

Institut für Parasitologie der Vetsuisse-Fakultät und der Medizinischen Fakultät  
Universität Bern  
(Direktor: Prof. Dr. B. Gottstein)

Arbeit unter der Leitung von  
Dr. med. vet. C. F. Frey und Prof. Dr. B. Gottstein

***Toxoplasma gondii*: Potenzielle tierische Infektionsquellen in der  
Schweiz**

**Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung der Doktorwürde  
der Vetsuisse-Fakultät der Universität Bern

vorgelegt von

**Andrea Berger-Schoch**  
von Schwellbrunn, AR und Steffisburg, BE

**2009**

Von der Vetsuisse-Fakultät Universität Bern auf Antrag  
von Prof. Dr. B. Gottstein als Dissertation genehmigt.

Bern,

Der Dekan der  
Vetsuisse-Fakultät Universität Bern

# Inhaltsverzeichnis

---

<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>3</b>
<b>1. Einführung .....</b>	<b>4</b>
<b>1.1. Entwicklung .....</b>	<b>4</b>
1.1.1. Entwicklung im Endwirt (Feliden).....	4
1.1.2. Entwicklung im Zwischenwirt (Warmblüter) .....	5
1.1.3. Entwicklung im Menschen.....	5
<b>1.2. Epidemiologie.....</b>	<b>5</b>
<b>1.3. Diagnostische Methoden .....</b>	<b>6</b>
1.3.1. Antikörper-Nachweis .....	6
1.3.2. Parasiten-Nachweis .....	7
<b>1.4. Genotypen von <i>T.gondii</i> .....</b>	<b>8</b>
<b>1.5. Prävention .....</b>	<b>9</b>
<b>1.6. Zielsetzung der aktuellen Studie .....</b>	<b>9</b>
<b>2. Tiere, Material und Methoden .....</b>	<b>10</b>
<b>2.1. Proben und Stichprobenumfang .....</b>	<b>10</b>
<b>2.2. ExVivo-Experiment mit C57BL/6 Mäusen (n = 2) .....</b>	<b>12</b>
<b>2.3. Serologie .....</b>	<b>12</b>
2.3.1. Zeitlicher Verlauf des Antikörper-Titers im Fleischsaft .....	13
<b>2.4. Westernblot.....</b>	<b>13</b>
<b>2.5. DNA-Extraktion für PCR.....</b>	<b>14</b>
<b>2.6. PCR-Analyse .....</b>	<b>14</b>
<b>2.7. Genotypisierung.....</b>	<b>15</b>
<b>2.8. Histologie.....</b>	<b>15</b>
<b>2.9. Koprologische Untersuchungen .....</b>	<b>15</b>
<b>2.10. Statistische Analysen .....</b>	<b>16</b>
<b>3. Resultate .....</b>	<b>17</b>
<b>3.1. ExVivo-Experiment.....</b>	<b>17</b>

<b>3.2. Fleischproben aus dem Schlachthof.....</b>	<b>17</b>
3.2.1. Rinder.....	17
3.2.2. Schafe.....	19
3.2.3. Schweine.....	20
3.2.4. Zusammenfassung der Schlachthofproben.....	22
3.2.5. Geographische Verteilung der untersuchten Tiere in der Schweiz.....	23
<b>3.3. Fleischproben aus dem Handel .....</b>	<b>26</b>
3.3.1. Serologie.....	26
3.3.2. realtime PCR.....	26
3.3.3. Vergleich Serologie / PCR.....	27
3.3.4. Zusammenfassung der Handelsproben.....	27
3.3.5. zeitlicher Verlauf des Antikörper-Titers im Fleischsaft (n = 40).....	27
<b>3.4. Vergleich Haltungsformen in der Schweinemast (outdoor vs. indoor).....</b>	<b>29</b>
<b>3.5. Vergleich 2000 (Studie Reto Wyss) mit 2009 .....</b>	<b>29</b>
<b>3.6. Histologie.....</b>	<b>31</b>
3.6.1. Schlachthofproben.....	31
3.6.2. Handelsproben.....	31
<b>3.7. Westernblot.....</b>	<b>31</b>
<b>3.8. Koprologie Katzenkotproben .....</b>	<b>32</b>
<b>3.9. Genotypisierung.....</b>	<b>34</b>
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>36</b>
<b>5. Fazit .....</b>	<b>42</b>
<b>6. Danksagungen.....</b>	<b>43</b>
<b>7. Literatur .....</b>	<b>44</b>
<b>8. Anhang .....</b>	<b>47</b>
<b>8.1. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>47</b>
8.1.1. Tabellen.....	47
8.1.2. Abbildungen.....	47

# ***Toxoplasma gondii*: potenzielle tierische Infektionsquellen in der Schweiz**

Andrea E. Berger-Schoch<sup>1</sup>, Caroline F. Frey<sup>1</sup>, Daniel Bernett<sup>2</sup>, D. C. Herrmann<sup>3</sup>, Norbert Müller<sup>1</sup>, Marcus Doherr<sup>4</sup>, Gereon Schares<sup>3</sup> und Bruno Gottstein<sup>1</sup>

(1) Institut für Parasitologie, Universität Bern, Schweiz

(2) Abteilung Monitoring, Zoonosen und Diagnostik, Bundesamt für Veterinärwesen, Bern, Schweiz

(3) Friedrich-Loeffler-Institute, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Wusterhausen, Deutschland

(4) Departement klinische Forschung und VPH, Vetsuisse Fakultät, Universität Bern, Schweiz

## **Zusammenfassung**

Der weltweit verbreitete einzellige Parasit *Toxoplasma gondii* ist für eine bedeutende Zoonose verantwortlich, welche schwerwiegende gesundheitliche Folgen beim Menschen haben kann (v.a. vorgeburtlich und bei immungeschwächten Personen). Der Parasit hat einen fakultativ heteroxenen Lebenszyklus mit Feliden als Endwirten. Zwischenwirte können fast alle Warmblüter (Säugetiere, Vögel) und der Mensch sein.

Die letzte epidemiologische Studie zur Inzidenz und Verbreitung von *T. gondii* in der Schweiz wurde 1999/2000 durchgeführt. Das aktuelle Projekt sollte das gegenwärtige Vorkommen von *Toxoplasma*-Infektionen in End- und Zwischenwirten in der Schweiz darstellen und einen Vergleich mit den Daten von 2000 ermöglichen. Zusätzlich wurde ein Vergleich der verschiedenen Haltungsformen in der Schweineproduktion angestrebt. Des Weiteren wurde zum ersten Mal in der Schweiz eine Genotypisierung der gefundenen *T. gondii*-Isolate durchgeführt. Schliesslich wurde deskriptiv auch eine grobe Prävalenz bei der Katze ermittelt, mit der dazugehörigen Genotypisierung. Zusammen sollen diese Daten dazu dienen, das aktuelle Infektionsrisiko für die Schweizer Bevölkerung besser einschätzen zu können.

In der aktuellen Studie wurden Fleischproben von Rindern, Schafen und Schweinen sowohl serologisch als auch mittels PCR auf das Vorliegen einer *Toxoplasma*-Infektion untersucht. Katzenkotproben wurden auf Oozysten untersucht.

Im Vergleich zu 2000 wurde ein leichter Anstieg der Seroprävalenz bei den untersuchten Schlachttieren festgestellt. Die realtime-PCR-positiven Resultate der Schlachttiere zeigen bei den Kälbern einen relativ grossen [ $>20\%$ ], bei den Kühen und Schweinen einen leichten Anstieg, während bei den Schafen eine kleine Abnahme feststellbar war. Bei den Katzen konnte betreffend Oozystenausscheidung eine Prävalenz von 0.4% festgestellt werden. Zusammenfassend halten wir fest, dass das Infektionsrisiko für den Menschen sowohl vom Fleisch wie von der Katze ausgeht, und dass das Expositionsrisiko eher zu- als abgenommen hat.

## **Summary**

The protozoan parasite *Toxoplasma gondii* is one of the most common parasites worldwide and represents an important zoonosis by causing severe complications in affected humans (unborn infants and immunocompromised individuals). The parasite has a facultatively heteroxenous life cycle with felidae as definitive hosts and almost all warm-blooded animals (mammals and birds) and humans as intermediate hosts.

The latest study on the incidence and distribution of *T. gondii* in production animals of Switzerland dated to 1999/2000. The aim of the present investigation was to actualise the epidemiological data on the distribution of *T. gondii* in animals slaughtered for meat consumption (intermediate hosts) and in cats (definitive hosts). Furthermore the data allowed a comparison with the results from 2000. In addition different housing systems for fattening pigs (outdoor versus indoor) were addressed as well as, for the first time in Switzerland, the determination of the genotypes of the detected parasites (*T. gondii*). Finally, in a descriptive way, a rough prevalence with its respective genotyping was identified with the cat. Altogether, the obtained data provided new information concerning the infection risk sources for the Swiss population.

Meat samples of bovines, sheep and pigs were assessed serologically and by PCR for the presence of a *Toxoplasma* infection. Cats were assessed for oocyst-excretion.

Compared to 2000, the obtained results suggested a slight increase in the overall seroprevalence. As for the realtime PCR data the results for calves, cows and pigs showed an increase compared to 2000 (only a slight increase for all species expect the calves [ $>20\%$ ]), whereas the results for sheep showed a slight decrease.

In cats, the prevalence determined for oocyst excretion was of 0.4%.

Conclusively, the risk of infection for a human being can still come both from meat as well as from the cat, and in both cases, the risk has not decreased, but remains either persisting or even increasing.

# 1. Einführung

Der Parasit *Toxoplasma gondii* ist ein weltweit verbreitetes Kokzidium mit fakultativ heteroxenem Entwicklungszyklus. Weltweit gilt die Toxoplasmose als eine der bedeutendsten parasitären Zoonosen. Endwirt sind Feliden, in deren Dünndarm Oozysten gebildet werden, die sich nach dem Ausscheiden mit dem Kot an der Aussenwelt zu infektiösen Stadien (sporulierte Oozysten) entwickeln. Als fakultative Zwischenwirte dienen fast alle Warmblüter (Säugetiere, Vögel) inklusive der Mensch.

Der Parasit *T. gondii* hat verschiedene horizontale Übertragungswege entwickelt: vom Endwirt zum Zwischenwirt (**Oozysten**), vom Zwischenwirt zum Endwirt (**Gewebezysten**), vom Endwirt zum Endwirt (**Oozysten**) und vom Zwischenwirt zum Zwischenwirt (**Gewebezysten**, **Tachyzoiten**). Zusätzlich kann eine vertikale Übertragung über die Plazenta bei den Zwischenwirten (inkl. Mensch) vorkommen (Andreolotti, Budka et al. 2007).

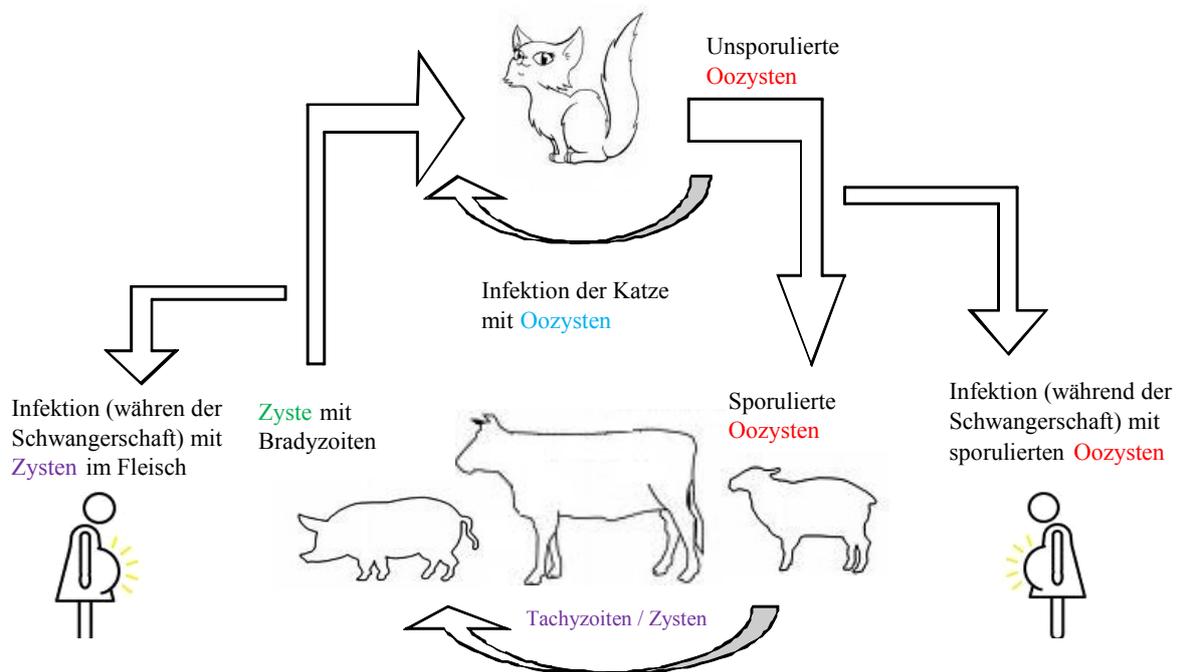


Abb.1 Entwicklungszyklus von *T. gondii*. Sporulierte Oozysten werden vom Zwischenwirt peroral aufgenommen und es werden schliesslich Gewebezysten mit Bradyzoiten gebildet. Nimmt ein Endwirt Muskelfleisch mit Zysten auf, schliesst sich der Zyklus und der Endwirt scheidet nach der Präpatenz-Zeit wieder Oozysten aus. Der Mensch kann einerseits über Oozysten infiziert werden und andererseits über Gewebezysten.

## 1.1. Entwicklung

### 1.1.1. Entwicklung im Endwirt (Feliden)

Katzen infizieren sich durch Aufnahme von sporulierten Oozysten aus der Umwelt oder durch Aufnahme von Gewebezysten aus den Zwischenwirten.

Nach der Aufnahme von Oozysten werden die Sporozoiten im Dünndarm der Katzen frei und dringen via Darmwand und Blut/Lympe in die inneren Organe ein. Dort machen sie eine extraintestinale Entwicklung wie im Zwischenwirt durch. Ein Teil der extraintestinal gebilde-

ten Stadien kehrt dann in die Darmwand zurück und durchläuft die Entwicklung bis zur Oozystenbildung.

Nimmt die Katze Gewebezysten auf, bleiben die meisten Bradyzoiten im Dünndarm und leiten dort in den Enterozyten eine Endopolygenie (Schizogonie; Bildung von Merozoiten) und Gamogonie (Bildung von Mikro- und Makrogamonten) ein. Die Mikrogamonten befruchten die Makrogamonten und es entstehen unsporulierte Oozysten, die mit dem Kot ausgeschieden werden. Die Oozysten sind ca. 12µm gross und enthalten im sporulierten Zustand zwei Sporozysten mit je 4 Sporozoiten.

Die Präpatenz nach der Aufnahme von Gewebezysten beträgt 3 – 10 Tage, nach Aufnahme von Oozysten 18 – 36 Tage. Die Patenz dauert wenige Tage bis 3 Wochen.

### **1.1.2. Entwicklung im Zwischenwirt (Warmblüter)**

Nach Aufnahme von Gewebezysten oder Oozysten dringen die Parasiten über lymphohämatogene Wege in die inneren Organe der Zwischenwirte ein. Dort beginnen sich die Sporozoiten intrazellulär schnell zu vermehren (Endodyogenie; Bildung von Tachyzoiten) und es kommt zu einer Parasitämie. Mit der Bildung der parasiten-spezifischen Immunantwort leiten die Tachyzoiten der letzten Generation die Phase der Zystenbildung ein. Diese Zysten enthalten Tausende zu Bradyzoiten umgeformte Tachyzoiten, die sich nur noch selten teilen. Die Zysten sind 50 - 100µm gross und können lebenslänglich persistieren.

### **1.1.3. Entwicklung im Menschen**

Der Mensch kann sich einerseits über die Aufnahme von sporulierten Oozysten (z.B. Katzenkot) oder andererseits über Gewebezysten (z.B. ungenügend gekochtes Fleisch) infizieren. Die weitere Entwicklung läuft wie bei den anderen Zwischenwirten ab. [Kap. 1.1.2]

Beim Menschen mit normaler Immunabwehr verursacht die Toxoplasmose nur selten Krankheitserscheinungen wie Lymphadenopathie oder leichte Grippe-symptome; meistens verläuft die Infektion asymptomatisch, führt aber zu einer lebenslangen Persistenz von Gewebezysten (Miro, Montoya et al. 2008).

Infiziert sich eine Frau erstmals während der Schwangerschaft mit dem Parasiten, kann es zu einer pränatalen Infektion des Ungeborenen kommen (vertikale Übertragung). Das Risiko der materno-foetalen Transmission beträgt ca. 30% und steigt mit zunehmender Schwangerschaftsdauer an (Dunn, Wallon et al. 1999). Die Folgen der Infektion variieren von subklinisch bis lebensbedrohlich oder können zu foetalem oder neonatalem Tod führen. Spätschäden wie die okkuläre Toxoplasmose können ebenfalls auftreten.

Eine zweite Risikogruppe sind die immunsupprimierten Patienten. Die meisten *T. gondii*-Infektionen bei dieser Gruppe sind Reaktivierungen von früheren Infektionen (Andreolotti, Budka et al. 2007). Die klinischen Symptome reichen von inapparent bis hin zu schweren Symptomen wie Enzephalitis, Meningoenzephalitis oder disseminierten Formen.

## **1.2. Epidemiologie**

*T. gondii* ist weltweit verbreitet und in Europa sind 1 – 10 auf 10'000 Neugeborene von der Toxoplasmose betroffen. Davon entwickeln 1% - 2% direkte gesundheitliche Probleme (Lernschwierigkeiten bis hin zu Todesfällen) und 4% - 27% eine okkuläre Krankheit (Cook, Gilbert et al. 2000). In Europa sind zwischen 37% und 58% der Frauen im gebärfähigen Alter seropositiv (Tenter, Heckeroth et al. 2000), der entsprechende Wert für die Schweiz ist 46% (Jacquier et al., 1995).

Haustiere sind oft mit *Toxoplasma* infiziert: 1999/2000 konnte in der Schweiz bei den Rindern ein Seroprävalenz von 4% - 21%, bei den Schafen von 53% und bei den Schweinen von 1% - 27% festgestellt werden (jeweils abhängig von den Altersgruppen).

Die PCR-Prävalenzen, welche im selben Jahr bestimmt worden sind, lagen bei den Rindern zwischen 1% - 6%, bei den Schafen bei 6% und bei den Schweinen bei 0% (Wyss, Sager et al. 2000).

## 1.3. Diagnostische Methoden

### 1.3.1. Antikörper-Nachweis

#### Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA)

Mit Antigen beschichtete Platten werden mit verdünnten Proben inkubiert und allfällig vorhandene Antikörper binden an die Platte. Anschliessend wird enzymmarkiertes Anti-Spezies-IgG (Konjugat) zugegeben und mit Hilfe einer Substratlösung wird gebundenes Konjugat sichtbar gemacht. Der Farbumschlag kann mit einem Spektrometer abgelesen werden und steht in direkter Relation zur vorhandenen Antikörper-Menge.

Dieser Test ist einfach durchzuführen und Konjugate vieler Tierspezies, Substrat und ganze Kits sind kommerziell erhältlich. Diese Methode eignet sich auch für grosse Probemengen und ist wohl der am häufigste in Diagnostiklabors durchgeführte Screening-Test für *T. gondii*. Die Resultatbeurteilung ist objektiv und der Test ist hoch sensitiv und spezifisch (Ortega-Mora, Gottstein et al. 2007).

Der ELISA wird heutzutage in verschiedenen Variationen durchgeführt (unterschiedliche Plattenbeschichtungen mit verschiedensten Antigenen; kinetischer ELISA u.a.) und mit Hilfe des Aviditäts-ELISA kann zwischen akuter und chronischer Infektion unterschieden werden.

#### Sabin Feldman dye test

Lebende *Toxoplasma*-Tachyzoiten werden mit einem zusätzlichen Faktor (im Serum eines nicht-infizierten Individuums enthaltenes Komplement) versehen und zum Testserum gegeben. Anschliessend wird mit Methylenblau inkubiert. Sind in der zu untersuchenden Serumprobe *T. gondii*-Antikörper vorhanden, wird die Membran der Tachyzoiten so verändert, dass sie für Methylenblau durchlässig wird und die Tachyzoiten bleiben farblos. Sind keine Antikörper vorhanden, färben sich die Tachyzoiten blau (Ortega-Mora, Gottstein et al. 2007).

Diese Methode gilt bis heute als Goldstandard, ist nicht Spezies-spezifisch, hat eine hohe Sensitivität und Spezifität und bis anhin sind keine Anhaltspunkte für falsche Resultate (beim Menschen) bekannt (Dubey 2008). Die Methode ist jedoch teuer (Produktion von Tachyzoiten), verlangt ein hohes Mass an technischem Können und wird deshalb nur sehr selten für die Diagnose einer *Toxoplasmose* beim Tier gebraucht.

#### Indirekter Immunofluoreszenz-Antikörpertest (IFAT)

Der Test wird zum Nachweis von spezifischem anti-*Toxoplasma* IgG und IgM eingesetzt und ist Spezies-spezifisch. Vollständige, Formalin-fixierte Tachyzoiten werden mit verdünntem Serum inkubiert und anschliessend wird adäquates, fluoreszierendes anti-Spezies Serum zugegeben. Schlussendlich wird die Probe unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt (Ortega-Mora, Gottstein et al. 2007).

Die Methode ist billig, einfach und fluoreszierende Antikörper sind für viele Tierspezies kommerziell erhältlich. Der Test ist aber relativ zeitaufwändig und kann durch die subjektive Beurteilung des Titers und des Testausgangs variieren. Die Sensitivität ist aber ähnlich hoch wie beim ELISA (Ortega-Mora, Gottstein et al. 2007).

