere in der PCR negativ waren. Von den Seren der sieben oben erwähnten Mastbullen reagierte eines seropositiv im *Toxoplasma*-P30-ELISA. Der Nachweis von *N. caninum*-DNA gelang bei keinem der 100 Tiere. *Neospora*-seropositiv war nur eines der 100 untersuchten Seren.

Tabelle 2: Verteilung von *T. gondii* in zusätzlichen ZNS-Proben von zwei ausgewählten zerebralen *Toxoplasma*-PCR-positiven Fällen der initialen Testserie. L: Linke Hirnhälfte, R: rechte Hirnhälfte.

Toxoplasma-PCR/ZNS (6 verschiedene Stellen pro Hirnhälfte)			
Tier-Nr.		1392	1406
Medulla oblongata	L1	–	+
Cerebellum	L2	–	–
Cerebellum	L3	–	–
Hirnstamm	L4	–	+
Grosshirn	L5	–	+
Grosshirn	L6	–	+
Medulla oblongata	R1	–	–
Cerebellum	R2	–	–
Cerebellum	R3	–	+
Hirnstamm	R4	–	+
Grosshirn	R5	–	–
Grosshirn	R6	–	+

Kälber

Von 100 untersuchten Kälbern (Schlachtalter 3–5 Monate) konnte in der Muskelprobe eines Tieres *T.*

Tabelle 3: Häufigkeiten des *Toxoplasma*- und *Neospora*-Nachweises (DNA-Nachweise mittels PCR und Antikörpernachweis mittels ELISA). Gruppen mit positiven Testergebnissen sind fettgedruckt.

	positive Tiere (in %)		95%-Konfidenz-Intervall
Kühe (n = 100)	Toxoplasma-PCR positiv	3%	0.6–8.5%
	Neospora-PCR positiv	2%	0.2–7%
	Toxoplasma-Seropositiv	32%	23–42%
	Neospora-Seropositiv	7%	2.8–13.8%
Jungrinder («Gusti») (n = 50)	Toxoplasma-PCR positiv	6%	1.2%–16.5%
	Neospora-PCR positiv	0	
	Toxoplasma-Seropositiv	32%	19.5–46.6%
	Neospora-Seropositiv	0	
Jungbullen («Mastmuni») (n = 100)	Toxoplasma-PCR positiv	2%	0.2–7%
	Neospora-PCR positiv	0	
	Toxoplasma-Seropositiv	21%	13.5–30.3%
	Neospora-Seropositiv	1%	0.03%–5.3%
Kälber (n = 100)	Toxoplasma-PCR positiv	1%	0.03%–5.3%
	Neospora-PCR positiv	0	
	Toxoplasma-Seropositiv	4%	1.1–9.9%
	Neospora-Seropositiv	7%	2.8–13.8%
Schafe (n = 150)	Toxoplasma-PCR positiv	6%	2.8–11%
	Neospora-PCR positiv	0	
	Toxoplasma-Seropositiv	53%	44.4–60.9%
	Neospora-Seropositiv	5%	1.9–9.4%
Pferde (n = 120)	Toxoplasma-PCR positiv	0	
	Neospora-PCR positiv	0	
	Toxoplasma-Seropositiv	4%	1.4–9.5%
	Neospora-Seropositiv	0	
Mastschweine (n = 100)	Toxoplasma-PCR positiv	0	
	Neospora-PCR positiv	0	
	Toxoplasma-Seropositiv	1%	0.03%–5.3%
	Neospora-Seropositiv	1%	0.03%–5.3%
Mutterschweine (n = 100)	Toxoplasma-PCR positiv	0	
	Neospora-PCR positiv	0	
	Toxoplasma-Seropositiv	27%	18.6–36.8%
	Neospora-Seropositiv	3%	0.6–8.5%

gondii-DNA nachgewiesen werden. Vier Seren reagierten im *Toxoplasma*-P30-ELISA positiv, dasjenige des PCR-positiven Kalbes aber nicht. Alle untersuchten Proben waren *N. caninum*-PCR negativ. Sieben Seren waren im *Neospora*-SA-ELISA positiv.

Schafe

Es wurden 150 Tiere (84 Lämmer, 66 Auen) untersucht. Mittels PCR wurde bei neun Tieren in sieben Muskel- und fünf Gehirnproben *T. gondii*-DNA nachgewiesen. Dabei waren bei drei Tieren sowohl die ZNS- als auch die Muskelprobe *T. gondii*-PCR positiv. Einen positiven anti-*Toxoplasma*-Antikörpernachweis hatten 79 Tiere (einschließlich acht von neun PCR-positiven Tieren), wobei nur bei einem PCR-positiven Schaf (Lamm) keine Serokonversion stattgefunden hatte. In der *N. caninum*-PCR waren alle untersuchten Proben negativ. Sieben Seren reagierten positiv im *Neospora*-SA-ELISA, davon waren fünf ebenfalls positiv im *Toxoplasma*-P30-ELISA.

Befallsintensität und Befallslokalisation von *T. gondii* beim Schaf

Um etwas über die Verteilung von *T. gondii* in den untersuchten Organen zu erfahren, wurden die Köpfe von zwei – im ZNS wie auch in der Muskulatur – *T. gondii*-PCR-positiven Schafen eröffnet und an verschiedenen, definierten (d.h. für beide Köpfe identischen) Stellen des Gehirns Proben für die PCR entnommen. Dazu wurden von denselben sowie von zwei weiteren, zusätzlichen Tieren, bei denen Amplifikationsprodukte des Parasiten nur in der Muskulatur nachzuweisen waren, ebenfalls weitere Muskelstücke des Masseters bzw. Hirnstücke auf *T. gondii*-DNA untersucht (Tab. 1 und 2). Bei einem der mehrfach getesteten Schafe (Nr. 1406) konnte DNA von *T. gondii* in allen weiteren untersuchten Masseterstücken sowie in vielen weiteren Gehirnproben nachgewiesen werden (genaue Verteilung siehe Tab. 2). Beim zuvor ebenfalls in ZNS und Muskel *T. gondii*-PCR-positiven Tier Nr. 1392 gelang der Nachweis nur noch in einigen Muskelproben. Alle neuen Gehirnproben waren *T. gondii*-PCR-negativ. Ein ähnliches Bild zeigte sich bei den zwei nur im Masseter *T. gondii*-PCR-positiven Schafen. Beim Einen konnte noch aus weiteren Muskelproben Parasiten-DNA amplifiziert werden, beim anderen waren alle neu untersuchten Proben PCR-negativ.

