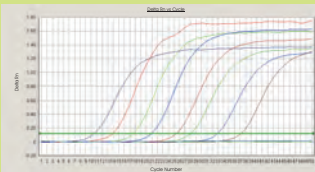


# REAL TIME-PCR-UNTERSUCHUNGEN ZUR PERSISTENZ VON INFEKTIÖSEN *TOXOPLASMA GONDII*-DAUERSTADIEN IN ROHWURST-ERZEUGNISSEN



**STEFANIE ULRIKE ROSA**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2009

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2009

© 2009 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Aus dem Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Betreuer: Prof. Dr. M. Bülte

**„Real Time-PCR-Untersuchungen zur Persistenz von  
infektiösen *Toxoplasma gondii*-Dauerstadien  
in Rohwurst-Erzeugnissen“**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Stefanie Ulrike Rosa**

Tierärztin aus Wildeshausen

Gießen 2009

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Gutachter: Prof. Dr. M. Bülte  
Prof. Dr. H. Zahner

Tag der Disputation: 18.05.2009

**Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:**

Rosa, S. und M. Bülte (2007)

Zur Überlebensfähigkeit von *Toxoplasma gondii* in Rohwürsten. 48. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Dtsch. Vet. Med. Ges. (DVG), vom 26.-28. September 2007, Garmisch-Partenkirchen

Rosa, S. und M. Bülte (2008)

Rohwurst-Erzeugnisse als Toxoplasmose-Infektionsquelle  
RFL, 60, 56-60

Rosa, S., A. Abdulmawjood, H. Zahner, C. Bauer, A. Taubert und M. Bülte (2008)

Persistenz von infektiösen *Toxoplasma gondii*-Dauerstadien in Rohwurst-Erzeugnissen. 49. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Dtsch. Vet. Med. Ges. (DVG), vom 29. September bis 02. Oktober 2008, Garmisch-Partenkirchen

*Meiner Mutter Gudrun,  
meinem Vater Oskar  
und  
meiner Schwester Christine*

## Inhaltsverzeichnis

1.	Ausgangssituation und Fragestellung .....	1
2.	Schrifttum.....	3
2.1	<i>Toxoplasma gondii</i> .....	3
2.1.1	Taxonomie.....	3
2.1.2	Historischer Kontext .....	4
2.1.3	Morphologie .....	6
2.1.4	Entwicklungszyklus.....	8
2.1.5	Genetik .....	10
2.2	Toxoplasmose.....	11
2.2.1	Risikofaktoren und Infektionsquellen .....	11
2.2.1.1	Tachyzoiten.....	12
2.2.1.2	Gewebssystem (Bradyzoiten) .....	14
2.2.1.3	Oozysten (Sporozoitien) .....	17
2.2.2	<i>T. gondii</i> -Seroprävalenz.....	20
2.2.2.1	Seroprävalenz postnataler Infektionen des Menschen.....	20
2.2.2.2	Seroprävalenz pränataler Infektionen des Menschen .....	25
2.2.2.3	Seroprävalenz bei Feliden, insbesondere der Katze.....	27
2.2.2.4	Seroprävalenz bei Caniden, insbesondere dem Hund.....	30
2.2.2.5	Seroprävalenz bei Haus- und Wildschweinen .....	33
2.2.2.6	Seroprävalenz bei Haus- und Wildwiederkäuern .....	39
2.2.2.7	Seroprävalenz bei anderen Haus- und Wildtieren .....	43
2.2.3	Symptomatik der Toxoplasmose .....	45
2.2.3.1	Toxoplasmose des Menschen.....	45
2.2.3.1.1	Immunkompetente Personen .....	45
2.2.3.1.2	Immunsupprimierte Personen .....	46
2.2.3.1.3	Kongenitale Toxoplasmose.....	47
2.2.3.1.4	Okuläre Toxoplasmose .....	48
2.2.3.2	Toxoplasmose der Tiere .....	49
2.2.4	Prävention und Therapie.....	51
2.3	Nachweismethoden.....	53
2.3.1	Serologischer Nachweis beim Menschen.....	53
2.3.2	Serologischer Nachweis bei Tieren .....	55
2.3.3	Direkte Nachweismethoden.....	57

2.3.3.1	Einsatz der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	58
2.3.3.2	Konventionelle PCR .....	60
2.3.3.3	Real Time-PCR .....	60
2.3.3.4	Interne Amplifikationskontrolle .....	62
3.	Material und Methoden.....	63
3.1	Etablierung der <i>T. gondii</i> <i>in vitro</i> -Kultur (Stamm ME 49) .....	64
3.2	Entwicklung der Real Time-PCR.....	65
3.2.1	Herkunft und Herstellung der für die Etablierung der Real Time-PCR verwendeten <i>T. gondii</i> -Tachyzoiten .....	66
3.2.2	Entwicklung der Primer und Sonden.....	66
3.2.3	Herstellung der Kontrollen .....	68
3.2.4	Ermittlung der Sensitivität.....	69
3.2.5	Bestimmung der Nachweisgrenze und relativen Häufigkeit.....	70
3.2.6	Entwicklung der Internen Amplifikationskontrolle .....	72
3.2.7	Auswertung der Real Time-PCR-Ergebnisse .....	72
3.3	Schweine-Infektionsversuch.....	73
3.4	Produktion der Rohwurst-Erzeugnisse .....	74
3.5	Mäuse-Infektionsversuch .....	76
3.6	Nachweis von <i>T. gondii</i> mittels Real Time-PCR .....	79
3.6.1	Methodik des Erregernachweises in Schweine-Geweben .....	80
3.6.2	Methodik des Erregernachweises in Rohwurst-Erzeugnissen .....	80
3.6.3	Methodik des Erregernachweises in Mäuse-Geweben.....	81
3.7	Nachweis von Antikörpern gegen <i>T. gondii</i> mithilfe des Western-Blot-Verfahrens .....	82
3.8	Statistische Auswertung .....	83
4.	Ergebnisse .....	84
4.1	Etablierung der <i>T. gondii</i> <i>in vitro</i> -Kultur (Stamm ME 49) .....	84
4.2	Entwicklung der Real Time-PCR.....	84
4.2.1	Herkunft und Herstellung der für die Etablierung der Real Time-PCR verwendeten <i>T. gondii</i> -Tachyzoiten .....	84
4.2.2	Entwicklung der Primer und Sonden.....	84
4.2.3	Überprüfung der Kontrollen.....	89
4.2.4	Bestimmung der Sensitivität .....	90
4.2.5	Bestimmung der Nachweisgrenze und der relativen Häufigkeit.....	93
4.2.6	Entwicklung der Internen Amplifikationskontrolle .....	95
4.3	Schweine-Infektionsversuch.....	98



4.4	Produktion der Rohwurst-Erzeugnisse .....	99
4.5	Mäuse-Infektionsversuch .....	100
4.6	Nachweis von <i>T. gondii</i> -DNA mittels Real Time-PCR.....	100
4.6.1	Real Time-PCR-Nachweis von <i>T. gondii</i> in Schweine-Geweben.....	100
4.6.2	Real Time-PCR Nachweis in Rohwurst-Erzeugnissen .....	101
4.6.3	Real Time-PCR Nachweis in verschiedenen Mäuse-Geweben.....	103
4.7	Nachweis von Antikörpern gegen <i>T. gondii</i> mithilfe des Western-Blot-Verfahrens .....	107
5.	Diskussion.....	108
5.1	Entwicklung der Real Time-PCR.....	110
5.2	Schweine-Infektionsversuch.....	112
5.3	Rohwurst-Produktion .....	114
5.4	Mäuse-Infektionsversuch .....	116
5.4.1	Molekularbiologischer Erregernachweis.....	116
5.4.2	Serologischer Erregernachweis .....	120
6.	Schlussfolgerung .....	121
7.	Zusammenfassung .....	122
8.	Summary .....	124
	Anhang I: Rezepturen.....	126
	A) Hessische Bauern-Mettwurst.....	126
	B) Hessische ÖKO Bauern-Mettwurst .....	127
	C) Teewurst .....	128
	D) ÖKO Teewurst.....	129
	E) Salami (mittelgrob).....	130
	F) ÖKO Salami (mittelgrob).....	131
	Anhang II: Real Time-PCR-Ergebnisse der nativen Schweinegewebe.....	132
	Anhang III: Real Time-PCR-Ergebnisse der Mäusegruppen 1-4 .....	133
	Anhang IV: Real Time-PCR-Ergebnisse der Rohwurst-Erzeugnisse .....	135
	A) Handwerklich produzierte Mettwurst .....	135
	B) Ökologisch produzierte Mettwurst.....	136
	C) Handwerklich produzierte Teewurst.....	137
	D) Ökologisch produzierte Teewurst.....	138
	E) Handwerklich produzierte Salami .....	139
	F) Ökologisch produzierte Salami.....	140
	Anhang V: pH-und a <sub>w</sub> -Wert-Entwicklung der Rohwurst-Erzeugnisse .....	141

## Inhaltsverzeichnis

---

A) Übersicht zur pH-Wert-Entwicklung der Mettwurst.....	141
B) Übersicht zur pH-Wert-Entwicklung der Teewurst.....	142
C) Übersicht zur pH-Wert-Entwicklung der Salami .....	143
D) Übersicht zur $a_w$ -Wert-Entwicklung der Salami .....	144
Literaturverzeichnis.....	145
Selbständigkeitserklärung .....	169
Danksagung .....	170

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Nachweishäufigkeit von <i>T. gondii</i> -Oozysten bei Katzen .....	17
Tabelle 2: Seroprävalenz von <i>T. gondii</i> beim Mensch in verschiedenen Ländern .....	21
Tabelle 3: Seroprävalenz von <i>T. gondii</i> bei Katzen .....	27
Tabelle 4: Seroprävalenz von <i>T. gondii</i> bei potentiellen Beutetieren von Katzen .....	28
Tabelle 5: Seroprävalenz von <i>T. gondii</i> bei Feliden exklusive Hauskatzen .....	29
Tabelle 6: Seroprävalenz von <i>T. gondii</i> bei Hunden .....	30
Tabelle 7: Seroprävalenz von <i>T. gondii</i> bei Caniden exklusive Hunde .....	32
Tabelle 8: Seroprävalenz von <i>T. gondii</i> beim Schwein .....	33
Tabelle 9: Seroprävalenz von <i>T. gondii</i> bei möglichen Beutetieren von Katzen und Schweinen.....	35
Tabelle 10: Seroprävalenz von <i>T. gondii</i> bei Zuchtsauen .....	37
Tabelle 11: Seroprävalenz von <i>T. gondii</i> bei Wildschweinen .....	38
Tabelle 12: Seroprävalenz von <i>T. gondii</i> bei Hauswiederkäuern .....	39
Tabelle 13: Seroprävalenz von <i>T. gondii</i> bei Wildwiederkäuern.....	42
Tabelle 14: Seroprävalenz von <i>T. gondii</i> bei domestizierten und wildlebenden Säugetieren .....	44
Tabelle 15: Seroprävalenz von <i>T. gondii</i> bei domestizierten und wildlebenden Vögeln .....	44
Tabelle 16: Ergebnisinterpretation der serologischen Diagnostik (mod. nach RKI, 2007b) .....	54
Tabelle 17: Allgemeine Laborausstattung.....	63
Tabelle 18: Material für die Etablierung der <i>T. gondii</i> <i>in vitro</i> -Kultur .....	64
Tabelle 19: Material für die Entwicklung und Durchführung der Real Time-PCR .....	65
Tabelle 20: Pipettierprotokoll für die Real Time-PCR unter Verwendung von SybrGreen® .....	67
Tabelle 21: Pipettierprotokoll für die Time-PCR unter Verwendung der TaqMan <sub>mgb</sub> <sup>®</sup> -Fluoreszenzsonde .....	68
Tabelle 22: Thermocycler-Konditionen der Real Time-PCR .....	68
Tabelle 23: Material für den Schweine-Infektionsversuch .....	73
Tabelle 24: Material für die Produktion der Rohwurst-Erzeugnisse .....	74
Tabelle 25: Übersicht über die im IFTN hergestellten Rohwurst-Chargen .....	75
Tabelle 26: Material für den Mäuse-Infektionsversuch .....	76
Tabelle 27: Übersicht über Inokulationsart und –datum der Mäuse-Versuchsgruppen sowie den Tötungszeitpunkt .....	78
Tabelle 28: Material für den Nachweis von <i>T. gondii</i> mittels Real Time-PCR .....	79
Tabelle 29: Beispielhafte Darstellung der Probenbezeichnung der Versuchsmäuse.....	81
Tabelle 30: Primer- und Sondensequenzen des B1-Gens .....	85
Tabelle 31: Primer -und Sondensequenzen des 529-bp-Fragmentes .....	85

## Tabellenverzeichnis

---

Tabelle 32: Real Time-PCR-Ergebnisse der <i>T. gondii</i> -Verdünnungsreihen 1-3 .....	90
Tabelle 33: Real Time PCR-Ergebnis bei dem 1. Einmischversuch .....	94
Tabelle 34: Real Time PCR-Ergebnis bei dem 2. Einmischversuch .....	94
Tabelle 35: Real Time-PCR-Ergebnis bei dem 3. Einmischversuch .....	94
Tabelle 36: Nachweisraten und relative Häufigkeiten bei den Einmischversuchen 1 - 3 .....	95
Tabelle 37: Gegenüberstellung der C <sub>T</sub> -Werte der Real Time-PCR mit und ohne kompetitive Interne Amplifikationskontrolle.....	95
Tabelle 38: Real Time-PCR-Ergebnisse bei Rohwurst-Erzeugnissen unter Berücksichtigung der Schlachttierkörper .....	101
Tabelle 39: Real Time-PCR-Ergebnisse der Rohwurst-Erzeugnisse in Abhängigkeit der Herstellungsverfahren .....	101
Tabelle 40: Real Time-PCR-Ergebnisse bei Rohwurst-Erzeugnissen in Abhängigkeit von der Rohwurst-Sorte .....	102
Tabelle 41: Anzahl positiv getesteter Mäuse in den Mäuse-Kontrollgruppen 1-4 .....	103
Tabelle 42: Real Time-PCR-Ergebnisse der 1. Untersuchung und der 1./2. Nachuntersuchungen der Gruppen 2-4.....	104
Tabelle 43: Real Time-PCR-Ergebnisse der 3. Nachuntersuchung der Gruppen 3 und 4.....	105
Tabelle 44: Real Time-PCR Ergebnisse der 1. Untersuchung und der 1. Nachuntersuchung der positiv getesteten Mäuse .....	105
Tabelle 45: Real Time-PCR Ergebnisse der 3. Nachuntersuchung der positiv getesteten Mäuse .....	106
Tabelle 46: Charakterisierung der Inokula bei positiven Versuchsmäusen .....	106

**Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Taxonomische Einordnung von *T. gondii* (ECKERT et al., 2005)..... 3

Abbildung 2: Infektionszyklus von *T. gondii* (mod. nach DUBEY, 1993 u. TENTER et al., 2000) ..... 11

Abbildung 3: Seroprävalenz von *T. gondii* bei Frauen im gebärfähigen Alter ..... 22

Abbildung 4: Entwicklung der Seroprävalenz von *T. gondii* während der letzten 10 Jahre ..... 22

Abbildung 5: Altersabhängigkeit der Seroprävalenz von *T. gondii* ..... 23

Abbildung 6: Abhängigkeit der Seroprävalenz von *T. gondii* von der Niederschlagsmenge ..... 24

Abbildung 7: Gemeldete Fälle konnataler Toxoplasmose ..... 26

Abbildung 8: Seroprävalenz von *T. gondii* bei Katzen in Abhängigkeit des Alters ..... 29

Abbildung 9: Abhängigkeit der Seroprävalenz von *T. gondii* von der Haltung bei Hunden ..... 31

Abbildung 10: Entwicklung der Seroprävalenz von *T. gondii* beim deutschen Mastschwein ..... 34

Abbildung 11: Seroprävalenz von *T. gondii* beim Schwein in Abhängigkeit des Alters ..... 36

Abbildung 12: Präventivmaßnahmen gegen *Toxoplasma*-Infektionen  
(mod. nach GROß et al., 2001; GROß, 2004) ..... 51

Abbildung 13: IFTN-spezifisiertes Arbeitsprotokoll zur Isolierung von *T. gondii*-DNA ..... 71

Abbildung 14: B1-Gen-basierte Real Time-PCR-Amplifikationssignale verschiedener *T. gondii*-  
Konzentrationen unter Verwendung von SybrGreen® ..... 86

Abbildung 15: B1-Gen-basierte Schmelzkurvenanalyse der *T. gondii*-DNA ..... 86

Abbildung 16: B1-Gen-basierte Real Time-PCR-Amplifikationssignale verschiedener *T. gondii*-  
Konzentrationen unter Verwendung von TaqMan® ..... 87

Abbildung 17: 529-bp-Fragment-basierte Real Time-PCR-Amplifikationssignale verschiedener  
*T. gondii*-Konzentrationen unter Verwendung von SybrGreen® ..... 88

Abbildung 18: 529-bp-Fragment-basierte Schmelzkurvenanalyse der *T. gondii*-DNA ..... 88

Abbildung 19: 529-bp-Fragment-basierte Real Time-PCR-Amplifikationssignale verschiedener  
*T. gondii*-DNA-Konzentrationen unter Verwendung von TaqMan® ..... 89

Abbildung 20: Real Time-PCR-Amplifikationssignale der 1. dekadischen Verdünnungsreihe zur  
Bestimmung der Sensitivität ..... 90

Abbildung 21: Standardkurve der 1. dekadischen Verdünnungsreihe zur Bestimmung der  
Sensitivität der Real Time-PCR ..... 91

Abbildung 22: Real Time-PCR-Amplifikationssignale der 2. dekadischen Verdünnungsreihe zur  
Bestimmung der Sensitivität ..... 91

Abbildung 23: Standardkurve der 2. dekadischen Verdünnungsreihe zur Bestimmung der  
Sensitivität der Real Time-PCR ..... 92

Abbildung 24: Real Time-PCR-Amplifikationssignale der 3. dekadischen Verdünnungsreihe zur  
Bestimmung der Sensitivität ..... 92