### Direktagglutinationstest (Toxo-Screen DA®)

Kommerziell erhältlicher Test von BioMérieux, der anti-*Toxoplasma*-IgG Antikörper nachweist (modified agglutination test [MAT]). Dabei agglutiniert Formalin-fixiertes *Toxoplasma* Antigen, wenn spezifische IgG Antikörper im verdünnten Serum vorhanden sind. Agglutination bedeutet somit ein positives Resultat und kann schlüssig von negativen, nicht-agglutinierten Proben unterschieden werden.

Der Test hat eine 100%ig Sensitivität und eine 94.8% Spezifität. Seropositive Proben müssen aber mit einem weiteren Test bestätigt werden, da der Vorhersagewert für positive Proben nur 71.3% beträgt (Sukthana, Chintana et al. 2001).

### **1.3.2. Parasiten-Nachweis**

#### Bioassay (Mäuseinokulationstest)

Gewebeproben (Hirn, Muskulatur) von Test-Tieren werden separat mit Trypsin verdaut und eine definierte Anzahl Mäusen wird mit 1ml der verdauten Probe (intraperitoneal) infiziert. Die Tiere werden 30 bis 40 Tage beobachtet und dann euthanasiert. Blutproben werden serologisch untersucht und Hirn-, Muskel- und eventuell weitere Gewebeproben histologisch analysiert.

Der Bioassay in Mäuse ist immer noch etwas effektiver als die konventionelle PCR. Mit der realtime PCR steht heute aber eine gute Alternative zur Verfügung und der Mäuseinokulationstest wird nur noch selten diagnostisch angewendet (da Silva and Langoni 2001).

#### Katzenfütterungstest

Adulte (sicher *Toxoplasma*-negative) Katzen werden mit potenziell infizierten Proben (Fleisch, Mäuse-Gewebe) gefüttert (direkt oder per Schlundsonde). Katzenkot wird täglich gesammelt und mittels Flotation / Mikroskopie auf Oozysten untersucht. Zusätzlich kann auch mithilfe von serologischen Methoden die Serokonversion der einzelnen Katzen verfolgt werden. Am Ende des Versuchs werden die Katzen meistens euthanasiert und die Därme histopathologisch untersucht (Dubey, Miller et al. 1970).

Diese Methode wird heute aus Gründen des Tierschutzes nur noch sehr selten verwendet. Auch stehen heute mit der PCR eine günstiger und tierschonendere Methode zur Verfügung.

#### Kombiniertes Sedimentations-Flotations-Verfahren / Lichtmikroskopie

5 – 10g Kot wird in einem geeigneten Gefäss mit Wasser zu einer möglichst homogenen Suspension verrührt und anschliessend durch ein grobmaschiges Sieb gespült. Nach einer Sedimentationszeit von 30min wird der Überstand dekantiert und das anschliessend gut durchmischte Sediment (ca. 2ml) wird in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Dieses wird mit der Flotationslösung (ZnCl<sub>2</sub>) bis zum Rand aufgefüllt. Nach der Zentrifugation bei ca. 2000 U/min können die gesuchten Parasitenstadien mit Hilfe einer Öse oder direkt mit einem Deckglas von der Oberfläche entnommen und mikroskopisch untersucht werden.

Dieses Verfahren wird sehr häufig in diagnostischen Labors angewendet und ist eine sehr sensitive Methode (bis 100% Sensitivität). Sie hängt aber auch vom Können und der Erfahrung des Untersuchers ab und beinhaltet damit einen kleinen Rest-Unsicherheitsfaktor (Rommel, Eckert et al. 2000).

#### Histologie / Immunhistochemie

Bei Aborten oder Totgeburten kann eine histologische Untersuchung von Plazenta-, Gehirn oder Muskelgewebe durchgeführt werden. Dazu wird das Gewebe in Formalin fixiert, dehydriert, gewaschen und in Paraffin eingebettet. Danach werden die Paraffin-Blöcke geschnitten und die Hämatoxylin/Eosin-gefärbten Schnitte können unter dem Mikroskop beurteilt werden.

Beim immunohistochemischen Verfahren werden zusätzlich noch spezifische *Toxoplasma*-Antikörper zugegeben, welche an das *Toxoplasma*-Antigen im Gewebe binden und mittels spezieller Reagenzien im Fluoreszenz-Mikroskop sichtbar gemacht werden können (Ortega-Mora, Gottstein et al. 2007).

Die Histologie wie auch die Immunhistochemie haben eine tiefere Sensitivität als die PCR-Methode, da beide von der subjektiven Beobachtung des Untersuchers abhängig sind und somit variiert die Sensitivität der Methode auch zwischen den verschiedenen Labors. Der Vorteil der Methode liegt darin, dass das Vorkommen des Parasiten direkt mit den Läsionen korreliert (Ortega-Mora, Gottstein et al. 2007). Wie auch in der PCR kann bei dieser Methode nur ein sehr kleines Probenvolumen untersucht werden, was zu einer Verminderung der Sensitivität führen kann.

#### PCR (konventionelle PCR und realtime PCR)

Die PCR-Methode dient zum direkten Nachweise der Parasiten-DNA im Gewebe oder im Blut. Dazu wird mit Hilfe verschiedener Reagenzien die DNA aus der Gewebe- oder der Blutprobe aufgearbeitet. Anschliessend wird die DNA nach Zugabe von Primern in einem Thermozykler in 25 – 40 Zyklen vermehrt (Denaturation, Annealing, Elongation). Damit kann eine Amplifikation von bis zu  $10^6$  der Ursprungsmenge erreicht werden (Rommel, Eckert et al. 2000). Bei der konventionellen PCR werden die PCR-Produkte anschliessend mittels Gel-Elektrophorese aufgetrennt und sichtbar gemacht. Bei der realtime PCR kann das Resultat dank Labelling mit fluoreszierenden Molekülen direkt sichtbar gemacht und abgelesen werden.

Die PCR-Methode hat eine sehr hohe Spezifität (je nach Studie bis 100%) und ebenfalls eine sehr hohe Sensitivität. Der positive prediction value ist annähernd bei 100% (Montoya and Liesenfeld 2004).

Trotz der hohen Sensitivität und Spezifität hat die PCR-Methode durch das kleine einsetzbare Probenvolumen einen entscheidenden Nachteil beim Nachweise von Parasiten-DNA im Gewebe. Zusätzlich ist die Technik immer noch relativ teuer (Ortega-Mora, Gottstein et al. 2007).

### **1.4. Genotypen von *T. gondii***

Bei *T. gondii* sind bisher drei Genotypen (I, II, III) bekannt. Deren Einteilung beruht vorwiegend auf ihrem unterschiedlichen Verhalten in Mäusen (Darde 2004):

- **Typ I:**  
Selten isolierter Stamm; sehr virulent für Mäuse (10% der Stämme in Europa und den USA; vorwiegend bei Menschen, wenig bei Tieren).
- **Typ II:**  
Der am häufigsten isolierte Stamm; nicht virulent für Mäuse (80% der gefundenen Isolate in Europa und den USA; Mensch, Schaf, Schwein).
- **Typ III und rekombinante Genotypen:**  
Selten in Europa und den USA; virulenter als Typ II für Mäuse (häufig aus Wildtieren isoliert).

## 1.5. Prävention

Präventionsmassnahmen können das Risiko einer *Toxoplasma*-Infektion signifikant reduzieren, aber eine Infektion kann nicht immer verhindert werden (Tenter, Heckeroth et al. 2000).

Zu den wichtigsten Präventionsmassnahmen gehören folgende Regeln:

- Katzen nicht mit rohem oder ungenügend gekochtem Fleisch füttern oder das Fleisch vorher tiefgefrieren.
- Katzenkisten täglich säubern. (Sollte nicht von Schwangeren und anderen zu Risikogruppen gehörenden Personen gemacht werden.)
- Katzen aus Gebäuden fernhalten, in welchen Schlachttiere gehalten werden (Rinder, Schweine, Schafe, Geflügel u.a.).
- Regelmässiges Screening von Katzen (Serologie, Koprologie)
- Fleisch nicht roh oder nur leicht gekocht konsumieren (die Kerntemperatur beim Kochen sollte im Minimum 67°C betragen).
- Hoher Standard bei der Küchenhygiene.
- Keine ungewaschenen Gemüse, Salate oder Früchte konsumieren.
- Risikopersonen sollten bei Gartenarbeiten Handschuhe tragen.

(Tenter, Heckeroth et al. 2000; Miro, Montoya et al. 2008)

## 1.6. Zielsetzung der aktuellen Studie

Das aktuelle Projekt sollte ein Bild der gegenwärtigen Situation der *T. gondii*-Infektionen in End- und Zwischenwirten in der Schweiz geben und die Daten von 2000 sollten mit den heutigen Resultaten verglichen werden. Zusätzlich wurde eine Gegenüberstellung der verschiedenen Haltungsformen in der Schweineproduktion gemacht: Vergleich von intensiv gehaltenen Mastschweinen mit Freilandschweinen und Wildschweinen. Des Weiteren wurde zum ersten Mal in der Schweiz eine Genotypisierung der gefundenen Parasiten (*T. gondii*) angestrebt (Genotyp I, II und III). Schlussendlich sollte die Studie ein Bild der aktuellen Prävalenz der *T. gondii*-Ausscheidung bei der Katze geben.

Anhand dieser Daten sollte das aktuelle Infektionsrisiko für die Schweizer Bevölkerung besser einzuschätzen und der Durchseuchungsgrad der Nutztierpopulation feststellbar sein.

## 2. Tiere, Material und Methoden

### 2.1. Proben und Stichprobenumfang

In der vorliegenden Studie wurden Fleischproben von drei Zwischenwirtspezies untersucht: Rinder (Kälber, weibliche Jungrinder [Gusti], Mastbullen [Muni], Kühe), Schafe (Lämmer, Auen) und Schweine (intensiv gehaltene Mastschweine, Freilandschweine, Mutterschweine, Wildschweine) und Kotproben von der Endwirtspezies (Katze).

Die Fleischproben wurden zum Teil direkt aus den Schlachthöfen (Schlachthöfe Estavayer-le-Lac, Basel, Courtepin, Eggwil u.a.) [Tabelle 1] oder von der Jagd und zum anderen Teil von Direkteinkäufen im Handel (Migros, Coop, lokale Metzgereien) [Tabelle 2] bezogen.

Tab. 1

<b>Schlachthöfe</b> <b>Tiergruppe</b>	<b>Basel</b> (Proben)	<b>Bazenhe id</b> (Proben)	<b>Courtepin</b> (Proben)	<b>Eggwil</b> (Proben)	<b>Estavayer-le-lac</b> (Proben)	<b>Zürich</b> (Proben)	<b>div. kleine Schlachthöfe</b> (Proben)	<b>Jagd</b> (Proben)
Kälber	-	-	-	-	50	-	-	-
Gusti	-	-	-	-	130	-	-	-
Muni	-	-	-	-	100	-	-	-
Kühe	-	-	-	-	130	-	-	-
Lämmer	100	-	-	-	-	-	-	-
Auen	127	-	-	23	-	-	-	-
Mastschweine	42	8	-	-	-	-	-	-
Freiländer	7	2	53	-	-	-	38	-
Mutterschweine	71	-	-	-	-	49	-	-
Wildschweine	-	-	-	-	-	-	-	150

Tab. 2

<b>Tiergruppe</b>	<b>Migros</b> (Proben)	<b>Coop</b> (Proben)	<b>Metzgerei</b> (Proben)
Lämmer	34	34	32
Rinder	40	40	40
Schweine	40	40	40

Von jedem Schlacht tier wurde ein Stück Muskulatur direkt im Schlachthof oder vom Jäger auf der Jagd (Wildschweine) abgepackt. Die Proben aus den Schlachthöfen und von der Jagd waren ca. 20g schwer und wurden vom Diaphragma mit einem (für jede Probe neuen) Einweg-Skalpell abgeschnitten. Im Handel wurde ca. 50g Ragout oder ähnliches eingekauft. Alle Proben wurden bei -30°C eingefroren.

Fleischsaft wurde durch Auftauen der Proben und Sammeln der entstandenen Flüssigkeit gewonnen. Gleichzeitig wurden für die realtime PCR pro Probe 2 x 0.5g kleingeschnittenes Fleisch zur DNA-Isolierung abgewogen.

Katzenkotproben wurden zu einem grossen Teil in Tierheimen und Tierferienpensionen der Regionen Bern und Olten gesammelt. Den Heim en wurden dazu kleine Behälter zum Sammeln des Kots und für jede Probe ein entsprechendes Formular zugeschickt. Falls bekannt, wurden von den Katzen Name, Alter, Geschlecht, Fundort oder Haltungsort und Hal tungsort erfasst. Dieser Teil der Kotproben stammt zum allergrössten Teil von gesunden Katzen ohne Anzeichen von Krankheiten. Ein kleinerer Teil der Proben stammte aus der Routine-

Diagnostik des Instituts für Parasitologie, Bern und damit von Katzen, welche Symptome aufwiesen, die eine Kotuntersuchung rechtfertigten. Der in der aktuellen Studie untersuchte Teil der Katzenpopulation setzte sich folglich aus gesunden Katzen aus Privathaushalten (68%), Findelkatzen (17%) und Katzen aus Tierarztpraxen (15%) zusammen.

Der benötigten Stichprobenumfangs wurde mit Win Episcopo 2.0 (<http://www.clive.ed.ac.uk/clive>) unter Verwendung von folgenden Einstellungen berechnet: Populationsgrösse:  $\geq 50'000$ ; Vertrauensbereich: 95%; akzeptierter Fehler: 1.4% (für den Nachweis von *T. gondii* Oozysten im Katzenkot), bzw. 8% (für die Fleischsaftuntersuchungen); Sensitivität und Spezifität des verwendeten Tests: 100%. Die angenommenen serologischen Befallshäufigkeiten von *T. gondii* bei Schlachttieren basieren auf der Studie von Wyss et al. (2000) oder wurden geschätzt [Tabelle 3]. Die errechneten Stichprobenumfänge sind in Tabelle 3 ersichtlich. Bei der Berechnung des Stichprobenumfanges wurde zudem überprüft, welche Stichprobengrößen nötig sind, um mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% mind. eine PCR-positive Probe detektieren zu können, falls die Infektion in der Population vorhanden wäre. Die berechneten Stichprobengrösse aus Tabelle 3 trugen dieser Vorgabe i.d.R. genügend Rechnung, bzw. wurden wie beispielsweise beim Schweinefleisch aus dem Verkauf entsprechend angepasst.

Tab. 3

Tiergattung	Tierkategorie	Seroprävalenz <i>T. gondii</i>	Stichprobengrösse
<b><i>Fleischsaftuntersuchungen bei Schlachttieren</i></b>			
Rinder	Kühe	32%	130
	Gusti	32%	130
	Muni	21%	100
	Kälber	4%	50 <sup>1</sup>
Schafe	Auen (> 11Mt.)	53%	150
	Lämmer (< 11 Mt.)	21% (geschätzt)	100
Schweine	Mastschweine (konventionelle Haltung)	1%	50 <sup>1</sup>
	Mutterschweine (konventionelle Haltung)	27%	120
	Freilandschweine (Freilaufhaltung)	5-21% (geschätzt)	100
	Wildschweine	50% (geschätzt)	150
<b><i>Frischfleisch im Handel (Ragout)</i></b>			
Rindfleisch	Muni und Rinder	27%	120
Lammfleisch	-	21% (geschätzt)	100
Schweinefleisch	-	3%	120 <sup>2</sup>
<b><i>Koprologie zum Nachweis von T. gondii Oozysten in Katzenkot</i></b>			
Katzenkot	-	1% (geschätzt)	200 <sup>3</sup>

<sup>1</sup> Der errechnete Wert lag bei 6 bzw. 24 und wurde erhöht auf je 50 Proben

<sup>2</sup> Der errechnete Wert lag bei 18 und wurde erhöht auf 120 Proben und somit dem Umfang bei Rindfleisch und Lammfleisch angeglichen. Zudem kommt diese angepasste Stichprobenmenge der benötigten Stichprobengrösse

<sup>3</sup> Achtung: der akzeptierte absolute Fehler wurde beim Katzenkot wegen der tiefen zu erwartenden Befallsprävalenz auf 1.4% angesetzt.

Folgende Probemengen sind schlussendlich effektiv untersucht worden: [Tabelle 4]

Tab. 4

**Schlachthaus:**

Kälber	47 Tiere
Gusti	129 Tiere
Muni	100 Tiere
Kühen	130 Tiere
Lämmer	100 Tiere
Auen	150 Tiere
Mastschweine	50 Tiere
Mutterschweine	120 Tiere
Freilandschweine	100 Tiere
Wildschweine	150 Tiere
<b>Total</b>	<b>1076 Tiere</b>

**Handel:**

Rinder	120 Tiere
Schweine	120 Tiere
Lämmer	100 Tiere
<b>Total</b>	<b>340 Tiere</b>

**Katzen:**

252 Kotproben
---------------

## 2.2. ExVivo-Experiment mit C57BL/6 Mäusen (n = 2)

Vorgängig zu allen DNA- (realtime PCR, nested PCR, RFLP-) und Histologie-Untersuchungen wurde ein Maus-Experiment durchgeführt, welches zeigen sollte, dass Muskelzysten und Parasiten-DNA im Muskelfleisch durch Tiefgefrieren nicht zerstört werden.

Zu diesem Zweck wurden zwei C57BL/6 Mäuse mit je  $10^6$  Tachyzoiten von *T. gondii* (Isolat aus einer Schweizer Katze) infiziert. Die Mäuse wurden einen Monat nach Infektion euthanasiert. Von jeder Maus wurden direkt eine Hirn- und eine Muskelprobe entnommen (Probe 1), und je die Hälfte der Maus eingefroren beziehungsweise in 4%-PBS-gepuffertem Formalin eingelegt. Nach einigen Tagen wurde die gefrorenen Maushälften wieder aufgetaut, Muskel- und Hirnproben entnommen (Probe 2) und der Rest der Maushälfte wiederum in 4%-PBS-gepuffertem Formalin eingelegt.

Von den 2 Hirnproben und 2 Muskelproben (je eine nicht gefroren [Probe 1] und eine gefroren [Probe 2]) wurde anschliessend die DNA aufgearbeitet (siehe 2.4) und mittels realtime PCR (wie unter 2.5 beschrieben) untersucht.

Von der nicht gefroren, in Formalin eingelegten Maushälfte sowie von der nach Einfrieren eingelegten Maushälfte wurden je eine Muskelprobe und eine Hirnprobe histologische untersucht. (Methode unter 2.6 beschrieben, 2 Proben pro Organ im Abstand von 0.5mm.)

## 2.3. Serologie

Für den Nachweis von *Toxoplasma*-Antikörpern im Fleischsaft wurde ein P30-ELISA (ELISA-Platten, die mit affinitätsgereinigtem P30-Oberflächenantigen beschichtet sind; SR<sup>2</sup>B, Arvillé, France) eingesetzt, welcher dem Standardprozedere des Diagnostiklabors des Instituts für Parasitologie der Universität Bern entspricht (Nationales Referenzlabor für Toxoplasmosis). Für die aktuelle Studie ist jeder Fleischsaft als Einfachansatz in einer Verdünnung von 1:10 geprüft worden. Für die verschiedenen Spezies wurden verschiedene sekundäre Antikörper verwendet: Esel-anti-Schaf IgG alkalische Phosphatase (AP) (Sigma Immunochem. cat. no. A5187; Verdünnung 1:4000), Kaninchen-anti-Rind AP (Sigma Immunochem. cat. no. A0705; Verdünnung 1:1000) und Kaninchen-anti-Schwein AP (Sigma Immunochem. cat. no. A1192; Verdünnung 1:4000). Als Substratlösung wurde 104<sup>®</sup> Phosphatase von Sigma verwendet (1mg/ml). Die Platten wurden nach dem Auftauen mit ELISA-Waschpuffer (20g

NaCl, 0.5g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3.5g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.5g KCl, 0.5g NaN<sub>3</sub>, 7.5ml Tween in 1l H<sub>2</sub>O<sub>ad inject.</sub>, pH 7.2 – 7.4) gewaschen. Anschliessend wurden die Platte mit ELISA-Verdünnungspuffer 1% Horse Serum (0.8g NaCl, 0.2g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.4g Na<sub>2</sub>HOP<sub>4</sub>, 0.2g KCl, 0.2g NaN<sub>3</sub>, 3ml Tween 20 in 1l H<sub>2</sub>O<sub>ad inject.</sub>, pH 7.2 – 7.4) 30 min bei 37°C abgesättigt. Danach wurden die Probenverdünnungen und Kontrollen in die entsprechenden Wells pipetiert und 90min bei 37°C inkubiert. Nach dem Waschen mit ELISA-Waschpuffer wurde mit Konjugat 45min bei 37°C inkubiert und anschliessend wurde die Platte wiederum mit Waschpuffer gewaschen. Schlussendlich wurde die Substratlösung zugegeben und nach 10 – 20min wurde die Reaktion mit NaOH (3N) gestoppt. Die Resultate werden mit einem ELISA-Reader (Wellenlänge 405nm, Referenzwellenlänge 630nm) abgelesen. Die Methode wurde bei Sager, Gloor et al. 2003 beschrieben.

Der Nullwert jeder Platte wurde aus der Standardabweichung (s) und der mittleren optischen Dichte (mean OD) von Minimum 30 negativen Seren (diagnostisch abgeklärt vom Institut für Parasitologie Bern) berechnet [mean OD + 3s] (Wyss, Sager et al. 2000). Für jede Probe wurde dann eine plattenkorrigierte Ratio aus dem mean OD-Wert im Verhältnis zum Nullwert auf der Platte berechnet. Der Test wurde vor Beginn der Untersuchungen mit Seren jeder Tierart aus der Studie von 2000 noch einmal reevaluiert.