Pferde

In den Proben der 120 untersuchten Pferde gelang der DNA-Nachweis weder für *T. gondii* noch

für *N. caninum*. Fünf der Seren hatten eine positive Antikörperreaktion im *Toxoplasma*-P30-ELISA, im *Neospora*-SA-ELISA dagegen reagierten alle Seren negativ.

Mastschweine

Es gelang in keiner der Proben von 100 untersuchten Mastschweinen Amplifikationsprodukte von *T. gondii* und *N. caninum* nachzuweisen. Eines der Seren (1%) war im *Toxoplasma*-P30-ELISA, ein anderes im *Neospora*-SA-ELISA positiv.

Mutterschweine

Auch bei den 100 untersuchten Mutterschweinen wurde weder *T. gondii*- noch *N. caninum*-DNA mittels PCR nachgewiesen. Die Seroprävalenz bezüglich *T. gondii* war allerdings mit 27 positiven Seren (27%) deutlich höher als bei den Mastschweinen. Im *Neospora*-SA-ELISA reagierten drei Seren positiv, zwei davon waren ebenfalls positiv im *Toxoplasma*-P30-ELISA.

Serologische Massenuntersuchung beim Schwein

Die Seroprävalenzen bezüglich *T. gondii* und den beiden untersuchten Schweinegruppen sind in Abbildung 1 aufgezeichnet. Bei 66 von 82 (80%) Zuchtbetrieben lagen die Seroprävalenzen zwischen 10% und 80%. Bei fünf von 82 (6%) waren keine seropositiven Tiere nachzuweisen mit einer entsprechenden Seroprävalenz von 0%. Im Gegensatz dazu lagen bei den Mastbetrieben die Seroprävalenzen bedeutend niedriger: 69/117 (59%) hatten eine Seroprävalenz von 0% und deren 34/117 (29%) eine zwischen 1%–10%. Bei 14 (12%) der Mastschweinebetriebe lag eine Seroprävalenz von > 10% vor, drei von diesen Betrieben mit sehr hohen Werten von > 60%. Die Seroprävalenz für alle 1720 Mutterschweine betrug 32.6% und für alle 2249 Mastschweine 6.1%.

Histologie

Von den Formalin-fixierten Proben der PCR-positiven Tiere aller Gattungen wurden histologische Schnitte nach Tachyzoiten oder Zysten von *T. gondii*, beziehungsweise *N. caninum* abgesucht. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden in den meisten Muskelproben der Rinder Zysten von *Sarcocystis* spp. gefunden. Im Längsschnitt liessen sich die zigarrenförmigen Zysten von *Sarcocystis* spp. morphologisch leicht von den kugelförmigen *Toxoplasma*- und *Neospora*-Zysten unterscheiden (Abb. 2). In Querschnitten erwies sich dies aber dann als unzuverlässig, insbesondere wenn die Zys-

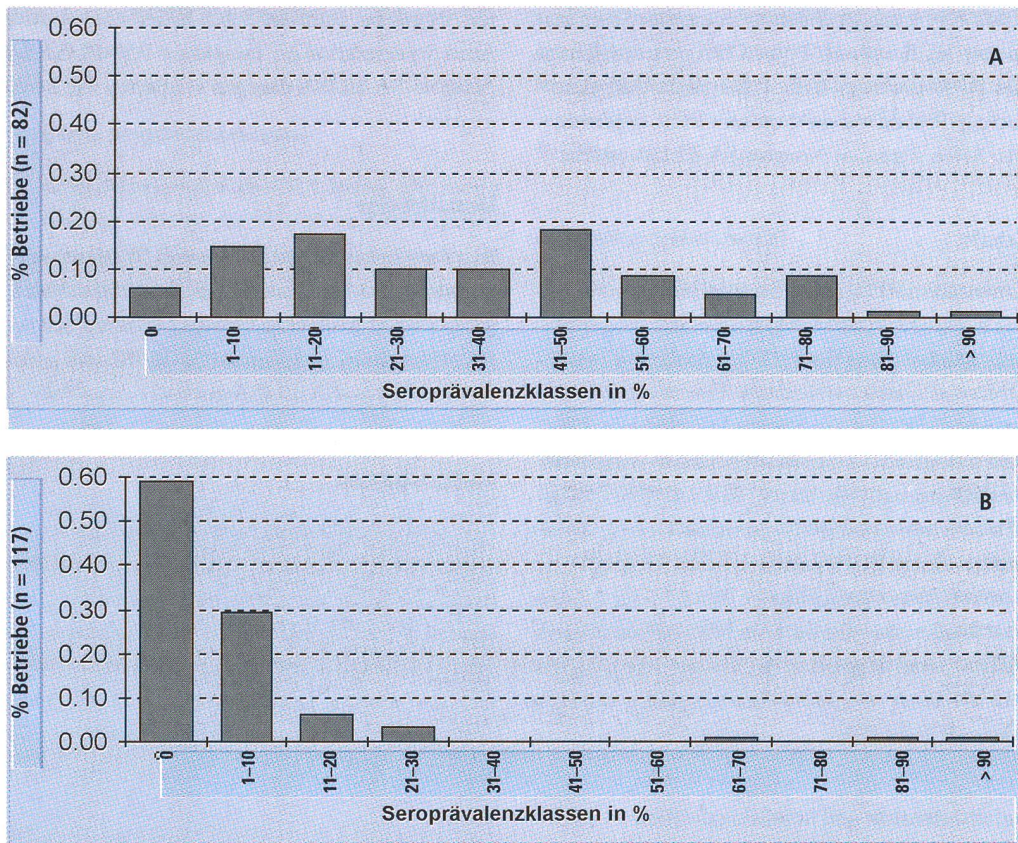


Abbildung 1: *T.gondii*-Seroprävalenzen geordnet nach dem Anteil der Zuchtbetriebe (A) sowie der Mastbetriebe (B) innerhalb der jeweiligen 10%-Seroprävalenzklassen.

te einen Durchmesser aufwies, der innerhalb der für *Toxoplasma* oder *Neospora* beschriebenen Spannweite fiel. Aufgrund der grösseren Wanddicke und einer inneren Kammerung waren auch hier einige *Sarcocystis*-Arten gut von *Toxoplasma* und *Neospora* unterscheidbar (Abb. 3), andere aber nicht (Abb. 4). Aus diesem Grund wurden die Schnitte zusätzlich immunhistologisch untersucht.