Abbildung 25: Standardkurve der 3. dekadischen Verdünnungsreihe zur Bestimmung der Sensitivität der Real Time-PCR .....	93
Abbildung 26: Real Time-PCR-Amplifikationssignale von <i>T. gondii</i> mit Anwendung der cIAC.....	96
Abbildung 27: Real Time-PCR-Amplifikationssignale ohne Anwendung der kompetitiven Internen Amplifikationskontrolle .....	96
Abbildung 28: Real Time-PCR mit kompetitiver Interner Amplifikationskontrolle bei einer stark positiven Probe .....	97
Abbildung 29: Real Time-PCR mit kompetitiver Interner Amplifikationskontrolle bei einer negativen Probe .....	97
Abbildung 30: Körpertemperaturverlauf der morgens durchgeführten Untersuchung über einen Zeitraum von 3 Wochen ab einem Tag vor der Infektion .....	98
Abbildung 31: Körpertemperaturverlauf der abends durchgeführten Untersuchung über einen Zeitraum von 3 Wochen ab einem Tag vor der Infektion .....	99

## Verzeichnis relevanter und häufig verwendeter Abkürzungen und Einheiten

%	Prozent
+	positiv, plus
-	negativ, minus
>	größer als
≥	größer oder gleich
<	kleiner als
≤	kleiner oder gleich
=	ist gleich
®	geschütztes Warenzeichen
§	Paragraph
°C	Grad Celsius
µg	<u>Mikrogramm</u>
µl	<u>Mikroliter</u>
µm	<u>Mikrometer</u>
Abs.	<u>Absatz</u>
AT	<u>Agglutination Test</u>
a <sub>w</sub>	<u>activity of water</u> (Wasseraktivität)
BLAST®	<u>Basic Local Alignment Search Tool</u>
bzw.	<u>beziehungsweise</u>
ca.	<u>circa</u>
ciAC	<u>competitive Internal Amplification Control</u> (Kompetitive Interne Amplifikationskontrolle)
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
C <sub>T</sub>	<u>Cycle Threshold</u>
DAT	<u>Direct Agglutination Test</u>
d.h.	<u>das heißt</u>
DIN	<u>Deutsches Institut für Normung</u> , Berlin
DNA	<u>Desoxyribonucleic acid</u>
EFSA	<u>European Food Safety Authority</u>
ELISA	<u>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</u>
et al.	<u>et alii</u>
etc.	<u>et cetera</u>
Fa.	<u>Firma</u>
g	<u>Gramm</u>
GmbH	<u>Gesellschaft mit beschränkter Haftung</u>
Hrsg.	<u>Herausgeber</u>
IAC	<u>Internal Amplification Control</u> (Interne Amplifikationskontrolle)
IFAT	<u>Indirect Fluorescence Antibody Test</u>
IfSG	<u>Infektionsschutzgesetz</u>
IFTN	<u>Institut Für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde</u>
IHA	<u>Indirect Haemagglutination Assay</u>
i. v.	<u>intravenös</u>

## Abkürzungsverzeichnis

---

IVK	Zeitpunkt des theoretischen <u>I</u> n- <u>V</u> erkehr-Bringens der Rohwürste
Kg	<u>K</u> ilogramm
LAT	<u>L</u> atex <u>A</u> gglutinations <u>T</u> est
LD	<u>L</u> etale <u>D</u> osis
MAT	<u>M</u> odified <u>A</u> gglutination <u>T</u> est
Mb	<u>M</u> ega <u>B</u> asen
min.	<u>M</u> inute
MPa	<u>M</u> ega <u>P</u> ascal
MHD	<u>M</u> indesthaltbarkeits <u>d</u> atum
ml	<u>M</u> illiliter
mm	<u>M</u> illimeter
NaCl	<u>N</u> atrium <u>ch</u> lorid
NR	<u>N</u> achweis <u>r</u> ate
Nr.	<u>N</u> ummer
PCR	<u>P</u> olymerase- <u>C</u> hain- <u>R</u> eaction
p. i.	<u>p</u> ost <u>i</u> nfectionem
r <sup>2</sup>	Bestimmtheitsmaß
ref.	<u>r</u> eferiert
RH	<u>R</u> elative <u>H</u> äufigkeit
RKI	<u>R</u> obert <u>K</u> och- <u>I</u> nstitut (Berlin)
RNA	<u>R</u> ibonucleic <u>A</u> cid
SFT	<u>S</u> abin- <u>F</u> eldmann- <u>T</u> est
Sw	<u>S</u> chwein
<i>T. gondii</i>	<u>T</u> oxoplasma <u>g</u> ondii
u. a.	<u>u</u> nter <u>a</u> nderem
UMELISA	<u>U</u> ltramicro- <u>E</u> nzyme- <u>L</u> inked- <u>I</u> mmunosorbent- <u>A</u> ssay
v. a.	<u>v</u> or <u>a</u> llem
z. B.	<u>z</u> um <u>B</u> eispiel
z. T.	<u>z</u> um <u>T</u> eil



## 1. Ausgangssituation und Fragestellung

*Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) ist ein obligat intrazellulärer protozoärer Parasit (SIBLEY et al., 1992; GUSTAFSSON et al., 1997; LIN, 1998; LEE et al., 2000; ASPINALL et al., 2002) aus der Klasse der Kokzidien (ECKERT et al., 2005). Die *T. gondii*-Infektion ist weit verbreitet und von großem sowohl wirtschaftlichem als auch gesundheitlichem Interesse (LIN, 1998). Die klinische Symptomatik der Erkrankung differenziert sich in eine prä- und postnatale Verlaufsform (GROß et al., 2001). Während die postnatale Infektion in aller Regel einen gutartigen Verlauf nimmt, kann die pränatale sowie die Infektion immunsupprimierter Patienten schwerwiegende Krankheitsbilder hervorrufen (DUBEY, 2004; GROß, 2004; KLUN et al., 2006). Aufgrund der geringen Zell- und Wirtsspezifität zählt die Toxoplasmose weltweit zu den häufigsten parasitär-bedingten Infektionen (GROß, 2004). Es ist anzunehmen, dass alle Warmblüter, sowohl Säuger, Vögel als auch Menschen für den Erreger empfänglich sind (ASPÖCK, 1994; LIN, 1998; TENTER et al., 1999). Schätzungen zufolge besitzt zwischen einem Drittel und der Hälfte der Weltbevölkerung Antikörper gegen diesen Parasiten (SIBLEY et al., 1992; ASPINALL et al., 2002; FEHLHABER, 2005; KIM und WEISS, 2008). Die Infektion kann über die Nahrung, diaplazentar oder durch zufälligen Kontakt (Gartenarbeit, Sandkasten, Katzentoilette) erfolgen. Neben mit Oozysten verunreinigten Lebensmitteln wie Obst, Gemüse und Trinkwasser spielen im Rahmen des alimentären Infektionsgeschehens insbesondere kontaminierte Schlachttierkörper eine zentrale Rolle (KAPPERUD et al., 1996; BOWIE et al., 1997; COOK et al., 2000; TENTER et al., 2000; GROß et al., 2001; TENTER und FEHLHABER, 2002; DUBEY, 2004; DUBEY et al., 2007a). Studien zur Seroprävalenz belegen, dass der Erreger unter den lebensmittelliefernden Tieren weit verbreitet ist, so dass mit dem Auftreten zystenhaltigen Fleisches in der Lebensmittelkette zu rechnen ist (SEINECKE, 1996; SROKA, 2001; CAVALCANTE et al., 2006; KLUN et al., 2006; LUDEWIG et al., 2007). Entsprechend wurden *T. gondii*-Zysten mehrfach in Fleisch und Fleischerzeugnissen nachgewiesen (GROßKLAUS et al., 1965; WARNEKULASURIYA et al., 1998; ASPINALL et al., 2002; FEHLHABER et al., 2003; SCHULZIG und FEHLHABER, 2006).

Da Fleisch bei der Rohwurst-Herstellung keinem Erhitzungsprozess oder anderen adäquaten Abtötungsmechanismen unterliegt, muss insbesondere bei diesen Erzeugnissen ein erhöhtes Infektionsrisiko in Betracht gezogen werden (TENTER und FEHLHABER, 2002), wobei im

Allgemeines zwischen lang- und kurzgereiften Produkten unterschieden wird. Während langgereifte Rohwurst-Erzeugnisse aufgrund früherer Untersuchungen gemeinhin als sicher angesehen werden, bedürfen vor allem kurzgereifte Produkte eingehenderer Betrachtung (SOMMER et al., 1965; TENTER und FEHLHABER, 2002; BfR, 2005; BfR, 2006).

Weiterhin nicht ausreichend geklärt ist das möglicherweise erhöhte Infektionspotential ökologischer Produkte (TENTER und FEHLHABER, 2002). Bei vergleichenden Untersuchungen von Mastschweinen wurden signifikant höhere Prävalenzen bei Tieren aus ökologisch bewirtschafteten Betrieben nachgewiesen, als bei konventioneller Haltung (LUDEWIG et al., 2007). Additiv sind der Verzicht von Nitritpökelsalz sowie häufig vorkommende Reifungsfehler im Rahmen des Herstellungsprozesses ökologischer Erzeugnisse zu beachten (SOMMER et al., 1965; TENTER und FEHLHABER, 2002; BfR, 2006). Entsprechend diesem von Rohwurst-Erzeugnissen ausgehenden, bislang nicht geklärten Gefährdungspotential, weist das Bundesinstitut für Risikobewertung in seiner Stellungnahme vom September 2005 auf die Notwendigkeit weiterer Forschung hin.

Diese Ausgangssituation war Ansatzpunkt für die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Untersuchungen zur Überlebensfähigkeit von *T. gondii* bei der Herstellung unterschiedlicher Rohwurst-Erzeugnisse unter Berücksichtigung verschiedener Produktionsverfahren. Durchgeführt wurden die Untersuchungen mithilfe einer im Rahmen des Projektes entwickelten Real Time-PCR.

## 2. Schrifttum

### 2.1 *Toxoplasma gondii*

#### 2.1.1 Taxonomie

*T. gondii* ist wie alle *Protozoen*<sup>1)</sup> ein einzelliger eukaryotischer Mikroorganismus. Innerhalb des Stammes der *Alveolata* ist er den *Apikomplexa* zugehörig. Dieser Unterstamm der *Alveolata* ist von besonderem parasitologischem Interesse, da angehörige Vertreter häufig als Parasiten von Evertebraten und Vertebraten in Erscheinung treten. So fallen neben *T. gondii* die Erreger der Coccidiose, Babesiose und Malaria ebenfalls unter die Apikomplexa. Als charakteristisches Merkmal besitzt der Parasit wie alle Apikomplexa den u. a. der Identifikation und Infektion neuer Wirtszellen dienenden Apikalkomplex.

Die weitergehende Taxonomie gliedert *T. gondii* in die Klasse der *Coccidia* und dort innerhalb der Ordnung der *Eimeriida* in die Familie der *Toxoplasmatidae* ein. Diese Familie umfasst die Gattungen *Toxoplasma*, *Hammondia*, *Neospora* und *Besnoitia*, von denen neben *Neospora* als Abortursache des Rindes vor allem die Gattung *Toxoplasma* als Zoonoseerreger eine bedeutende Rolle spielt. Diese Gattung umfasst lediglich die Art *gondii* (ECKERT et al., 2005).

Regnum	Eukaryota
Phylum	Alveolata
Subphylum	Apikomplexa
Classis	Coccidia
Ordo	Eimeriida
Familia	Toxoplasmatidae
Genus	<i>Toxoplasma</i>
Spezies	<i>gondii</i>

**Abbildung 1: Taxonomische Einordnung von *T. gondii* (ECKERT et al., 2005)**

<sup>1)</sup> Sammelbezeichnung für eine Gruppe sehr heterogener Stämme von Eukaryoten ohne phylogenetische Bedeutung (ECKERT et al., 2005)

## 2.1.2 Historischer Kontext

Die erste Beschreibung von *T. gondii* geht vermutlich auf das Jahr 1900 zurück. LAVERAN (1900) entdeckte in der Milz und im Knochenmark von Reisfinken einen Organismus, den er als *Haemoeba danilewskyi* bezeichnete, bei dem es sich aber vermutlich um *Toxoplasma* handelte.

Eine detailliertere Darstellung erfolgte acht Jahre später durch NICOLLE und MANCEAUX (1908). Die Wissenschaftler entdeckten den Erreger in Blut, Milz und Leber eines nordafrikanischen Nagetieres und benannten ihn zunächst zögernd als *Leishmania gondii*. Bereits ein Jahr später entschlossen sie sich, einen neuen Genus zu errichten, und führten aufgrund der Halbmondform (toxon = griechisch Bogen; plasma = griechisch Gebilde) das Genus „*Toxoplasma*“ ein; die Speziesbezeichnung „*gondii*“ erfolgte in Anlehnung an das Wirtstier (*Ctenodactylus gondii*) (NICOLLE und MANCEAUX, 1909). Unabhängig davon wurde das Protozoon fast zeitgleich aus einem an Paralyse verendeten Kaninchen in São Paulo, Brasilien (SPLENDORE, 1908) isoliert. Darauf folgten weitere Beschreibungen von *Toxoplasma*-Spezies aus vielen verschiedenen Tierarten (ASPÖCK, 1994).

Den ersten Fall kongenitaler Toxoplasmose diagnostizierte vermutlich der Ophthalmologe JANKU im Jahr 1923; er entdeckte Parasiten-Zysten in der Retina eines verstorbenen elf Monate alten Kleinkindes mit Hydrozephalus und Mikrophthalmus. Fünf Jahre später klassifizierte LEVADITI (1928) dieses Protozoon als *Toxoplasma*.

Dennoch blieb die Rolle des Parasiten als Humanpathogen weitgehend unbekannt, bis WOLF et al. (1939a, b) von einem Fall bestätigter humaner Toxoplasmose berichteten. Es gelang ihnen, Toxoplasmen im Tierversuch zu bestätigen, die sie zuvor bei Neugeborenen mit Enzephalomyelitis isoliert hatten.

Mit dem „Dye-Test“, der noch heute als „Goldener Standard“ für den Nachweis von *T. gondii* gilt, legten SABIN und FELDMANN 1948 einen entscheidenden Grundstein in der Toxoplasmose-Diagnostik. Durch die Anwendung des SABIN-FELDMANN-Tests offenbarte sich die weltweite Verbreitung der Erkrankung. Die Übertragungswege blieben dagegen weiterhin ungeklärt. Die diaplazentare Weitergabe der Infektion war ein zu seltenes Ereignis, um die weitläufige Verbreitung der Erkrankung hinreichend zu erklären (DUBEY, 1993). WEINMANN und CHANDLER stellten 1954 die Hypothese auf, dass unzureichend erhitztes Fleisch als Infektionsquelle in Frage kommt. Dies konnte 1965 durch DESMONTS et al. in einem Experiment bewiesen werden. Die Infektionsrate von Kindern in einem Tuberkulose-

Krankenhaus stieg von 10 % auf 100 %, nachdem ungenügend erhitztes Lammfleisch dem Speiseplan hinzugefügt worden war.

Dieser Übertragungsweg bot jedoch keine hinreichende Erklärung für die weite Verbreitung der Erkrankung auch unter Herbivoren und Vegetariern (DUBEY, 1993). Erst die Entdeckung von *T. gondii*-Zysten in Katzenkot im Jahre 1965 (HUTCHISON, 1965) lieferte den entscheidenden Hinweis auf die Bedeutung der Katze bzw. aller Feliden im Entwicklungszyklus des Parasiten. Die starke Verbreitung des Erregers über das Medium Katzenkot mit der damit verbundenen Möglichkeit der zufälligen Infektion (Reinigung von Katzentoiletten, Gartenarbeit, Spielen in Sandkästen) kann als Erklärung für die teilweise sehr hohen Seroprävalenzen angesehen werden (TENTER et al., 2000). Im Jahr 1970 konnte der Lebenszyklus von *T. gondii* fast zeitgleich durch mehrere voneinander unabhängige Forschungsgruppen endgültig aufgeklärt werden (DUBEY et al., 1970; DUBEY, 1993).

### 2.1.3 Morphologie

*T. gondii* ist ein obligat intrazellulärer Parasit (SIBLEY et al., 1992; GUSTAFSSON et al., 1997; LIN, 1998; LEE et al., 2000; BLACK und BOOTHROYD, 2000; ASPINALL et al., 2002), der in drei verschiedenen Stadien in Erscheinung tritt, welche alle sowohl für die End- als auch für die Zwischenwirte infektiös sind. Diese Stadien [Tachyzoiten, Bradyzoiten (Gewebiszyste) und Sporozoiten (Oozysten)] sind in einem komplexen Lebenszyklus miteinander verbunden (BOCH, 1980; DUBEY et al., 1998).

Ultrastrukturell beinhalten alle *T. gondii*-Stadien zahlreiche Organellen und Einschlusskörperchen, unterscheiden sich jedoch in Ausprägung und Anzahl dieser Zellbestandteile. Der Mikroorganismus besitzt keine sichtbaren Fortbewegungsorgane, kann jedoch durch Gleiten, Beugen, Undulieren und Rotieren manövrieren (DUBEY et al., 1998).

Als Angehörige der Apikomplexa besitzen Toxoplasmen einen Apikalkomplex, welcher eine wichtige Rolle im Rahmen des Infektionsgeschehens spielt (SEITZ, 1994; ECKERT, 2005). Als Bestandteil dieser Struktur ermöglicht das Konoid das Drehen, Vor- und Zurückweichen des Erregers beim Abtasten des Plasmalemmas kurz vor der Penetration (CHIAPPINO et al., 1984). Die Rhoptrien enthalten proteolytische Enzyme, die sie im Rahmen der Zellpenetration nach außen sekretieren (NICHOLS et al., 1983; SAFFER et al., 1992; DUBEY et al., 1998). Obwohl die Funktion des Konoids, der Rhoptrien, der Mikroporen (zytostomartige Strukturen: NICHOLS et al., 1983; CHIAPPINO et al., 1984), sowie der Mikronemen (rutenförmige Strukturen) noch nicht vollständig geklärt ist, wird vermutet, dass sie eine entscheidende Rolle für die Penetration neuer Wirtszellen sowie für die Schaffung eines parasitenfreundlichen Milieus im Zellinneren spielen (DUBEY et al., 1998).