Positiv- und Negativkontrollen für die Rinder-ELISA wurden aus früheren Studien (Gottstein, Hentrich et al. 1999; Wyss, Sager et al. 2000) übernommen. Die Schaf-Kontrollseren (positiv und negativ) wurden von A. Tenter (Institut für Parasitologie, Hannover, Deutschland) zur Verfügung gestellt und die Schweine-Kontrollen stammen von P. Lind (Kopenhagen, Dänemark). Alle Kontrollseren sind in einer früheren Studie (Lind, Haugegaard et al. 1997) überprüft worden.

### **2.3.1. Zeitlicher Verlauf des Antikörper-Titers im Fleischsaft**

Zur Abklärung, ob Antikörper während des normalen Reifungsprozesses des Fleisches vor der Freigabe für den Handel abgebaut werden können, ist eine Versuchsreihe mit Rindfleischproben (n = 40) vorgesehen worden.

Je 20 Proben von Gusti und Muni wurden direkt im Schlachthof bezogen. Jede dieser Proben wurde in sieben ca. gleich grosse Stücke unterteilt. Von jedem Tier (Rind 1 – 20; Muni 1 – 20) wurde eine Fleischsaftprobe (Nr. 0) nach 4 – 5 Tagen Lagerung im Schlachthof bei 4°C genommen und mittels des P30-ELISA (wie unter 2.3. beschrieben) auf Antikörper getestet. Diese Probe wurde also genau zum selben Zeitpunkt genommen wie die Proben vom übrigen Schlachthoffleisch dieser Studie. Die übrigen zu jedem Tier gehörenden 6 Proben (n<sub>total</sub> = 240) wurden vakuumiert und bei 4°C weiter gelagert.

Während drei Wochen (entspricht der üblichen durchschnittlichen Lagerungszeit von Fleisch, bevor es in den Verkauf gelangt) sind pro Woche zwei Proben pro Tier eingefroren (-30°C) worden. Am Ende des Versuchs wurden alle gefrorenen Proben wieder aufgetaut und Fleischsaft gesammelt. Alle Proben sind dann mittels des P30-ELISA auf Antikörper untersucht worden, wobei insbesondere auf den Titerverlauf im Fleischstück jedes Tieres geachtet wurde.

## **2.4. Westernblot**

Ein Westernblot zur Bestätigung und somit zur Verbesserung der Genauigkeit der Serologie-Resultate wurde mit einigen Anpassungen im Wesentlichen wie bei Staubli, Nunez et al. 2006 beschrieben ausgeführt. Die gefrorenen *T. gondii*-Tachyzoiten-Pellets (in-vitro Kultivierung eines RH-Stammes) wurden auf Eis aufgetaut und in 80µl Lämmle Buffer (Tris [pH 6.8,

1.5M], SDS 20%, Glycerol, Mercaptoethanol, BromphenolBlue, H<sub>2</sub>O) resuspendiert. Anschliessend wurde die Suspension 5min bei 95°C auf dem Wärmeblock denaturiert.

Die Proben wurden in einem 12% Trenn-Gel mit einem 3% Sammel-Gel elektrophoretisch getrennt. Danach sind die aufgetrennten Komponenten auf PVDF-Membranen (Whatman, pore size 0.45µm, Lot 7069776) transferiert worden. Die Membranen sind für die anschliessenden Untersuchungen einzelner Proben in Streifen geschnitten worden.

Zur Untersuchung der Proben wurden die PVDF-Streifen 4 Stunden mit PBS/0.05%Tween/2.5%Sojamilch geblockt. Daraufhin sind die Streifen über Nacht mit 1:50 in PBS/Tween/Sojamilch verdünnten Fleischsäften auf der Schaukel inkubiert worden. Bevor die Streifen mit Anti-Peroxidase (Anti-Bovine-Peroxidase 1:300; Anti-Sheep-Peroxidase 1:500, Anti-Pig-Peroxidase 1:1000) behandelt worden sind (2 Stunden auf der Schaukel), wurden sie 4 x 5min mit vorgewärmtem (ca. 50°C) PBS/Tween gewaschen. Vor dem Sichtbarmachen der Banden mittels 3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid in 20ml PBS und 2µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Inkubation 10min) sind die Streifen noch einmal 5 x 5min mit PBS/Tween und 2 x 5min mit PBS gewaschen worden. Die Reaktion ist mit H<sub>2</sub>O<sub>demin.</sub> gestoppt worden. Zur Archivierung sind die Membranen sofort eingescannt worden.

## 2.5. DNA-Extraktion für PCR

Die DNA-Extraktion aus den Gewebeproben erfolgte mittels des DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland). Das Protokoll des Herstellers wurde leicht modifiziert hinsichtlich des Verdauungsschrittes mit Proteinase K. Anstelle der im Handbuch vorgeschlagenen 50µl Gewebe, 20µl Proteinase K und 180µl ATL-Puffer wurden 2 x 500µl Gewebe pro Probe mit je 100µl Proteinase K und 900µl ATL-Puffer inkubiert. Mit dieser Anpassung konnte eine 10x höhere Sensitivität als bei der im Buch „Protozal abortion in farm ruminants: guidelines for diagnosis and control“ (Ortega-Mora, Gottstein et al. 2007) beschriebenen Methode erreicht werden.

Nach der Verdauung über Nacht wurden je 100µl der Lösung aus den zwei entsprechenden Eppendorf-Tubes entnommen und die weiteren Aufarbeitungsschritte sind entsprechend dem Herstellerprotokoll ausgeführt worden. Die Proben sind anschliessend direkt für die realtime PCR verwendet oder bei -30°C eingefroren worden.

## 2.6. PCR-Analysen

Für den DNA-Nachweis aus den Fleischproben wurde eine bereits früher beschriebene realtime-PCR-Methode, die einen 529-bp Abschnitt des B1-Genes von *Toxoplasma gondii* amplifiziert, mit einigen Modifikationen verwendet (Costa, Pautas et al. 2000; Müller, Vonlaufen et al. 2002).

Die Amplifikations-Mixtur bestand aus 1.575µl H<sub>2</sub>O, 1µl Mastermix (LightCycler FastStart Master Hybridization Probes, Roche Diagnostics), 0.25µl 40x Primer-P-Tox-PF2 (5'-GGAGGACTGGCAACCTGGTGTTCG-3'), 0.25µl 40x Primer-P-Tox-PR2 (5'-TTGTTTCACCCGGACCGTTTAGCAG-3'), 1µl 10x Sonde-P-X-SO3FL (5'-CGGAAATAGAAAGCCATGACGCACTCC-3'), 1µl 10x Sonde-P-X-SO5LC (5'-ACGGGCGAGTAGCACCTGAGGAGAT-3'), 0.8µl MgCl<sub>2</sub> (25mM) und 0.125µl UDG (1unit/µl; hitzelabil) pro Ansatz. Das Reaktionsvolumen jedes Ansatzes betrug 10µl (6µl Mixtur, 1µl DNA, 3µl H<sub>2</sub>O). Die Analysen wurden auf einem Corbett Rotor-Gene<sup>TM</sup> 6000 (realtime rotary analyzer) der Firma Biolabo Scientific Instruments SA, Châtel St – Denis, entsprechend den Herstellervorschriften durchgeführt und mit der vom Hersteller zur Verfügung gestellten Software ausgewertet.

## 2.7. Genotypisierung

Mit den realtime-PCR-positiven Proben wurden weitere Analysen zur Genotypisierung wie bei Basso, More et al. 2009 beschrieben durchgeführt.

Die nested PCR (n-PCR) und die RFLP (restriction fragment length polymorphism)-Analyse (basierend auf Markern für die Loci 3'-SAG2, 5'-SAG2, BTUB (I), BTUB (II), GRA6, SAG3, c22-8, L358, PK1, c29-2 und Apico) wurden wie folgt durchgeführt:

Die Primer wurden in einer Konzentration von 0.3µM und die dNTP's in einer Konzentration von 250µM eingesetzt, TaqPolymerase wurden 4U/100µl verwendet. Für beide Amplifikations-schritte wurde 2.5µl DNA genommen. Die Reaktionen wurden dann auf einem Thermozykler mit einem initialen Denaturierungsschritt (94°C, 4min), 35 Zyklen (94°C – 30sec, 55°C – 1min, 72°C – 2min) und einem letzten Extensionsschritt (72°C, 5min) durchgeführt. Anschliessend an die n-PCR wurden die zweiten Amplifikationsprodukte für die RFLP-Analyse mit Restriktionsendonukleasen verdaut.

## 2.8. Histologie

Von jeder aufgetauten Fleischprobe wurde 1g in 4%-PBS-gepuffertem Formalin fixiert. Die PCR-positiven Proben sind am Institut für Tierpathologie der Universität Bern in Paraffin eingebettet, geschnitten (3 – 4µm dick) und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt worden. Die Schnitte sind anschliessend unter dem Mikroskop auf das Vorkommen von *T. gondii*-Zysten untersucht worden. (Pro Organprobe ein Schnitt)

## 2.9. Koprologische Untersuchungen

Die von Tierheimen erhaltenen und aus der Routine-Diagnostik stammenden Kotproben von Katzen wurden mittels eines kombinierten Sedimentations-/Flotationsverfahren auf das Vorkommen von *Toxoplasma/Hammondia*-Oozysten und Oozysten bzw. Eiern von anderen intestinalen Parasiten untersucht. Die Flotations-Technik wurde dabei wie bei Rommel, Eckert et al. 2000 beschrieben durchgeführt.

Kotproben, welche *Toxoplasma/Hammondia*-Oozysten aufwiesen, wurden mit der schon zuvor beschriebenen realtime-PCR-Methode (siehe 2.6.) untersucht. Dazu sind die Oozysten aus dem Sediment des Kots mit Hilfe einer gesättigten Succrose-Lösung (Dichte D = 1.3) aufkonzentriert worden (Schaes, Pantchev et al. 2005). Zum Aufschliessen wurden die Oozysten anschliessend mit einem Sonikator (Branson Sonifier 250) behandelt (50mg glass beads, 2min, 50 Duty control [% auf Power Output], 35 Watt) und 3x hintereinander in flüssigem Stickstoff eingefroren und wieder aufgetaut (Standardprozedere des Diagnostiklabors des Instituts für Parasitologie der Universität Bern). Die DNA-Aufarbeitung wurde mittels des DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) entsprechend dem Herstellerprotokoll zur Aufarbeitung von Gewebeproben durchgeführt. Anschliessend wurde sowohl eine *Toxoplasma*-PCR (siehe 2.6.) wie auch eine *Hammondia*-PCR (Schaes, Herrmann et al. 2008) durchgeführt. Mit diesen Analysen kann eine sichere Identifizierung von *H. hammondi*- und *T. gondii*-Oozysten (mikroskopisch nicht unterscheidbar) erreicht werden.

## 2.10. Statistische Analysen

Die statistischen Analysen wurden einerseits mit der Software Microsoft Excel und andererseits mit dem NCSS-Programm durchgeführt.

Die Häufigkeit ELISA- und PCR-positiver Tiere innerhalb der einzelnen Tierarten (zwischen den Alterskategorien oder Nutzungsformen) und zwischen den verschiedenen Tierarten wurden mit dem Exakten Fisher-Test auf Signifikanz-Unterschiede geprüft. Hierfür wurde das Programm STRUC verwendet (Einstellungen: 10'000 Dememorisations-Schritte, 100 batches und 5000 Iterationen pro batch). STRUC ist Teil des GENEPOP 3.4 (Raymond & Rousset, 1995) Software Paketes und berechnet den P-Wert des Exakten Fisher-Tests in R x C Mehrfelder-Kombinationen in einer ungebiasteten Weise. Infolge multiplen Testens wurden die P-Werte Bonferroni korrigiert (Holm, 1979). Die 95% Konfidenz-Intervalle der Binomialverteilung zu den Häufigkeiten positiver Reagenten innerhalb einer Tiergruppe wurden mit den „BinomLow“ und „BinomHigh“-Funktionen in Excel berechnet (<http://statpages.org/confint.xls>).

Die GIS-Karten wurden vom Bundesamt für Veterinärwesen (BVET) zur Verfügung gestellt.

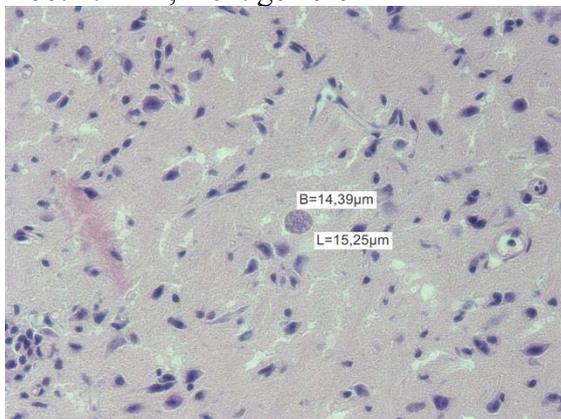
## 3. Resultate

### 3.1. ExVivo-Experiment

Das vorgängig zu allen Analysen durchgeführte Experiment mit zwei C57BL/6-Mäusen zur Abklärung einer allfälligen Schädigung von DNA durch Tiefgefrieren hat folgende Resultate erbracht:

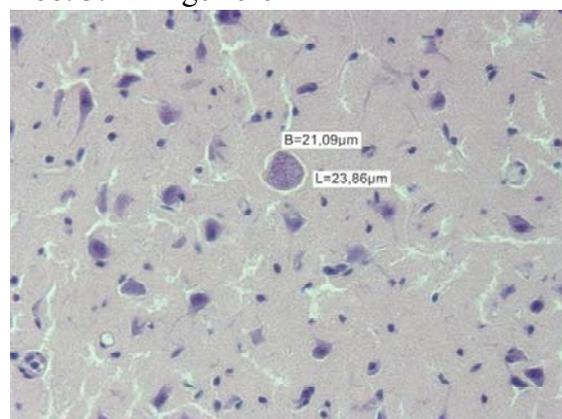
- In allen vier Proben der experimentell infizierten Mäuse (2x Hirn, 2x Muskel) konnte mittels realtime PCR das Vorkommen von *T. gondii*-DNA bestätigt werden. Die Menge der DNA war in den Muskelproben leicht tiefer als in den Hirnproben.
- In allen histologischen Schnitten der Gehirne konnten *Toxoplasma*-Zysten nachgewiesen werden [Abb.2, Abb.3]. Jedoch sind in keinem der Muskelschnitte Gewebezysten gefunden worden.

Abb. 2: Hirn, nicht gefroren



(400x vergrössert)

Abb. 3: Hirn gefroren



(400x vergrössert)

Somit konnte gezeigt werden, dass Tiefgefrieren keinen Einfluss auf die Parasiten-DNA hat und die geplanten Analysen der Fleischproben (Serologie [P30 ELISA], realtime PCR, histologische Untersuchung, Genotypisierung) wie vorgesehen durchgeführt werden können.

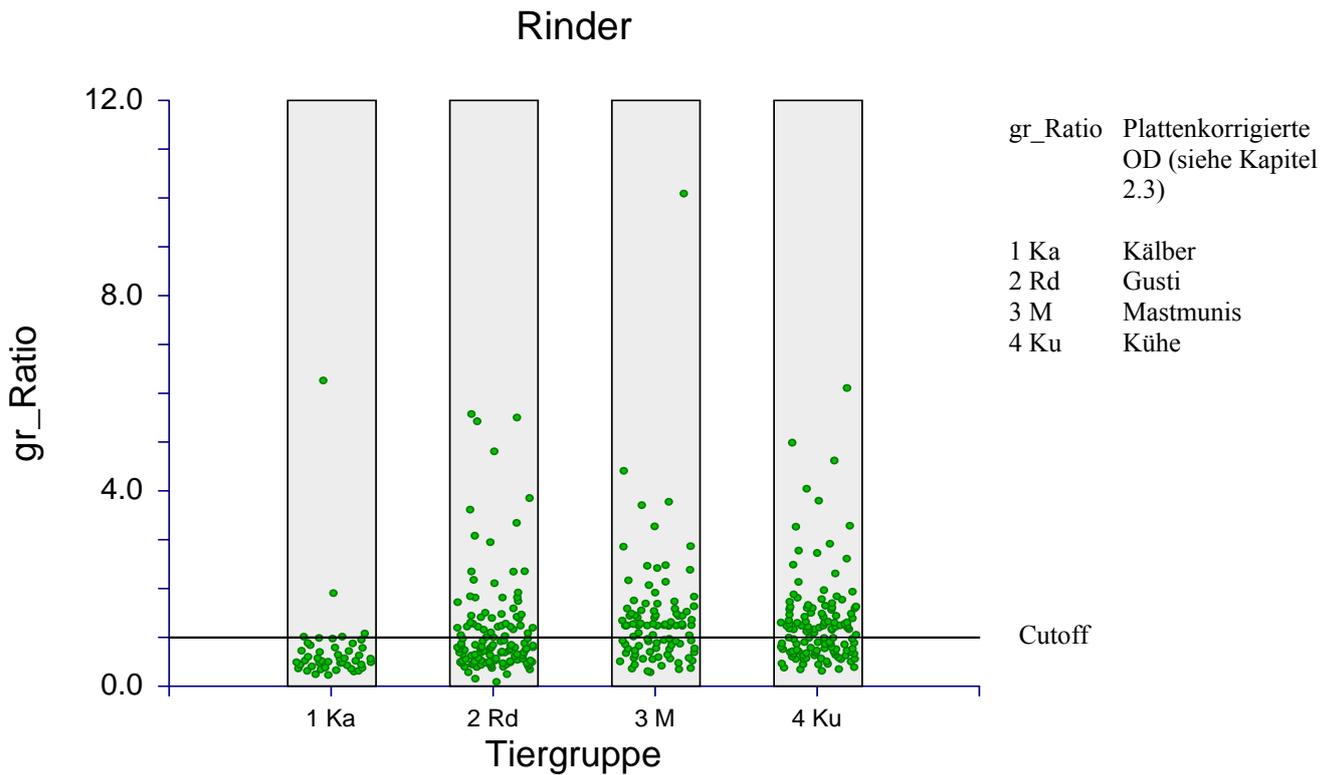
### 3.2. Fleischproben aus dem Schlachthof

#### 3.2.1. Rinder

##### Serologie

Bei den Rindern konnten Seroprävalenzen von 12.8% (n = 6) bei den Kälbern, 37.2% (n = 48) bei den Gusti (weibliche Jungrinder), 62.0% (n = 62) bei den Munis (Bullen) und 53.1% (n = 69) bei den Kühen festgestellt werden [Abb.4]. Innerhalb der Rinder-Gruppe konnten signifikante Unterschiede in der Seroprävalenz zwischen den Kälbern und den anderen Untergruppen (Kälber signifikant niedriger als Gusti, Muni und Kühe) und zwischen den Rindern und Munis (Rinder signifikant niedriger als Muni) festgestellt werden (Fischer's Exakt Test, Bonferroni-korrigiert,  $p < 0.01$ ). Zwischen den Rindern resp. den Munis und den Kühen besteht serologisch kein signifikanter Unterschied (Fischer's Exakt Test, Bonferroni-korrigiert,  $p \geq 0.05$ ).

Abb.4

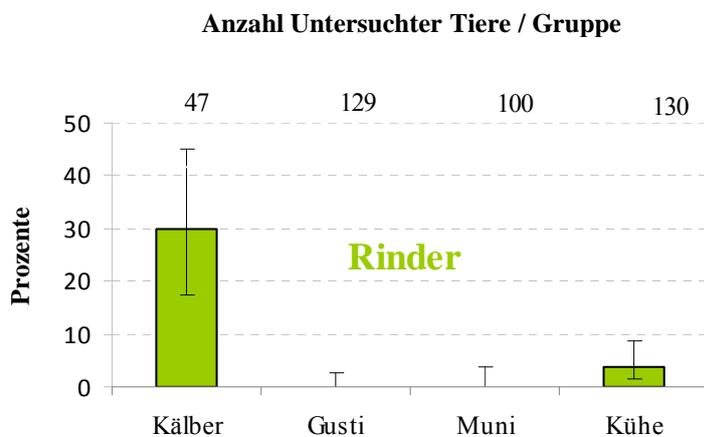


realtime PCR

29.8% (n = 14) der Kälber, 0% (n = 0) der Gusti, 0% (n = 0) der Munis und 3.8% (n = 5) der Kühe waren PCR-positiv. [Abb.5]

Die PCR-Resultate waren bei den Kälbern im Vergleich zu den anderen Untergruppen (Rinder, Muni, Kühe) signifikant höher (Fischer's Exakt Test, Bonferroni-korrigiert,  $p < 0.01$ ). Zwischen allen anderen Gruppen bestehen keine signifikanten Unterschiede (Fischer's Exakt Test, Bonferroni-korrigiert,  $p \geq 0.05$ ).