Immunhistochemie

Die immunhistochemische Untersuchung der morphologisch-mikroskopisch nicht eindeutig differenzierbaren Zysten zeigte nun ein klares Ergeb-

nis. Abbildung 5 zeigt eine mit einem spezifischen anti-*Toxoplasma*-Serum behandelten *Toxoplasma*-Zyste (in der Muskulatur einer infizierten Maus) als «Positiv-Kontrolle». Die Zyste in der Rindermuskulatur in Abbildung 6 (exemplarische Probe aus der vorliegenden Studie) wurde mit demselben anti-*Toxoplasma*-Serum inkubiert und zeigte keine Immunreaktion (= negativ). Auch mit dem anti-*Neospora*-Serum liessen sich in der Immunhistochemie keine *Neospora*-Zysten nachweisen.

Statistik: 95%-CI (Konfidenzintervalle)

In der Tabelle 3 werden alle Ergebnisse bezüglich

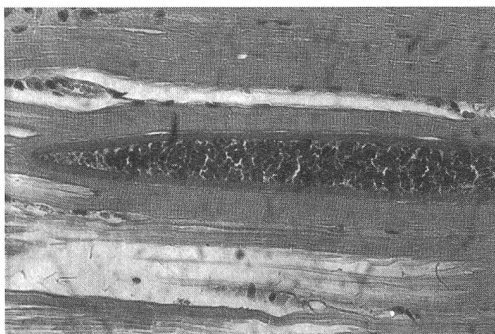


Abbildung 2: *Sarcocystis*-Zyste im Längsschnitt, Muskulatur Rind.

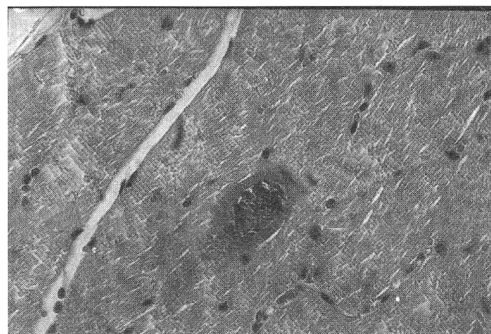


Abbildung 3: *Sarcocystis*-Zyste im Querschnitt, Muskulatur Rind.

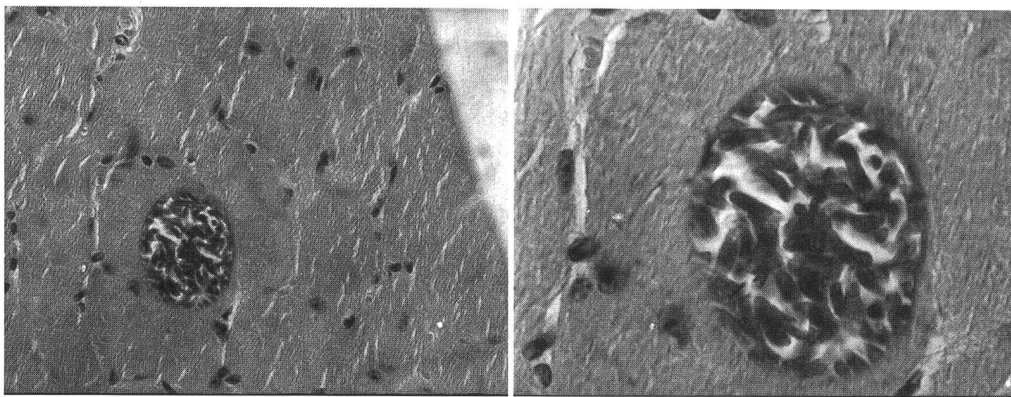


Abbildung 4: Toxoplasma-ähnliche Zyste in Muskulatur Rind, rechts vergrößert dargestellt.

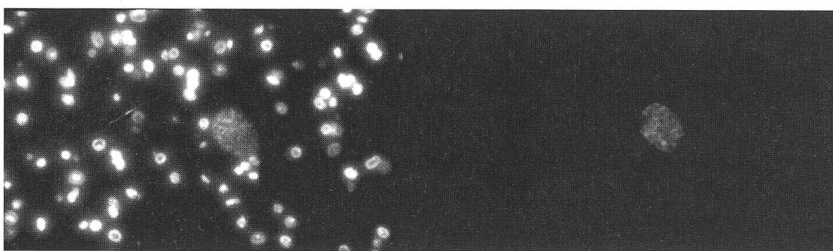


Abbildung 5: Toxoplasma-Zyste und Muskelgewebe (Maus = Positivkontrolle), links Kernfärbung (Hoechst-Staining), rechts Toxoplasma-Zyste immunofluoreszenz-markiert mit Toxoplasma-spezifischem Hyperimmuns serum.



Abbildung 6: Sarcocystis-Zyste und Muskelgewebe (Rind), links Kernfärbung (Hoechst-Staining), rechts Sarcocystis-Zyste, ohne Signal nach Immunofluoreszenzmarkierung mit Toxoplasma-spezifischem Hyperimmuns serum.

serologischer und molekularbiologischer Untersuchungen zusammengefasst dargestellt. «Positive» Ergebnisse wurden fettgedruckt hervorgehoben.

Diskussion

Als Quelle einer Infektion mit *T. gondii* kann sowohl für den Menschen als auch für das Tier zystenhaltiges Fleisch eine wichtige Rolle spielen, so dass Kenntnisse über die Prävalenz von *T. gondii* im Fleisch von Schlachttieren zur Abschätzung eines Gefährdungspotentials wichtig sind. Mit der PCR steht uns heute eine molekularbiologische Untersuchungsmethode zur Verfügung, die gegenüber anderen Methoden, z.B. der Immunhistochemie, bedeutend sensitiver ist und gegenüber der Serologie den Vorteil hat, dass der Parasit im Untersuchungsgut direkt nachgewiesen werden kann. Da die Wahrscheinlichkeit einer potentiell erfolgten *T. gondii*-Infektion mit dem Alter zunimmt und