Die Bezeichnung *Tachyzoit* geht auf FRENKEL (1973) zurück und bezieht sich auf die schnelle Vermehrung dieses Stadiums in allen Zellen der Zwischen- und in den nicht intestinalen Epithelzellen der Endwirte (tachos = griechisch schnell). Die halbmond- bis sichelförmigen Endozoiten bzw. Merozoiten besitzen einen spitzen cranialen und einen runden caudalen Pol (DUBEY et al., 1998). Mit einer Größe von durchschnittlich 2 x 6 µm (DUBEY et al., 1998) sind sie problemlos lichtmikroskopisch darstellbar. Die Penetration der Wirtszelle erfolgt entweder aktiv oder mittels Phagozytose (NICHOLS et al., 1983; DUBEY et al., 1998; BLACK und BOOTHROYD, 2000). Nach dem Eindringen nimmt der Erreger eine ovoide Gestalt an und ist von einer parasitären Vakuole umgeben. Die meist asynchrone Teilung der

Tachyzoiten führt zu einer zufälligen Anordnung innerhalb der Wirtszelle, eine rosettenartige Verteilung ist hingegen die Folge seltener synchroner Teilungsvorgänge (DUBEY et al., 1998). *Gewebssysteme* repräsentieren die endogene Dauerform des Parasiten und bestehen aus einer sehr widerstandsfähigen Zystenmembran und einer je nach Alter der Zysten stark variierenden Anzahl an Bradyzoiten (DUBEY et al., 1998). Die Bezeichnung *Bradyzoit* geht ebenfalls auf FRENKEL (1973) zurück und beschreibt die im Vergleich zu Tachyzoiten niedrigere Teilungsfrequenz (brady = griechisch langsam). Junge Zysten beinhalten teilweise nur zwei Bradyzoiten und besitzen einen Durchmesser von lediglich 5  $\mu\text{m}$ , wohingegen ältere hunderte Erreger enthalten können (DUBEY et al., 1998). Form und Größe der Gewebs-Zysten variieren zudem je nach Gewebeart der infizierten Wirtszelle. Während z. B. Gehirn-Zysten zumeist von spheroidaler Gestalt sind und selten Durchmesser von 70  $\mu\text{m}$  erreichen, sind Muskelzysten eher länglich orientiert und erreichen Größen um 100  $\mu\text{m}$  (DUBEY, 1993). Bradyzoiten zeigen Abmessungen von durchschnittlich 7 x 1,5  $\mu\text{m}$  (MEHLHORN und FRENKEL, 1980) und sind den Tachyzoiten bis auf wenige Unterschiede im morphologischen Erscheinungsbild sehr ähnlich (DUBEY et al., 1998).

Das dritte Stadium ist die exogenen Umwelteinflüssen gegenüber sehr resistente *Oozyste* (BOCH, 1980; TENTER et al., 2000). Unsporuliert erscheint sie kugelartig mit einem Durchmesser von ungefähr 10 x 12  $\mu\text{m}$ . Das Innere wird fast vollständig durch den Sporonten ausgefüllt. Nach der Sporulation in der Außenwelt, ca. 1 bis 5 Tage nach dem Ausscheiden durch den Endwirt, verändert sich die äußere Form der sporulierten Oozyste in Richtung einer Ellipse, der Durchmesser erreicht 11 x 13  $\mu\text{m}$ . Nach der Sporulation beinhaltet die Oozyste zwei ellipsenförmige Sporozysten (6 x 8  $\mu\text{m}$ ), die jeweils vier *Sporozoiten* mit einer Größe von 2 x 6 bis 8  $\mu\text{m}$  enthalten. Ultrastrukturell sind Sporozoiten den Tachyzoiten sehr ähnlich (DUBEY et al., 1998).

### 2.1.4      **Entwicklungszyklus**

Der Entwicklungszyklus von *T. gondii* ist fakultativ heteroxen. Hierbei kommt es lediglich im Darm von Feliden, von denen in unseren Breiten der Katze die größte epidemiologische Bedeutung zukommt, zu einer Entwicklung mit geschlechtlicher Differenzierung und Oozystenbildung. Die ungeschlechtliche Entwicklung ist hingegen vermutlich in Zellen der verschiedensten Organe fast sämtlicher warmblütiger Tiere inklusive des Menschen möglich (HEYDORN, 1979; SEITZ, 1994; TENTER und FEHLHABER, 2002).

Der Entwicklungszyklus von *T. gondii* ist sehr komplex und lässt sich in drei grundsätzliche Infektionszyklen unterteilen. Am längsten bekannt ist die Übertragung von Zwischenwirt zu Zwischenwirt über die Aufnahme von infiziertem Fleisch. Bereits 12 bis 24 Stunden nach dem Verzehr können die Parasiten in Mesenteriallymphknoten sowie einigen weiteren Organen nachgewiesen werden. Dort kommt es durch fortgesetzte Endodyogenie (besondere Form der Zweiteilung) über einen Zeitraum von bis zu drei Wochen zu einer intrazellulären Vermehrung des Parasiten (HEYDORN, 1979). Die aufgrund ihrer schnellen Teilungsfrequenz als Tachyzoiten bezeichneten Merozoiten werden hämatogen und lymphogen verbreitet und befallen auf diese Weise innerhalb weniger Tage verschiedenste Zelltypen und Organe (HEYDORN, 1979; TENTER et al., 2000; TENTER und FEHLHABER, 2002). Schon ab dem 3. Tag p. i., vermehrt jedoch erst ab dem 8. kommt es vermutlich aufgrund einer sich entwickelnden Immunität im Wirtstier zur Bildung von Zysten, die Bradyzoiten enthalten (HEYDORN, 1979; LINDSAY et al., 1997a). Diese endogene Dauerform des Parasiten kann Jahrzehnte, vermutlich sogar lebenslang, persistieren (GROß et al., 1996; LINDSAY et al., 1997a; TENTER et al., 2000). Auch innerhalb dieser sich in allen Organen entwickelnden Zysten erfolgt die Vermehrung durch Endodyogenie. Mit Ausbildung der Gewebszysten ist dieser unvollständige Entwicklungszyklus abgeschlossen (HEYDORN, 1979). Der vermutlich wichtigste Entwicklungszyklus ist mit der Entdeckung von Oozysten in Katzenkot bekannt geworden (HUTCHISON, 1965; HEYDORN, 1979). Die Verfütterung zystenhaltiger Organe eines Zwischenwirtes an Katzen führt in deren Dünndarmepithelien zu einer typischen Kokzidienentwicklung mit Schizogonie, Gamogonie und Oozystenbildung (HEYDORN, 1979). Nach einer Präpatenz von ca. drei bis fünf (10) Tagen kommt es über einen Zeitraum von ein bis zwei Wochen zur Ausscheidung unsporulierter Oozysten mit dem Kot (HEYDORN, 1979; LINDSEY et al., 1997a). Darüberhinaus findet aber auch im Endwirt, analog der im Zwischenwirt beschriebenen Entwicklung, eine extraintestinale



ungeschlechtliche Vermehrung mit Gewebszystenbildung statt (DUBEY, 1979; HEYDORN, 1979). Die ausgeschiedenen Oozysten sporulieren in der Außenwelt in Abhängigkeit der Temperatur innerhalb von ein bis vier Tagen (HEYDORN, 1979; BOCH, 1980). Die Aufnahme dieser sporulierten Oozysten durch einen potentiellen Zwischenwirt führt wiederum zur Produktion von Tachyzoiten, aus denen sich im Anschluss an eine durch massive Vermehrung gekennzeichnete Periode Gewebszysten in den verschiedenen Organen entwickeln (HEYDORN, 1979).

Der dritte Entwicklungszyklus läuft ohne Einschaltung eines Zwischenwirtes nur im Endwirt ab. Hierbei infizieren sich Angehörige der Feliden mit sporulierten Oozysten. Dies führt ähnlich der bei Zwischenwirten beschriebenen Situation zur Bildung von Tachyzoiten mit einer sich anschließenden generalisierten Infektion und Zystenbildung in den Organen. Erst ab dem 18. bis 20. Tag p. i. kommt es im Darm zur Kokzidienentwicklung mit Schizogonie, Gamogonie und Oozystenbildung. Demzufolge wird der Zwischenwirtzyklus in diesem Fall nicht übersprungen, sondern lediglich in den Endwirt verlagert. Das Auftreten von Oozysten im Kot ist bei diesem Zyklus frühestens ab dem 21. Tag nach der Infektion zu erwarten (HEYDORN, 1979).

### 2.1.5 Genetik

Das aus drei Komponenten bestehende Genom von *T. gondii* befindet sich im Nukleus, im Mitochondrium und im Apikoplasten. Das nukleäre Genom wird auf 87 Megabasen (Mb) geschätzt und ist in 11 Chromosomen organisiert, die mit den römischen Ziffern Ia, Ib, II bis X angegeben werden. Die Größe der Chromosomen variiert von ca. 1,8 bis über 10 Mb (AJIOKA, et. al., 2001). Die genetische Populationsstruktur von *T. gondii* wurde mithilfe von RFLP (Multilokus-Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus) -Analysen untersucht und die große Mehrheit (> 95 %) der Isolate in lediglich drei klonale Linien (Typ I, II, III) eingeteilt (HOWE und SIBLEY, 1995; HOWE et al., 1997). Bis vor kurzem wurde *T. gondii* dementsprechend als hoch klonal, mit einer nur sehr geringen genetischen Variabilität, angesehen. Demgegenüber weisen erst vor kurzem isolierte Stämme aus vielen Ländern bei mit Hilfe mit neuer Marker durchgeführten genetischen Charakterisierungen eine höhere genetische Variabilität als bisher angenommen auf (LEHMANN et al., 2006; DUBEY et al., 2007a). Geographisch scheinen in Europa und den USA die klonalen Linien I, II und III zu dominieren. Im Gegensatz dazu liegen in anderen Teilen der Welt, insbesondere in Südamerika und Afrika, Hinweise für das Vorherrschen atypischer Genotypen vor (PEYRON et al., 2006; RKI, 2007b; EFSA, 2007). Die Virulenz der drei klonalen Linien ist im Mausmodell gut untersucht worden und steht im Zusammenhang mit der Pathogenität bei Mäusen. Indes zeichnen sich Typ I-Toxoplasmen durch eine hohe Virulenz aus. Bereits ein lebensfähiger Organismus eines RH- oder eines genetisch ähnlichen Stammes hat eine LD<sub>100</sub> zur Folge (HOWE et al., 1996). Im Gegensatz dazu werden Typ II- (z.B. ME 49 Stamm) und Typ III- (z.B. CEP Stamm) Toxoplasmen als relativ avirulent angesehen (AJIOKA et al., 2001; VINEY, 2002). Entsprechend liegt die LD<sub>50</sub> nichtvirulenter Stämme bei  $\geq 10^2$  Parasiten (HOWE et al., 1996). Obwohl Stämme aller drei Linien beim Menschen isoliert wurden, scheint die Mehrheit der Toxoplasmose-Fälle (über 70 %) auf Typ II-Toxoplasmen zurückführbar zu sein (HOWE und SIBLEY, 1995; HOWE et al., 1997; AJZENBERG et al., 2002; RKI, 2007b; EFSA, 2007). Damit übereinstimmend wurden in einer Studie von HOWE et al. (1996) 81 % der untersuchten Infektionen durch Typ II-Toxoplasmen verursacht. Lediglich 10 % bzw. 9 % wurden durch Typ I- bzw. Typ III-Toxoplasmen hervorgerufen. Kongenitale und okuläre Infektionen sowie schwere Erkrankungen immunkompetenter Patienten sind hingegen vermutlich eher mit Typ I-Toxoplasmen assoziiert (HOWE und SIBLEY, 1995; FUENTES et al., 2001; CARME et al., 2002; SWITAJ et al., 2006).

## 2.2 Toxoplasmose

### 2.2.1 Risikofaktoren und Infektionsquellen

Vergleicht man die Inzidenzen pränataler Infektionen (0,47 bis 12/1000 Neugeborenen) mit den in Mitteleuropa vorherrschenden Seroprävalenzen gebärfähiger Frauen (37 % – 58 %), so wird ersichtlich, dass nur ein geringer Prozentsatz der humanen Toxoplasmosen auf eine vertikale Übertragung der Erkrankung zurückzuführen ist (DAR et al., 1997; PAUL et al., 2000; PAUL et al., 2001; TENTER et al., 2000; VELA-AMIEVA et al., 2005; EFSA, 2007). Dies wirft die Frage auf, welche Gegebenheiten zur horizontalen Infektion des Menschen führen, wobei zu berücksichtigen ist, dass nicht allen möglichen Infektionswegen eine bedeutende Rolle zukommt. Darüberhinaus besteht eine große Variation der Infektionsquellen und Risikofaktoren zwischen verschiedenen ethnischen Gruppen und geographischen Lokalisationen (TENTER et al., 2000; EFSA, 2007). Im Allgemeinen wird davon ausgegangen, dass die Majorität der horizontalen Infektionen des Menschen entweder durch die Aufnahme von mit Gewebssystemen infiziertem Fleisch, Fleischerzeugnissen bzw. Innereien oder durch die Ingestion von mit sporulierten Oozysten kontaminiertem Wasser und Lebensmitteln (Obst, Gemüse etc.) bzw. durch deren versehentliche Aufnahme aus der Umwelt (Gartenarbeit, Sandkasten), bedingt ist (KAPPERUD et al., 1996; COOK et al., 2000; TENTER et al., 2000; STUDENIČOVÁ et al., 2006; DUBEY et al., 2007a; EFSA, 2007).

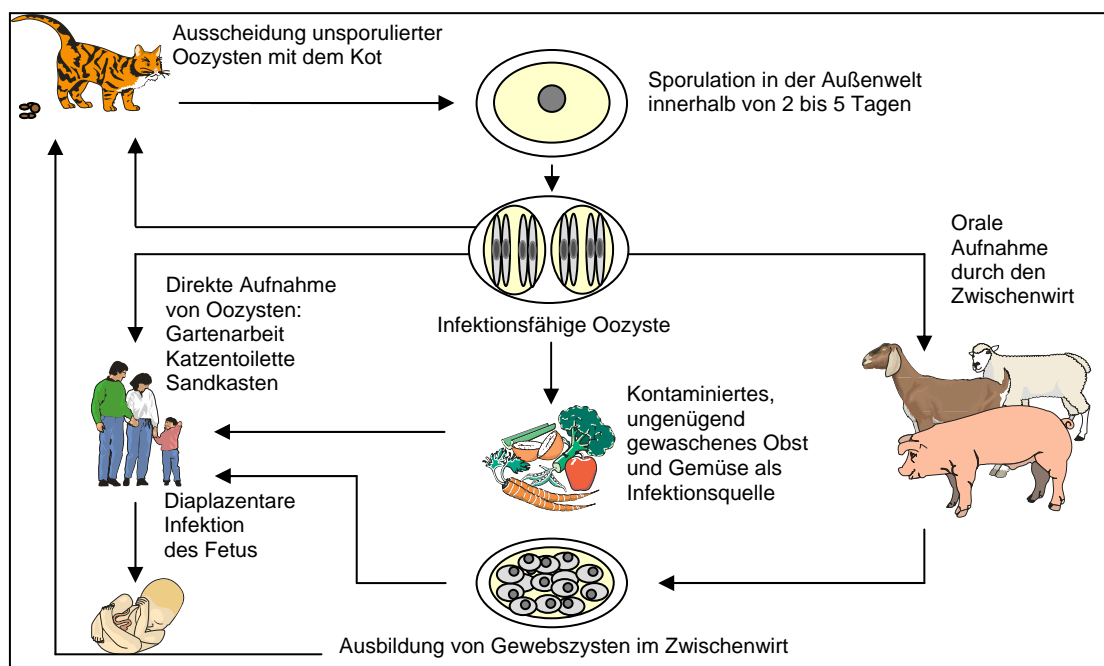


Abbildung 2: Infektionszyklus von *T. gondii* (mod. nach DUBEY, 1993 u. TENTER et al., 2000)

Im Folgenden werden die verschiedenen Risikofaktoren und Infektionsquellen (schematische Übersicht in *Abbildung 2*) unterteilt nach den *T. gondii*-Entwicklungsstadien [Tachyzoiten, Gewebszysten (Bradyzoiten), Oozysten (Sporozoiten)] besprochen.

### **2.2.1.1 Tachyzoiten**

Durch den möglichen Übertritt auf den Feten kommt Tachyzoiten im Rahmen der vertikalen Übertragung der Infektion die größte Bedeutung zu. Da sie außerhalb ihres Wirtes aufgrund der hohen Empfindlichkeit Umwelteinflüssen gegenüber schnell absterben, wird ihnen für den horizontalen Übertragungsweg epidemiologisch hingegen kein großer Stellenwert beigemessen. Nichtsdestotrotz treten Tachyzoiten-bedingte Infektionen hin und wieder auf (TENTER et al., 2000).

Beschrieben sind Toxoplasmose-induzierte Komplikationen bei Herz-, Nieren-, Leber- und Knochenmarkstransplantationen, wobei diese sowohl durch Tachyzoiten als auch durch Gewebszysten vermittelt werden können (MCGREGOR et al., 1984; BARCÁN et al., 2000; TENTER et al., 2000). Die Komplikationen können zum Einen bei *T. gondii*-negativen Empfängern positiver Organe und zum Anderen bei positiven immunsupprimierten Empfängern als Folge der Reaktivierung einer bestehenden latenten Infektion auftreten (HILL und DUBEY, 2002). Entsprechend kam es bei einer Untersuchung von MCGREGOR et al., (1984) bei drei von vier Herztransplantationen *T. gondii*-positiver Spender an negative Empfänger zu einer Krankheitsübertragung, wobei ein Patient an den Folgen der Infektion verstarb. In einem anderen Fall führte eine Lebertransplantation bei einer *T. gondii*-positiven Empfängerin zu einer Pneumonie im Rahmen einer reaktivierten Toxoplasmose (BARCÁN et al., 2000).

Über Blutprodukte ist eine Übertragung ebenfalls möglich (JANITSCHKE et al., 1974; TENTER et al., 2000; HILL und DUBEY, 2002). Im Hinblick auf die nur kurz andauernde Parasitämie im Anschluss an die Primärinfektion erscheint das mit einer normalen Bluttransfusion einhergehende Risiko jedoch gering (JANITSCHKE et al., 1974; TENTER et al., 2000).