Abb.5



Vergleich Serologie / PCR

Unter den Kälbern, Gusti und Muni, welche anti-*Toxoplasma*-Antikörper (ELISA) aufwiesen, konnten keine PCR-positiven Tiere nachgewiesen werden. Unter den 69 seropositiven Kühen wurden 2 PCR-positive Proben gefunden. [Tabelle 5]

Tab.5

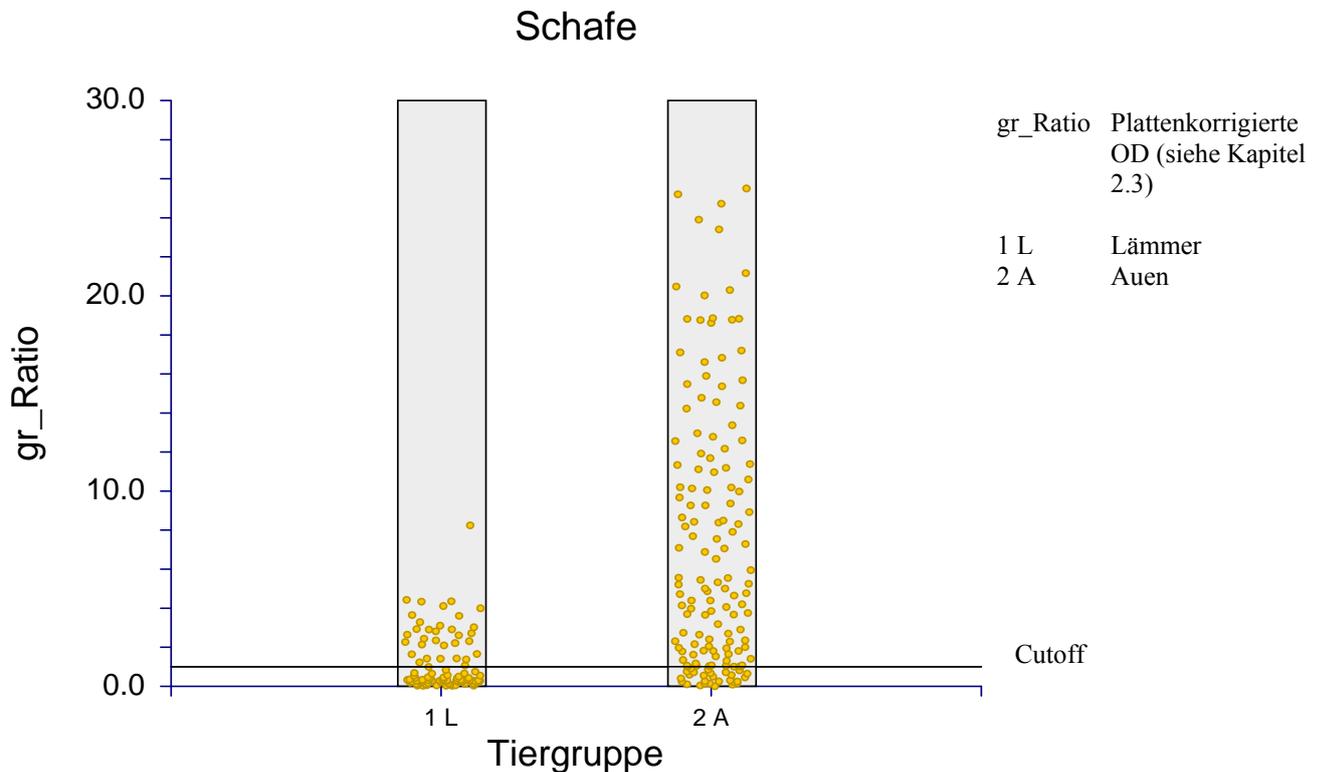
Kategorie	Seronegativ / PCR-negativ	Seronegativ / PCR-positiv	Seropositiv / PCR-negativ	Seropositiv / PCR-positiv	Total
Kälber	27	14	6	0	47
Rinder	81	0	48	0	129
Muni	38	0	62	0	100
Kühe	58	3	67	2	130

### 3.2.2. Schafe

#### Serologie

In der Tiergruppe der Schafe wurden 33% (n = 33) der Lämmer und 80.7% (n = 121) der Auen (weibliche Mutterschafe) positiv auf *T. gondii*-Antikörper getestet [Abb.6]. Die Gruppe der Lämmer weist eine signifikant niedrigere Seroprävalenz im Vergleich zu den Auen auf (Fischer's Exakt Test, Bonferroni-korrigiert; p<0.01).

Abb.6

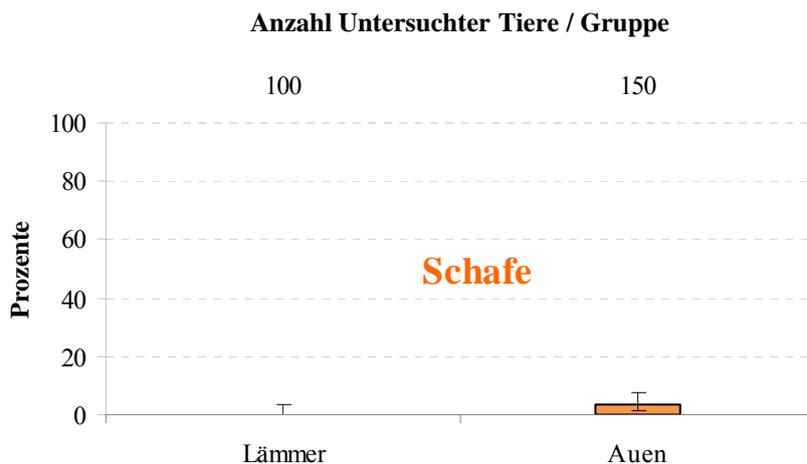


#### realtime PCR

In der realtime-PCR-Reaktion sind 0% (n = 0) der Lämmer- und 2% (n = 5) der Auen-Proben positiv ausgefallen. [Abb.7]

In der PCR-Untersuchung konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Altersgruppen der Schafe festgestellt werden (Fischer's Exakt Test, Bonferroni-korrigiert, p≥0.05).

Abb.7



Vergleich Serologie / PCR

Vier der seropositiven Auen-Proben waren ebenfalls PCR-positiv. [Tabelle 6]

Tab.6

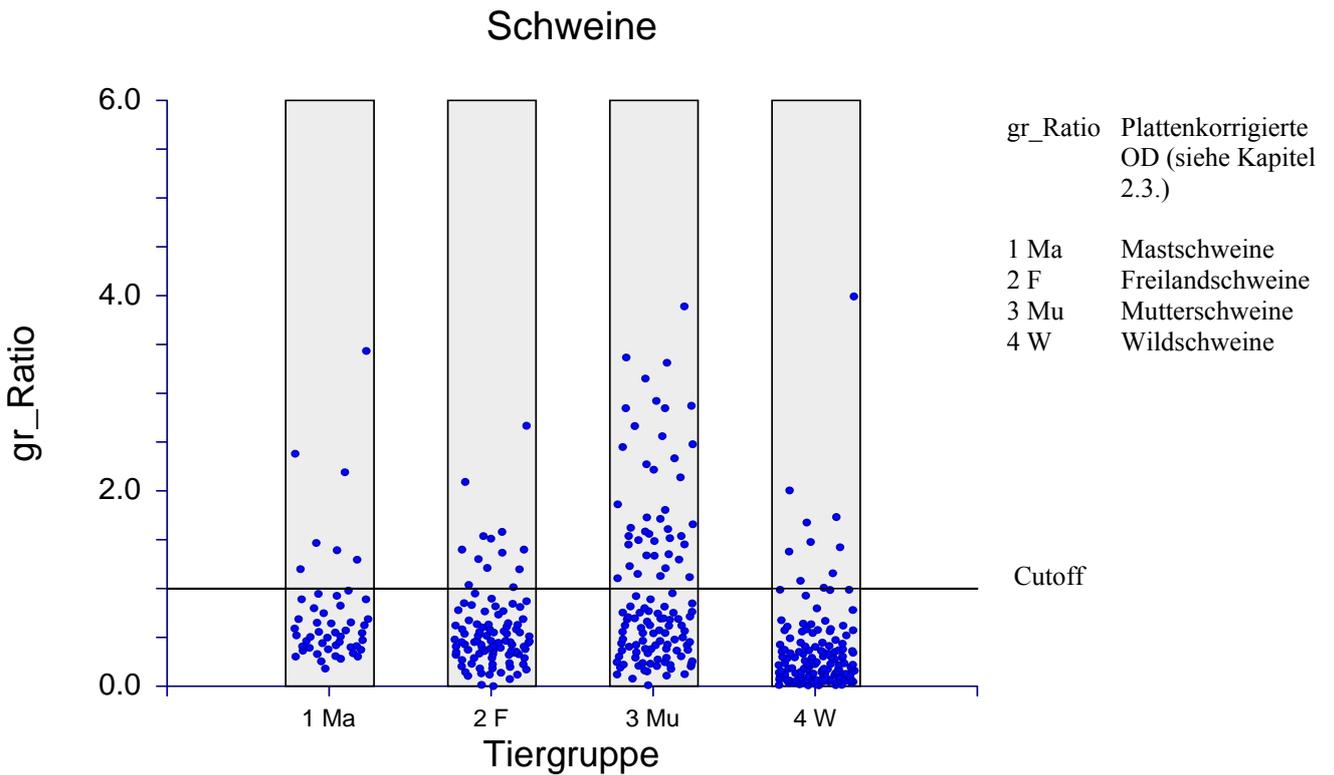
Kategorie	Seronegativ / PCR-negativ	Seronegativ / PCR-positiv	Seropositiv / PCR-negativ	Seropositiv / PCR-positiv	Total
Lämmer	67	0	33	0	100
Auen	28	1	117	4	150

**3.2.3. Schweine**

Serologie

Bei den verschiedenen Schweingruppen konnten Seroprävalenzen von 14% (n = 7) für die Mastschweine, 13% (n = 13) für die Freilandschweine, 35% (n = 42) für die Mutterschweine und 6.7% (n = 10) für die Wildschweine gefunden werden [Abb.8]. Die Mutterschweine sind signifikant höher als alle anderen Schweine-Gruppen (Fischer's Exakt Test, Bonferroni-korrigiert; p<0.01). Die restlichen Gruppen sind untereinander serologisch nicht signifikant unterschiedlich (Fischer's Exakt Test, Bonferroni-korrigiert, p≥0.05).

Abb.8

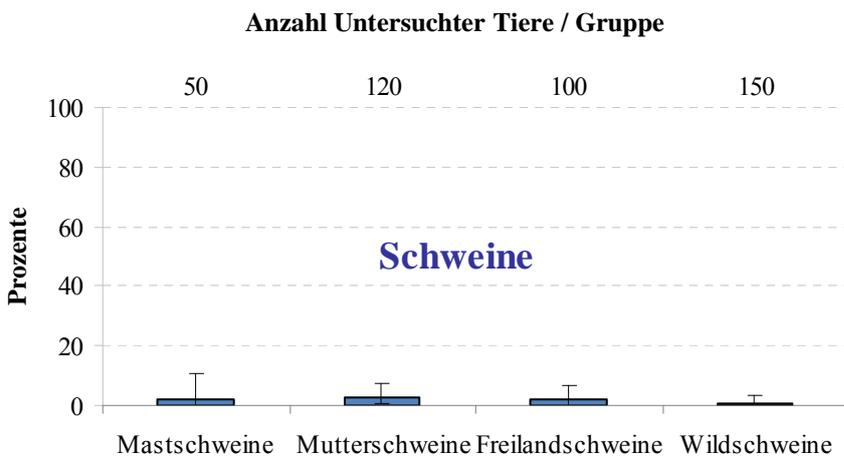


realtime PCR

2% (n = 1) der Mastschweine, 2% (n = 2) der Freilandschweine 2.5% (n = 3) der Mutterschweine, und 0.7% (n = 1) der Wildschweine waren PCR-positiv für *T.gondii*. [Abb.9]

In der PCR-Analyse konnten bei den Schweinen keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Untergruppen gefunden werden (Fischer's Exakt Test, Bonferroni-korrigiert,  $p \geq 0.05$ ).

Abb.9



Vergleich Serologie / PCR

Keines der seropositiven Freiland- und Wildschweine konnte mit der realtime PCR positiv getestet werden. Ein Mast- und ein Mutterschweine waren gleichzeitig sero- und PCR-positiv. [Tabelle 7]

Tab.7

Kategorie	Seronegativ / PCR-negativ	Seronegativ / PCR-positiv	Seropositiv / PCR-negativ	Seropositiv / PCR-positiv	Total
Mastschweine	43	0	6	1	50
Mutterschweine	76	2	41	1	120
Freiländer	85	2	13	0	100
Wildschweine	139	1	10	0	150

### 3.2.4. Zusammenfassung Schlachthofproben [Tabelle 8]

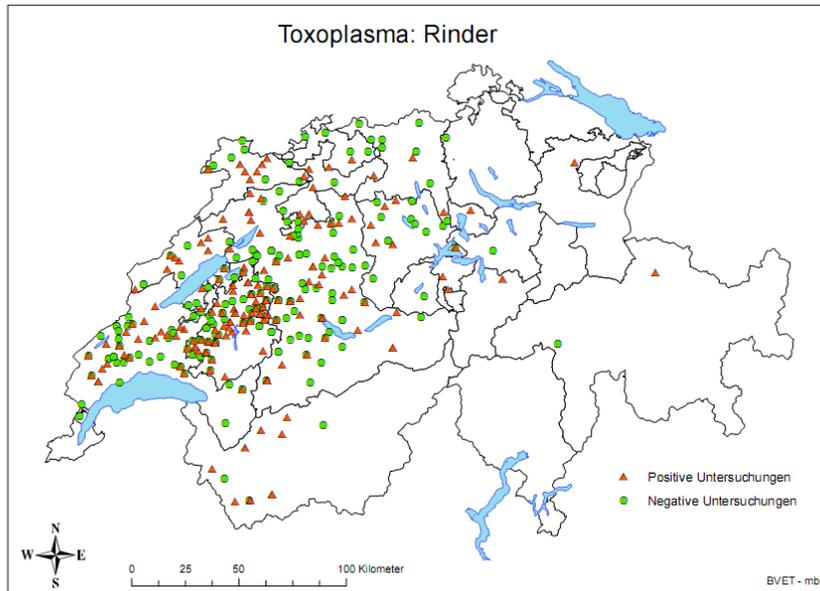
Tab.8

Kategorie	N	Positive Tiere (%)		95%-Confidence- interval (%)
		Serologie	PCR	
Lämmer	100	Serologie	33	23.9 – 43.1
		PCR	0	0.0 – 3.6
Auen	150	Serologie	80.7	73.4 – 86.7
		PCR	3.3	1.1. - 7.6
Kälber	47	Serologie	12.8	4.8 – 25.7
		PCR	29.8	17.3 – 44.9
Rinder	129	Serologie	37.2	28.9 – 46.2
		PCR	0	0.0 – 2.8
Munis	100	Serologie	62.0	51.7 – 71.5
		PCR	0	0.0 – 2.8
Kühe	130	Serologie	53.1	44.1 – 61.9
		PCR	3.8	1.3 – 8.7
Mastschweine	50	Serologie	14	5.8 – 26.7
		PCR	2	0.1 – 10.6
Mutterschweine	120	Serologie	35	26.5 – 44.2
		PCR	2.5	0.5 – 7.1
Freilandschweine	100	Serologie	13	7.1 – 21.2
		PCR	2	0.2 – 7.0
Wildschweine	150	Serologie	6.7	3.2 – 11.9
		PCR	0.7	0.0 – 3.7

### 3.2.5. Geographische Verteilung der untersuchten Tiere in der Schweiz

#### Serologie Rind

Abb.10

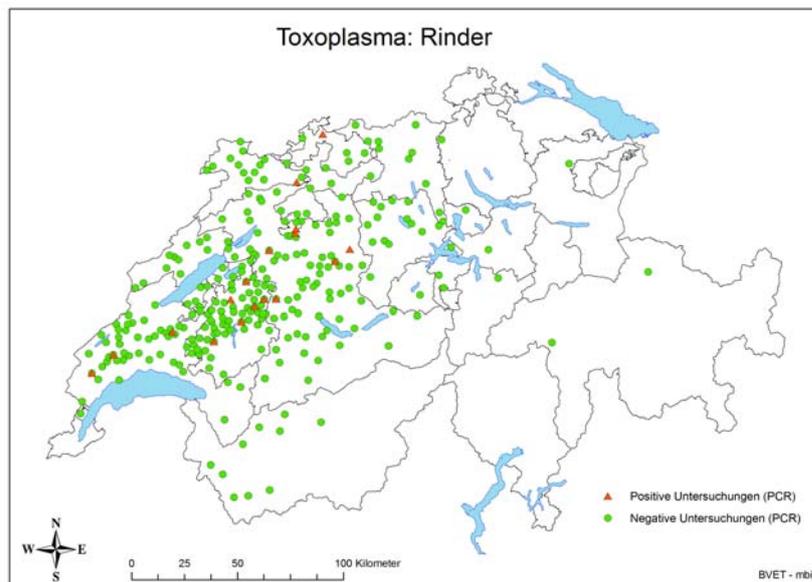


Die seropositiven Proben sind gleichmässig über die ganze Stichprobenmenge verteilt. Der grösste Teil der Stichproben stammt aus dem Mittelland, wo sich auch vermehrt die grösseren landwirtschaftlichen Betriebe befinden.

$n_{\text{total}} = 404$

#### PCR Rind

Abb.11

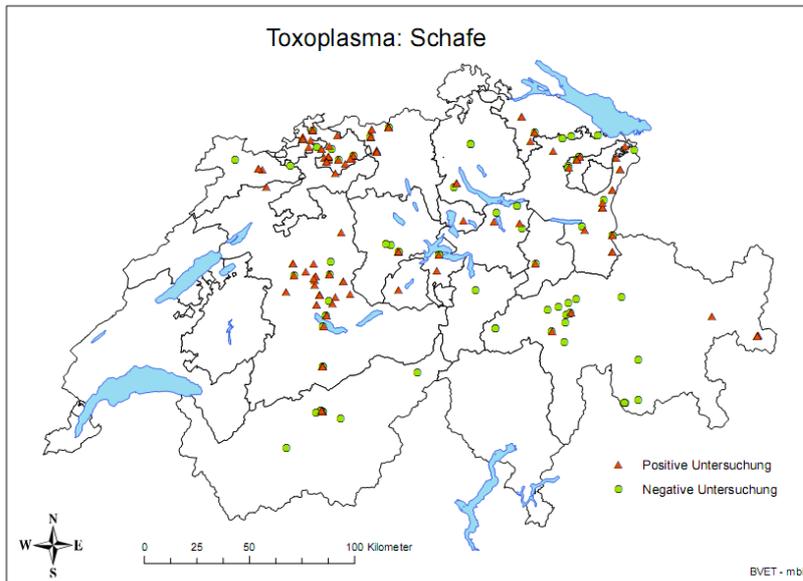


Die PCR-positiven Proben zeigen keine regionalen Unterschiede in der geographischen Verteilung.

$n_{\text{total}} = 404$

## Serologie Schaf

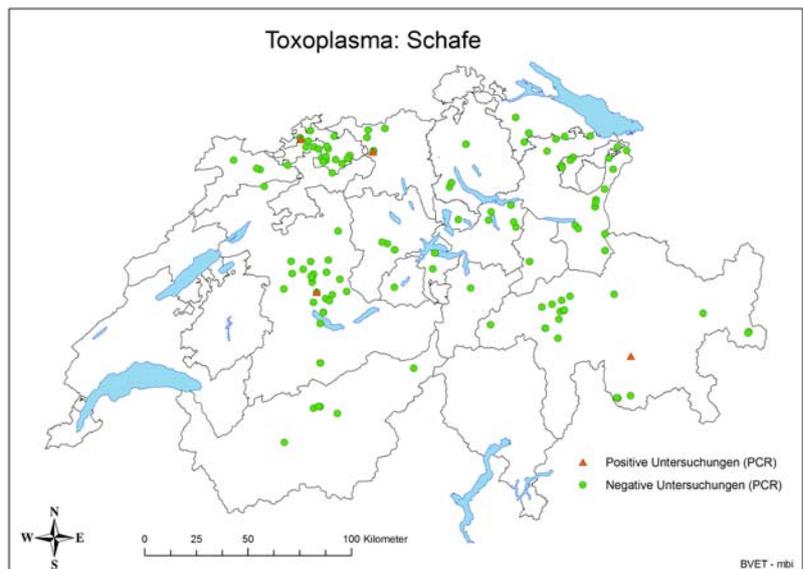
Abb.12



Es sind zwei kleinere Ballungszentren in der Region Baselland und Aaretal / Eriz erkennbar. Die seropositiven Proben sind aber ähnlich verteilt wie die seronegativen.  
 $n_{\text{total}} = 250$

## PCR Schaf

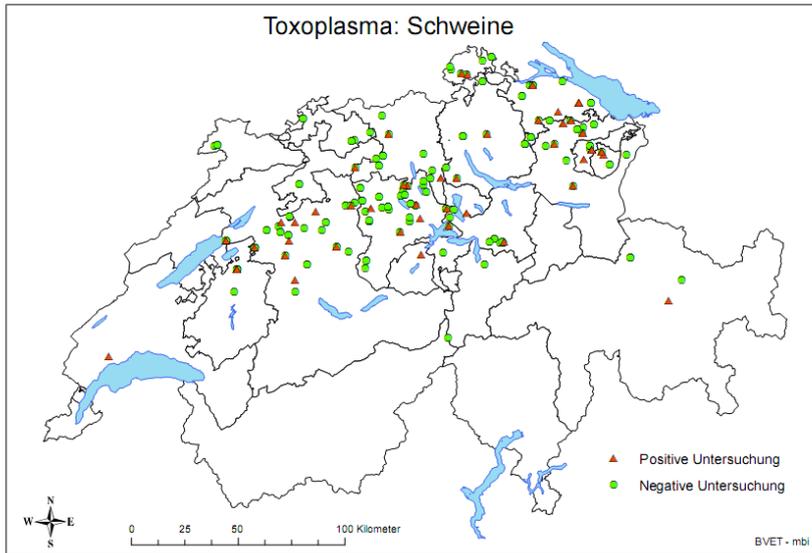
Abb.13



Die PCR-positiven Schafproben zeigen keine regionalen Auffälligkeiten.  
 $n_{\text{total}} = 250$

## Serologie Schwein

Abb.14



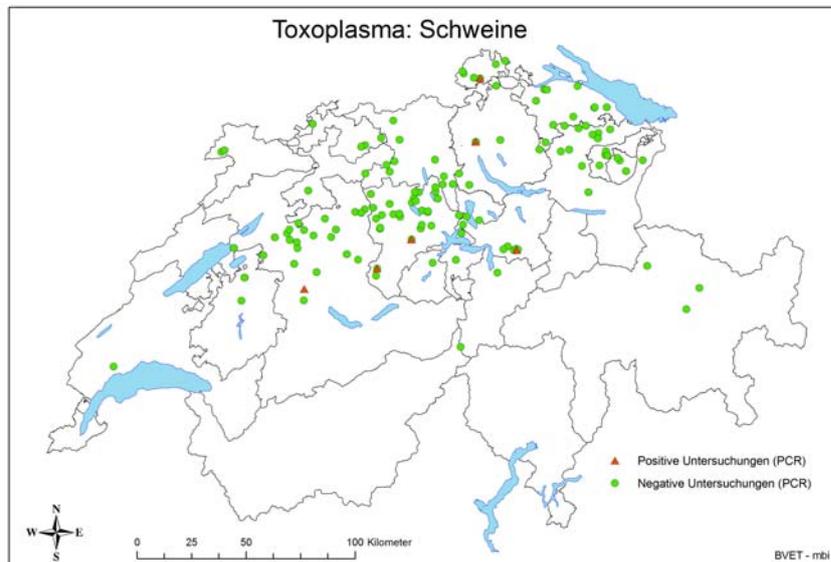
Die seropositiven Proben sind gleichmässig in der gesamten Stichprobemenge verteilt. Die Stichproben stammen grösstenteils aus den bekannten „Schweinehaltungsgebieten“ des Mittellands und der Nordwestschweiz.