zudem Unterschiede bezüglich Haltungs-/Ernährungsarten bestehen, haben wir Kühe, Jungrinder («Gusti»), Mastbullen und Kälber in getrennten Gruppen untersucht. Bei den Kälbern, welche im Alter von drei bis fünf Monaten geschlachtet werden und bei denen die Milchfütterung einen wichtigen Anteil bei der Ernährung einnehmen kann, wird die Möglichkeit der peroralen Aufnahme von sporulierten *T. gondii*-Oozysten gegenüber den anderen Schlachttiergruppen erheblich geringer sein. Ein entsprechendes Bild bieten denn auch die erhaltenen Resultate. Den 32% seropositiven Kühen und Jungrindern stehen 21% seropositive Mastbullen sowie nur 4% seropositive Kälber gegenüber. Die höhere Rate seropositiver Kühe und Jungrinder könnte mit der Haltungsart (Weidehaltung) bei diesen Tiergruppen und der damit verbundenen erhöhten Möglichkeit, Oozysten aus der Umwelt aufzunehmen, erklärt werden. Dem gegenüber werden die Mastbullen meist in speziellen Mastbetrieben in grösseren Gruppen aufgestallt

und intensiv gemästet. So gehaltene Tiere sind offensichtlich einem geringeren Infektionsrisiko ausgesetzt, wofür die gegenüber den Kühen und Rindern kleinere Seropositivitätsrate spricht. Die mittels PCR eruierten Prävalenzen sind gegenüber den Seroprävalenzen deutlich geringer. Dies könnte einerseits auf die in der Einleitung erwähnte vermutete Fähigkeit der Rinder, *Toxoplasma* relativ rasch zu eliminieren, zurückgeführt werden. Andererseits kann in der PCR nur ein relativ kleines Probenvolumen untersucht werden, was zu falsch-negativen Ergebnissen geführt haben kann. Bei den insgesamt elf PCR-positiven Tieren der Rindergattung zeigten nur zwei Jungrinder gleichzeitig eine positive Serologie im *Toxoplasma*-P30-ELISA. Bei allen anderen Rindern stimmten die Ergebnisse aus Serologie und PCR nicht überein. Potentielle Gründe dafür können vielfältig sein: In einer frühen Disseminationsphase des Parasiten (vor dem Einsetzen der Immunität) können wir davon ausgehen, dass Tachyzoiten mittels PCR im Gewebe leicht nachzuweisen sind. Zu diesem Zeitpunkt der Infektion können noch keine Antikörper nachgewiesen werden (Dubey und Beattie, 1988). In diesem Stadium der Infektion ist die Befallsintensität grösser als nach Einsetzen der Immunität, so dass die Wahrscheinlichkeit, eine positive PCR zu erhalten, ebenfalls grösser sein muss. Ein anderer Grund kann sein, dass die Antikörperkonzentration nach einer zeitlich weit zurückliegenden Infektion auf ein Niveau unterhalb des Testgrenzwertes abgesunken ist, wir aber mit der PCR eine reaktionslos im Gewebe liegende Zyste nachgewiesen haben. Für unsere Studie von Bedeutung ist jedoch nicht der Nachweis einer Seropositivität, sondern der Parasiten-DNA-Nachweis im Gewebe. Diesbezüglich müssen wir grundsätzlich feststellen, dass sowohl in Rind- als auch in Kalbfleischproben Amplifikationsprodukte von *Toxoplasma* nachgewiesen werden konnten.

Aufgrund bisheriger Angaben in der Fachliteratur ging man zwar davon aus, dass die im Frühstadium einer Infektion anwesenden Tachyzoiten bei einer peroralen Ingestion nicht infektiös sein sollen. Diese Lehrmeinung wird zwar durch epidemiologische Begebenheiten (Dubey und Beattie, 1988) grundsätzlich unterstützt, sie wurde jedoch experimentell nie gänzlich bewiesen. Im Gegensatz zu dieser Auffassung gelang es nämlich, Katzen mit Gewebetachyzoiten peroral erfolgreich zu infizieren und eine anschliessende Parasitenvermehrung zu induzieren (Fayer, 1994). Ebenfalls wurde kürzlich in Frage gestellt, dass peroral aufgenommene Tachyzoiten abgetötet werden (Dubey, 1998a), und es gelang Dubey (1998b) sogar, Mäuse mit Tachyzoiten von *T. gondii* erfolgreich zu infizieren (Dubey, 1998b). Wir müssen somit heute davon ausge-

hen, dass der Konsum ungenügend zubereiteter Produkte von Rinderfleisch ein potentiell Infektionsrisiko darstellen kann. Diese Tatsache wird insbesondere dort zur Geltung kommen, wo Rindfleisch roh (z.B. Steak tartare) gegessen wird. Denn obwohl im Vergleich zu anderen Tierarten – wie z.B. beim Schaf – die Prävalenz beim Rind sehr gering ist, dürfte der Konsum von noch potentiell infektiösen Fleischprodukten beim Rind aufgrund diverser Zubereitungsgewohnheiten nicht unbedeutend sein.

Beim Schaf lag die Seroprävalenz für *T. gondii* mit 52.5% in einem erwarteten hohen Bereich. Dem hohen Durchseuchungsgrad entsprechend gelang auch der Erregernachweis mittels PCR häufiger als bei den Rindern. Dass aus den Gewebeproben von seropositiven Schafen in der PCR nur selten *Toxoplasma*-Amplifikationsprodukte erhalten wurden, könnte auch mit der bereits erwähnten Problematik des Probenvolumens zusammenhängen. Nicht ausgeschlossen werden kann aber auch eine gänzliche Elimination des Parasiten in einigen alternden Tieren. Im Gegensatz zum Rind scheint bezüglich des Infektionsverlaufes beim Schaf die DNA-Nachweisbarkeit vorwiegend im post-immunitären Zustand zu liegen. Der DNA-Nachweis bei Seronegativität gelang nur bei einem Lamm, das wahrscheinlich in der allerersten Infektionsphase erfasst wurde. Unter dem Gesichtspunkt der Fleischhygiene kann zusammengefasst werden, dass der Konsum von Schaffleisch ein Infektionsrisiko darstellt, besonders weil Lammfleisch gerne nicht ganz durchgebraten gegessen wird.

Die Untersuchung der Befallsintensität bei *T. gondii*-PCR-positiven Schafen ergab ein sehr heterogenes Bild. Bei drei Tieren konnte der Parasit in fast allen weiteren Proben nachgewiesen werden. Bei einem Tier dagegen gelang der Nachweis nur in der ersten Muskelprobe. Ein ähnliches Bild ergab sich bei den zwei untersuchten Gehirnen. Bei einem Tier konnte eine hohe Befallsintensität nachgewiesen werden, wobei Parasiten-DNA in Proben aus verschiedenen Hirnregionen amplifiziert werden konnte. Bei einem anderen Hirn gelang der Parasitennachweis nur in einer von 13 verschiedenen Gehirnproben. Die Wahrscheinlichkeit, ein PCR-positives Resultat zu erhalten, ist bei einem Tier mit hoher Parasitendichte sicherlich grösser als bei einer schwachen Befallsintensität.