Obwohl Toxoplasmen in der Milch verschiedener Zwischenwirte wie Schaf, Ziege und Rind nachgewiesen wurde, beschränken sich Berichte über durch diese Tiere verursachte akute Toxoplasmosen auf unpasteurisierte Ziegenmilch (SACKS et al., 1982; COOK et al., 2000; TENTER et al., 2000). Angesichts der hohen Empfindlichkeit von Tachyzoiten gegenüber

gastrischen Enzymen werden sie in der Regel durch die Verdauung im Magen abgetötet (TENTER et al., 2000). Eine mögliche Erklärung für die Übertragung der Tachyzoiten über unpasteurisierte Milch ist die Penetration mukosaler Gewebe, wodurch die Erreger vor Eintritt in den Magen in den Blutkreislauf sowie das lymphatische System gelangen könnten (DUBEY und FRENKEL, 1976; SUMYUEN et al., 1995; JOHNSON, 1997). Darüberhinaus scheinen Tachyzoiten bisweilen bis zu zwei Stunden in Pepsin-Lösungen überleben zu können (DUBEY, 1998b). Berücksichtigt man zudem, dass vollwertige Mahlzeiten bei Erwachsenen zu einer Erhöhung des pH-Wertes führen können und Kinder insgesamt eine niedrigere Konzentration proteolytischer Enzyme besitzen, kann nicht ausgeschlossen werden, dass einige postnatal erworbene Toxoplasmosen auf die Ingestion mit Tachyzoiten zurückzuführen sind (EFSA, 2007). Diese These wird durch Studien, die Milch als potentiellen Risikofaktor für eine *Toxoplasma*-Infektion postuliert haben, unterstützt (PAUL, 1998; COOK et al., 2000). Da ein gewisses Gefährdungspotential ausgehend von Milch folglich nicht ausgeschlossen werden kann, sollte diese, insbesondere die von der Ziege Stammende, vor dem Verzehr abgekocht bzw. pasteurisiert werden (TENTER et al., 2000). Eine weitere mögliche Infektionsquelle könnten Eier sein. Bei einer artifiziellen Infektion von 16 Hühnern wurde der Erreger bei einem von 327 gelegten Eiern nachgewiesen (JACOBS und MELTON, 1966). Allerdings gilt kommerziell gehaltenes Geflügel zum Einen faktisch als *Toxoplasma*-frei, zum Anderen sollte auch hier jede Art der Erhitzung zum Abtöten des Erregers führen (TENTER et al., 2000).

### 2.2.1.2 Gewebssystem (Bradyzoiten)

Die im Fleisch von Nutztieren enthaltenen Gewebssysteme stellen für den Menschen eine bedeutende (SOMMER et al., 1965; SEITZ, 1994; KAPPERUD et al., 1996; JANITSCHKE, 1999; TENTER et al., 2000; COOK et al., 2000; TENTER und FEHLHABER, 2002; LUNDÉN et al., 2002; STUDENIČOVÁ et al., 2006; SCHULZIG und FEHLHABER, 2006; LUDEWIG et al., 2007), vielleicht sogar die wichtigste Infektionsquelle dar (SEITZ, 1994). Da Gewebssysteme Verdauungsenzymen gegenüber resistenter sind als Tachyzoiten, führt die Aufnahme von Gewebssystemen bei einem nicht immunen Wirt in der Regel zu einer Infektion (DUBEY et al., 1998; TENTER et al., 2000).

Studien zur Seroprävalenz verdeutlichen, dass die Zoonose bei fleischliefernden Haus- und Wildtieren weit verbreitet ist (GAMBLE et al., 1999; FEHLHABER et al., 2003; GAUSS et al., 2005; SCHULZIG und FEHLHABER, 2005; CAVALCANTE et al., 2006; KLUN et al., 2006; LUDEWIG et al., 2007). Darüberhinaus haben Untersuchungen von rohem Fleisch dieses eindeutig als Infektionsquelle identifiziert (SOMMER et al., 1965; SCHULZIG und FEHLHABER, 2006), wobei in Deutschland, in Abhängigkeit von der Verzehrshäufigkeit, dem Schweinefleisch die größte Bedeutung zuzukommen scheint (LUDEWIG et al., 2007). Zudem wurden Toxoplasmen auch in Hackfleisch und „Hackepeterproben“ des Handels nachgewiesen (GROßKLAUS et al., 1965; FEHLHABER et al., 2003). Der Rohfleischverzehr kann somit als potentiell Infektionsrisiko angesehen werden (KAPPERUD et al., 1996; CHOI et al., 1997; COOK et al., 2000; STUDENIČOVÁ et al., 2006).

Fleisch und Fleischerzeugnisse werden für den menschlichen Genuss auf unterschiedlichste Art und Weise bearbeitet und zubereitet. Während manche Be- und Verarbeitungsweisen keinerlei Einfluss auf die Infektiosität von Toxoplasmen haben, sind einige Prozesse dazu geeignet, den Erreger abzutöten. Keinen Einfluss auf die Infektiosität von Gewebssystemen haben die im Rahmen der Fleischreifung stattfindende pH-Wert-Senkung sowie der Vorgang des Wolfens (SOMMER et al., 1965; GROßKLAUS und BAUMGARTEN, 1967). Erst die stärkere Zerkleinerung mithilfe einer Kolloidmühle führt zu einer Verringerung infektionstüchtiger Zysten (SOMMER et al., 1965). Als adäquate Methode zur Abtötung des Erregers haben sich Hochdruckbehandlungen ab 300 MPa erwiesen (LINDSAY et al., 2006).

Gegenstand intensiver Untersuchungen war der Einfluss verschiedener Temperaturbehandlungen. Hierbei hat sich herausgestellt, dass die reine Kühlung nicht geeignet ist, um Toxoplasmen unschädlich zu machen (GROßKLAUS und BAUMGARTEN, 1967). Werden die

Temperaturen jedoch unter den Gefrierpunkt abgesenkt, ist eine Abtötung möglich. In einer diesbezüglichen Studie von KOTULA et al. (1991) blieb die Infektiösität zwischen -1 und -3,9 °C für 22 Tage erhalten und reduzierte sich bei einer weiteren Absenkung der Temperatur auf -6,7 °C bereits auf ca. 11 Tage. Ab bzw. unter -12,2 °C waren schon bei kurzen Einwirkzeiten keine infektiösen Erreger mehr nachweisbar. Vereinzelt wird jedoch von Fällen berichtet, bei denen die Infektiösität auch bei Temperaturen von -12,2 °C bzw. darunter erhalten blieb (GROßKLAUS und BAUMGARTEN 1967; KOTULA et al., 1991).

Hitzeeinwirkung ist ebenfalls zur Abtötung von *T. gondii*-Zysten geeignet. Untersuchungen von DUBEY et al. (1990) ergaben, dass Toxoplasmen bei 52°C bis zu 24 min überleben können, ein weiterer Temperaturanstieg auf 64 °C erniedrigte die Überlebensdauer bereits auf drei Minuten und ab 67 °C wurden keine lebensfähigen Toxoplasmen mehr nachgewiesen. Die Erhitzung kann somit als effizientes Mittel zur Zysteninaktivierung angesehen werden. Die Verwendung von Mikrowellen scheint indes, vermutlich aufgrund der ungleichmäßigen Erwärmung des Fleisches, weniger verlässlich zu sein (LUNDÉN und UGGLA., 1992).

Der Effekt des Räucherns auf die Infektiösität der Zysten ist bislang wenig untersucht. Obwohl nach der Räucherung einer Hammelkeule für 24 h bis 48 h bei 50°C keine lebenden Toxoplasmen nachgewiesen wurden, ist die Effizienz dieses Verfahrens in Bezug auf die Abtötung der Zysten bei kurzzeitiger Heiß- bzw. Kalträucherung großvolumiger Würste sowie bei Flüssigrauchanwendung fraglich (LUNDÉN und UGGLA, 1992, TENTER und FEHLHABER, 2002).

Diesen Ausführungen ist zu entnehmen, dass Toxoplasmen im Rahmen der Lebensmittelgewinnung am sichersten durch Temperaturen < -13 °C bzw. > 67 °C inaktiviert werden können. Besonderes Augenmerk ist demnach unter anderem auf die Sicherheit von Rohwurst-Erzeugnissen zu richten, da im Herstellungsprozess dieser Produkte sicher schützende Präventivmaßnahmen, wie Erhitzungsschritte, fehlen. Bisherige Untersuchungen lassen bezüglich der Rohwurst-Produktsicherheit keinen endgültigen Schluss zu (BfR, 2006). In einem Versuch von SOMMER et al. (1965) wurden frisch produzierte, gewerbeübliche Salamiwürste (Kaliber 75 mm) mit einer langen Kanüle artifiziell mit *T. gondii*-Zysten versetzt. Im Anschluss wurden diese Erzeugnisse unter Anwendung der Kalt- bzw. Feuchträucherung sowie der Lufttrocknung gereift. Bereits nach zwei Tagen konnten, unabhängig vom angewendeten Herstellungsverfahren, in keiner der Würste

infektionsfähige Zysten nachgewiesen werden. TENTER und FEHLHABER (2002) schließen hierdurch auf die Unbedenklichkeit langgereifter Produkte, weisen aber auf ein verbleibendes Restrisiko bei nicht oder nur kurzgereiften Rohwurst-Erzeugnissen hin. Auch das BfR warnt vor einer möglichen Infektionsgefahr bei dem Verzehr von Tartar, Mett- und Teewürsten (BfR, 2006).

Ein weiterer Unsicherheitsfaktor sind Ökoprodukte. Der Lebenszyklus von *T. gondii* bedingt, dass Tiere aus ökologischer Haltung stärker mit Toxoplasmen belastet sind als Tiere aus herkömmlichen Betrieben. Entsprechend waren Schweinefleischproben ökologischer Herkunft mit 9 % signifikant häufiger *T. gondii*-positiv als Schweinefleisch konventioneller Herkunft (2,5 %) (SCHULZIG und FEHLHABER, 2006). Darüberhinaus kommen weitere Faktoren im Rahmen des Herstellungsprozesses ökologischer Produkte hinzu. Der Verzicht auf Nitritpökelsalz als Umrötungsmittel kann die Überlebenswahrscheinlichkeit von *T. gondii*-Zysten erhöhen. Untersuchungen von SOMMER et al. (1965) ergaben, dass das Nitrit im Pökelsalz einen wichtigen Beitrag zur Abtötungseffizienz von *T. gondii* beisteuert. Bei Verwendung reiner Kochsalzlösungen in steigenden Konzentrationen konnten selbst bei Verwendung 8 %-iger Lösungen noch nach vier Tagen infektionsfähige Zysten nachgewiesen werden. Nitrit-Pökellaken entsprechender Konzentrationen (acht Baumé-Grade) töteten den Erreger innerhalb eines Tages ab, hier ergab sich eine eindeutige Korrelation zwischen Konzentrationssteigerung und Abtötungseffekt (SOMMER et al., 1965).

Verschiedenste Untersuchungen von Bioprodukten zeigen zudem starke Qualitätsschwankungen, deren Ursache oft in technologischen Unzulänglichkeiten zu suchen ist (MÜLLER et al., 1994). Vorkommende Reifungsfehler sowie erhöhte  $a_w$ - und pH-Werte könnten ein längeres Überleben von *T. gondii*-Zysten begünstigen (TENTER und FEHLHABER, 2002).

Neben der thematisierten Infektionsmöglichkeit durch die orale Aufnahme von mit Zystenkontaminiertem Fleisch deuten die z. T. überdurchschnittlich hohen Seroprävalenzen von Fleischern, Schlachthofmitarbeitern und Personen, die ihre Haustiere mit rohem Fleisch füttern darauf hin, dass schon allein der Umgang mit rohem Fleisch als Infektionsquelle anzusehen ist (PRICE, 1969; RIEMANN et al., 1975; AMIN und MORSY, 1997; DIAS et al., 2005; GONCALVES et al., 2000).



### 2.2.1.3 Oozysten (Sporozoitien)

Da lediglich Feliden, in unseren Breiten insbesondere die Katze, den Erreger in Form von resistenten Oozysten in der Umwelt freisetzen, sind sie für die Verbreitung des Parasiten von entscheidender Bedeutung (Seitz, 1994; DUBEY, 1995; DUBEY et al., 2006; SHARIF et al., 2008). Die Ausscheidung von Oozysten nach einer Erstinfektion ist zwar auf einen relativ kurzen Zeitraum von zwei bis drei Wochen beschränkt; diese Zeitspanne genügt jedoch, um Millionen von Oozysten mit dem Kot freizusetzen (SEITZ, 1994; DUBEY, 1995; LAPPIN, 1999; DABRITZ et al., 2007). Nach einer einmal erfolgten Ausscheidung von Oozysten entwickeln Katzen im Allgemeinen eine Immunität, die eine erneute Freisetzung bei einem weiteren Kontakt mit dem Erreger verhindert (DUBEY, 1995; DAVIS und DUBEY, 1995). Wie lange diese Immunität anhält, ist noch nicht hinreichend geklärt (DUBEY, 1995). In einer auf dieser Fragestellung beruhenden Studie von DUBEY (1995) bestand bei fünf von fünf Katzen 39 Tage nach einer artifiziellen Erstinfektion bei einer Reinfektion eine stabile Immunität; sogar nach 77 Monaten wurden bei fünf von neun Tieren nach einer Reinfektion keine Oozysten im Kot nachgewiesen. Die kurze Ausscheidungsperiode im Leben einer Katze erklärt die in *Tabelle 1* dargestellten geringen prozentualen Oozysten-Nachweisraten zwischen 0 % und 2 %. Zur Beurteilung der Umweltbelastung sind deshalb serologische Erhebungen von entscheidender Bedeutung; insbesondere da eine positive Serologie indiziert, dass die Katze zu einem gegebenen Zeitpunkt Oozysten ausgeschieden hat (GAUSS et al., 2003; BRESCIANI et al., 2007). Auf der Basis der geschätzten Katzenkotmenge wurde die jährliche Belastung der Umgebung in einer Studie von DABRITZ et al. (2007) auf 94 bis 4.671 Oozysten/m<sup>2</sup> geschätzt.

**Tabelle 1: Nachweishäufigkeit von *T. gondii*-Oozysten bei Katzen**

Land	Prävalenz in %	n <sup>1</sup> /N <sup>2</sup>	Literatur	Datum
Brasilien	0	0/170	DUBEY et al.	2006
Brasilien	1,3	3/237	PENA et al.	2006
China	0	0/34	DUBEY et al.	2007
Deutschland	0	0/259	HECKING-VELTMAN et al.	2001
Deutschland	0,1	22/20317	SCHARES et al.	2008
Frankreich	0,2	2/858	SCHARES et al.	2008
Österreich	0,1	1/994	SCHARES et al.	2008
Spanien	0	0/382	MIRÓ et al.	2004
USA	1,8	5/274	DUBEY et al.	1995
USA	0,9	3/326	DABRITZ et al.	2007

<sup>1</sup>) Anzahl positiv

<sup>2</sup>) Anzahl untersucht

Die mit dem Kot der Feliden in die Außenwelt gelangenden Oozysten (SEITZ, 1994; LAPPIN, 1999) können zur Kontamination von Trinkwasser, Obst, Gemüse sowie der Umgebung führen und repräsentieren infolgedessen eine enorme Infektionsquelle (KAPPERUD et al., 1996; BOWIE et al., 1997; COOK et al., 2000; TENTER et al., 2000; BAHIA-OLIVEIRA et al., 2003, STUDENICOVÁ et al., 2006). Verunreinigtes Trinkwasser wurde in mehreren Studien als potentieller Risikofaktor beschrieben (BOWIE et al., 1997; ARAMINI et al., 1998; ARAMINI et al., 1999; BAHIA-OLIVEIRA et al., 2003; ERTUG et al., 2005). Im Rahmen eines großen Toxoplasmose-Ausbruches in Kanada im Jahr 1995 wurde in 100 Fällen eine akute *Toxoplasma*-Infektion nachgewiesen. Von den Betroffenen lebten 94 in der Gegend Greater Victoria; sechs weitere Personen gaben bei der Befragung einen Besuch dort an. Es konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Infektion und einem nahegelegenen Wasserreservoir hergestellt werden. Untersuchungen deuten darauf hin, dass sowohl domestizierte als auch Wildfeliden zu dieser Kontamination geführt haben. Die Autoren sehen in diesem Fall das mit Toxoplasmen verunreinigte und ungefilterte Trinkwasser als die wahrscheinlichste Infektionsquelle für den kommunalen Ausbruch (BOWIE et al., 1997; ARAMINI et al., 1998; ARAMINI et al., 1999). Gleichfalls durch Oozysten bedingt wird der Verzehr von mit Toxoplasmen kontaminiertem Obst und Gemüse in der Literatur ebenfalls als potentielle Infektionsquelle thematisiert (KAPPERUD et al., 1996; STUDENICOVÁ et al., 2006).

Ergebnisse einer europäischen Studie von COOK et al. (2000) deuten sogar darauf hin, dass neben der oralen Aufnahme zystenhaltiger Lebensmittel bereits der alleinige Kontakt zu kontaminiertem Erdboden als potentielles Infektionsrisiko anzusehen ist. Die Autoren führten 7 % bis 17 % der ermittelten Infektionen auf einen zufälligen Kontakt zurück (COOK et al., 2000), wie er z.B. bei der Gartenarbeit oder bei in Sandkisten spielenden Kindern zustande kommt (TENTER et al., 2000).

Der direkte Katzenkontakt wird hingegen im Allgemeinen nicht als Risikofaktor für eine Infektion angesehen (ANONYM, 1999; TENTER et al., 2000); die Untersuchungsergebnisse von Studien zur Seroprävalenz des Menschen differieren jedoch. Während BARBIER et al. (1983) und SUKTHANA et al. (2000) aufgrund ihrer Ergebnisse eine deutliche Verbindung zwischen einem regelmäßigem Kontakt zu Katzen und einem erhöhten Infektionsrisiko festgestellt haben, konnten andere Autoren einen derartigen Zusammenhang nicht herstellen (KAPPERUD et al., 1996; DAR et al., 1997; COOK et al., 2000; ERTUG et al., 2005).

Zu bedenken ist, dass von Katzen ausgeschiedene Oozysten zunächst unsporuliert und demzufolge nicht infektiös sind (HEYDORN, 1979; LINDSAY et al., 1997a; TENTER et al., 2000). Folglich führt der direkte Kontakt zu Katzen normalerweise nicht zu einer Infektion. Entsprechend bedeutet der Besitz von Katzen sowie die Haltung der Tiere im Haus nicht zwangsläufig ein Infektionsrisiko, insbesondere wenn entsprechende Präventivmaßnahmen (v. a. tägliche Entfernung des Kotes, Reinigung der Katzentoailette mit heißem Wasser und Reinigungsmitteln) eingehalten werden (TENTER et al., 2000). Gezielte Untersuchungen von DUBEY (1995) ergaben zudem, dass bei keiner von sieben Katzen Oozysten auf dem Fell gefunden wurden, obwohl sie eine Woche vorher Millionen von Oozysten ausgeschieden hatten.