$n_{\text{total}} = 223$

(von 197 Schweineproben [v.a. Wildschweine] sind keine Koordinatenangaben vorhanden)

## PCR Schwein

Abb.15



Bei den PCR-positiven Schweine-Proben können keine Ballungszentren gesehen werden.

$n_{\text{total}} = 223$

(von 197 Schweineproben [v.a. Wildschweine] sind keine Koordinatenangaben vorhanden)

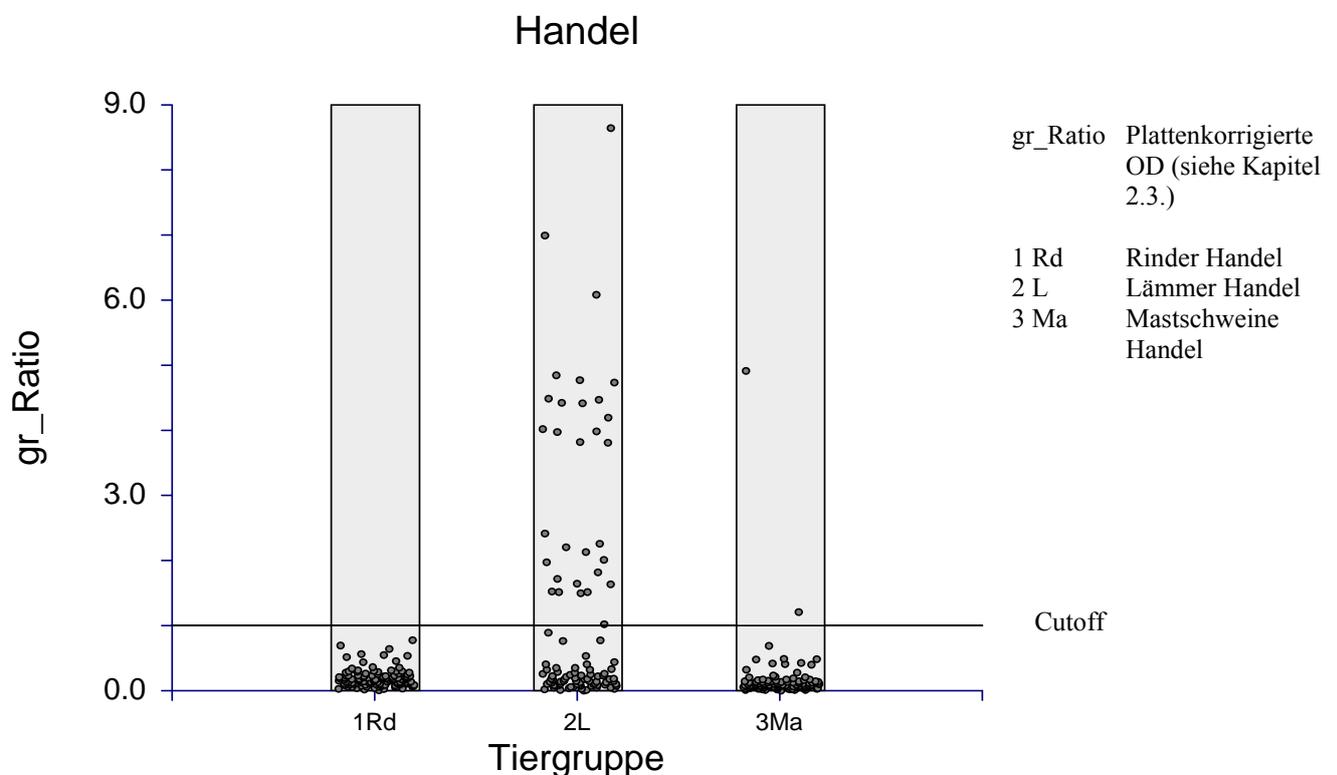
### 3.3. Fleischproben aus dem Handel

#### 3.3.1. Serologie

In den Untersuchungsgruppen aus dem Handel (Rinder [n = 120], Lämmer [n = 100], Mastschweine [n = 120]) sind Seroprävalenzen von 0% (n = 0) für die Rinder, 30% (n = 30) für die Lämmer und 2.5% (n = 3) für die Schweine bestimmt worden. [Abb.16]

Innerhalb der Gruppe „Fleisch aus dem Handel“ konnten signifikante Unterschiede zwischen den Lämmern und den Rindern und den Lämmern und den Schweinen gesehen werden (Fischer's Exakt Test, Bonferroni-korrigiert;  $p < 0.01$ ). Dabei sind die Lämmer-Resultate signifikant höher als die Resultate der beiden anderen Untergruppen. Die zwei anderen Gruppen waren nicht signifikant unterschiedlich (Fischer's Exakt Test, Bonferroni-korrigiert,  $p \geq 0.05$ ).

Abb.16

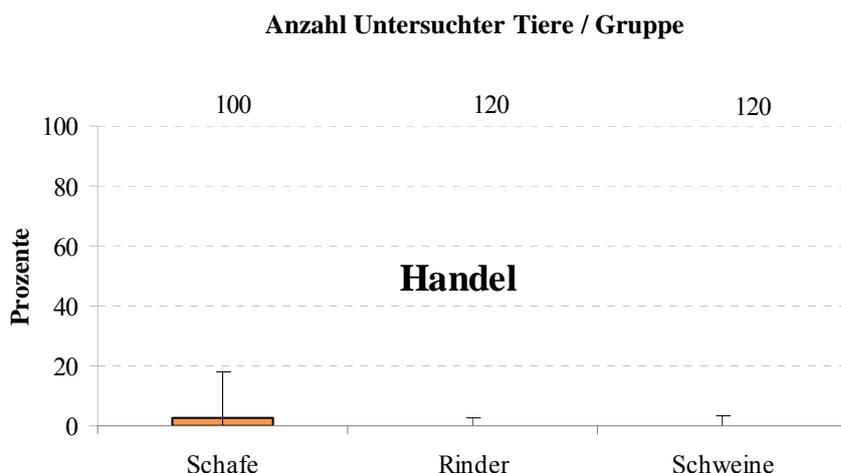


#### 3.3.2. realtime PCR

0% (n = 0) der Rinder und der Schweine, 3% (n = 3) der Lämmer sind in der PCR-Analyse positiv ausgefallen. [Abb.17]

Auch in der PCR-Analyse waren nur die Lämmer signifikant unterschiedlich (höher) zu den zwei anderen Gruppen (Fischer's Exakt Test, Bonferroni-korrigiert;  $p < 0.01$ ).

Abb.17



### 3.3.3. Vergleich Serologie / PCR

Bei den Lämmern waren 3 Proben sowohl sero- wie auch PCR-positiv, die restlichen 27 seropositiven Tiere fielen in der PCR negativ aus. Bei den Schweinen waren alle seropositiven Proben PCR-negativ. [Tabelle 9]

Tab.9

Kategorie	Seronegativ / PCR-negativ	Seronegativ / PCR-positiv	Seropositiv / PCR-negativ	Seropositiv / PCR-positiv	Total
Rinder	120	0	0	0	120
Lämmer	70	0	27	3	100
Schweine	117	0	3	0	120

### 3.3.4. Zusammenfassung der Handelsproben [Tabelle 10]

Tab.10

Kategorie	N	Positive Tiere (%)		95%-Konfidenz-Intervall (%)
Rinder	120	Serologie	0	0.0 – 3.0
		PCR	0	0.0 – 3.0
Lämmer	100	Serologie	30	8.8 – 10.0
		PCR	3	2.4 – 5.5
Schweine	120	Serologie	2.5	
		PCR	0	0.0 – 3.0

### 3.3.5. Zeitlicher Verlauf des Antikörper-Titers im Fleischsaft (n = 40)

Bei der zusätzlichen Untersuchung von 20 Rinder- und 20 Muni-Proben, sollte abgeklärt werden, ob sich der Antikörper-Titer (AK-Titer) im Fleischsaft während der Lagerung verändert. 65% der 40 Proben waren im ELISA zur Zeit 0 (Fleischsaftentnahme nach Erhalt der Probe aus dem Schlachthof) negativ und blieben in den folgenden 5 ELISA-Untersuchungen (während 3 Wochen) auch negativ.

9 von 20 Rinderproben und 5 von 20 Muni-Proben wiesen aber AK-Titer-Schwankungen auf [Abb.18 und Abb.19]. Auch hier wurde wieder mit einem plattenkorrigierten OD-Werte gearbeitet (siehe Kapitel 2.3.) und die einzelnen Werte können direkt verglichen werden. Leider konnte nicht bei allen Fleischstücken eine konstante Abnahme des AK-Titers gezeigt werden und einzelne Fleischproben wiesen sogar einen AK-Titer-Anstieg gegen Ende der Versuchsreihe auf. Eindeutig kann aber gezeigt werden, dass sich der AK-Titer in den Fleischproben während der Lagerung (üblich bevor das Fleisch in den Handel kommt) verändert.

Abb.18

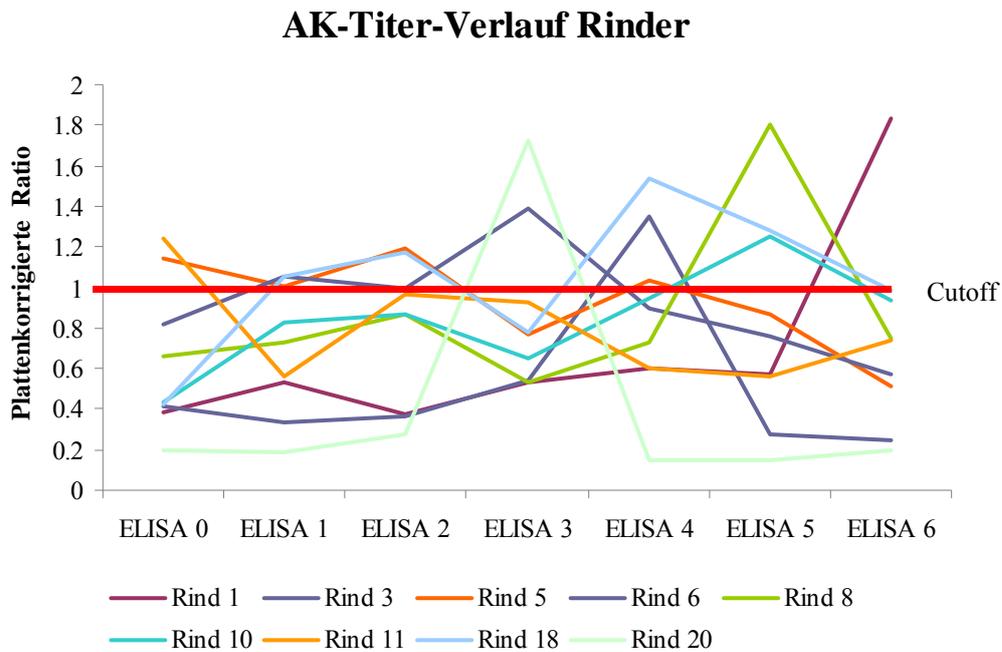
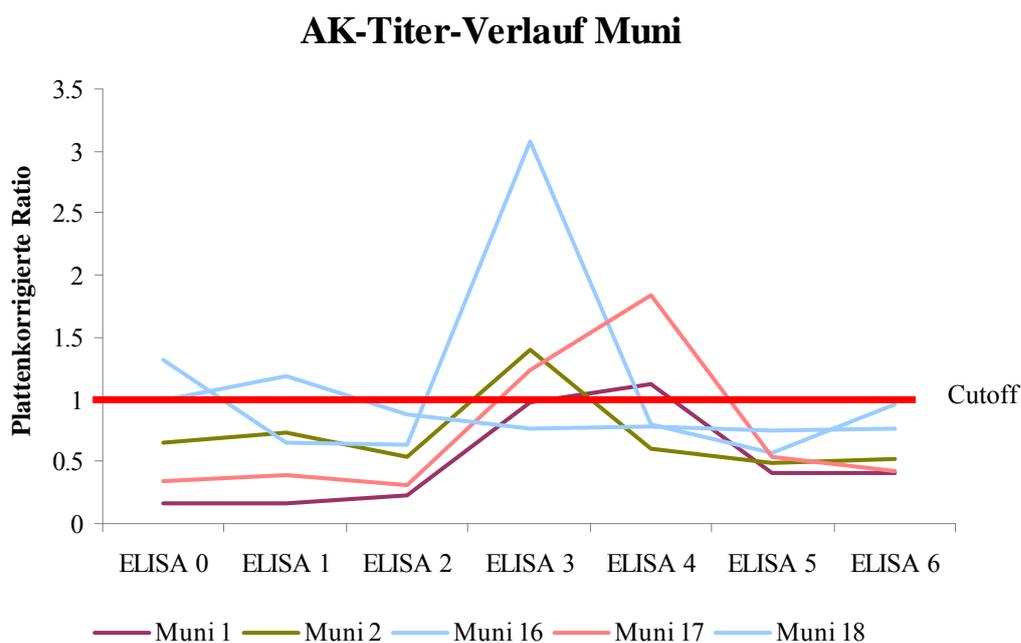


Abb.19

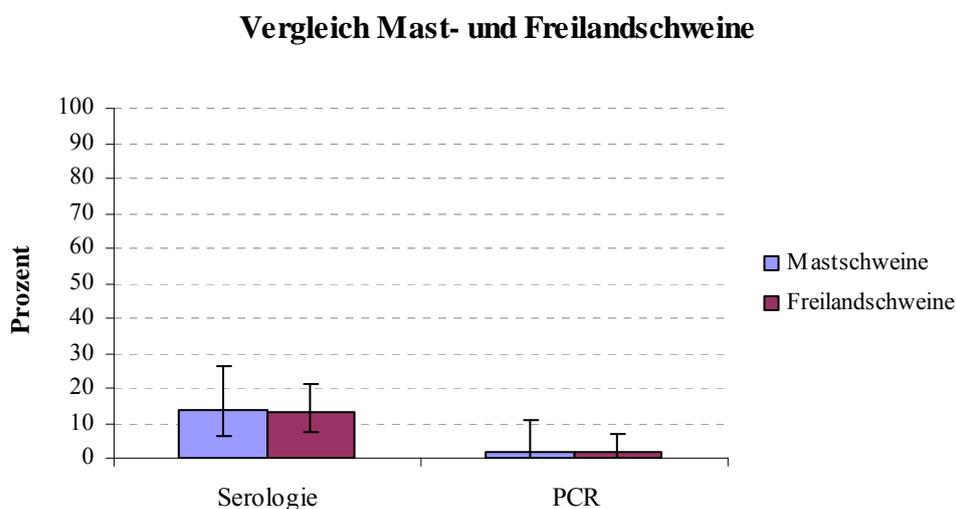


### 3.4. Vergleich Haltungsformen in der Schweinemast (outdoor versus indoor)

Innerhalb der untersuchten Schweinepopulation konnte zusätzlich ein Vergleich zwischen den fast ausschliesslich in Ställen gehaltenen Mastschweinen (indoor) mit den auf Weiden gehaltenen Freilandschweinen (outdoor) gemacht werden. Erstaunlicherweise wurden für die beiden so unterschiedlich gehaltenen Populationen fast dieselben Seroprävalenzen (14% Mastschweine, 13% Freilandschweine) und dieselbe realtime-PCR-Prävalenz (2.0%) für *T. gondii* festgestellt. [Abb.20]

Zwischen den Mast- und Freilandschweinen konnte weder in der Serologie noch in der PCR-Analyse ein signifikanter Unterschied gesehen werden.

Abb.20



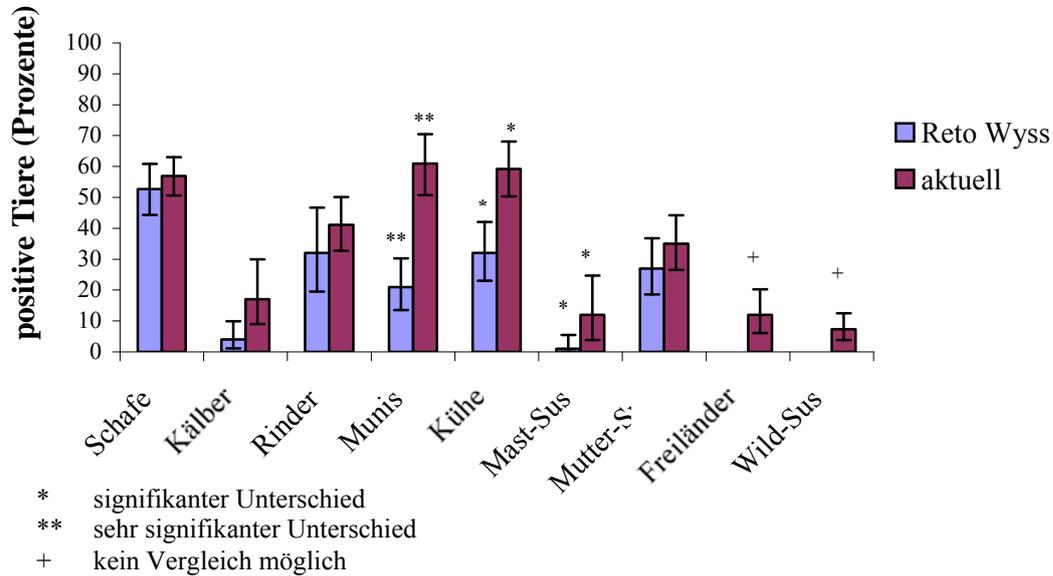
### 3.5. Vergleich 2000 (Studie Reto Wyss) mit 2009

Der Vergleich der aktuellen Daten mit der Studie von 2000 (Wyss, Sager et al. 2000) zeigt über alle Tiergruppen einen Anstieg der Seroprävalenz von *T. gondii*. Für die Munis ( $p < 0.00001$ ), Kühe ( $p = 0.001662$ ) und Mastschweine ( $p = 0.002076$ ) konnte eine statistische Signifikanz nachgewiesen werden (Fischer's Exakt Test, Bonferroni-korrigiert;  $p < 0.01$ ). Bei allen anderen vergleichbaren Gruppen konnte keine Signifikanz nachgewiesen werden ( $p \geq 0.05$ ). [Abb.21]

Im Unterschied zur Studie von 2000 wurden in der aktuellen Studie zusätzlich Freilandschweine und Wildschweine untersucht. In diesen Populationen konnte aber kein Vergleich gemacht werden.

Abb. 21

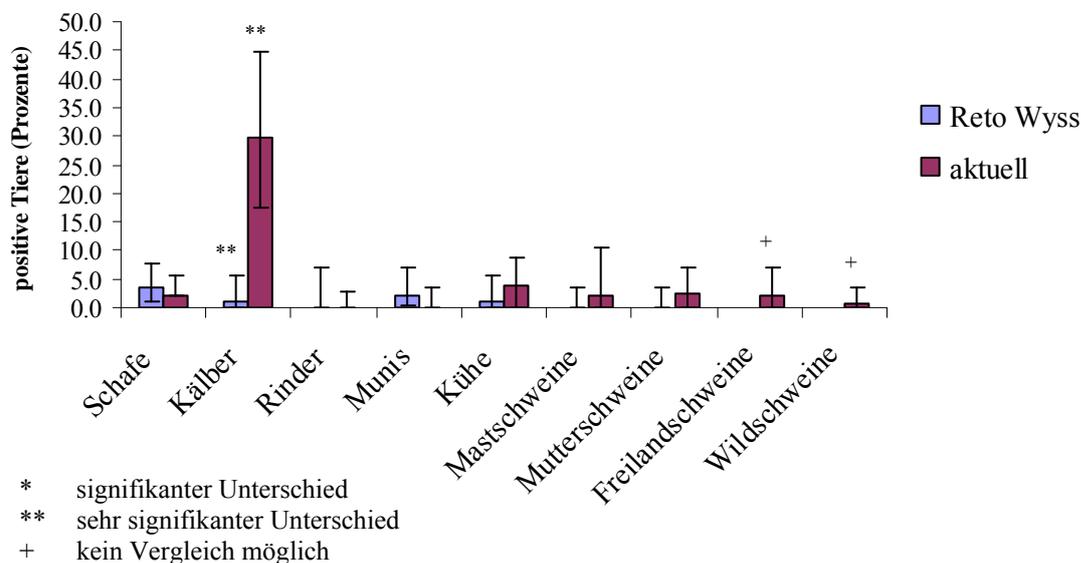
### Serologie (Vergleich 2000 und 2009)



Beim Direktnachweis des Parasiten (realtime PCR) wurde mit Ausnahme der Gruppe der Schafe (Lämmer und Auen) und der Rinder (Prävalenz = 0%) in allen Tiergruppen ebenfalls ein Anstieg der Prävalenzen nachgewiesen. Ein signifikanter Unterschied konnte aber nur bei den Kälbern nachgewiesen werden ( $p < 0.00001$ ), bei allen anderen vergleichbaren Gruppen war  $p \geq 0.05$ . [Abb.22]

Abb. 22

### PCR (Vergleich 2000 und 2009)



## 3.6. Histologie

### 3.6.1. Schlachthofproben

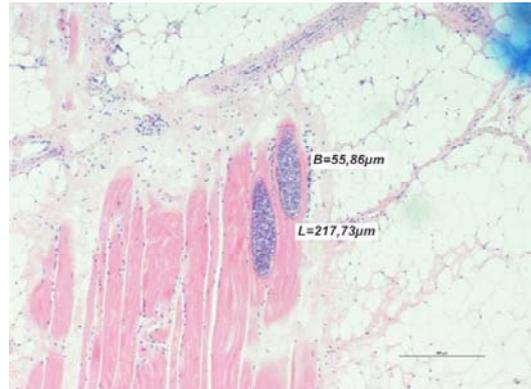
Alle PCR-positiven Proben der Schlachthoftiere sind histologisch auf das Vorkommen von Gewebezysten untersucht worden. In keiner der untersuchten Proben von Kälbern (n = 14), Mast- und Mutterschweinen (n = 4) und Freilandschweinen (n = 2) konnten *Toxoplasma*-Zysten gefunden werden. Demgegenüber konnten bei 4 von 5 Kühen, bei allen 5 Auen und beim Wildschwein *Sarkozystis*-Zysten gesehen werden. [Abb.23, Abb.24]

Abb. 23: Kuh



(400x vergrössert)

Abb. 24 Aue



(200x vergrössert)

### 3.6.2. Handelsproben

In keiner der histologisch untersuchten Proben des Handelsfleisches konnten Zysten von *T. gondii* gefunden werden. In allen untersuchten Lämmerproben (n = 3) sind aber *Sarkozystis*-Zysten gesehen worden.