Beim Pferd lag die in der vorliegenden Studie ermittelte Seropositivität von 4.2% deutlich unter den von Erb (1986) ermittelten 50%. Der Nachweis von Parasiten-DNA mittels PCR gelang in keiner der Proben, was einerseits an der bereits tiefen Seroprävalenz, andererseits aber auch am kleinen Probenvolumen liegen könnte. Die *Toxoplasma*-positiven Seren stammten von zwei 14 be-

ziehungsweise 15 Jahre alten Pferden sowie von drei 7 Monate alten Freibergfohlen. Da das Verhältnis untersuchter Fohlen zu Pferden ungefähr gleich war, scheint die Seroprävalenz bei den Adulten wie auch bei den Fohlen in etwa gleich hoch zu sein. Diese Tendenz steht im Gegensatz zum Rind, wo die Kälber eine gegenüber älteren Tieren deutlich geringere Seroprävalenz aufwiesen. Grund dafür könnte das höhere Schlachalter und die extensivere Haltung der Fohlen gewesen sein. Beim Schwein erschienen die Seroprävalenz und deren altersabhängige Verteilung ähnlich wie beim Rind. Bei den jungen Mastschweinen war nur 1% der untersuchten Seren im *Toxoplasma*-P30-ELISA positiv, bei den Mutterschweinen hingegen 27%. Dies kann einerseits darauf zurückgeführt werden, dass die Wahrscheinlichkeit einer erfolgten Infektion mit dem Alter zunimmt, andererseits können auch die Unterschiede in Fütterung und Haltung zu diesem Unterschied beitragen. Die mit nur 1% sehr tiefe Seroprävalenz bei den Mastschweinen ist deutlich geringer als die in früheren Studien in der Schweiz ermittelten Daten. Diese Abnahme wurde auch schon von anderen Autoren beschrieben und wird auf die gegenüber früher verbesserten hygienischen Haltungsbedingungen in den Schweinemastbetrieben zurückgeführt (Edelhofer, 1994). Der Nachweis von Parasiten-DNA in der PCR gelang weder bei den Mastschweinen noch bei den Mutterschweinen. Bei den Mastschweinen war dies wegen der tiefen Seroprävalenz nicht sehr verwunderlich, bei der recht hohen Seropositivitätsrate der Mutterschweine würde man aber doch einige PCR-positive Proben erwarten. In einem methodisch ausgerichteten Quervergleich zur Nachweisbarkeit beim Schaf und teilweise beim Rind weisen unsere Ergebnisse darauf hin, dass das Risiko für Menschen, sich durch Verzehr von Schweinefleisch – insbesondere von Mastschweinen – mit Toxoplasmen zu infizieren, derzeit wahrscheinlich geringer ist, als bisher angenommen wurde. Ganz auszuschließen ist es jedoch nicht, weil auch die PCR gelegentlich falsch-negative Resultate liefern kann (s. unten). Auch bei der großflächigen serologischen Untersuchung von Zucht- und Mastschweinebeständen zeigten sich deutlich die unterschiedlichen Prävalenzen zwischen beiden Betriebsarten ab. Die Seroprävalenzen bei den Zuchtbetrieben waren statistisch nicht signifikant unterschiedlich (27% versus 33%) und reflektieren den relativ hohen akkumulierten Expositionsgrad bei den älteren Tieren. Bei den Mastschweinen hingegen fiel eine polarisierte Verteilung innerhalb der untersuchten 117 Betriebe auf. Die meisten der Betriebe wiesen eine sehr tiefe Seroprävalenz auf, wie bei der Primärstudie beobachtet. In sehr wenigen Betrieben mussten jedoch Bedingungen vorgeherrscht haben, die zu

einer sehr hohen Seroprävalenz geführt haben. Diese wenigen Betriebe trugen zur Erhöhung der mittleren (im Vergleich zur Primärstudie) bei. Aus fleischhygienischer Sicht wäre es sinnvoll herauszufinden, welches die Gründe für die hohe Verbreitung von *T.gondii* in diesen wenigen Betrieben sind, und insbesondere ob ebenfalls andere Infektionserreger gehäuft vorkommen, was auf eine hygienisch-infektiologische Problematik in diesen Betrieben hinweisen würde.

Bezüglich *N. caninum* gelang beim Rind der Nachweis des Parasiten mittels PCR nur in je einer Muskel- und einer Gehirnprobe von zwei verschiedenen Kühen. Im Untersuchungsgut der Jungrinder, Mastbullen und Kälber gelang die Amplifikation von *Neospora*-DNA nicht. Serologisch waren im *Neospora*-SA-ELISA 7% der Kühe und der Kälber, 1% der Mastbullen und keines der Jungrinder positiv. Im Gegensatz zu Toxoplasmen, die nur sehr selten aus abortierten Rinderföten isoliert werden können und beim Rind offenbar kaum transplazentär übertragen werden, scheint der vertikale Übertragungsmodus für *N. caninum* am wichtigsten zu sein (Gottstein et al., 1999). Dementsprechend sind auch die Ergebnisse der serologischen Untersuchung unserer Tiere ausgefallen: Gleich viele Kühe und Kälber haben anti-*Neospora*-Antikörper. Die Seroprävalenz bei diesen Tieren stimmt in etwa mit früher vorgefundenen Werten überein (Gottstein et al., 1998). In der Altersgruppe der Jungrinder und der Mastmunis wurden hingegen kaum positive *Neospora*-Serologien gefunden, was zum jetzigen Zeitpunkt nur eine hypothetische Erklärung erlaubt. Wir gehen davon aus, dass bei erwachsenen Tieren *Neospora*-Zysten reaktionslos im ZNS und eventuell anderen Geweben liegen. Eine Reaktivierung des Parasiten wird sich vorwiegend im Rahmen einer Trächtigkeit und der damit verbundenen temporären Th2-abhängigen Immunsuppression ereignen (Cox und Liew, 1992; Abbas et al., 1996), gefolgt von der diaplazentären Passage des Parasiten, was die Bedeutung der bisher als wichtig betrachteten vertikalen Übertragung unterstützt. Bei chronisch infizierten, trächtigen Tieren könnte die Reaktivierung des Parasiten auch zur Restimulation des humoralen Immunstatus beitragen, was für die relativ hohe Seroprävalenz bei den adulten weiblichen Tieren eine Erklärung liefern könnte. Bei männlichen, älteren Tieren (Mastmunis) sowie weiblichen Rindern (Gustis) vor Trächtigkeit würde mangels *Neospora*-Reaktivierung und entsprechender Antigenstimulation die Antikörperkonzentration sinken und sich unterhalb des von uns gewählten ELISA-Grenzwertes einordnen.