Dessen ungeachtet ist die Angst vor einer durch Katzen vermittelten Infektion in der Bevölkerung weit verbreitet. Nicht selten wird schwangeren Frauen von ihrem Arzt geraten, im Haushalt befindliche Katzen abzugeben. Dieser Umstand war Anstoß für eine serologische Erhebung zur Seroprävalenzsituation bei im tiermedizinischen Sektor tätigen Personen. Die Untersuchung ergab, dass, trotz der kontinuierlichen Exposition dieser Menschen zu Katzen, lediglich 16,1 % Antikörper gegen den *T. gondii* besaßen. Die Autoren schließen daraus, dass der Kontakt zu Katzen die Gefahr für eine *Toxoplasma*-Infektion nicht erhöht (SHUHAIBER et al., 2003).

Andere Haustiere wie z. B. Meerschweinchen oder Vögel können zwar mit Toxoplasmen infiziert sein, da es bei diesen Tieren aber im Gegensatz zu Feliden zu keiner Ausscheidung infektiöser Stadien kommt, spielen sie für die Übertragung der Erkrankung keine Rolle (SEITZ, 1994). Eine Einschränkung gilt möglicherweise für den Hund. Der Nachweis von *T. gondii*-Oozysten in Hundekot deutet darauf hin, dass dieser ein Risiko für eine Infektion darstellen kann. Als Ursache sehen die Autoren die orale Aufnahme durch Koprophagie mit anschließender Darmpassage und Ausscheidung (SCHARES et al., 2005). Entsprechend ist davon auszugehen, dass Hunde durch die Aufnahme von Katzenkot bzw. über das Rollen in faul riechenden Substanzen als mechanische Transportwirte fungieren können (LINDSAY et al., 1997b; SEDLÁK und BÁRTOVÁ, 2006b). Darüberhinaus besteht eine Gefahr der Infektion in Ländern, in denen Hundefleisch verzehrt wird (JACKSON und HUTCHISON, 1989).

## **2.2.2 T. gondii-Seroprävalenz**

Die Etablierung des „Dye-Tests“ von SABIN und FELDMANN (1948) kann als Schlüsselereignis in Bezug auf einen Großteil des heute bekannten Wissens über die Toxoplasmose angesehen werden (DUBEY, 1993). Seine Verwendung ermöglichte erste Erhebungen zur humanen und animalen Seroprävalenzsituation und visualisierte die weltweite Verbreitung der Infektion mit teilweise sehr hohen Prävalenzen in vielen Regionen der Welt (DUBEY, 1993; ASPÖCK, 1994; TENTER et al., 2000).

### **2.2.2.1 Seroprävalenz postnataler Infektionen des Menschen**

Schätzungen zur Folge besitzen zwischen einem Drittel und der Hälfte der Weltbevölkerung Antikörper gegen *T. gondii* (SIBLEY et al., 1992; ASPINALL et al., 2002; FEHLHABER, 2005; KIM und WEISS, 2008). Es bestehen jedoch extreme Unterschiede, die zwischen 0 % und 100 % variieren können (JACKSON und HUTCHISON, 1989; TENTER et al., 2000). Bei dem Vergleich der Seroprävalenzdaten von *T. gondii* sollte berücksichtigt werden, dass die verschiedenen serologischen Nachweismethoden nicht standardisiert sind, unterschiedliche Untersuchungsperioden sowie variierende Probenanzahlen und differierende Definitionen positiver Ergebnisse vorliegen (JACKSON und HUTCHISON, 1989; TENTER et al., 2000; AZEVEDO et al., 2005). Darüberhinaus bestehen große Unterschiede zwischen der Infektionshäufigkeit verschiedener Länder, verschiedener geographischer Lokalisationen und ethnischer Gruppen. Ein Vergleich verschiedener Studien sollte deshalb immer vor dem Hintergrund vergleichbarer Voraussetzungen erfolgen (TENTER et al., 2000).

Für Deutschland wird die durchschnittliche Antikörperprävalenz auf 50 % der Bevölkerung geschätzt (RKI, 2007b). Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen der im Laufe der letzten 15 Jahre in Deutschland durchgeführten Studien, die eine Prävalenz von 41,6 % bzw. 59 % ermittelten (ROOS et al., 1993; FIEDLER et al., 1999). Eine exemplarische Zusammenstellung zur Seroprävalenz in verschiedenen Ländern ist *Tabelle 2* zu entnehmen.

**Tabelle 2: Seroprävalenz von *T. gondii* beim Mensch in verschiedenen Ländern**

Land	Prävalenz in %	Prävalenz n <sup>1</sup> /N <sup>2</sup>	Methode	Literatur	Datum
Belgien	67	1.232/1.839	MEIA <sup>3)</sup>	LUYASU et al.	1997
Brasilien	57	820/1.436	UMELISA <sup>4)</sup>	BAHIA-OLIVEIRA et al.	2003
China	7,9	1.159/14.577	IHA <sup>5)</sup>	WANG et al.	1989
China	9,8	245/2.499	IFAT <sup>6)</sup>	KO et al.	1980
Deutschland	41,6	874/2104	DAT <sup>7)</sup>	ROOS et al.	1993
Deutschland	59	2.864/4.854	ELISA <sup>8)</sup>	FIEDLER et al.	1999
Frankreich	60	1.943/3.238	IFAT	BARBIER et al.	1983
Indien	23.79	59/248	LAT <sup>9)</sup>	HALDAR et al.	1993
Indien	24,3	56.12/23.094	ELISA	DHUMNE et al.	2007
Indonesien	58	1.021/1.761	/ <sup>10)</sup>	KONISHI et al.	2000
Indonesien	70	1.185/1.693	ELISA	TERAZAWA et al.	2003
Iran	18,3	166/909	IFAT	ZADEH et al.	2003
Israel	9,96	748/7.506	SFT <sup>11)</sup>	NISHRI et al.	1978
Italien	48,5	9.425/19432	ELISA	VALCAVI et al.	1995
Korea	6,7	74/1.109	ELISA	LEE et al.	2000
Kroatien	36,4	533/1464	ELISA	TONKIĆ et al.	2002
Kuwait	95,5	235/246	IHA	BEHBEHANI et al.	1980
Slowakai	24,2	123/508	ELISA	STUDENICOVÁ et al.	2006
Schweiz	52,4	2.777/4300	/	JACQUIER et al.	1995
Tunesien	58,4	830/1.421	ELISA	BOURATBINE et al.	2001
Türkei	31,01	1522/4908	ELISA	KUK und OZDEN	2007

1) Anzahl positiv

2) Anzahl untersucht

3) Microparticle Enzyme Immunoassay

4) Ultramicro Enzyme Linked Immunosorbent Assay

5) Indirect Haemagglutination Assay

6) Indirect Fluorescence Antibody Test

7) Direct Agglutination Test

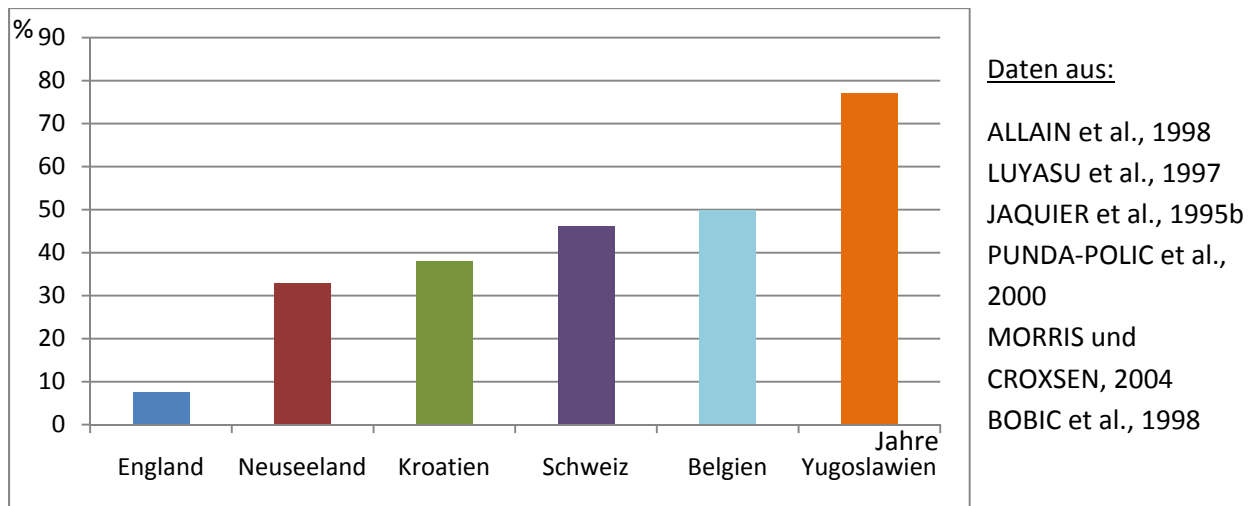
8) Enzyme Linked Immunosorbent Assay

9) Latex Agglutination Test

10) keine Angabe

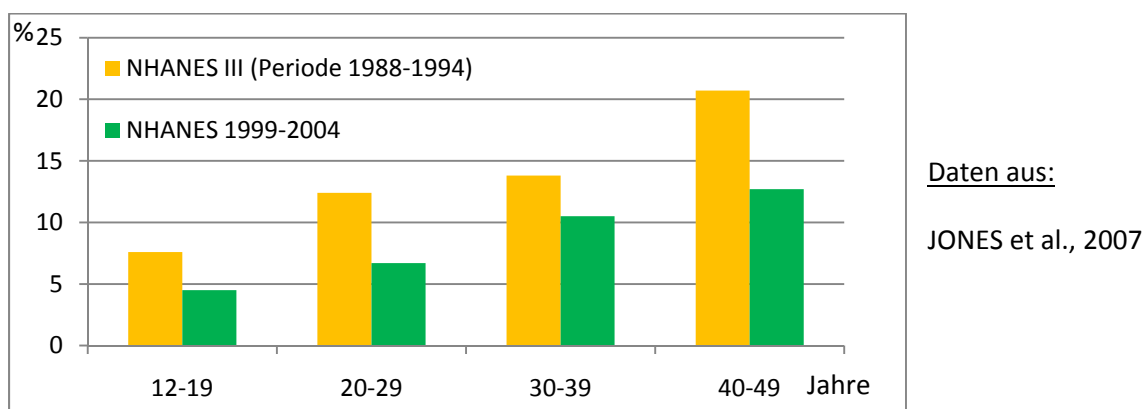
11) Sabin Feldmann Test

Durch die mögliche kongenitale Übertragung der Erkrankung wird die Antikörperprävalenz gebärfähiger Frauen oftmals gesondert erfasst. In den 1990er Jahren durchgeführte serologische Untersuchungen innerhalb dieser Personengruppe in Mitteleuropa ergaben Prävalenzen zwischen 37 % und 58 %. Ähnliche Ergebnisse ergaben Studien in Ländern mit entsprechenden Populationsstrukturen wie z. B. Australien (TENTER et al. 2000). Die in England (7,7 %) und Jugoslawien (77 %) ermittelten Prävalenzen zeigen jedoch, dass auch bei dieser Personengruppe eine große Schwankungsbreite vorhanden ist (ALLAIN et al., 1998; BOBIC et al., 1998). Einen graphischen Eindruck über die durchschnittliche Seroprävalenz bei Frauen im gebärfähigen Alter gibt *Abbildung 3*.



**Abbildung 3: Seroprävalenz von *T. gondii* bei Frauen im gebärfähigen Alter**

Um einen Überblick über die Entwicklung der Antikörperprävalenz über einen Zeitraum von zehn Jahren zu bekommen, untersuchten JONES et al. (2007) von der NCHS (National Center for Health Statistics) im Rahmen des NHANES 1999 – 2004 (National Health and Nutrition Examination Survey) gesammelte Seren auf *T. gondii*-Antikörper und verglichen die Daten mit den Ergebnissen der NHANES III (Untersuchungsperiode von 1988 bis 1994). Hierbei konnte in der Gruppe der 12- bis 49-Jährigen eine 36 %-ige Reduktion der *T. gondii*-Prävalenz von 14,1 % auf 9 % festgestellt werden (Abbildung 4). Inwieweit dieser Rückgang auf andere Länder übertragen werden kann, muss in weiteren Studien geklärt werden.

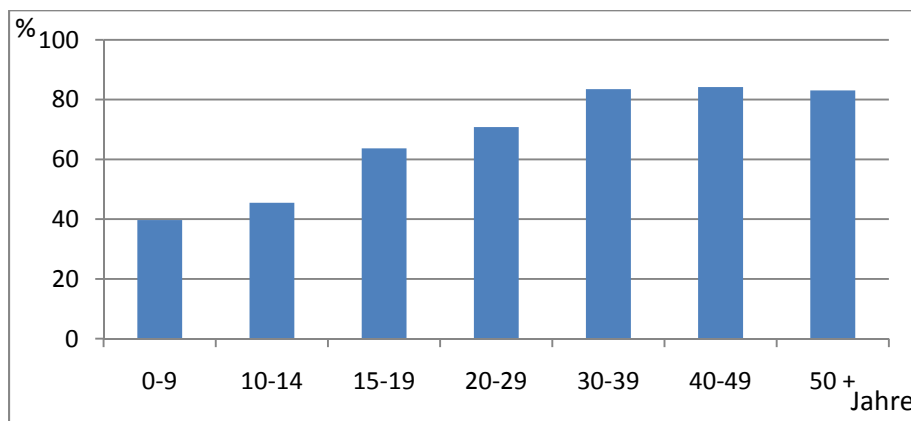


**Abbildung 4: Entwicklung der Seroprävalenz von *T. gondii* während der letzten 10 Jahre**

Entscheidenden Einfluss auf eine Infektion und damit auf die Antikörperprävalenz gegen *T. gondii* haben das Lebensalter, der Hygienestandard sowie die vorherrschenden Umweltbedingungen (BARBIER et al., 1983; BAHIA-OLIVEIRA et al., 2003; ZADEH et al., 2003; ERTUG et al., 2005; STUDENICOVÁ et al., 2006; JONES et al., 2007). Infolgedessen können die

Prävalenz-Erhebungen sowohl zwischen verschiedenen Ländern, zwischen verschiedenen Regionen eines Landes als auch zwischen verschiedenen ethnischen Gruppen einer Region sehr stark variieren (TENTER et al., 2000).

Die Altersabhängigkeit der Infektionshäufigkeit wird durch eine Studie von BAHIA-OLIVEIRA et al. (2003) verdeutlicht. In dieser Untersuchung liegt die Prävalenz bei den 0- bis 9-Jährigen noch bei 39,7 %, steigt bei den 20- bis 29-Jährigen bereits auf 70,8 % und erreicht bei den über 50-Jährigen 83,1 % (*Abbildung 5*). Diese signifikante Korrelation zwischen dem Alter und der Zunahme der Seroprävalenz ist auch bei anderen Autoren beschrieben (*Abbildung 4*) (RAZ et al., 1993; BOBIC et al., 1998; ZADEH et al., 2003; ERTUG et al., 2005; STUDENICOVÁ et al., 2006; JONES et al., 2007).

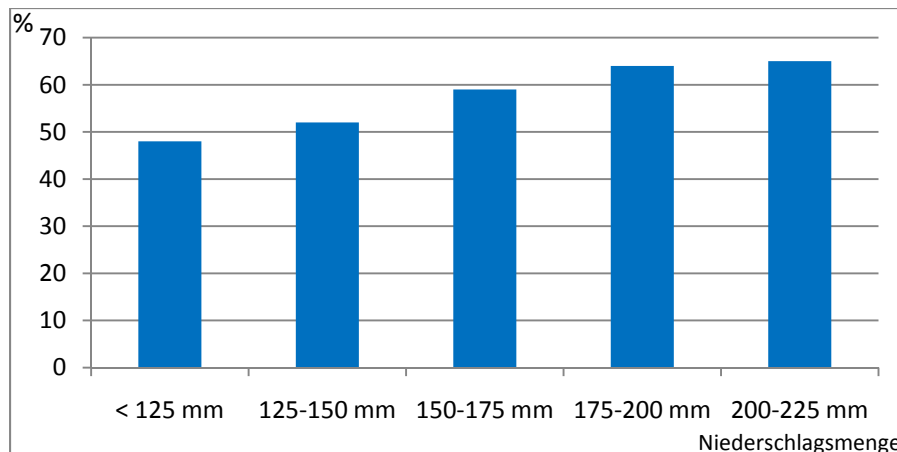


Daten aus:

BAHIA-OLIVEIRA  
et al., 2003

**Abbildung 5: Altersabhängigkeit der Seroprävalenz von *T. gondii***

BARBIER et al. (1983) untersuchten den Einfluss von Feuchtigkeit auf die Antikörperprävalenz. In dieser Studie wurde eine signifikant positive Korrelation zwischen der jährlichen Niederschlagsmenge und der *T. gondii*-Prävalenz festgestellt (*Abbildung 6*). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen DHUMNE et al. (2007) bei einer umfangreichen Studie zur Seroprävalenz der indischen Bevölkerung. Die ELISA-Untersuchung von 23.094 Menschen ergab eine Gesamtprävalenz von 24,3 %. Hierbei fanden sich die niedrigsten Prävalenzen in den nördlichen Regionen Indiens, die Höchsten in den Südlichen. Die Autoren vermuten als Ursache für diesen Unterschied die signifikant trockeneren Bedingungen mit einem damit verbundenen negativen Einfluss auf die Überlebensfähigkeit von *T. gondii*-Oozysten in den nördlicher gelegenen Gebieten.



Daten aus:

BARBIER et al., 1983

**Abbildung 6: Abhängigkeit der Seroprävalenz von *T. gondii* von der Niederschlagsmenge**

Wie sehr sich die Seroprävalenzen verschiedener ethnischer Gruppen innerhalb einer Region unterscheiden können, verdeutlicht eine Untersuchung der Infektionshäufigkeit in Israel. Während von den jüdischen Kibbutzmitgliedern durchschnittlich 22,5 % *T. gondii*-Antikörper besaßen, waren es in der arabischen Bevölkerung 55,8 %. Die Autoren führen den Unterschied zwischen diesen Gruppen auf unterschiedliche Ernährungsgewohnheiten, insbesondere auf den Verzehr von rohem Fleisch und unpasteurisierter Milch sowie anderer Milchprodukte zurück (RAZ et al., 1993).