## 3.7. Westernblot

Abb .25



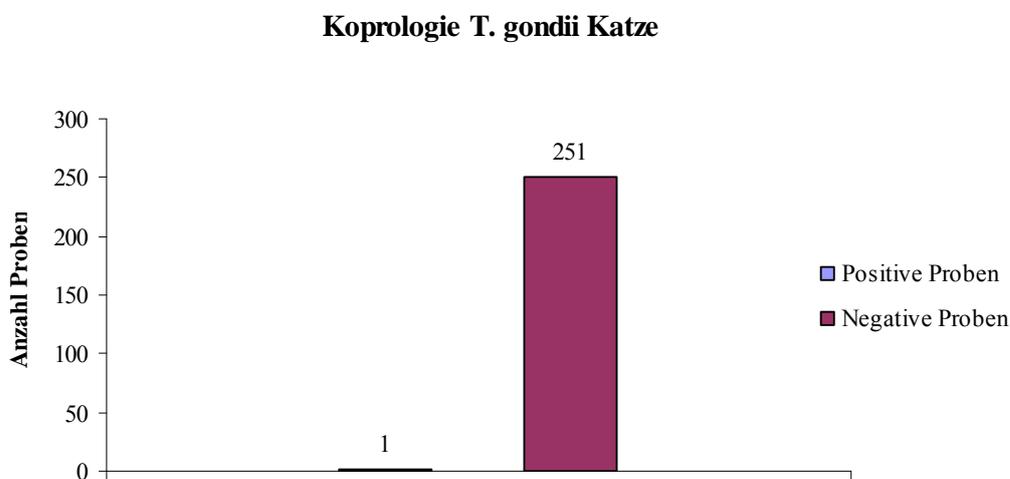
Der zusätzlich zur Serologie durchgeführte Westernblot mit einigen ausgewählten Fleischsäften zeigte für die Schaf-Proben sehr klar unterscheidbare Bandenmuster: „+“ = Positivkontrolle, A76 = ELISA-positiver Fleischsaft, A98 = ELISA-negativer Fleischsaft [Abb.25]. Im Gegensatz dazu konnten bei den Rindern nur sehr schwache Banden sowohl beim Kontrollserum wie auch bei den ELISA-positiven Fleischsäften gesehen werden. Bei den Schweine-Proben konnte nur sehr schlecht eine Differenzierung zwischen positiven und negativen Proben gemacht werden, da sowohl bei den negativen wie auch bei den positiven Fleischsäften Banden mit ähnlicher Verteilung gesehen werden konnten. Die Durchführung des Westernblot-Tests mit allen Fleischsäften der Studie würde somit zu keinen weiteren Erkenntnissen bezüglich der aktuellen Seroprävalenz von *T. gondii* führen. Die Methode kann aber sicherlich zukünftig als Nachtest bei unklaren Schaf- und eventuell auch Rinderproben eingesetzt werden.

### 3.8. Koprologie Katzenkotproben

Insgesamt sind 252 Katzenkotproben mittels eines kombinierten Sedimentations-/Flotationsverfahren untersucht worden. In 2 Proben konnten Kokzidien-Oozysten nachgewiesen werden. Bei der anschliessenden realtime PCR konnte eine der Proben als *T. gondii* und die andere Probe als *H. hammondi* identifiziert werden. Diese PCR-Analyse war nötig, da *Neospora*-, *Hammondia*- und *Toxoplasma*-Oozysten mikroskopisch nicht unterschieden werden können (Dubey, Hill et al. 2002). [Abb.26]

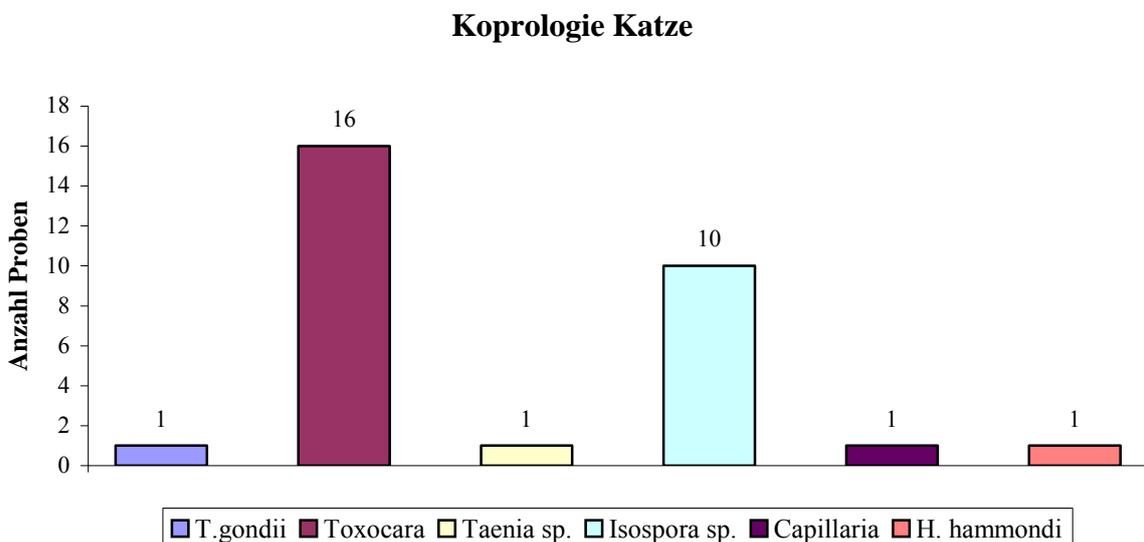
Die gefundene Prävalenz für die *T. gondii*-Oozystenausscheidung beträgt in unserer Studie folglich 0.4%. Hochgerechnet auf die Schweizer Katzenpopulation, welche ca. 1.35 Mio. Tiere beträgt, bedeutet dies, dass an einem bestimmten Stichtag ca. 5400 Katzen in der Schweiz *T. gondii*-Oozysten ausscheiden.

Abb. 26



Zusätzlich zu *Toxoplasma gondii* wurde auch das Vorkommen der übrigen Parasiten im Katzenkot erfasst. Gefunden wurden weitere Protozoen (*Hammondia hammondi*, *Isospora* sp.), Nematoden (*Toxocara* sp., *Capillaria* sp.) und Zestoden (*Taenia* sp.). [Abb.27]

Abb. 27



Das Alter der untersuchten Katzen wurde ebenfalls erfasst und es wurde auch beschrieben, welche Parasiten in welchen Altersgruppen vorkommen. [Tabelle 11] Dabei kann gesehen werden, dass *Toxocara* und *Isospora* eher bei den Jungtieren vorkommen.

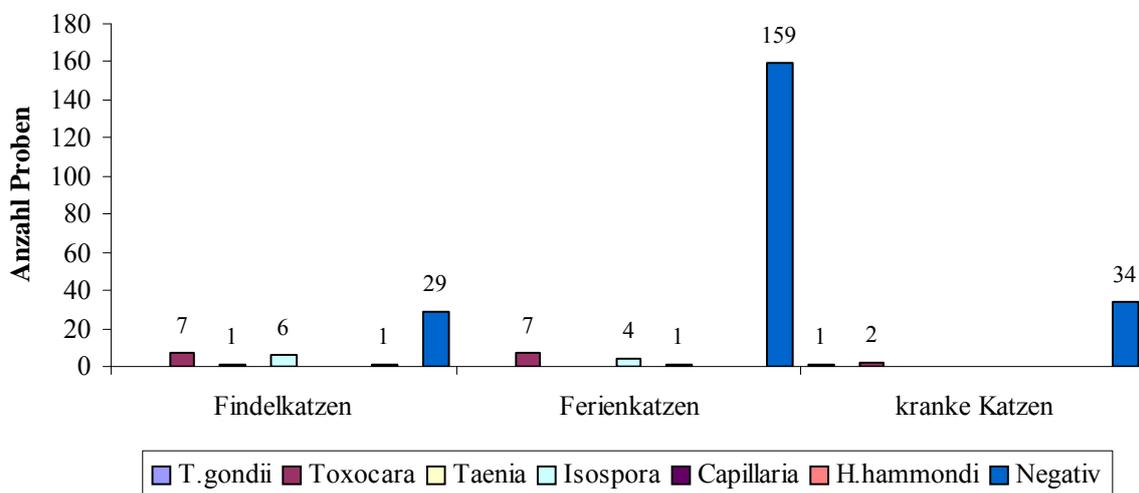
Tab.11

Alter	0 – 2 Jahre	2.5 – 5 Jahre	5.5 – 10 Jahre	> 10 Jahre	unbekannt	Total
<i>T.gondii</i>	-	-	-	1 (0.4%)	-	1 (0.4%)
<i>Toxocara</i> sp.	8 (3.2%)	4 (1.6%)	4 (1.6%)	-	-	16 (6.4%)
<i>Taenia</i> sp.	-	-	-	1 (0.4%)	-	1 (0.4%)
<i>Isospora</i> sp.	7 (2.8%)	1 (0.4%)	-	2 (0.8%)	-	10 (4.0%)
<i>Capillaria</i> sp.	1 (0.4%)	-	-	-	-	1 (0.4%)
<i>H. hammondi</i>	1 (0.4%)	-	-	-	-	1 (0.4%)
Negativ	49 (19.4%)	57 (22.6%)	58 (23.0%)	48 (19.4%)	9 (3.6%)	222 (88.0%)
<b>Total</b>	<b>66</b>	<b>62</b>	<b>62</b>	<b>52</b>	<b>9</b>	<b>252</b>

Die Aufteilung der Katzenproben nach Herkunft der Katzen (Abb. 28) zeigt klar, dass die meisten Ferienkatzen (gesunde Katzen aus Privathaushalten) negativ sind. *Toxocara* kommt in allen drei Katzenpopulationen vor.

Abb.28

### Koprologie Katze (2)



### 3.9. Genotypisierung [Tabelle 12]

Die Genotypisierung mit Hilfe von n-PCR und RFLP-Analyse wurde mit PCR-positiven Fleisch- und Kot-Proben sowohl aus der **aktuellen Studie**, wie auch aus der **Studie von 2000** durchgeführt. Einige Proben konnten nicht genotypisiert werden, da zu wenig Parasiten-DNA pro Probe vorhanden war.

Die Rinder-Isolate weisen eine Tendenz Richtung Typ I oder III, die einzige Schweineprobe weist auf einen Typ II hin und die Schaf-Isolate zeigen eine starke Tendenz Richtung Typ II. Die einzige vorhandene *T. gondii*-positive Katzenkotprobe konnte eindeutig als Typ II identifiziert werden.

Diese Resultate sind, mit Ausnahme der Katzen-Probe, aber nicht schlüssig, da von den einzelnen Proben zu wenige Marker bestimmt werden konnten. Zur Bestätigung der formulierten Tendenzen müssten noch weitere Resultate mit positiven Markern folgen.

Tab.12

Tier	ID	3'SAG2	5'SAG2	SAG3	BTUB	GRA6	c22-8	c29-2	L358	PK1	Apico	Typ
Kalb	B4	I / III	-	-	-	-	-	-	-	-	-	?
Kalb	B8	-	-	-	-	III?	-	-	-	-	-	?
Kalb	B16	-	-	I?	-	I/III?	-	-	-	-	-	I ?
Kalb	B24	I / III	-	II+III?	-	?	-	-	-	-	-	?
Kalb	B30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kalb	B37	I / III	-	-	-	II?	-	-	-	-	-	?
Kalb	512	I/III	-	-	-	-	-	-	-	-	-	?
Rind	241	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rind	244	I+III?	I+III?	-	-	-	-	-	-	-	-	I?
Rind	246	I	I	-	-	III?	-	-	-	-	-	I/III - at?
Bulle	317	I/III	-	-	-	I	-	-	-	-	-	?
Kuh	K77	I / III	-	-	-	-	-	-	-	-	-	?
Kuh	K102	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kuh	K106	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kuh	61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kuh	86	-	-	III	-	-	-	-	-	-	-	III ?

<b>Frei-land-schwein</b>	<b>F24</b>	II	-	-	-	II	-	-	-	-	-	II
<b>Auen</b>	<b>A99</b>	-	I / II	-	-	-	-	-	-	-	-	?
<b>Schaf</b>	<b>1319</b>	I/III	I/II	II	-	-	II	-	II	-	-	II
<b>Schaf</b>	<b>1392</b>	II	I/II	II	II	II	II	II	II	II	-	II
<b>Schaf</b>	<b>1394</b>	I/III	-	-	-	-	-	-	-	-	-	?
<b>Schaf</b>	<b>1406</b>	II	-	II	II	II	II	II	II	II	-	II
<b>Schaf</b>	<b>1410</b>	II	III	II	II	II	II	II	II	II	-	II ?
<b>Schaf</b>	<b>1419</b>	II	II	I+III	III?	II	-	-	-	-	-	?
<b>Katze</b>		II	II	II	II	-	II	II	II	II	-	II

## 4. Diskussion

Die Toxoplasmose weist eine ähnliche Infektionshäufigkeit auf wie Salmonellose und Campylobakteriose (Kijlstra and Jongert 2009), und zählt somit zu den wichtigsten durch Lebensmittel übertragenen Zoonosen.

Da in der Schweiz die empfohlenen Vorsorgeuntersuchungen auf *T. gondii* für schwangere Frauen in diesem Jahr in Frage gestellt worden sind (Rudin, Boubaker et al. 2009) und weil die neuen Richtlinien betreffend der Einschätzung der Infektionsrisiken und der dazu gehörenden Infektionsquellen sehr fragwürdig erscheinen, ist es aus Sicht der öffentlichen Gesundheit wichtig, zuverlässige Grunddaten betreffend *T. gondii* in der Schweiz zur Verfügung zu haben. Genaue Kenntnisse über Verbreitung und Vorkommen von *T. gondii* bei verschiedenen Tierarten in der Schweiz sind eine Grundvoraussetzung zur anschliessenden Risikobeurteilung für den Konsumenten/Menschen. Erst dann können zuverlässige und realitätsnahe Empfehlungen zur Prävention erarbeitet und der Öffentlichkeit vorgestellt werden.

Die Toxoplasmose kann bei einer Infektion während der Schwangerschaft und bei der Reaktivierung von Gewebezysten in immunkompromittierten bzw. -geschwächten Patienten (HIV, Transplantation) fatale Folgen haben (Kijlstra and Jongert 2009). Aber auch bei gesunden Personen kann die Infektion zu Verhaltensänderungen und psychischen Krankheiten wie beispielsweise Schizophrenie führen (Kijlstra and Jongert 2009).

Zu den Quellen einer *T. gondii*-Infektion für den Menschen wie auch für das Tier zählen einerseits zystenhaltiges Fleisch und andererseits die Aufnahme von sporulierten Oozysten. Da Feliden als einzige Tiere umweltresistente Oozysten ausscheiden (Silva, Ogassawara et al. 2001), kommen in der Schweiz praktisch nur die Katzen für diesen Übertragungsweg in Frage. In einigen europäischen Städten konnte gezeigt werden, dass in Stadtgebieten kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Infektion beim Menschen und der Anwesenheit von Katzen, der Fütterungsart von Katzen und der Jagdangewohnheit der Katzen besteht (Cook, Gilbert et al. 2000).

Als erhebliche Risikofaktoren für eine *T. gondii*-Infektion gelten gemäss Literaturangaben zu kurz gekochtes Lamm-, Rind- oder Wildfleisch, der Kontakt mit Erde, das Trinken von unbehandeltem Wasser, das Konsumieren von unpasteurisierter Milch oder Milchprodukten, der Verzehr von Salami, die Arbeit mit Tieren und das Reisen ausserhalb Europas und ausserhalb Nordamerikas (Cook, Gilbert et al. 2000). Hunde sollen ebenfalls eine Rolle bei der (mechanischen) Übertragung von Oozysten auf den Menschen spielen und wären somit ein weiterer Risikofaktor (Lindsay, Dubey et al. 1997; Bresciani, Costa et al. 2009).

Die in der aktuellen Studie ermittelte Prävalenz von 0.4% für die Oozysten-Exkretion bei den Katzen in der Schweiz sagt daher nur wenig über das Gesamtrisiko für die Schweizer Bevölkerung aus. Hier muss aber auch noch festgehalten werden, dass bei den meisten früheren Studien nicht zwischen *T. gondii* und *Hammondia hammondi* unterschieden wurde. Neu wurde bei der aktuellen Katzenuntersuchung sowohl ein *T. gondii* als auch ein *H. hammondi*-Fall gefunden. Die gesamte koprologische Oozysten-Ausscheidungsprävalenz (ohne PCR) betrug somit 0.8%, was den älteren Daten aus der Schweiz und Mitteleuropa sehr nahe kommt (Vergleich: Oozystenexkretion in Deutschland 2002: 1.1%; Barutzki 2002). Um das wirklich vorhandene Infektionsrisiko in der Schweiz bestimmen zu können, müssten aber alle zuvor aufgezählten Risikofaktoren in eine Studie mit einbezogen und ausgewertet werden.

Diese Risikofaktoren und die Tatsache, dass von einigen Autoren behauptet wird, dass die Katze als Überträger nur eine untergeordnete Rolle spielen könnte, haben einen grossen Einfluss auf die Präventionsmassnahmen. So spielen heute gemäss Literaturangaben, im Gegensatz zu früher, vor allem auch die Küchenhygiene und der korrekte Umgang mit Lebensmitteln eine wichtige Rolle zum Schutz vor einer *T. gondii*-Infektion (Tenter, Heckerroth et al. 2000). Rohe oder nur kurz gereifte Fleischprodukte können eine Infektionsquelle sein (Bundesinstitut 2005); gesalzene, gepökelte oder getrocknete Fleischprodukte gelten als sicher,

können aber unter bestimmten Umständen auch noch infektiöses Material enthalten (Bundesinstitut 2005). Hitze und Tiefgefrieren können Oozysten inaktivieren (Mie, Pointon et al. 2008); Salzen, Reifen und Wärme können das Risiko einer Infektion verringern, aber nicht verhindern (Bundesinstitut 2005).

Trotz der relativ geringen Oozysten-Ausscheidungsprävalenz (0.4%) bei den in dieser Studie untersuchten Katzen kann durch folgende Überlegungen das von der Katze ausgehende Risiko abgeschätzt werden: Die durchschnittlich Oozysten-Ausscheidungsphase beträgt bei der Katze ca. 2 Wochen (Miro et al., 2008). Wird an einem Stichtag X also eine Prävalenz von 0.4% nachgewiesen, ergibt sich daraus mathematisch eine jährliche Durchschnittsprävalenz von  $26 \times 0.4 = 10\%$ . Das heisst, dass 10% einer Katzenpopulation innerhalb eines Jahres eine Oozysten-Ausscheidungsphase hat. In der Schweiz leben ca. 1.3 Millionen Katzen, extrapoliert wird das dann bedeuten, dass jedes Jahr 130'000 Katzen Oozysten ausgeschieden haben. Oder anders betrachtet, jede zehnte Katze hat in einem vorgegebenen Jahr Oozysten ausgeschieden. Überträgt man diese Zahlen auf eine 9-Monate-Schwangerschaft einer seronegativen Frau mit einer Katze im Haushalt, dann wird in jeder 13. dieser Schwangerschaften eine von der Katze ausgehende Risikosituation auftreten. Da zudem, im Gegensatz zu anderen intestinalen Apikomplexa-Infektionen von Karnivoren, wie z.B. *Neospora caninum* beim Hund, die Katze eine sehr grosse Anzahl von Oozysten mit ihrem Kot ausscheidet und diese Oozysten in der Umwelt eine sehr hohe Tenazität aufweisen (bis zu 2 Jahren, Dubey et al., 1979), muss vor einer Unterschätzung des Risikofaktors Katze, wie sie kürzlich durch Boubaker et al. (2008) für die Schweiz propagiert wurde, gewarnt werden.