Über die Prävalenz von *Neospora* in Schweinen lagen bisher in der Schweiz keine Angaben vor. Die

in unserer Studie ermittelten tiefen Seroprävalenzen von 1% für die Mastschweine beziehungsweise 3% für die Mutterschweine sowie das Ausbleiben jeglicher DNA-Nachweisbarkeit mittels PCR weisen darauf hin, dass *Neospora* im Rahmen der Schweineproduktion keine oder eine nur unbedeutende Rolle einnimmt. Die Seroprävalenz von *N. caninum* im Schaf war mit sieben positiven Seren von 150 untersuchten Tieren ebenfalls tief. Dass die untersuchten Pferdeproben weder in der Serologie noch in der PCR positiv reagierten, überrascht eigentlich nicht. *N. caninum* wurde beim Pferd erst ein einziges Mal in den USA bei einem abortierten Föten nachgewiesen (Dubey und Porterfield, 1990). Bei einem zweiten Fall entpuppte sich der nachgewiesene Parasit als eine neue *Neospora*-Art, nämlich als *N. hughesi* (Marsh et al., 1998).

Obwohl die PCR methodisch sowohl bei *T. gondii* als auch bei *N. caninum* eine sehr hohe Sensitivität und Spezifität aufwies (Gottstein et al., 1999), wurde in der vorliegenden Studie der Nachteil der PCR aufgedeckt, dass nur eine kleine – für unsere Fragestellung wahrscheinlich zu geringe – Probenmenge analysiert werden kann. Die Befallsintensität (Anzahl Parasiten pro Tier) bei einigen der im Schlachthof zufällig ausgewählten, klinisch völlig unauffälligen Tieren kann so gering gewesen sein, dass sie durch unsere Untersuchungsstrategie nicht erfasst wurde. Wir sind uns somit bewusst, dass unsere Studie «falsch-negativ» Resultate beinhalten muss. Um einen Hinweis zu erhalten, inwiefern PCR-positive Tiere eine hohe Befallsintensität pro Organ aufwiesen oder ob ein positives Resultat einem Zufallstreffer zuzuschreiben sei, wurden von zwei PCR-positiven Schafhirnen sowie von vier PCR-positiven Muskeln zusätzliche Proben untersucht. Dabei zeigte sich, dass sowohl hohe wie auch sehr niedrige Befallsintensitäten vorkamen. Unsere diesbezüglich vorläufigen Daten erlauben jedoch keine Aussage bezüglich der Fragestellung, wieviele der grundsätzlich PCR-positiven Tiere eine hohe und wieviele eine geringe Befallsintensität aufweisen. Inwiefern das Fleisch schwach befallener Tiere infektiologisch überhaupt ein Risiko darstellt, wissen wir ebenfalls noch nicht.

Alle in unserer Studie PCR-positiven Proben wurde zum Vergleich ebenfalls mittels herkömmlicher Direktnachweismethoden (Histologie, Immunhistochemie) untersucht. Bezüglich dieser Proben zeigte sich, dass die PCR der Histologie und Immunhistochemie deutlich überlegen ist: In keiner der PCR-positiven Proben gelang der Toxoplasmen-Nachweis mit den genannten mikroskopischen Verfahren. Neben der Ermittlung der Prävalenz von *T. gondii* und *N. caninum* war auch die Erprobung der Praxistauglichkeit der beiden PCRs ein Ziel der vorliegenden Untersuchung. Erfah-

rungen aus der bisherigen Routinediagnostik sowie aus epidemiologischen Studien (Gottstein et al., 1998) mit dem Nachweis von *Neospora* in Gewebeproben von abortierten Föten zeigten, dass sich diese PCR zum Nachweis des Parasiten bei klinischer Indikation (und damit entsprechend hoher Parasitendichte im Gewebe) bestens eignet. Im Gegensatz deckt die vorliegende Studie einige Grenzen der PCR auf: Für Fragen nach der Prävalenz in klinisch unauffälligen Tierpopulationen stellt das relativ kleine einsetzbare Probenvolumen den limitierenden Faktor der an sich methodisch sehr sensitiven PCR dar. Umgekehrt kann die geringe PCR-Nachweisbarkeit von *N. caninum* im Hirn gesunder Rinder jeden Alters als Hinweis gewertet werden, dass die bei abortierten Föten häufig vorgefundene positive *Neospora*-PCR (Gottstein et al., 1999) nicht auf eine ubiquitäre zerebrale Verbreitung des Parasiten zurückzuführen ist, die auch bei gesunden Tieren vorkommen könnte, sondern tatsächlich auch ätiologisch im Rahmen eines infektiologisch-pathologischen Abortgeschehens steht.

Dank

Die Arbeiten wurden finanziell durch das «Bundesamt für Veterinärwesen» (Projekt Nr. 012.4.93.4) und durch das «Bundesamt für Gesundheit» (Projekt Nr. 316.96.5947) unterstützt. Wir möchten folgenden Personen ganz herzlich danken: Frau Ursula Mäusli und Frau Dr. Trudi Stiffler für die Mithilfe bei der Durchführung serologischer Tests; den Proff./Drs. A. Tenter (Hannover), D. Buxton (Moredun), P. Lind (Kopenhagen), J.P. Dubey (Beltsville) sowie M. McAllister (Urbana) für die Überlassung der für uns sehr wertvollen Referenzmaterialien, insbesondere Standardseren für die verschiedenen untersuchten Tierarten; Herrn Horisberger für die Pferdeproben; dem Histologiela-bor des Instituts für Tierpathologie sowie Herrn PD Dr. A. Hemphill für die Unterstützung bei den histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen.