Ebenfalls von Bedeutung ist die soziale Gesellschaftsstruktur bzw. der hygienische Status. BARBIER et al. (1983) fanden eine hochgradig negative Korrelation zwischen der Sauberkeit bzw. dem finanziellen Status und der *T. gondii*-Antikörper-Rate. Gleiches ergab eine Studie nördlich von Rio de Janeiro. Die untersuchte Population wurde nach dem Einkommen in drei sozioökonomische Gruppen aufgeteilt. Personen der ärmsten Gebiete (monatliches Einkommen < 150 US \$) wiesen mit 84 % deutlich höhere Infektionsraten auf, als Menschen mit mittlerem Einkommen (150-500 US \$). Hier lag die Prävalenz bei 62 %. Weitaus am geringsten verbreitet war die Infektion mit 23 % bei den gehobenen (> 500 US \$) Gehaltsklassen (BAHIA-OLIVEIRA et al., 2003).

Weniger aussagekräftig ist die Abhängigkeit von der Einwohnerdichte. Während BAHIA-OLIVEIRA et al. (2003) eindeutig höhere Prävalenzen bei der ländlichen (71,0 %) als bei der urbanen (49,9 %) Bevölkerung nachgewiesen haben, konnten andere Autoren keinerlei Zusammenhang herstellen (BARBIER et al., 1983; STUDENICOVA et al., 2006). BOURATBINE et al. (2001) hingegen fanden in der städtischen Bevölkerung signifikant höhere Prävalenzen. Ähnlich widersprüchlich verhält es sich mit der Abhängigkeit der Seroprävalenz vom Geschlecht. Während viele Studien der Geschlechtszugehörigkeit keine Bedeutung



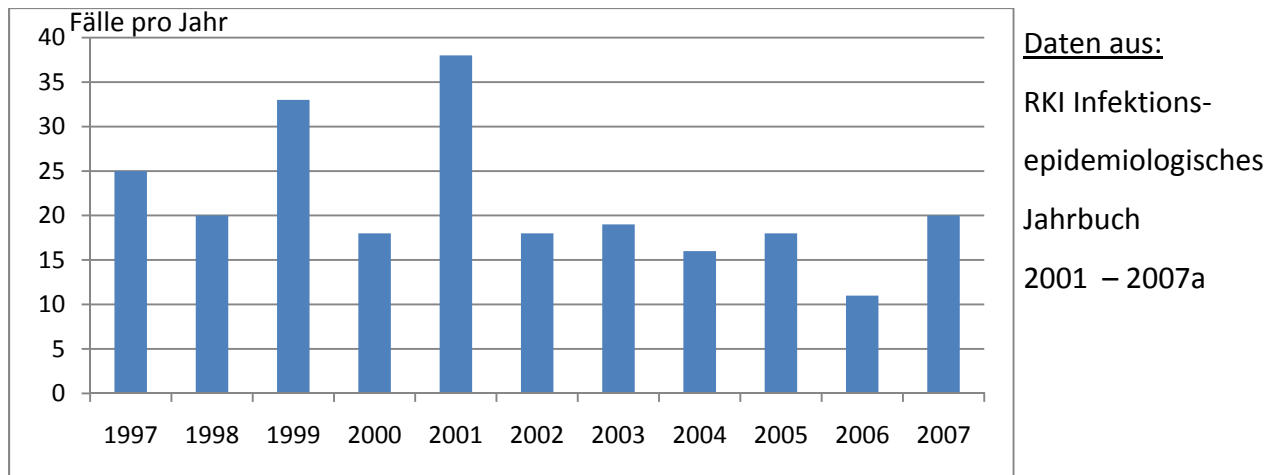
beimessen (KO et al., 1980; JACQUIER et al., 1995; LEE et al., 2000; ZADEH et al., 2003; TERAZAWA et al., 2003), fanden HALDAR et al. (1993) die Infektion häufiger bei Frauen, während KONISHI et al. (2000) eine höhere Seroprävalenz unter der männlichen Bevölkerung nachwies.

Als Fazit dieser Ausführungen bleibt festzuhalten, dass die *T. gondii*-Antikörperprävalenz starke Schwankungen aufweist und von vielen verschiedenen Faktoren abhängig ist.

### **2.2.2.2 Seroprävalenz pränataler Infektionen des Menschen**

Zu einer Übertragung der Erkrankung kommt es im Allgemeinen nur bei einer Erstinfektion der Mutter während der Schwangerschaft (DUBEY, 1993; FRIESE, 1994; GROß et al., 2001; EFSA, 2007; RKI, 2007b). Hierbei sind die Schwere der Erkrankung sowie die Wahrscheinlichkeit der Übertragung abhängig vom Graviditätsstadium der Schwangeren zum Zeitpunkt der Infektion. Während die Übertragungswahrscheinlichkeit mit zunehmender Progression der Gravidität zunimmt, sinkt die prozentuale Häufigkeit klinischer Manifestationen im Verlauf der Schwangerschaft ab (DUBEY, 1993; GROß et al., 2001; EFSA, 2007; RKI, 2007b). Schätzungen zufolge variiert die Wahrscheinlichkeit einer Übertragung im ersten Drittel der Schwangerschaft zwischen 4 % und 15 %, im letzten Drittel kommt es hingegen mit 60 %-iger Wahrscheinlichkeit zu einer Übertragung der Erkrankung (ANONYM, 1999). In einer Studie von DAR et al. (1997) kam es in 38,3 % der Schwangerschaften *Toxoplasma*-positiver Mütter zu einem Übertritt des Erregers über die Plazenta. Von den 301 untersuchten Babys wiesen 18 (12/1000) signifikante IgM Antikörperspiegel auf. In anderen Untersuchungen lag die Prävalenz der kongenitalen Toxoplasmose zwischen 0,47 und 1,9 von jeweils 1000 Neugeborenen (PAUL et al., 2000; PAUL et al., 2001; VELA-AMIEVA et al., 2005).

Die laut Infektionsschutzgesetz (§7 Abs. 2) vorzunehmende Meldung des Erregernachweises einer konnatalen Erkrankung verdeutlicht die Ernsthaftigkeit dieser Übertragungsform. Wie aus *Abbildung 7* ersichtlich, wurden in Deutschland im Zeitraum der letzten Dekade jährlich zwischen 11 und 38 Fälle an das Robert-Koch-Institut gemeldet.



**Abbildung 7: Gemeldete Fälle konnataler Toxoplasmose**

Da jedoch in der Regel lediglich die zum Geburtszeitpunkt klinisch bzw. serologisch auffälligen Fälle angezeigt werden, ist von einer erheblich höheren Dunkelziffer auszugehen (RKI, 2007b). Nach Schätzungen von JANITSCHKE et al. (1999) ist in Deutschland pro Jahr in etwa 1.540 Fällen mit Toxoplasmose bedingten mittelgradigen bis schweren Gesundheitsschädigungen bei Kindern bzw. mit Schädigungen im weiteren Alter zu rechnen.

### 2.2.2.3 Seroprävalenz bei Feliden, insbesondere der Katze

Der Infektionsnachweis bei Katzen kann sowohl serologisch als auch koproskopisch erfolgen. Zur Bestimmung des epidemiologischen Status von Katzen sind serologische Verfahren dem koproskopischen Oozysten-Nachweis überlegen, da zu einem gegebenen Zeitpunkt nur ca. 1 % der Tiere Oozysten mit dem Kot ausscheiden (DUBEY, 2004a). Aus diesem Grund wird im Folgenden nur auf den serologischen Status der Tiere eingegangen.

Ähnlich der Situation beim Menschen besteht eine erhebliche Variation bezüglich der Seroprävalenz von Katzen aus verschiedenen Ländern, aber auch innerhalb einzelner Länder. Allein in den in *Tabelle 3* dargestellten Studien schwankt der Infektionsnachweis zwischen 11 % (JITTAPALAPONG et al., 2007) und über 87 % (CAVALCANTE et al., 2006). Bei in Deutschland durchgeführten Untersuchungen zur Bestimmung der Antikörperprävalenz konnten bei 45 % bis 65 % der Katzen Antikörper gegen *T. gondii* nachgewiesen werden (TENTER et al., 1994; HECKING-VELTMANN et al., 2001).

**Tabelle 3: Seroprävalenz von *T. gondii* bei Katzen**

Land	Prävalenz in %	Prävalenz n <sup>1</sup> /N <sup>2</sup>	Methode	Autor	Datum
Bangladesch	33,3	8/24	LAT <sup>3)</sup>	SAMAD et al.	1997
Brasilien	26,3	132/502	MAT <sup>4)</sup>	SILVA et al.	2002
Brasilien	25	100/400	IFAT <sup>5)</sup>	BRESCIANI et al.	2007
Brasilien	84,4	49/58	MAT	DUBEY et al.	2004b
Brasilien	70,8	17/24	ELISA <sup>6)</sup>	GALVÁN RAMÍREZ et al.	1999
China	79,5	27/34	MAT	DUBEY et al.	2007b
Deutschland	65,6	170/259	ELISA	HECKING-VELTMANN et al.	2001
Deutschland	45	138/306	ELISA	TENTER et al.	1994
Iran, Sari	40	40/100	LAT	SHARIF et al.	2008
Kolumbien	45,2	77/170	MAT	DUBEY et al.	2006
Mexiko	21	22/105	MAT	ALVARADO-ESQUIVEL et al.	2007
Portugal	35,8	73/204	MAT	LOPES et al.	2008
Schweden	42	102/244	MAT	UGGLA et al.	1990
Spanien	32,3	189/585	IFAT	MIRÓ et al.	2004
Spanien	45	99/220	MAT	GAUSS et al.	2003
Tschechien	44,1	126/286	IFAT	SEDLÁK und BÁRTOVÁ	2006b
USA	50,6	89/176	/ <sup>7)</sup>	NUTTER et al.	2004
USA, Illinois	68,3	267/391	MAT	DUBEY et al.	1995
USA, Ohio	48	133/275	MAT	DUBEY et al.	2002
USA, Rhode Island	42	84/200	MAT	DEFEO et al.	2002
Westind. Inseln <sup>8)</sup>	35	14/40	ELISA	ASTHANA et al.	2006
Westind. Inseln <sup>9)</sup>	84,9	89/106	MAT	MOURA et al.	2007

<sup>1)</sup> Anzahl positiv    <sup>2)</sup> Anzahl untersucht

<sup>5)</sup> Indirect Fluorescence Antibody Test

<sup>7)</sup> keine Angabe    <sup>8)</sup> Grenada

<sup>3)</sup> Latex Agglutination Test    <sup>4)</sup> Modified Agglutination Test

<sup>6)</sup> Enzyme Linked Immunosorbent Assay

<sup>9)</sup> St. Kitts

Es ist davon auszugehen, dass sich Katzen hauptsächlich durch die Aufnahme von Gewebssystemen vor allem kleiner Säuger und Vögel infizieren (DAVIS und DUBEY, 1995). Bei einer Umgebungsuntersuchung von DUBEY et al. (1995) erwiesen sich alle einbezogenen Säugetierspezies (u.a. Hausmaus, Weißfußmaus, Ratte) als Reservoir für eine *T. gondii*-Infektion. Dementsprechend sind die in *Tabelle 4* dargestellten Seroprävalenzen potentieller Beutetiere von entscheidender Bedeutung für das Infektionsgeschehen der Katze.

**Tabelle 4: Seroprävalenz von *T. gondii* bei potentiellen Beutetieren von Katzen**

Tierart	Prävalenz in %	Prävalenz n <sup>1</sup> /N <sup>2</sup>	Methode	Land	Literatur	Datum
Hausmaus	2,1	26/1.243	MAT <sup>3)</sup>	USA, Illinois	DUBEY et al.	1995
Hausmaus	6,5	2/31	Real Time-PCR	Niederlande	KIJLSTRA et al.	2008
Hausspitzmaus	13,6	3/22	Real Time-PCR	Niederlande	KIJLSTRA et al.	2008
Hausratte	49,0	18/37	DA <sup>4)</sup>	Philippinen	SALIBAY et al.	2005
Südfeldmaus	0	0/361	DA	Spitzbergen	PRESTRUD et al.	2007
Ratte	6,3	6/95	MAT	USA, Illinois	DUBEY et al.	1995
Wanderratte	70,0	35/50	DA	Philippinen	SALIBAY et al.	2005
Wanderratte	10,3	4/39	Real Time-PCR	Niederlande	KIJLSTRA et al.	2008
Weißfußmaus	4,9	3/61	MAT <sup>5)</sup>	USA, Illinois	DUBEY et al.	1995

<sup>1)</sup> Anzahl positive

<sup>2)</sup> Anzahl untersucht

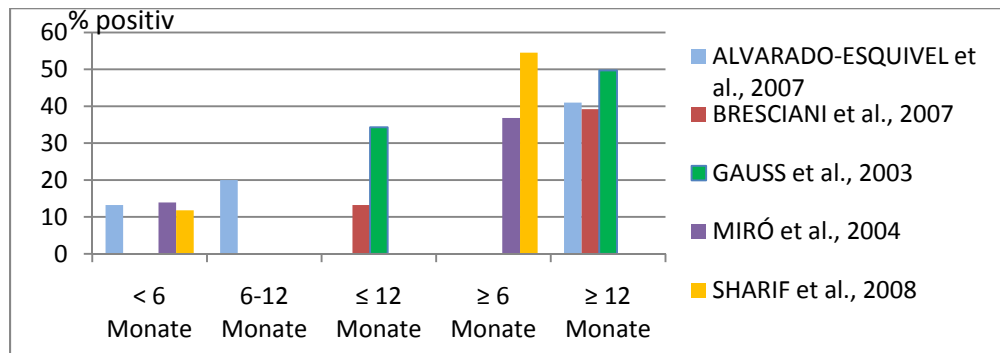
<sup>3)</sup> Modified Agglutination Test

<sup>4)</sup> Direct Agglutination

<sup>5)</sup> Modified Agglutination Test

Die Bewandnis infizierter Beutetiere verdeutlicht sich auch bei dem Vergleich der Auswirkungen unterschiedlicher Futterquellen. Katzen die sich von der Jagd und Abfällen ernährten waren deutlich häufiger positiv (30,0 %) als Tiere, die mit kommerziellem (20,9 %) oder selbst hergestelltem (19,7 %) Futter gefüttert wurden (ALVARADO-ESQUIVEL et al., 2007; LOPES et al., 2008). Dem entspricht, dass bedingt durch die Ernährungsweise bei Freigängern, Streunern und verwilderten Hauskatzen signifikant höhere Prävalenzen gefunden werden, als bei im Haus gehaltenen Katzen (DEFEO et al., 2002; GAUSS et al., 2003; MIRÓ et al., 2004; NUTTER et al., 2004; ALVARADO-ESQUIVEL et al., 2007). Darüberhinaus haben auch die Art des Freigangs und die Gruppengröße einen entscheidenden Einfluss auf die Infektionshäufigkeit. Die nachgewiesenen Prävalenzen waren signifikant höher bei Streunern als bei Hofkatzen und bei in Gruppen gehaltenen (mehr als fünf Tiere) [72/142 (50,7 %)] bzw. Katzen mit Katzenkontakt gegenüber allein lebenden [14/50 (28 %)] Katzen (GAUSS et al., 2003; MIRÓ et al., 2004; LOPES et al., 2008). Ähnlich den Verhältnissen beim Mensch besteht eine stark positive Korrelation zwischen dem Alter und der *T. gondii*-Seroprävalenz. In verschiedensten Untersuchungen konnte ein

entscheidender Unterschied zwischen unter 6 bzw. unter 12 Monate alten und über 6 bzw. 12 Monate alten Tieren festgestellt werden. (HECKING-VOLTMANN et al., 2001; GAUSS et al., 2003; MIRÓ et al., 2004; ALVARADO-ESQUIVEL et al., 2007; BRESCIANI et al., 2007; SHARIF et al., 2008; LOPES et al., 2008). In *Abbildung 8* ist dieser Zusammenhang illustriert.



**Abbildung 8: Seroprävalenz von *T. gondii* bei Katzen in Abhängigkeit des Alters**

Weniger eindeutig ist die Abhängigkeit der Infektionshäufigkeit vom Geschlecht der Tiere. Während einige Autoren diesem Faktor keine Bedeutung beimessen (DEFEO et al., 2002; ALVARADO-ESQUIVEL et al., 2007; BRESCIANI et al., 2007; LOPES et al., 2008), wiesen JITTAPALONG et al. (2007) und SHARIF et al. (2008) den Erreger häufiger bei männlichen, MIRÓ et al. (2004) hingegen öfter bei weiblichen Tieren nach.

Zum Abschluss dieses Kapitels soll *Tabelle 5* einen Überblick über die Seroprävalenz anderer Feliden vermitteln. Bei diesen Spezies scheint die durchschnittliche Infektionshäufigkeit noch höher zu liegen als bei Katzen; allerdings sind die zum Teil sehr kleinen Untersuchungspopulationen bei der Beurteilung zu berücksichtigen.

**Tabelle 5: Seroprävalenz von *T. gondii* bei Feliden exklusive Hauskatzen**

Tierart	Prävalenz in %	Prävalenz n <sup>1</sup> /N <sup>2</sup>	Methode	Land	Literatur	Datum
Bengalkatze	50	1/2	SFT <sup>3)</sup>	Thailand	BUDDHIRONGAWATR et al.	2006
Luchs <sup>4)</sup>	15	39/255	MAT <sup>5)</sup>	USA	ZARNKE et al.	2001
Luchs <sup>6)</sup>	81,5	22/27	MAT	Spanien	SOBRINO et al.	2007
Gepard	86,7	13/15	IFAT <sup>7)</sup>	Tschechien	SEDLÁK und BÁRTOVÁ	2006a
Rotluchs	83,3	5/6	MAT	USA	DUBEY et al.	2004b
Tiger	50	3/6	SFT	Thailand	BUDDHIRONGAWATR et al.	2006
Wildkatze	50	3/6	MAT	Spanien	SOBRINO et al.	2007
Löwe	48	24/50	MAT	Zimbabwe	HOVE und MUKARATIRWA	2005

<sup>1)</sup> Anzahl positiv

<sup>2)</sup> Anzahl untersucht

<sup>3)</sup> Sabin Feldmann Test

<sup>4)</sup> Eurasischer

<sup>5)</sup> Modified Agglutination Test

<sup>6)</sup> Iberischer

<sup>7)</sup> Indirect Fluorescence Antibody Test

### 2.2.2.4 Seroprävalenz bei Caniden, insbesondere dem Hund

Da der Hund ein weit verbreitetes Haustier ist, können Angaben zur Prävalenz dieser Tierart als Reflexion der Umweltkontamination angesehen werden und sind dementsprechend von großem Interesse (LIN, 1998; SEDLÁK und BÁRTOVÁ, 2006b). *Tabelle 6* gibt einen Überblick über die Verbreitung der Erkrankung bei Hunden in verschiedenen Ländern mit einer Variation in den dargestellten Studien von 2 % bis über 30 % (ASLANTAŞ et al., 2005; LANGONI et al., 2006). Bei einer in Deutschland durchgeführten Untersuchung lag die Antikörperprävalenz im Jahr 2001 bei 29 % der untersuchten Population (KLEIN und MÜLLER, 2001).