Zusätzlich zu diesen Tatsachen sind die Kenntnisse der Prävalenz von *T. gondii* in Schlachtieren und dem Handelsfleisch ebenfalls ein wichtiger Faktor zur Abschätzung des Gefährdungspotenzials für den Konsumenten/Menschen in der Schweiz. Heutzutage stehen uns mit serologischen und molekularbiologischen Methoden verschiedene Untersuchungsmöglichkeiten zum Nachweis von *T. gondii* zur Verfügung. Im Jahr 2000 wurde in der Schweiz bereits eine Studie zum Vorkommen des Parasiten in Schlachtieren durchgeführt (Wyss, Sager et al. 2000). Mit Hilfe der damals gewonnenen Daten wurden die einzelnen Tiergruppen in der aktuellen Studie eingeteilt und die Stichprobenmenge bestimmt. Weil die Wahrscheinlichkeit einer *T. gondii*-Infektion mit dem Alter zunimmt (längere Exposition, andere Haltungsart) sind alle Tiergruppen in entsprechende Altersgruppen eingeteilt worden.

**Rinder:** In der Rinder-Gruppe wurde bis zu den Muni (Kälber – Gusti – Munis) eine Zunahme der *T. gondii*-Seroprävalenz festgestellt. Von den Muni zu den Kühen war dann eine geringe Abnahme zu verzeichnen. Die Zunahme kann grundsätzlich mit der längeren Exposition und auch der extensiveren Haltung der älteren Tiere erklärt werden. Auch kommt die in der Kälbermast eingesetzte Milch kaum als Infektionsquelle in Frage. Die Abnahme der *T. gondii*-Seroprävalenz von Muni zu Kühen kann einerseits dadurch erklärt werden, dass in Rindern die meisten Zysten mit grosser Wahrscheinlichkeit eliminiert werden, oder dass die Infektion meistens nur wenige Jahre ( $\leq 3$  Jahre) persistiert (Eckert, Friedhoff et al. 2005; Dubey and Jones 2008). Gleichzeitig werden Mastmuni, im Gegensatz zu Gusti und Kühen, oft in speziellen Mastbetrieben in nächster Nähe zum Bauernhof gehalten, wo die Umweltkontamination durch Oozysten der Hauskatzen wesentlich höher sein kann. Zusätzlich kann es auch zu einer leichten Verschiebung der Resultate bei den älteren Tiergruppen kommen, da ein höherer Background im ELISA durch andere eventuell vorhandene Parasitosen sowie anderen aufgebauten Immunreaktionen nicht ausgeschlossen werden kann.

Da gemäss Literaturangaben (refs. in Dubey and Jones, 2008) *T. gondii* relativ schnell eliminiert werden soll und in einer realtime PCR nur geringe Probemengen untersucht werden können, gehen wir davon aus, dass in der PCR-Analyse eine wesentlich niedrigere Prävalenz als in der Serologie gefunden wird. Auffallend in dieser Untersuchung ist die hohe Prävalenz von *T. gondii* von 29.8% (14 von 47 Proben) bei Kälbern. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass die untersuchten Kälber eine Infektion im frühen Stadium hatten

und somit Tachyzoiten im Blut (Parasitämie, einhergehend mit einer Tachyzoitenvermehrung im Endothelium von Gefässwänden) und nicht Gewebezysten nachgewiesen worden sind. Offen bleibt dann die Frage, ob solche Tachyzoiten für den Konsumenten infektiös sind. Da eine schützende Gewebezystenwand, wie sie bei den Bradyzoiten vorliegt, fehlt, könnten solche Tachyzoiten infektiologisch für den Konsumenten unbedenklich sein. Eine eingehende Studie aus den USA (Dubey et al., 2005) zeigte, dass lebende, infektionstüchtigen Toxoplasmen nur in Schweinemuskulatur nachgewiesen werden konnte, im Rinder- und Hühnerfleisch hingegen, trotz Seropositivität, konnten keine infektionstüchtigen Toxoplasmen nachgewiesen werden.

Die geringe Übereinstimmung zwischen Seropositivität und PCR-positiven Resultaten (nur zwei Kühe der gesamten Stichprobenmenge waren gleichzeitig sero- als auch PCR-positiv) kann verschiedene Gründe haben. PCR-positive, aber seronegative Proben können einerseits aus einem frühen Stadium der Infektion stammen, in welchem Tachyzoiten im Gewebe (Parasitämie) nachgewiesen werden können (siehe oben), die Immunität aber noch nicht eingesetzt hat. Andererseits besteht die Möglichkeit, eine im Gewebe reaktionslos liegende Zyste nachgewiesen zu haben, wobei der Antikörper-Titer bereits wieder unter das nachweisbare Niveau gesunken ist. Seropositive, aber PCR-negative Proben können durch die geringe Infektionsintensität, d.h. der geringen Wahrscheinlichkeit, in einem Tier eine einzelne Zyste anzutreffen, zustande kommen. Dieser Effekt wird zusätzlich noch durch das geringe in der PCR eingesetzte Probevolumen (1g pro untersuchtes Tier) verstärkt. Aufgrund früherer Studien kann festgehalten werden, dass PCR-Analysen oft negative Resultate ergeben, da der Parasit nicht gleichmässig im Körper verteilt ist (Lunden, Lind et al. 2002). Auch die gleichzeitige serologische und molekularbiologische Untersuchung von mehreren Föten hat gezeigt, dass keine der Proben sowohl Sero- als auch PCR-positiv war (Gottstein, Hentrich et al. 1999). Wir können aber davon ausgehen, dass bei zunehmender Befallsintensität das Infektionspotenzial für den Konsumenten zunimmt, und dass dann auch die Wahrscheinlichkeit einer PCR-Positivität zunimmt.

In Rindfleischproben aus dem Handel konnten weder in der Serologie noch in der PCR positive Ergebnisse gefunden werden. Es wird angenommen, dass durch die zwei- bis dreiwöchige Lagerung des Fleisches nach der Schlachtung (Fleischreifung) und der damit verbundenen pH- und  $a_w$ -Wert-Veränderung und der Aktivität von Proteasen, die Antikörper im Fleischsaft verändert oder abgebaut werden und deshalb im ELISA-Verfahren keine hohen Antikörper-Titer mehr nachgewiesen werden können. Diese Prozesse konnten teilweise mit der zusätzlichen Versuchsreihe dargestellt werden (siehe Kapitel 3.3.5.). Da nicht für alle Proben eine konstante Abnahme des Antikörper-Titers feststellbar war, können andere Faktoren als die Fleischreifung aber ebenfalls eine Rolle spielen. Zur besseren Klärung dieses Phänomens wären deshalb weitere Versuche mit der Lagerung von Rindfleisch und die Abklärung weiterer Einflussfaktoren notwendig.

Im Vergleich zur Probekampagne von 2000 zeigt die aktuelle Studie in allen untersuchten Rinder-Gruppen einen Anstieg sowohl der Sero- als auch der PCR-Prävalenz (Ausnahme: Gusti). Dieser Anstieg könnte theoretisch mit einer Verbesserung der diagnostischen Methoden, d.h. der methodischen Sensitivität der Serologie erklärt werden. Praktisch allerdings wurde in der vorliegenden Studie genau derselbe ELISA eingesetzt, wie er in der 2000-Studie verwendet worden war. Andererseits hat in den letzten Jahren auch ein vermehrtes Umdenken in Tierschutz und Tierhaltung stattgefunden. Die zunehmend tierfreundliche Haltung der Nutztiere in der Schweiz (d.h. zunehmende Beweidung auch mit älteren Kühen) kann zu einer Erhöhung der *T. gondii*-Prävalenz führen, da vermehrter Kontakt zum Endwirten resp. zu umweltresistenten Oozysten möglich ist. Gerade im Zusammenhang mit der Prävention sollte dieses erhöhte Risiko einer Kontamination des „tierfreundlich produzierten Fleisches“ mit *T. gondii* nicht ausser Acht gelassen werden.

**Schafe:** Bei den Schafen wurden die höchsten Seroprävalenzen gefunden, wobei auch eine deutliche Zunahme der Seroprävalenz von Jungtieren (Lämmern) zu Adulten (Auen) festgestellt werden konnte. Diese hohen Werte, wie auch die Steigerung der Seroprävalenz von Lämmern zu Auen korrelieren mit bereits bestätigten Werten aus anderen europäischen Ländern (Aspinall, Marlee et al. 2002; Panadero, Paineira et al. 2009). Die Zunahme der Seroprävalenz kann einerseits sicherlich mit einer längeren Exposition der Auen zu *T. gondii* erklärt werden. Eine weitere Erklärung ist aber auch die Tatsache, dass Schafe im Gegensatz zu Rindern *T. gondii* nicht eliminieren und so eine Akkumulation von Zysten in älteren Tieren stattfinden kann, wodurch das Immunsystem immer wieder stimuliert wird. Zusätzlich haben Schafe eine höhere Wahrscheinlichkeit, sich mit am Boden befindlichen Oozysten zu infizieren, da sie, im Gegensatz zu Rindern, aus anatomischen Gründen näher am Boden grasen (Panadero, Paineira et al. 2009).

Wie bei den Rindern kann auch in dieser Tiergruppe bei den älteren Tieren noch eine leichte Verzerrung durch den hohen Background dazukommen, welcher durch gleichzeitig vorkommende andersartige Parasitosen verursacht wird.

Die Zunahme der positiven Befunde von Lämmern zu Auen konnte auch in der PCR festgestellt werden, allerdings in einem wesentlich geringeren Anteil als in der Serologie.

Auch diese Tiergruppe zeigte nur geringe Übereinstimmungen zwischen Serologie und PCR (vier Auen sero- als auch PCR-positiv). Eine Erklärung dafür ist wiederum, dass bei der geringen Probemenge, die in der PCR eingesetzt werden kann, die Wahrscheinlichkeit eine einzelne Zyste zu finden, gering ist. Zusätzlich werden bei Schafen bis zum 3. Monat nach der Geburt Antikörper von der Mutter auf das Jungtier übertragen (Waldeland 1977). Da Lämmer in der Schweiz im Alter von 120 – 150 Tage (Lebendgewicht 35 – 40kg) geschlachtet werden, kann es gut möglich sein, dass im ELISA von Lämmer-Proben noch maternale Antikörper nachgewiesen werden, ohne dass eine Infektion des Lammes stattgefunden hat.

Von den untersuchten Handelsproben waren 30% serologisch und 3% PCR-positiv. Diese Werte entsprechen in etwa den bei den Lämmern aus dem Schlachthof gefundenen Werten. Unter dem Aspekt der Fleischhygiene kann festgehalten werden, dass beim Konsum von Lammfleisch ein signifikant höheres Infektionsrisiko besteht als beim Konsum von Rind- und Schweinefleisch. Dieses Risiko wird noch durch die Tatsache verstärkt, dass Lammfleisch häufig nicht ganz durchgebraten wird. Das erhöhte Risiko beim Lammfleisch-Konsum konnte auch in einer Studie in Frankreich bestätigt werden (Dumetre, Ajzenberg et al. 2006).

Im Vergleich zur Studie von 2000 (Wyss, Sager et al. 2000) wurde bei den Schafen in der Serologie ein Anstieg der *T. gondii*-(Sero-)Prävalenz festgestellt. Im Gegensatz dazu wurde in der PCR-Analyse ein leichter Rückgang der Prävalenz dokumentiert. Der Anstieg der positiven Serologie-Resultate ist mit grösster Wahrscheinlichkeit ebenfalls auf die vermehrt tierfreundliche Haltung und dem damit erhöhten Risiko, Oozysten aufzunehmen, zurückzuführen. Zur Klärung der Abnahme der positiven PCR-Resultate müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden: können Schafe, wie Rinder, Gewebezysten eliminieren? Wo befinden sich Zysten hauptsächlich in den Tieren (Muskulatur, Gehirn)?

**Schwein:** Die Resultate der Untersuchung von Schweinen zeigten bezüglich der Seroprävalenzen ähnliche Verhältnisse wie die Ergebnisse bei den Schafen. Von den juvenilen Tieren (Mastschweine und Freilandschweine) zu den adulten Tieren (Mutterschweine) konnte eine Zunahme festgestellt werden. Eine solche Zunahme konnte ebenfalls in anderen europäischen Ländern (beispielsweise Deutschland) nachgewiesen werden (Damriyasa, Bauer et al. 2004). Wildschweine scheinen nicht in dieses Schema zu passen, da ihre Seroprävalenz mit 6.7% geringer ist als die Seroprävalenzen bei den Mast- und Freilandschweinen (13% resp. 12%). Die PCR-Resultate zeigten ein ähnliches Muster wie die Serologie. Auch hier konnte eine Zunahme der positiven Proben von Mast- und Freilandschweinen zu Mut-

terschweinen und eine Abnahme zu Wildschweinen registriert worden. Da sich Schweine durch die zufällige Aufnahme von infizierten Mäusen oder infiziertem Katzenkot (Wingstrand, Lind et al. 1997) mit *T. gondii* infizieren, kann die Abnahme der *T. gondii*-Prävalenz bei Wildschweinen mit dem geringeren Kontakt zum Endwirten und Oozysten-Ausscheider Katze erklärt werden.

Auch in dieser Gruppe konnten die nur geringen Übereinstimmungen zwischen Serologie und PCR, welche bei den Rindern und Schafen gefunden worden sind, bestätigt werden. (Ein Mast- und ein Mutterschwein sero- und auch PCR-positiv.) Diese Unterschiede können auch in dieser Gruppe einerseits mit reaktionslosen Gewebezysten und bereits abgesunkenem Antikörper-Titer erklärt werden. Andererseits können auch bei Mastschweinen wie bei den Kälbern Tiere während der Parasitämie getestet worden sein. Bei seropositiven aber PCR-negativen Proben spielt auch hier vor allem das geringe Probevolumen in der PCR und die damit verbundene niedrige Wahrscheinlichkeit, eine Zyste nachzuweisen eine entscheidende Rolle.

Die für die Handelsproben der Schweine ermittelten Werte entsprechen mehr oder weniger den Werten der Proben aus dem Schlachthof.

In der Untersuchungsgruppe der Schweine konnte ein Vergleich nur zwischen den Mast- und Mutterschweinen aus den Jahren 2000 und 2009 gemacht werden, da 2000 weder Frein- noch Wildschweine mit in die Studie eingeschlossen worden sind. In beiden vergleichbaren Altersgruppen konnte sowohl in der Serologie als auch in der PCR ein Anstieg der *T. gondii*-Prävalenz festgestellt werden. Wie bei den Rindern und den Schafen kann dieser Anstieg einerseits methodisch und andererseits durch die tierfreundlicheren Haltungsarten bedingt sein (Auslauf, Zugang zu freien Aussenflächen). In anderen europäischen Studien in Holland, Deutschland und Österreich (Edelhofer and Aspöck 1996; Shirley 1997; Tenter, Seineke et al. 1999; Tenter, Heckerroth et al. 2000; Kijlstra, Eissen et al. 2004) konnte nachgewiesen werden, dass bei ausschliesslicher Innenhaltung (inkl. Schleusen, Hygienekontrolle, Zugangskontrolle etc.) die Seroprävalenz von *T. gondii* bei den Schweinen <1% sein kann. Da auch bei intensiver Schweinehaltung in der Schweiz auf eine tierfreundliche Haltung geachtet werden muss, kann ein solcher Wert voraussichtlich nie erreicht werden.

Die in der serologischen Untersuchung (ELISA) erhaltenen Resultate aller untersuchten Gruppen müssen auch unter dem Aspekt betrachtet werden, dass ein positives Serologie-Resultat prinzipiell nur auf einen (jüngeren oder älteren) Kontakt des jeweiligen Tieres mit dem Parasiten hinweist. Eine aktuelle Infektion, d.h. die Präsenz eines lebenden, ruhenden oder sich aktiv entwickelnden Parasiten kann mit dieser Untersuchung nicht nachgewiesen werden. Gerade bei Rindern kann die Seroprävalenz sehr hoch sein, obwohl gemäss Literaturangaben selten gleichzeitig infektiöse Parasiten in essbaren Geweben festgestellt werden (Kijlstra and Jongert 2008).

Fleischsaft hat sich als adäquate Alternative zum Blutserum für die serologische Diagnose einer *Toxoplasma*-Infektion erwiesen (Nilsson and Ugglä 1992; Wingstrand, Lind et al. 1997), trotzdem sollte erwähnt werden, dass der ELISA-Cutoff in der aktuellen Studie mit Seren von experimentell infizierten Tieren und nicht mit Fleischsäften festgelegt worden ist. Eine in Schweden bezüglich dieser Problematik durchgeführte Studie zeigt eine sehr hohe Korrelation der ELISA-Werte zwischen Seren und Fleischsäften derselben Tiere (Lunden, Lind et al. 2002). Von 33 experimentell infizierten Schweinen und 22 Kontroll-Schweinen wurde gleichzeitig Serum und Fleischsaft genommen und es wurde damit ein indirekter IgG-ELISA gemacht. Die serologischen Resultate von Fleischsäften und Seren haben alle korreliert (Wingstrand, Lind et al. 1997). Aufgrund dieser Korrelation sind anschliessend in der schwedischen Studie wie auch in der aktuellen Studie für weitere Untersuchungen von Fleischsäften mittels ELISA positive und negative Seren als Referenzproben mit geprüft worden. Ein Anteil von falsch-positiven und falsch-negativen Resultaten kann aber trotzdem nicht

ausgeschlossen werden, da Fleischsäfte durchschnittlich etwas tiefere Absorptionswerte aufweisen als Seren.

Der Anteil an unsicheren Resultaten sollte in der aktuellen Studie mit Hilfe des angepassten Westernblot so klein wie möglich gehalten werden. Leider konnten in diesem Westernblot nur einige ausgewählte Lämmer- und Auenproben getestet werden, da die Unterscheidung von positiven und negativen Proben für Rinder und Schweine aufgrund der hohen Backgroundreaktionen im Immunoblot nicht definitiv möglich war. Es steht also eine Weiterentwicklung bzw. Verbesserung des *Toxoplasma*-Westernblot für die Spezies Rind und Schwein an, aber im Rahmen der vorliegenden Dissertation konnten diese Arbeiten nicht mehr durchgeführt werden.

Zur Klärung, ob der Parasit in einem seropositiven Tier bereits aus dem Gewebe eliminiert oder noch vorhanden ist, und somit ein Gefährdungspotenzial für den Menschen darstellen könnte, kann grundsätzlich eine realtime RT-PCR eingesetzt werden. Eine solche PCR ist für *Neospora caninum*-Infektionen entwickelt worden (Strohbusch et al., 2008), bei *T. gondii* müsste sie zuerst noch kreiert werden. Die realtime PCR selber zeichnet sich durch eine hohe Sensitivität und hohe Spezifität aus, der grosse Nachteil hierbei ist hingegen die sehr kleine einsetzbare Probenmenge, die analysiert werden kann. Diese geringe Probenmenge ist wohl für die bereits erwähnten Unterschiede in Serologie und PCR von einzelnen Tieren und die wahrscheinlich falsch-negativen Resultate verantwortlich. Zur Verbesserung der Sensitivität der PCR-Methode könnte zukünftig die von Opsteegh, Langelaar et al. (2009) vorgeschlagene Kombination von PCR mit Magnetkuppelung eingesetzt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden zusätzlich alle PCR-positiven Proben histologisch untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die realtime PCR den histologischen Methoden weit überlegen ist, da histologisch keine einzige *T. gondii*-Zyste in den untersuchten Proben nachweisbar war. Umgekehrt aber wurde in diesen histologisch untersuchten Proben eine relativ grosse Anzahl von *Sarkozystis*-Zysten gefunden, was auf eine hohe Sarkosporidien-Prävalenz bei den Nutztieren in der Schweiz hinweist (Koprologische *Sarkozystis*-Prävalenz bei Hunden in der Schweiz: 3.7%; Sager, Moret et al. 2006). Dies weist somit auch auf eine hohe Spezifität der PCR hin.

Mit Hilfe der Genotypisierungsanalyse sollten die ersten Daten über die genetische Struktur der *T. gondii*-Population in der Schweiz gewonnen werden. Die klonale Populationstruktur von *T. gondii* entstand gemäss Literatur vorwiegend durch drei Faktoren: (i) die sexuelle Rekombination im Endwirt wird durch die direkte Übertragung von Zwischenwirt zu Zwischenwirt umgangen; (ii) viele Makrogamonten bleiben unbefruchtet und können durch Parthenogenese Oozysten bilden; (iii) Katzen sind nur sehr selten mit verschiedenen Genotypen von *T. gondii* infiziert (Ajzenberg, Banuls et al. 2004). Bei der Genotypisierung der Isolate der aktuellen Studie wurden ansatzweise mehrere Genotypen gefunden, was darauf schliessen lässt, dass mehr als ein Genotyp in der Schweiz vorkommt. Diese Resultate stehen im Gegensatz zu anderen Studien, die in einem Land (beispielsweise Frankreich, Deutschland oder Grossbritannien) nur einen Genotypen gefunden haben (Owen and Trees 1999; Ajzenberg, Cogne et al. 2002; Aspinall, Marlee et al. 2002; Jungersen, Jensen et al. 2002; Dubey, Patitucci et al. 2006; Dumetre, Ajzenberg et al. 2006; Schares, Vrhovec et al. 2008; Elbez-Rubinstein, Ajzenberg et al. 2009). Eine Unterscheidung der einzelnen Genotypen wird zudem erschwert durch die nur geringen Unterschiede in den typisierten Mikrosatelliten: weniger als 2% zwischen den einzelnen Genotypen (Grigg, Bonnefoy et al. 2001; Ajzenberg, Banuls et al. 2004). Schlussendlich war eine abschliessende Typisierung einzelner Proben der aktuellen Studie und der Studie von 2000 nicht möglich, da teilweise nur sehr wenig DNA pro Probe vorhanden war. Allerdings weisen die Ergebnisse darauf hin, dass eine weitaus grössere Diversität der Genotypen von *T. gondii* als erwartet in der Schweiz vorhanden ist. Da der Genotyp der einzigen *T. gondii*-positiven Katzenprobe definitiv als Genotyp II identifiziert werden konnte, wäre es interessant, in einer weiterführenden Studie abzuklären, woher die Genotypen I und

III, und diesbezüglich auch gemischte Genotypen bei Rindern und Schweinen stammen, und ob bei diesen Tierarten sogar gemischte Genotypen gleichzeitig vorkommen könnten.