Literatur

- Abbas A.K., Murphy K.M., Sher A. (1996): Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383, 787–794.
- Al-Khalidi N.W., Dubey J.P. (1979): Prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in horses. *J. Parasitol.* 65, 31–36.
- Audigé L., Huber R., Conzelmann C., Schmidt A., Häni H., Keller H. (1999): «Schwein 99»: Ein Gesundheits- und Produktivitätsprofil der Schweine in der Schweiz. *Suisseporcs* (submitted).
- Björkman C., Lunden A., Holmdahl J., Barber J., Tees A.J., Ug-

Prévalence de *Toxoplasma gondii* et *Neospora caninum* et hygiène alimentaire

Les deux parasites *Toxoplasma gondii* et *Neospora caninum* sont par leur phénotypes et leur phylogénies des coccidies de proche parenté et formant des kystes. Les deux peuvent provoquer des avortements chez plusieurs espèces. La toxoplasmose provoquée par *T. gondii* est une zoonose qui peut être importante chez l'homme, en particulier lors d'infections au cours de la grossesse et lors d'infections chez des personnes dont le système immunitaire est affaibli. Puisque l'homme peut s'infecter entre autres par la consommation de viande contenant des kystes de toxoplasme, il est important de connaître la prévalence de ce parasite chez les animaux abattus. Quoique *N. caninum* n'a pas d'importance zoonotique, le parasite a été considéré pour cette étude en raison de son importance économique. Afin de déterminer les prévalences des deux espèces de coccidies, des échantillons de muscle et de cerveau de bovins, de moutons, de chevaux et de porcs ont été examinés par PCR. De plus, le sérum des animaux considérés a été examiné par les tests *Toxoplasma*-P30-ELISA et *Neospora*-SA-ELISA. La prévalence de *T. gondii* détectée par PCR était basse chez toutes les espèces d'animaux abattus: vaches 3%, taureaux d'engraissement 2%, jeunes génisses 6%, veaux 1%, moutons 6%, chevaux et porcs 0%. La prévalence de *Neospora* était de 2% chez les vaches et 0% chez les autres groupes d'animaux. Les prévalences sérologiques, qui peuvent être dues à une ancienne infection dont l'élimination est concevable, étaient beaucoup plus élevées pour les deux parasites avec pour exception les porcs d'engrais. Comme la détection de toxoplasmes a été faite dans la viande de bovins, de veaux et de moutons, il faut assumer que, en cas de consommation de viande de ces espèces, un risque potentiel d'infection existe. Par contre, la viande de cheval ainsi que la viande de porc d'engrais semble être libre de *T. gondii* et n'est donc pas une source d'infection.

Esami riguardanti la presenza di *Toxoplasma gondii* e di *Neospora caninum* sotto l'aspetto dell'igiene delle carni

Ambedue i protozoi *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* sono coccidi fenotipicamente e filogeneticamente strettamente imparentati, produttori di cisti, che possono causare aborti in diverse specie animali. La toxoplasmosi, causata dal *T. gondii*, inoltre, rappresenta una zoonosi che nel feto umano può causare infezioni attraverso la placenta e in persone immuno-sopresse può provocare pericolose infezioni. Siccome l'uomo può infettarsi, tra l'altro, tramite il consumo di carne contenente cisti di *Toxoplasma*, è importante conoscere la prevalenza del parassita negli animali da macello. Malgrado non esistano dati che indichino il *N. caninum* quale causa di zoonosi, il parassita è stato incluso nello studio presente in considerazione della sua grande importanza economica nell'allevamento dei bovini. Per determinare la prevalenza di ambedue i parassiti, sono stati esaminati tramite PCR campioni di tessuto muscolare e cerebrale di bovini, pecore, cavalli e maiali. Inoltre i sieri degli animali esaminati sono stati controllati nel *Toxoplasma*-P30-ELISA e nel *Neospora*-SA-ELISA. Le prevalenze determinate per il *T. gondii* tramite PCR sono risultate basse per tutti gli animali da macello esaminati: mucche 3%, toro da ingrasso 2%, manzi 6%, vitelli 1%, pecore 6%, cavalli e maiali 0%. La prevalenza di *Neospora* è risultata del 2% nelle mucche e dello 0% in tutti gli altri gruppi di animali. Le sieroprevalenze ottenute, che potrebbero anche rispecchiare decorsi d'infezioni precedenti con potenziale eliminazione dei parassiti, sono risultate, ad eccezione dei maiali da ingrasso, chiaramente maggiori per ambedue le specie di parassiti. Dato che la presenza di *Toxoplasma* è stata sostanzialmente dimostrata nella carne di bovini, di pecora e di vitello, dobbiamo patire dal presupposto che il consumo delle sopraccitate carni può rappresentare un rischio potenziale d'infezione. Al contrario la carne di cavallo e di maiali da ingrasso è generalmente esente da *T. gondii* e quindi rappresenta un rischio minimo e trascurabile d'infezione.

gla A. (1994): *Neospora caninum* in dogs: Detection of antibodies by ELISA using an iscom antigen. *Parasite Immunol.* 16, 643–648.

Björkman C., Lunden A. (1998): Application of iscom antigen preparations in ELISAs for diagnosis of *Neospora* and *Toxoplasma* infections. *Int. J. Parasitol.* 28, 187–193.

Boch J., Janitschke K., Rommel M., Sommer R. (1965): Untersuchungen über das Vorkommen von *Toxoplasma*-Infektionen bei Schlachtrindern. *Wiener Tierärztl. Wschr.* 52, 1029–1036.

Boch J., Erber A., Weiland M. (1979): Sarcocystis- und *Toxoplasma*-Infektionen bei Schlachtschafen in Bayern. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 92, 137–141.

Boch J. (1980): Die Toxoplasmose der Haustiere – Vorkommen, Diagnose und hygienische Bedeutung. *Münch. Tierärztl. Wschr.* 93, 385–391.

Bretagne S., Costa J.M., Vidaud M., Nhieu J.T.V., Fleury-Feith J. (1993): Detection of *Toxoplasma gondii* by competitive DNA amplification of bronchoalveolar lavage samples. *J. Infect. Dis.* 168, 1585–1588.