**Tabelle 6: Seroprävalenz von *T. gondii* bei Hunden**

Land	Prävalenz in %	Prävalenz n <sup>1</sup> /N <sup>2</sup>	Methode	Autor	Datum
Brasilien	33,1	258/780	IFAT <sup>3)</sup>	LANGONI et al.	2006
Brasilien	45,1	129/286	IFAT	AZEVEDO et al.	2005
Brasilien	30,3	112/369	ELISA <sup>4)</sup>	MINEO et al.	2004
Deutschland	29	58/200	IFAT	KLEIN und MÜLLER	2001
Österreich	26	63/242	IFAT	WANHA et al.	2005
Schweden	23	70/303	ELISA	UGGLA et al.	1990
Taiwan	7,9	52/658	ELISA	LIN	1998
Thailand	9,4	40/427	LAT <sup>5)</sup>	JITTAPALAPONG et al.	2007
Trinidad und Tobago	32	80/250	LAT	ALI et al.	2003
Tschechien	25,9	107/413	IFAT	SEDLÁK und BÁRTOVÁ	2006b
Türkei	2,6	3/116	MAT <sup>6)</sup>	ASLANTAŞ et al.	2005
USA	13,2	59/488	IFAT	AHMED et al.	1983
Vietnam	50	21/42	MAT	DUBEY et al.	2007a

<sup>1)</sup> Anzahl positive

<sup>2)</sup> Anzahl untersucht

<sup>3)</sup> Indirect Fluorescence Antibody Test

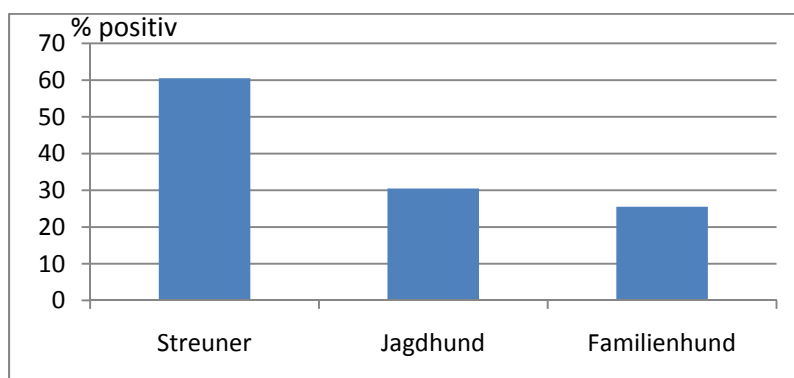
<sup>4)</sup> Enzyme Linked Immunosorbent Assay

<sup>5)</sup> Latex Agglutination Test

<sup>6)</sup> Modified Agglutination Test

Die bereits beim Menschen und ebenso bei der Katze thematisierte signifikant positive Korrelation zwischen der *T. gondii*-Antikörperprävalenz und dem zunehmendem Lebensalter ist auch für die Spezies Hund mehrfach wiedergegeben (LIN, 1998; AZEVEDO et al., 2005; LANGONI et al., 2006). Es existieren jedoch von dieser Sichtweise abweichende Ergebnisse. So beschreiben ALI et al. (2003) die höchste Prävalenz bei zwei- bis dreijährigen Tieren gegenüber unter zwei und über drei Jahre alten Hunden und AHMED et al. (1983) wiesen die Infektion insgesamt häufiger bei jüngeren (0-4 Jahre) als bei älteren (5-13 Jahre) Tieren nach. Ebenfalls Gegenstand mehrerer serologischer Erhebungen ist die unterschiedliche Infektionshäufigkeit bei Rassehunden bzw. im Haus gehaltenen Hunden im Gegensatz zu

Mischlingen bzw. streunenden Tieren. Während AZEVEDO et al. (2005) diesbezüglich keinen Zusammenhang herstellen konnten, ist eine signifikant höhere Prävalenz bei Mischlingen/Streunern mehrfach beschrieben (LIN, 1998; ALI et al., 2003; MINEO et al., 2004; LANGONI et al., 2006). Bei einer differenzierten Untersuchung der Prävalenzsituation verschiedener Hundegruppen wurde die höchste Prävalenz bei streunenden Hunden (60,5 %) gefunden. Wesentlich niedriger lag die Infektionsrate bei Jagdhunden (30,5 %), Haushunde waren nur zu 25,5 % seropositiv (*Abbildung 9*) (ALI et al., 2003). Mögliche Ursache für die höhere Prävalenz bei Streunern ist der vermutlich engere Kontakt dieser Gruppe zu Risikofaktoren wie Nagetieren und kontaminierten Katzenexkrementen. Bei Haushunden ebenfalls denkbar ist ein Zusammenhang mit dem ökonomischen Status der Eigentümer. Diesbezüglich ist davon auszugehen, dass Besitzer gehobener Gesellschaftsschichten ihrem Tier eine qualitativ und quantitativ bessere Futtermittellversorgung ermöglichen können, als Menschen mit niedrigerem sozialen Status, deren Hunde häufiger mit Essens- und Fleischabfällen gefüttert werden (MINEO et al., 2004). Diese These wird durch die Abhängigkeit der Prävalenz von der Beschaffenheit der Ernährung der Hunde untermauert. Bei ausschließlicher Fütterung kommerzieller Futtermittel lag die Prävalenz deutlich niedriger (17,2 %) als bei der Verfütterung selbst hergestellter Rationen (32,9 %) (ALI et al., 2003).



Daten aus:

ALI et al., 2007

**Abbildung 9: Abhängigkeit der Seroprävalenz von *T. gondii* von der Haltung bei Hunden**

Unsicher ist der Einfluss der Anwesenheit einer Katze im gleichen Haushalt. Während ALI et al. (2003) diesem Faktor keine Relevanz beimessen, stellten AZEVEDO et al. (2005) diesbezüglich eine positive Assoziation fest. Die Sexualität hingegen scheint keinen Einfluss auf die Infektionshäufigkeit der Hunde mit *T. gondii* zu haben (LIN et al., 1998; ALI et al.,

2003; ASLANTAŞ, et al., 2005; AZEVEDO et al., 2005; LANGONI et al., 2006; JITTAPALAPONG et al., 2007).

*Tabelle 7* soll einen abschließenden Überblick über die Verbreitung der Infektionsprävalenz bei anderen Caniden geben. Auch bei diesen Spezies besteht eine sehr hohe Variationsbreite, die bei den in *Tabelle 7* aufgeführten Studien von 9 % bis über 74 % reicht (ZARNKE et al., 2000; VITALIANO et al., 2004).

**Tabelle 7: Seroprävalenz von *T. gondii* bei Caniden exklusive Hunde**

Tierart	Prävalenz in %	Prävalenz n <sup>1</sup> /N <sup>2</sup>	Methode	Land	Literatur	Datum
Fuchs	35	34/94	IFAT <sup>3)</sup>	Österreich	WANHA et al.	2005
Mähnenwolf	74,6	44/59	ELISA <sup>4)</sup>	Brasilien	VITALIANO et al.	2004
Rotfuchs	64,7	66/102	MAT <sup>5)</sup>	Spanien	SOBRINO et al.	2007
Wolf	46,9	15/32	MAT	Spanien	SOBRINO et al.	2007
Rotfuchs	20	111/549	IFAT	UK	HAMILTON et al.	2005
Polarfuchs	43	255/594	DA <sup>6)</sup>	Spitzbergen	PRESTRUD et al.	2007
Wolf	9	11/125	MAT	ALASKA	ZARNKE et al.	2000

<sup>1)</sup> Anzahl positiv

<sup>2)</sup> Anzahl untersucht

<sup>3)</sup> Indirect Fluorescence Antibody Test

<sup>4)</sup> Enzyme Linked Immunosorbent Assay

<sup>5)</sup> Modified Agglutination Test

<sup>6)</sup> Direct Agglutination



### 2.2.2.5 Seroprävalenz bei Haus- und Wildschweinen

Infolge der möglichen Übertragbarkeit des Erregers über zystenhaltiges Gewebe von Schlachtschweinen ist die Einschätzung der Antikörperprävalenz von entscheidender Bedeutung für die Bewertung des vom Fleisch ausgehenden Risikos für den Verbraucher (FEHLHABER et al., 2003). Einen ersten Überblick über die Infektionshäufigkeit von *T. gondii* bei Schweinen gibt *Tabelle 8*.

**Tabelle 8: Seroprävalenz von *T. gondii* beim Schwein**

Land	Prävalenz in %	Prävalenz n <sup>1</sup> /N <sup>2</sup>	Methode	Literatur	Datum
Brasilien	43,7	35/80	IFAT <sup>3)</sup>	CAVALCANTE et al.	2006
Costa Rica	43,8	217/496	IFAT	ARIAS et al.	1994
Deutschland	98	488/500	SFT <sup>4)</sup>	BOCH et al.	1964
Deutschland	37	130/350	SFT	STOLL und KRAFT	1976
Deutschland	16,2	135/834	IHA <sup>5)</sup>	BOCH und NEUROHR	1982
Deutschland	0	0/60	ELISA <sup>6)</sup>	SEINECKE et al.	1996
Deutschland	19,8	188/948	ELISA	FEHLHABER et al.	2003
Deutschland	5,6	17/300	ELISA	SCHULZIG und FEHLHABER	2005
Deutschland	3,9	195/4961	ELISA	LUDEWIG et al.	2007
Ghana	39	250/641	ELISA	ARKO-MENSAH et al.	2000
Japan	9,1	19/208	/ <sup>7)</sup>	HORIO et al.	2001
Polen	15	18/120	DAT <sup>8)</sup>	SROKA et al.	2001
Schweden	3,3	23/695	ELISA	LUNDÉN et al.	2002
Serbien	28,9	175/605	MAT <sup>9)</sup>	KLUN et al.	2006
USA	2,3	97/4252	MAT	DUBEY et al.	1995
USA, New England	47,4	900/1897	MAT	GAMBLE et al.	1999
USA	3,1	59/1885	MAT	WEIGEL et al.	1995a
Zimbabwe	9,3	9/97	MAT	HOVE und DUBEY	1999

<sup>1)</sup> Anzahl positiv

<sup>4)</sup> Sabin Feldmann Test

<sup>7)</sup> keine Angabe

<sup>2)</sup> Anzahl untersucht

<sup>5)</sup> Indirect Haemagglutination Assay

<sup>8)</sup> Direct Agglutination Test

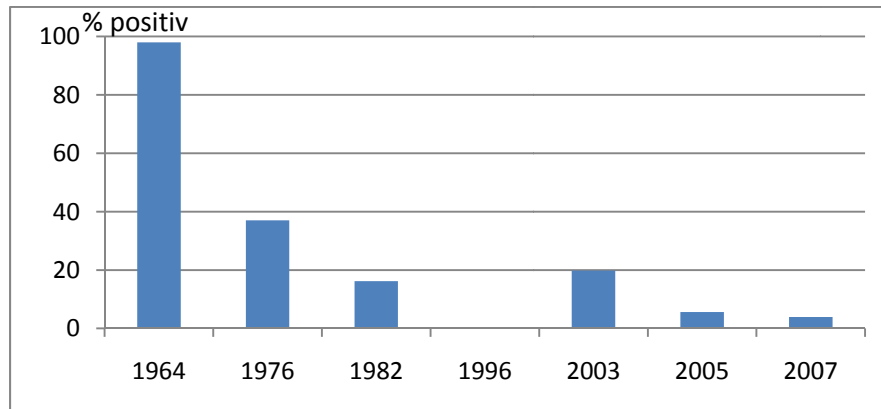
<sup>3)</sup> Indirect Fluorescence Antibody Test

<sup>6)</sup> Enzyme Linked Immunosorbent Assay

<sup>9)</sup> Modified Agglutination Test

Die Seroprävalenzsituation des Schweines unterlag in den letzten 50 Jahren einer enormen Veränderung (*Abbildung 10*). Während bei einer Untersuchung von BOCH et al. (1964) noch fast 98 % der Tiere Antikörper gegen *T. gondii* besaßen, sank diese Zahl 1976 bereits auf 37 % (STOLL und KRAFT, 1976) und bis 1982 weiter auf 16,2 % (BOCH und NEUROHR, 1982). Diese Entwicklung war vermutlich auf die verbesserte Hygiene und insbesondere auf die Aussperrung von Katzen aus den Mastbetrieben zurückzuführen (BOCH und NEUROHR, 1982). Im Einklang mit dieser Tendenz wies SEINECKE den Erreger 1996 bei keinem der im Rahmen seiner Studie untersuchten Mastschweine nach. Als Fazit neuerer Untersuchungen ist jedoch anzunehmen, dass die Toxoplasmose-Prävalenz in deutschen Schweinebeständen

wieder zunimmt (LUDEWIG et al., 2007). In den Jahren 2003 bis 2007 ermittelte Prävalenzen taxierten den Befall von Mastschweinen auf 3,9 %, 5,6 % bzw. 19,8 % (FEHLHABER et al., 2003; SCHULZIG und FEHLHABER, 2005; LUDEWIG et al., 2007).



Daten aus:

BOCH et al., 1964  
 STOLL et al., 1976  
 BOCH und  
 NEUROHR, 1982  
 SEINECKE et al., 1996  
 FEHLHABER et al., 2003  
 SCHULZIG und  
 FEHLHABER, 2005  
 LUDEWIG et al., 2007

**Abbildung 10: Entwicklung der Seroprävalenz von *T. gondii* beim deutschen Mastschwein**

Es wird vermutet, dass die Ursache der wieder ansteigenden Prävalenzen in der Schweinehaltung auf den in den vergangenen Jahren eingesetzten Trend zu „naturnahen“ bzw. „tierfreundlichen“ Haltungssystemen zurückzuführen ist (KIJLSTRA et al., 2004; LUDEWIG et al., 2007). Eine vor diesem Hintergrund durchgeführte serologische Untersuchung in acht ökologisch bewirtschafteten Mastschweinebeständen ergab eine durchschnittliche Prävalenz von 15,0 % mit einer sehr großen Variationsbreite von 0 % bis 30,6 % (FEHLHABER et al., 2003). Bei vergleichenden Untersuchungen von ökologisch bzw. konventionell gehaltenen Mastschweinen wurden signifikant höhere Prävalenzen bei Tieren aus ökologisch bewirtschafteten Betrieben (11,7 %) nachgewiesen, als bei konventioneller Haltung (3,8 %) (LUDEWIG et al., 2007). Analog bestand ein signifikanter Zusammenhang zwischen erhöhter Antikörperprävalenz und gewährtem Frei- bzw. Weidegang (SEINECKE, 1996; KLUN et al., 2000). Die Untersuchung von Schweinefleisch führte zu einem ähnlichen Ergebnis. Auch hier waren Schweinefleischproben ökologischer Herkunft mit 9 % signifikant häufiger mit Toxoplasmen belastet als konventionell (2,5 %) produziertes Schweinefleisch (SCHULZIG und FEHLHABER, 2006). Dementsprechend scheinen Tiere mit intensiverem Kontakt zur Außenwelt häufiger mit dem Erreger infiziert zu sein als Tiere, die in geschlossenen Systemen gehalten werden, wo Kontakt mit möglichen Infektionsquellen wie Katzen, Katzenkot und Schadnagern weitgehend vermieden werden kann (SEINECKE, 1996; FEHLHABER et al., 2003, SCHULZIG und FEHLHABER, 2006). KIJLSTRA et al. (2004) führen jedoch an, dass es indes viele tierfreundlich bewirtschaftete Betriebe gibt, die

*T. gondii*-freie Schweine aufziehen. Die Autoren sehen in der Kombination aus zu entwickelnden HACCP- (Hazard Analysis Critical Control Point) Konzepten und serologischer Überwachung bei der Schlachtung eine Möglichkeit für die Etablierung von Strategien zur Verhinderung von *T. gondii*-Infektionen bei Schweinen in tierfreundlichen Haltungssystemen.

In diesem Zusammenhang ist die Identifizierung von Quellen und Reservoiren für *T. gondii*-Infektionen von entscheidender Bedeutung. Bei einer unter dieser Prämisse durchgeführten Untersuchung von 47 Schweinefarmen inklusive deren Umgebung wurde der Erreger serologisch bei 68,3 % (267/391) der dort angetroffenen Katzen, sowie bei verschiedenen weiteren Tieren (Tabelle 9) nachgewiesen. Zusätzlich wurden im Mäuse-Bioassay Umgebungsuntersuchungen auf Oozysten durchgeführt, wobei in 1,8 % der untersuchten Katzenexkreme, in 1,3 % der Boden- sowie in 0,4 % der Futterproben Toxoplasmen nachgewiesen wurden. Als Ergebnis dieser Studie wurden Nagetiere, Futter sowie der Erdboden als mögliche Infektionsquellen für Schweine identifiziert (DUBEY et al., 1995).