## 5. Fazit und Ausblick

*T. gondii* kommt in der Schweiz bei allen als Zwischenwirt untersuchten Spezies (Rinder, Schafe, Schweine) vor. Die in der Serologie gefundenen Werte sind für Muni, Kühe und Mastschweine signifikant höher als in der Studie von 2000. In den anderen Tiergruppen konnte mit Ausnahme der Schafe ebenfalls ein leichter Anstieg festgestellt werden (statistisch nicht signifikant). Somit scheint in den letzten Jahren eine Zunahme von *T. gondii*-Infektionen bei den meisten in der Schweiz gehaltenen Nutztieren stattgefunden zu haben. Zwei Ursachen könnten dafür verantwortlich sein: (a) eine erhöhte Umweltkontamination mit Oozysten durch Katzen; (b) veränderte Haltungsbedingungen bestimmter Tierarten (zB vermehrter Weidegang bei Rindern), wobei dies offensichtlich beim Schwein nicht zutrifft.

Der angewandte P30-ELISA ist problemlos in der Lage *T. gondii*-Antikörper im Fleischsaft methodisch nachzuweisen, wobei validierte Grenzwerte für Fleischsäfte aber noch festgelegt werden müssen. Die realtime-PCR-Methode für *T. gondii* weist gute Ergebnisse auf, allerdings können die geringen Probemengen zu falsch-negativen Resultaten führen. Die realtime-PCR-positiven Proben der Schlachttiere zeigen im Vergleich zur Probekampagne aus dem Jahr 2000 bei den Kälbern einen signifikanten Delta-Anstieg von 28.8% (von 1% auf 29.8%). In den anderen Tiergruppen waren diese Unterschiede zwischen den Probekampagnen 2000 und 2009 nicht signifikant.

Abschliessend kann festgehalten werden, dass der Verzehr von Lammfleisch ein signifikant höheres Risikopotenzial für den Konsumenten darstellt als Rind- und Schweinefleisch. Für beide Fleischsorten besteht aber ein Restrisiko, welches nicht ausser Acht gelassen werden kann. Dabei spielt vor allem die Behandlung des Fleisches (Reifung, Räuchern, Kochen, Braten etc.) und die Küchenhygiene eine grosse Rolle bei diesem Restrisiko.

Die Resultate der Genotypisierung weisen darauf hin, dass beim Tier in der Schweiz mehr als ein Genotyp vorkommt (Genotyp II beim Schaf, beim Schwein und bei der Katze, Genotypen I und III beim Rind). Diesen Hinweisen sollte in weiterführenden Untersuchungen nachgegangen werden.

Die Prävalenz der *T. gondii*-Oozystenausscheidung durch Katzen erscheint mit 0.4% geringer als in früheren Studien (1 – 2%). Durch die PCR-Spezifisierung (*Toxoplasma* versus *Hammondia*) wird dieser Unterschied jedoch relativiert, so dass die Katze als Überträgerin betreffend Präventionsmassnahmen unbedingt mit eingeschlossen werden muss.

Um zukünftig möglichst alle methodischen Unsicherheiten aus dem Weg zu räumen, müssten in einer weiteren Studie gleichzeitig Seren und Fleischsäfte gesammelt werden und diese gemeinsam mit den in dieser Studie verwendeten Methoden untersucht werden. Dabei sollte vor allem im ELISA auf die Korrelation Serum / Fleischsaft geachtet werden, ebenso auch auf die Sensitivität und Spezifität der unterschiedlichen Probematerialien in der PCR. Schlussendlich müsste der bereits etablierte und weiterentwickelte Westernblot (Staubli, Nunez et al. 2006) für alle Tiergruppen angepasst werden.

## 6. Danksagungen

Abschliessend möchte ich allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, ganz herzlich danken:

Herrn Prof. Dr. B. Gottstein, Frau Dr. med. vet. C. F. Frey und Herrn Prof. Dr. N. Müller (Institut für Parasitologie) für die Überlassung des Forschungsthemas und die vorzügliche Betreuung.

Frau B. Zumkehr, Frau M. Margos, Frau M. Strohubusch, Herrn P. Stünzi und dem restlichen Diagnostikteam des IPA (Institut für Parasitologie) für die technischen Anleitungen und Hilfestellungen und die guten Diskussionen während der gesamten Arbeit.

Herrn Dr. med. vet. G. Schares, Herrn D.C. Herrmann und dem Labor-Team vom FLI (Friedrich-Loeffler-Institut, Wusterhausen) für die grossartige Unterstützung bei der Genotypisierung.

Herrn Prof. Dr. med. vet. M. Doherr (DCR-VPH, Klinische Forschung) für die statistischen Beratungen.

Herrn Dr. phil. nat. D. Bernet und Herrn M. Binggeli (Bundesamt für Veterinärwesen) für die statistischen Auswertungen und die GIS-Karten.

Herrn Dr. Töngi (Schlachthof Basel), Herrn Diethelm (Schlachthof Estavayer-le-lac), Herrn Dr. Rudelt (Schlachthof Langnau) und Herrn T. Bärtschi (Heidbühl Metzg AG, Eggiwil) und allen anderen Schlachthöfen für die grosszügige Hilfe bei der Probensammlung.

Maria, Maxi, Dorothea, Britta, Markus und Michi (Institut für Parasitologie und FIWI) für die tolle Stimmung im Doktorandenbüro.

Dem Histologielaor des Instituts für Tierpathologie (Bern) für die Unterstützung bei den histopathologischen Untersuchungen.

Meinen Eltern, meiner Schwester und meinem Mann für die jahrelange Unterstützung aller meiner Projekte.

## 7. Literatur

- Ajzenberg, D., A. L. Banuls, et al. (2004). "Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*." Int J Parasitol **34**(10): 1185-96.
- Ajzenberg, D., N. Cogne, et al. (2002). "Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings." J Infect Dis **186**(5): 684-9.
- Andreolotti, O., H. Budka, et al. (2007). "Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from EFSA on Surveillance and monitoring of *Toxoplasma* in humans, foods and animals." The EFSA Journal **5****3** **1-64**.
- Aspinall, T. V., D. Marlee, et al. (2002). "Prevalence of *Toxoplasma gondii* in commercial meat products as monitored by polymerase chain reaction--food for thought?" Int J Parasitol **32**(9): 1193-9.
- Barutzki, D. (2002). "Untersuchungen zum Endoparasitenbefall bei Hunden und Katzen in Deutschland."
- Basso, W., G. More, et al. (2009). "Isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from captive slender-tailed meerkats (*Suricata suricatta*) with fatal toxoplasmosis in Argentina." Vet Parasitol.
- Boubaker, K., Hohlfeld, P., Vaudaux, B., Bucher, H.U., Garweg, J., Hoesli, I., Kind, I., Kind, C., Raeber, P.A., Rudin, C. (2008). Verzicht auf das Toxoplasmose-Screening in der Schwangerschaft. Schweiz. Med. Forum **9**: 105-106.
- Bresciani, K. D., A. J. Costa, et al. (2009). "Transplacental transmission of *Toxoplasma gondii* in reinfected pregnant female canines." Parasitol Res **104**(5): 1213-7.
- Bundesinsitut, f. R. (2005). "Rohwurst kann eine Infektionsquelle für Toxoplasmose sein." Stellungnahme Nr. 039/2005 des BfR: 4.
- Bundesinstitut, f. R. (2005). "Rohwurst kann eine Infektionsquelle für Toxoplasmose sein." Stellungnahme Nr. 039/2005 des BfR: 4.
- Cook, A. J., R. E. Gilbert, et al. (2000). "Sources of toxoplasma infection in pregnant women: European multicentre case-control study. European Research Network on Congenital Toxoplasmosis." Bmj **321**(7254): 142-7.
- Costa, J. M., C. Pautas, et al. (2000). "Real-time PCR for diagnosis and follow-up of *Toxoplasma* reactivation after allogeneic stem cell transplantation using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes." J Clin Microbiol **38**(8): 2929-32.
- da Silva, A. V. and H. Langoni (2001). "The detection of *Toxoplasma gondii* by comparing cytology, histopathology, bioassay in mice, and the polymerase chain reaction (PCR)." Vet Parasitol **97**(3): 191-8.
- Damriyasa, I. M., C. Bauer, et al. (2004). "Cross-sectional survey in pig breeding farms in Hesse, Germany: seroprevalence and risk factors of infections with *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis* spp. and *Neospora caninum* in sows." Vet Parasitol **126**(3): 271-86.
- Darde, M. L. (2004). "Genetic analysis of the diversity in *Toxoplasma gondii*." Ann Ist Super Sanita **40**(1): 57-63.
- Dubey, J. P. (2008). "The history of *Toxoplasma gondii*--the first 100 years." J Eukaryot Microbiol **55**(6): 467-75.
- Dubey, J. P., D. E. Hill, et al. (2002). "*Neospora caninum* and *Hammondia heydorni* are separate species/organisms." Trends Parasitol **18**(2): 66-9.
- Dubey, J. P. and J. L. Jones (2008). "*Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States." Int J Parasitol **38**(11): 1257-78.
- Dubey, J. P., N. L. Miller, et al. (1970). "The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces." J Exp Med **132**(4): 636-62.
- Dubey, J. P., A. N. Patitucci, et al. (2006). "Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Chile, South America." Vet Parasitol **140**(1-2): 76-82.

- Dubey, J.P., Hill, D.E., Jones, J.L., Hightower, A.W., Kirkland, E., Roberts, J.M., Marcet, P.L., Lehmann, T., Vianna, M.C.B., Miska, K. et al. (2005). Prevalence of viable *Toxoplasma gondii* in beef, chicken and pork from retail meat stores in the United States: Risk assessment to consumers. J. Parasitol. **91**: 1082-1093.
- Dumetre, A., D. Ajzenberg, et al. (2006). "*Toxoplasma gondii* infection in sheep from Haute-Vienne, France: seroprevalence and isolate genotyping by microsatellite analysis." Vet Parasitol **142**(3-4): 376-9.
- Dunn, D., M. Wallon, et al. (1999). "Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling." Lancet **353**(9167): 1829-33.
- Eckert, J., K. T. Friedhoff, et al. (2005). Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin, Enke.
- Edelhofer, R. and H. Aspöck (1996). "Infektionsquellen und Infektionswege aus der Sicht des *Toxoplasma*-Screenings der Schwangeren in Österreich." Mitt Österr Ges Tropenmed Parasitol: 42.
- Elbez-Rubinstein, A., D. Ajzenberg, et al. (2009). "Congenital toxoplasmosis and reinfection during pregnancy: case report, strain characterization, experimental model of reinfection, and review." J Infect Dis **199**(2): 280-5.
- Gottstein, B., B. Hentrich, et al. (1999). "[Molecular and immunodiagnostic studies of bovine neosporosis in Switzerland]." Schweiz Arch Tierheilkd **141**(2): 59-68.
- Grigg, M. E., S. Bonnefoy, et al. (2001). "Success and virulence in *Toxoplasma* as the result of sexual recombination between two distinct ancestries." Science **294**(5540): 161-5.
- Jacquier P, Hohlfeld P, Vorkauf H, Zuber P. [Epidemiology of toxoplasmosis in Switzerland: national study of seroprevalence monitored in pregnant women 1990-1991] Schweiz Med Wochenschr Suppl. 1995;65:29S-38S
- Jungersen, G., L. Jensen, et al. (2002). "Non-lethal infection parameters in mice separate sheep Type II *Toxoplasma gondii* isolates by virulence." Comp Immunol Microbiol Infect Dis **25**(3): 187-95.
- Kijlstra, A., O. A. Eissen, et al. (2004). "*Toxoplasma gondii* infection in animal-friendly pig production systems." Invest Ophthalmol Vis Sci **45**(9): 3165-9.
- Kijlstra, A. and E. Jongert (2008). "Control of the risk of human toxoplasmosis transmitted by meat." Int J Parasitol **38**(12): 1359-70.
- Kijlstra, A. and E. Jongert (2009). "Toxoplasma-safe meat: close to reality?" Trends Parasitol **25**(1): 18-22.
- Lind, P., J. Haugegaard, et al. (1997). "The time course of the specific antibody response by various ELISAs in pigs experimentally infected with *Toxoplasma gondii*." Vet Parasitol **71**(1): 1-15.
- Lindsay, D. S., J. P. Dubey, et al. (1997). "Mechanical transmission of *Toxoplasma gondii* oocysts by dogs." Vet Parasitol **73**(1-2): 27-33.
- Lunden, A., P. Lind, et al. (2002). "Serological survey of *Toxoplasma gondii* infection in pigs slaughtered in Sweden." Scand J Infect Dis **34**(5): 362-5.
- Mie, T., A. M. Pointon, et al. (2008). "A qualitative assessment of *Toxoplasma gondii* risk in ready-to-eat smallgoods processing." J Food Prot **71**(7): 1442-52.
- Miro, G., A. Montoya, et al. (2008). "Toxoplasmosis - an update." EJCAP **18**(3).
- Montoya, J. G. and O. Liesenfeld (2004). "Toxoplasmosis." Lancet **363**(9425): 1965-76.
- Müller, N., N. Vonlaufen, et al. (2002). "Application of real-time fluorescent PCR for quantitative assessment of *Neospora caninum* infections in organotypic slice cultures of rat central nervous system tissue." J Clin Microbiol **40**(1): 252-5.
- Nilsson, L. A. and A. Ugglå (1992). "*Schistosoma mansoni* antibodies in tissue specimens demonstrated by a diffusion-in-gel ELISA technique." Vet Parasitol **45**(1-2): 73-80.
- Opsteegh, M., M. F. M. Langelaar, et al. (2009). "Highly sensitive detection of *Toxoplasma gondii* in 100g tissue samples by magnetic capture and PCR."

- Ortega-Mora, L. M., B. Gottstein, et al. (2007). Protozoal abortion in farm ruminants: guidelines for diagnosis and control. Wallingford, CABI.
- Owen, M. R. and A. J. Trees (1999). "Genotyping of *Toxoplasma gondii* associated with abortion in sheep." J Parasitol **85**(2): 382-4.
- Panadero, R., A. Paineira, et al. (2009). "Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in wild and domestic ruminants sharing pastures in Galicia (Northwest Spain)." Res Vet Sci.
- Rommel, M., J. Eckert, et al. (2000). Veterinärmedizinische Parasitologie. Berlin, Parey Buchverlag.
- Rudin, C., K. Boubaker, et al. (2009). "Verzicht auf das Toxoplasma-Screening in der Schwangerschaft - Eine kurze Begründung." Schweiz Med Forum(2009;9(5): 105-106): 2.
- Sager, H., M. Gloor, et al. (2003). "Immunodiagnosis of primary *Toxoplasma gondii* infection in sheep by the use of a P30 IgG avidity ELISA." Parasitol Res **91**(2): 171-4.
- Sager, H., C. S. Moret, et al. (2006). "Incidence of *Neospora caninum* and other intestinal protozoan parasites in populations of Swiss dogs." Vet Parasitol **139**(1-3): 84-92.
- Schares, G., D. C. Herrmann, et al. (2008). "Characterization of a repetitive DNA fragment in *Hammondia hammondi* and its utility for the specific differentiation of *H. hammondi* from *Toxoplasma gondii* by PCR." Mol Cell Probes **22**(4): 244-51.
- Schares, G., N. Pantchev, et al. (2005). "Oocysts of *Neospora caninum*, *Hammondia heydoni*, *Toxoplasma gondii* and *Hammondia hammondi* in faeces collected from dogs in Germany." Int J Parasitol **35**(14): 1525-37.
- Schares, G., M. G. Vrhovec, et al. (2008). "Occurrence of *Toxoplasma gondii* and *Hammondia hammondi* oocysts in the faeces of cats from Germany and other European countries." Vet Parasitol **152**(1-2): 34-45.
- Shirley, M. (1997). "Vaccines against animal coccidiosis." 28 - 52.
- Silva, J. C., S. Ogassawara, et al. (2001). "Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in captive neotropical felids from Brazil." Vet Parasitol **102**(3): 217-24.
- Staubli, D., S. Nunez, et al. (2006). "*Neospora caninum* immunoblotting improves serodiagnosis of bovine neosporosis." Parasitol Res **99**(6): 648-58.
- Strohbusch, M., Müller, N., Hemphill, A., Greif, G., Gottstein, B (2008). NcGRA2 as a molecular target to assess the parasitocidal activity of toltrazuril against *Neospora caninum*. Parasitology **135**:1065-1073.
- Sukthana, Y., T. Chintana, et al. (2001). "Predictive value of latex agglutination test in serological screening for *Toxoplasma gondii*." Southeast Asian J Trop Med Public Health **32**(2): 314-8.
- Tenter, A., P. Seineke, et al. (1999). "Aktuelle Studie zur Epidemiologie von *Toxoplasma*-Infektionen." In: Contraths FJ, Greiner M, Kreinenbrock L, Schnieder T, et al., editors. Neuere Methoden und Ergebnisse zur Epidemiologie von Parasitosen.
- Tenter, A. M., A. R. Heckeroth, et al. (2000). "*Toxoplasma gondii*: from animals to humans." Int J Parasitol **30**(12-13): 1217-58.
- Waldeland, H. (1977). "Toxoplasmosis in sheep. Long-term epidemiological studies in four breeding flocks." Acta Vet Scand **18**(2): 227-36.
- Wingstrand, A., P. Lind, et al. (1997). "Clinical observations, pathology, bioassay in mice and serological response at slaughter in pigs experimentally infected with *Toxoplasma gondii*." Vet Parasitol **72**(2): 129-40.
- Wyss, R., H. Sager, et al. (2000). "[The occurrence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* as regards meat hygiene]." Schweiz Arch Tierheilkd **142**(3): 95-108.

## 7. Anhang

### 7.1. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

#### 7.1.1. Tabellen

Tabelle 1 [Tab.1]	Verteilung der Proben auf die Schlachthöfe	Seite 10
Tabelle 2 [Tab.2]	Verteilung der Proben auf die Detaillisten	Seite 10
Tabelle 3 [Tab.3]	Stichprobenberechnung	Seite 11
Tabelle 4 [Tab.4]	Stichprobenumfang	Seite 12
Tabelle 5 [Tab.5]	Vergleich Serologie / PCR Rinder Schlachthof	Seite 19
Tabelle 6 [Tab.6]	Vergleich Serologie / PCR Schaf Schlachthof	Seite 20
Tabelle 7 [Tab.7]	Vergleich Serologie / PCR Schwein Schlachthof	Seite 22
Tabelle 8 [Tab.8]	Zusammenfassung Schlachthofproben	Seite 22
Tabelle 9 [Tab.9]	Vergleich Serologie / PCR Handelsproben	Seite 27
Tabelle 10 [Tab.10]	Zusammenfassung Handelsproben	Seite 27
Tabelle 11 [Tab.11]	Altersverteilung Katzen	Seite 33
Tabelle 12 [Tab.12]	Resultate Genotypisierung	Seite 34

#### 7.1.2. Abbildungen

Abbildung 1 [Abb.1]	Entwicklungszyklus von <i>T.gondii</i>	Seite 4
Abbildung 2 [Abb.2]	Histologie Hirn Maus (nicht gefroren)	Seite 17
Abbildung 3 [Abb.3]	Histologie Hirn Maus (gefroren)	Seite 17
Abbildung 4 [Abb.4]	Dotplot Serologie Rinder Schlachthof	Seite 18
Abbildung 5 [Abb.5]	Balkendiagramm PCR Rinder Schlachthof	Seite 18
Abbildung 6 [Abb.6]	Dotplot Serologie Schafe Schlachthof	Seite 19
Abbildung 7 [Abb.7]	Balkendiagramm PCR Schafe Schlachthof	Seite 20
Abbildung 8 [Abb.8]	Dotplot Serologie Schweine Schlachthof	Seite 21
Abbildung 9 [Abb.9]	Balkendiagramm PCR Schweine Schlachthof	Seite 21
Abbildung 10 [Abb.10]	GIS-Karte Serologie Rinder Schlachthof	Seite 23
Abbildung 11 [Abb.11]	GIS-Karte PCR Rinder Schlachthof	Seite 23
Abbildung 12 [Abb.12]	GIS-Karte Serologie Schafe Schlachthof	Seite 24
Abbildung 13 [Abb.13]	GIS-Karte PCR Schafe Schlachthof	Seite 24
Abbildung 14 [Abb.14]	GIS-Karte Serologie Schweine Schlachthof	Seite 25
Abbildung 15 [Abb.15]	GIS-Karte PCR Schweine Schlachthof	Seite 25
Abbildung 16 [Abb.16]	Dotplot Serologie Handelsproben	Seite 26
Abbildung 17 [Abb.17]	Balkendiagramm PCR Handelsproben	Seite 27
Abbildung 18 [Abb.18]	Antikörper-Titer-Verlauf Rinder	Seite 28
Abbildung 19 [Abb.19]	Antikörper-Titer-Verlauf Muni	Seite 28
Abbildung 20 [Abb.20]	Vergleich Mast- und Freiland Schweine	Seite 29
Abbildung 21 [Abb.21]	Serologie (Vergleich 2000 und 2009)	Seite 30
Abbildung 22 [Abb.22]	PCR (Vergleich 2000 und 2009)	Seite 30
Abbildung 23 [Abb.23]	Histologie Muskulatur Kuh (400x)	Seite 31
Abbildung 24 [Abb.24]	Histologie Muskulatur Aue (200x)	Seite 31
Abbildung 25 [Abb.25]	Westernblot Schaf	Seite 31
Abbildung 26 [Abb.26]	Koprologie <i>T.gondii</i> Katze	Seite 32
Abbildung 27 [Abb.27]	Koprologie Katze	Seite 32
Abbildung 28 [Abb.28]	Koprologie Katze (2)	Seite 33