- Carmichael G.A. (1975): The application of the indirect fluorescent antibody technique for the detection of toxoplasmosis. *Can. J. Med. Technol.* 37, 168–170.
- Cox F.E.G., Liew E.Y. (1992): T-cell subsets and cytokines in parasitic infections. *Parasitol. Today* 8, 371–374.
- Doby J.M., Deunff J. (1984): Toxoplasmose des herbivores d'élevage en Bretagne; enquête sérologique par hémagglutination passive chez plus de 2500 bovins, ovins et caprins. *Rec. Méd. Vét.* 160, 101–106.
- Dubey J.P. (1976): Prevalence of Toxoplasma infection in cattle slaughtered at an Ohio abattoir. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 169, 1197–1199.
- Dubey J.P., Posterfield M.L. (1986): Toxoplasma-like sporozoa in an aborted equine fetus. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 188, 1312–1313.
- Dubey J.P. (1987): Serological responses of equids fed Toxoplasma gondii oozysts. *Equine Vet. J.* 19, 337–339.
- Dubey J.P., Beattie C.P. (1988): Toxoplasmosis of animals and man. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Dubey J.P., Carpenter J.L., Speer C.A., Topper M.J., Uggla A. (1988): Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 192, 1269–1285.
- Dubey J.P., Porterfield M.L. (1990): Neospora caninum (Apicomplexa) in an aborted equine fetus. *J. Parasitol.* 76, 732–734.
- Dubey J.P. (1998a): Advances in the life cycle of Toxoplasma gondii. *Int. J. Parasitol.* 28, 1019–1024.
- Dubey J.P. (1998b): Re-examination of resistance of Toxoplasma gondii tachyzoites and bradyzoites to pepsin and trypsin digestion. *Parasitol.* 116, 43–50.
- Edelhofer R. (1994): Prevalence of antibodies against Toxoplasma gondii in pigs in Austria – an evaluation of data from 1982 and 1992. *Parasitol. Research.* 80, 642–644.
- Erb C. (1986): Untersuchung zum Vorkommen von Toxoplasma gondii im Fleisch von Schlachtieren. *Vet. Med. Diss.*, Bern.
- Fayer, R. (1994): Foodborne and waterborne zoonotic protozoa. In *Foodborne disease handbook*, Vol. 2 (Hui Y.H. et al., eds), Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 331–362.
- Fuchs N., Sonda S., Gottstein B., Hemphill A. (1998): Differential expression of cell surface- and dense granule-associated Neospora caninum proteins in tachyzoites and bradyzoites. *J. Parasitol.* 84, 753–758.
- Gottstein B. (1995): Zystenbildende Kokzidien: Toxoplasma, Neospora, Sarcocystis. *Schweiz. Med. Wschr.* 125, 890–898.
- Gottstein B., Hentrich B., Wyss R., Thür B., Busato A., Stärk K. (1998): Molecular and immunodiagnostic investigations on bovine neosporosis in Switzerland. *Int. J. Parasitol.* 28, 679–691.
- Gottstein B., Hentrich B., Wyss R., Thür B., Bruckner L., Müller N., Kaufmann H., Waldvogel A. (1999): Molekular- und immunodiagnostische Untersuchungen zur bovinen Neosporose in der Schweiz. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 141, 59–68.
- Hemphill A., Gottstein B., Kaufmann H. (1996): Adhesion and invasion of bovine endothelial cells by Neospora caninum. *Parasitol.* 112, 183–197.
- Ho M.S., Barr B.C., Tarantal A.F., Lai L.T., Hendrickx A.G., Marsh A.E., Sverlow K.W., Packham A.E., Conrad P.A. (1997): Detection of Neospora from tissues of experimentally infected rhesus macaques by PCR and specific DNA probe hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 35, 1740–1745.
- Huber R., Conzelmann C., Salman M.S., Stärk K.D.C., Audigé L. (1999). «Schwein 99»: Ein Gesundheits- und Produktivitätsprofil der Schweine in der Schweiz, I. Teil: Morbidität und Mortalität der Sauen. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* (submitted).
- Lind P., Haugegaard J., Wingstrand A., Henriksen S.A. (1997): The time course of the specific antibody response by various ELISAs in pigs experimentally infected with Toxoplasma gondii. *Vet. Parasitol.* 71, 1–15.
- Ljungstrom B.L., Lunden A., Höglund J., Zakrisson G. (1994): Evaluation of a direct agglutination test for detection of antibodies against Toxoplasma gondii in cat, pig and sheep sera. *Acta Vet. Scand.* 35, 213–216.
- Marsh A.E., Barr B.C., Packham A.E., Conrad P.A. (1998): Description of a new Neospora species. *J. Parasitol.* 84, 983–991.
- Müller N., Zimmermann V., Hentrich B., Gottstein B. (1996): Diagnosis of Neospora caninum and Toxoplasma gondii Infection by PCR and DNA Hybridization Immunoassay. *J. Clin. Microbiol.* 34, 2850–2852.
- Petersen E., Lebech M., Jensen L., Lind P., Rask M., Bagger P., Björkman C., Uggla A. (1999): Neospora caninum infection and repeated abortions in humans. *Emerg. Inf. Dis.* 5, 278–280.
- Redlich A., Müller W.A. (1998): Serodiagnosis of acute toxoplasmosis using a recombinant form of the dense granule antigene GRA6 in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Parasitol. Res.* 84, 700–706.
- Rommel M., Pötters G., Weller U. (1982): Untersuchungen zur Epizootiologie von Infektionen mit zystenbildenden Kokzidien (Toxoplasmidae, Sarcocystidae) in Katzen, Schweinen, Rindern und wildlebenden Nagern. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 89, 57–61.
- Weisstanner T. (1969): Nachweis von Toxoplasma gondii in der Zwerchfellmuskulatur des Schweines. *Path. Microbiol.* 33, 44–56.
- Wiesmann E. (1967): Toxoplasma-Infektionen bei Schweinen aus der Region Ostschweiz. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 71, 296–306.
- Wörk K. (1967). Isolation of Toxoplasma gondii from the flesh of sheep, swine and cattle. *Acta Path. Microbiol. Scand.* 71, 296–306.
- Zhang Y.W., Fraser A., Balfour A.H., Wreghitt T.G., Gray J.J., Smith J.E. (1995): Serological reactivity against cyst and tachyzoite antigens of Toxoplasma gondii determined by FAST-ELISA. *J. Clin. Pathol.* 48, 908–911.

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. B. Gottstein, Institut für Parasitologie der Universität Bern
Länggass-Strasse 122, CH-3001 Bern, e-mail: bruno.gottstein@ipa.unibe.ch

Manuskripteingang: 13. Juni 1999

In vorliegender Form angenommen: 6. September 1999