**Tabelle 9: Seroprävalenz von *T. gondii* bei möglichen Beutetieren von Katzen und Schweinen**

Tierart	Prävalenz in %	Prävalenz n <sup>1</sup> /N <sup>2</sup>	Methode	Literatur
Hausmaus	2,1	26/1.243	MAT <sup>3</sup>	
Ratte	6,3	6/95	MAT	
Weißfußmaus	4,9	3/61	MAT	
Waschbär	67	126/188	MAT	Dubey et al., 1995
Stinktief	38,9	7/18	MAT	
Opposum	22,7	29/128	MAT	

<sup>1</sup>) Anzahl positiv

<sup>2</sup>) Anzahl untersucht

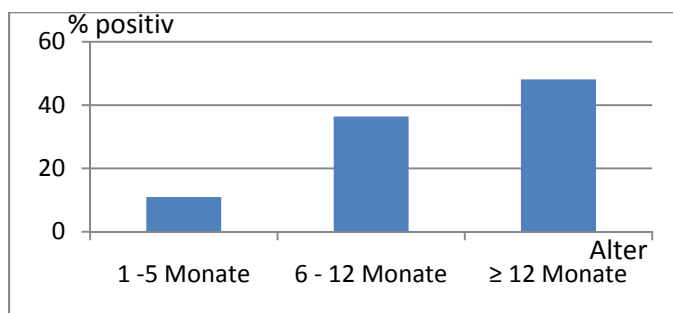
<sup>3</sup>) Modified Agglutination Test

Ein Anstieg der Antikörperprävalenz bei Schweinen durch die Anwesenheit von Nagern ist auch bei WEIGEL et al. (1995b) beschrieben und war Gegenstand einer Studie zur Ergründung der Rolle von Nagern bei der Übertragung von *T. gondii* auf die Tierart Schwein. Zu diesem Zweck wurde in drei Betrieben zu Beginn der Untersuchung ein serologisches Screening der Mastschweine durchgeführt. Daran schloss sich eine umfangreiche dreimonatige Nagerbekämpfung an. Als Ergebnis dieses Experimentes wurde in allen Betrieben eine Reduktion der Seropositivität erzielt und am Ende der Bekämpfungsperiode waren die Schweine in zwei der drei Betriebe *T. gondii*-frei. Auf Grundlage dieser Ergebnisse und unter Berücksichtigung der allgemein anerkannten Auffassung, dass junge Schweine begierig

versuchen, ein gesehenes Nagetier zu fangen und dieses in Anbetracht der ihnen eigenen Omnivorität zu verzehren (gilt ebenso für gefundene Kadaver), sehen die Verfasser Nager als ein bedeutendes Reservoir für eine direkte Übertragung der Erkrankung auf das Schwein (KIJLSTRA et al., 2008).

Kontrovers diskutiert wird hingegen die Rolle der Katze für das Infektionsgeschehen des Schweines. Während einige Autoren die Anwesenheit von Katzen in Betrieben nicht als Risikofaktor für *T. gondii*-Infektionen ansehen (SEINECKE, 1996; DAMRIYASA et al., 2004), sprechen Ergebnisse anderer Studien für einen Zusammenhang zwischen Katzen und erhöhten Antikörperprävalenzen bei Schweinen (BOCH und NEUROHR, 1982; WEIGEL et al., 1995b; DUBEY et al., 1995). Die Relevanz dieser Fragestellung wird durch die Feststellung von DAMRIYASA et al. (2004) verdeutlicht, wonach in 62 % der untersuchten Betriebe Katzen gehalten wurden und Zugang zu den Schweinestallungen hatten.

Vor diesem Hintergrund ist das Ergebnis einer vergleichenden Untersuchung der Antikörperprävalenz von Wildschweinen auf dem Festland von Georgia sowie der nahegelegenen Insel Ossabaw Island von Interesse. Tiere von der Insel waren mit 0,9 % signifikant seltener *T. gondii*-positiv als Wildschweine des Festlandes (18,2 %). Die Autoren führen die ausgesprochen niedrige Prävalenz von *T. gondii* auf Ossabaw Island auf die faktische Abwesenheit von Katzen auf der Insel zurück (DUBEY et al., 1997).



Daten aus:

ARCO-MENSAH et al., 2000

**Abbildung 11: Seroprävalenz von *T. gondii* beim Schwein in Abhängigkeit des Alters**

Als weiteren Einflussfaktor auf die Seroprävalenz des Schweines ist, analog der Situation bei Mensch, Hund und Katze, das Lebensalter zu nennen. Da auch bei Schweinen ein Anstieg der Seroprävalenz mit zunehmendem Alter zu beobachten ist (Abbildung 11) (SEINECKE, 1996; ARCO-MENSAH et al., 2000; DAMRIYASA et al., 2004; KLUN et al., 2006), sind die bei Zuchtsauen höheren Infektionsprävalenzen im Gegensatz zu Mastschweinen (BOCH und NEUROHR, 1982; DUBEY et al., 1991; DUBEY et al., 1995; SEINECKE, 1996; LUNDÉN et al.,

2002; LUDEWIG et al., 2007) erklärbar und auf die durch das höhere Alter der Zuchtsauen bedingte längere Exposition mit dem Erreger zurückzuführen. Additiv sind die besseren hygienischen Verhältnisse in Mastschweinebetrieben zu berücksichtigen (BOCH und NEUROHR, 1982).

In *Tabelle 10* ist eine exemplarische Auflistung der Seroprävalenz von Zuchtsauen zusammengestellt. Eine im Jahr 2007 durchgeführte Studie taxierte die *T. gondii*-Prävalenz deutscher Zuchtsauen auf 31,6 %. Die von FEHLHABER et al. (2003) ermittelten Prävalenzen für Zuchtsauen variierten je nach Haltungform zwischen 20 % bei Betrieben mit 100 bis 200 Tieren und 30 % bei Betrieben mit konzentrierter Haltung von 500 bis 1.000 Tieren. Von DAMRIYASA et al. (2004) und DAMRIYASA und BAUER (2005) durchgeführte Untersuchungen in Hessen und im Münsterland deuten hingegen eher auf eine negative Korrelation der Antikörperprävalenz zur Produktionsgröße hin. Als Ergebnis dieser Studien wurde der Erreger in 19 % der Tiere hessischer Betriebe nachgewiesen. Sauen in Betrieben aus dem Münsterland waren hingegen im Mittel nur zu 9 % *T. gondii*-positiv. Dies könnte nach Meinung der Autoren auf den höheren hygienischen Status der Großbetriebe im Münsterland gegenüber den überwiegend kleinen traditionellen Betrieben in Hessen zurückzuführen sein (DAMRIYASA et al., 2004; DAMRIYASA und BAUER, 2005).

**Tabelle 10: Seroprävalenz von *T. gondii* bei Zuchtsauen**

Land	Prävalenz in %	Prävalenz n <sup>1</sup> /N <sup>2</sup>	Methode	Autor	Datum
Deutschland	8	7/90	ELISA <sup>3)</sup>	SEINECKE	1996
Deutschland	29,8	17/57	ELISA	FEHLHABER et al.	2003
Deutschland	18,5	377/2041	ELISA	DAMRIYASA et al.	2004
Deutschland	9,3	140/1500	ELISA	DAMRIYASA und BAUER	2005
Deutschland	31,6	12/38	ELISA	LUDEWIG et al.	2007
Schweden	17,3	19/110	ELISA	LUNDÉN et al.	2002
USA	15,1	395/2617	MAT <sup>4)</sup>	DUBEY et al.	1995
USA	20,8	1.057/5.080	MAT	WEIGEL et al.	1995a

<sup>1)</sup> Anzahl positiv

<sup>2)</sup> Anzahl untersucht

<sup>3)</sup> Enzyme Linked Immunosorbent Assay

<sup>4)</sup> Modified Agglutination Test

Bei Zuchtbetrieben scheint darüberhinaus eine positive Korrelation zwischen der Prävalenz und dem Vorliegen von Reproduktionsstörungen zu bestehen (SEINECKE, 1996; DAMRIYASA et al., 2004). Diese Tatsache könnte von klinischem und ökonomischem Interesse für Züchter sein und sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen werden (DAMRIYASA et al., 2004).

## Wildschwein

Die Kenntnis über die Verbreitung der Toxoplasmose bei Wildschweinen ist in zweierlei Hinsicht von Nutzen. Zum Einen geht auch von rohem oder unzureichend erhitztem Fleisch dieser Tiere, wenn auch bedingt durch den geringeren Marktanteil in kleinerem Umfang als bei Mastschweinen, eine Verbrauchergefährdung aus, zum Anderen kann die Prävalenz dieser Tiere aufgrund ihrer omnivoren Ernährungsweise als Indikator für die Umweltkontamination dienen (NOGAMI et al., 1999; GAUSS et al., 2005). *Tabelle 11* vermittelt einen kurzen Überblick über die Seroprävalenzsituation von *T. gondii* bei Wildschweinen.

**Tabelle 11: Seroprävalenz von *T. gondii* bei Wildschweinen**

Land	Prävalenz in %	Prävalenz n <sup>1</sup> /N <sup>2</sup>	Methode	Autor	Datum
Deutschland	33,3	18/54	SFT <sup>3)</sup>	ROMMEL et al.	1967
Deutschland	25	32/130	IFAT <sup>4)</sup>	LUTZ	1997
Japan, Iriomote Island	5,6	6/108	LAT <sup>5)</sup>	NOGAMI et al.	1999
Japan, Shikoku	0	0/115	LAT/ELISA <sup>6)</sup>	YOSHITAKA et al.	2005
Spanien	38,4	185/507	MAT <sup>7)</sup>	GAUSS et al.	2005
Spanien	36,3	33/92	MAT	RUIZ-FONS et al.	2006
Tschechien	26,2	148/565	IFAT	BÁRTOVÁ et al.	2006
USA, Ossabaw Island, Georgia	0,9	11/1264	MAT	DUBEY et al.	1997
USA, Georgia	18,2	31/170	MAT	DUBEY et al.	1997

<sup>1)</sup> Anzahl positiv

<sup>2)</sup> Anzahl untersucht

<sup>3)</sup> Sabin Feldmann Test

<sup>4)</sup> Indirect Fluorescence Antibody Test

<sup>5)</sup> Latex Agglutination Test

<sup>6)</sup> Enzyme Linked Immunosorbent Assay

<sup>7)</sup> Modified Agglutination Test

Analog zu dem bei anderen Spezies beschriebenen Sachverhalt besteht auch bei Wildschweinen eine relativ große Variationsbreite bezüglich der Seroprävalenz. Bereits bei der in Tabelle 11 dargestellten Auswahl von Studien zur Infektionshäufigkeit des Erregers schwankt die Antikörperprävalenz von 0 % bis fast 40 %.

### 2.2.2.6 Seroprävalenz bei Haus- und Wildwiederkäuern

Bei den Hauswiederkäuern liegen die ermittelten Seroprävalenzen von Schafen und Ziegen in der Regel wesentlich höher als die beim Rind nachgewiesenen Infektionsraten (HASHEMI-FESHARKI, 1996; PITA GONDIM et al., 1999; GHAZAEI, 2005; HAMZAVI et al., 2007). Mögliche Ursachen für die niedrigere Antikörperprävalenz von Rindern ist einerseits eine geringere Empfindlichkeit dieser Spezies gegenüber dem Erreger, andererseits können auch unterschiedliche Haltungsbedingungen Ursache für diesen Umstand sein (PITA GONDIM et al., 1999; GHAZAEI, 2005; HAMZAVI et al., 2007). Einen Eindruck über die globale Seroprävalenzsituation der drei genannten Wiederkäuerarten liefert *Tabelle 12*.

**Tabelle 12: Seroprävalenz von *T. gondii* bei Hauswiederkäuern**

Tierart	Prävalenz in %	Prävalenz n <sup>1</sup> /N <sup>2</sup>	Methode	Land	Autor	Datum
Schaf	55,2	174/315	IFAT <sup>3)</sup>	Deutschland	BOCH et al.	1979
Schaf	33	370/1122	ELISA <sup>4)</sup>	Deutschland	SEINECKE	1996
Schaf	18,8	45/240	LAT <sup>5)</sup>	Brasilien	PITA GONDIM et al.	1999
Schaf	24,5	811/3.311	LAT	Iran	HASHEMI-FESHARKI	1996
Schaf	56	65/116	ELISA	Äthiopien	NEGASH et al.	2004
Schaf	90	9/10	DAT <sup>6)</sup>	Polen	SROKA et al.	2001
Schaf	84,5	432/511	MAT <sup>7)</sup>	Serbien	KLUN et al.	2006
Schaf	33,2	243/732	ELISA	Ghana	PUIJE, VAN DER et al.	2000
Schaf	30	60/200	ELISA	Iran	GHAZAEI et al.	2005
Schaf	7	22/319	MAT	Alaska (USA)	ZARNKE et al.	2000
Ziege	42	29/69	ELISA	Deutschland	SEINECKE	1996
Ziege	28,9	127/439	LAT	Brasilien	PITA GONDIM et al.	1999
Ziege	19,3	123/638	LAT	Iran	HASHEMI-FESHARKI	1996
Ziege	23,7	28/118	IFAT	Iran	HAMZAVI et al.	2007
Ziege	25,9	15/58	ELISA	Äthiopien	NEGASH et al.	2004
Ziege	26,8	141/526	ELISA	Ghana	PUIJE, VAN DER et al.	2000
Ziege	15	30/200	ELISA	Iran	GHAZAEI et al.	2005
Ziege	22,1	221/1000	MAT	USA	DUBEY und ADAMS	1990a
Ziege	5,9	26/438	IHA <sup>8)</sup>	Venezuela	NIETO et al.	1998
Rind	34,4	207/601	IFAT	Costa Rica	ARIAS et al.	1994
Rind	0	0/2.000	LAT	Iran	HASHEMI-FESHARKI	1996
Rind	53,8	141/262	DAT	Polen	SROKA	2001
Rind	9	18/200	ELISA	Iran	GHAZAEI et al.	2005
Rind	2,3	6/262	ELISA	China	YU et al.	2006
Rind	76,3	466/611	MAT	Serbien	KLUN et al.	2006
Rind	4,8	6/125	IFAT	Iran	HAMZAVI et al.	2007
Rind	1	2/194	LAT	Brasilien	PITA GONDIM et al.	1999

<sup>1)</sup> Anzahl positiv

<sup>2)</sup> Anzahl untersucht

<sup>3)</sup> Indirect Fluorescence Antibody Test

<sup>4)</sup> Enzyme Linked Immunosorbent Assay

<sup>5)</sup> Latex Agglutination Test

<sup>6)</sup> Direct Agglutination Test

<sup>7)</sup> Modified Agglutination Test

<sup>8)</sup> Indirect Haemagglutination Assay

Bei in Deutschland durchgeführten Untersuchungen reagierten 33 % der Schafe und 42 % der Ziegen im durchgeführten ELISA positiv auf den Nachweis von *T. gondii*-Antikörpern (SEINECKE, 1996). Wie aus *Tabelle 12* ersichtlich wurden ähnliche Prävalenzen auch bei anderen Studien nachgewiesen. Davon abweichend liegen die Infektionsraten in einigen Ländern wesentlich niedriger bzw. höher. So wiesen NEGASH (2004) bei 56 % und KLUN et al. (2001) sogar bei 84 % der untersuchten Schafe Antikörper gegen den Erreger nach.

Wie bereits bei anderen Tierarten und auch beim Mensch beschrieben, besteht auch bei Schaf und Ziege eine positive Korrelation zwischen dem Lebensalter und der Antikörperprävalenz (DUBEY und ADAMS, 1990; SEINECKE, 1996; NIETO et al., 1998; PUIJE, VAN DER et al., 2000); ein Umstand, der für eine in allen Altersstufen erfolgende Ansteckung mit lebenslang persistierenden Antikörperspiegeln spricht (SEINECKE, 1996).

Ebenfalls Einfluss auf die Infektionsprävalenz nimmt der Faktor Klima. Bei Studien in Ghana und Serbien waren in den feuchteren Regionen signifikant mehr Tiere *T. gondii*-positiv, als in trockeneren Gebieten (PUIJE, VAN DER et al., 2000; KLUN et al., 2006). Keinen Einfluss scheinen hingegen das Geschlecht, die Rasse sowie die Haltungsbedingungen mit Ausnahme der Fütterung zu haben. So wiesen Schafe, die additiv mit Kraftfutter oder Trockenschnitzeln gefüttert wurden, signifikant häufiger Antikörper gegen *T. gondii* auf als Schafe, die sich lediglich von Gras ernährten. Als Ursache hierfür kommen zur Schadnagerbekämpfung eingesetzte Katzen mit Zugang zu den Futterlagerräumen in Betracht (SEINECKE, 1996).

Angaben über den Immunstatus von Rindern weisen in der Regel auf sehr viel niedrigere Antikörperprävalenzen als bei Schaf und Ziege beschrieben hin (*Tabelle 12*). Entsprechend wiesen PITA GONDIM et al. (1999) und YU et al. (2006) den Erreger lediglich bei 1,03 % bzw. 2,3 % der Tiere und HASHEMI-FESHARKI et al. (1996) bei gar keinem von 2000 untersuchten Rindern nach. Ähnlich der beim Schaf beschriebenen Situation weisen jedoch auch bei der Spezies Rind einige Studien auf sehr viel höhere Prävalenzen in manchen Ländern hin (SROKA, 2001; KLUN et al., 2006).



### **Wildwiederkäuer**

Zur Seroprävalenzsituation jagdbarer Tiere wie Reh und Hirsch liegen für Europa derzeit nur wenige Daten vor (TENTER et al., 1999). Die Durchseuchungsraten sind jedoch hoch (ASPÖCK, 1994). Eine Übersicht der Seroprävalenzsituation bei Wildwiederkäuern soll *Tabelle 13* vermitteln. Aus den dargestellten Studien ist ersichtlich, dass die Seroprävalenz inter- und innerartlich starken Schwankungen unterworfen ist. Beispielhaft sei hier auf zwei im selben Jahr in Peru durchgeführte Untersuchungen bei Lamas verwiesen, bei denen Infektionsprävalenzen von 8 % und 50 % ermittelt wurden (CHÁVEZ-VELÁSQUEZ et al., 2005; WOLF et al., 2005).

Prinzipiell analog zu den bei Hauswiederkäuern beschriebenen Einflussfaktoren auf die Seroprävalenz ist auch bei Wildwiederkäuern eine positive Korrelation zum Lebensalter beschrieben (VANEK et al., 1996; VIKØREN et al., 2004; WOLF et al., 2005). Ebenso scheint die Feuchtigkeit ein entscheidendes Kriterium zu sein, da die Prävalenz in trockenen Regionen signifikant niedriger ausfiel als in feuchteren Gebieten (GAUSS et al., 2006).

**Tabelle 13: Seroprävalenz von *T. gondii* bei Wildwiederkäuern**

Tierart	Prävalenz in %	Prävalenz n <sup>1</sup> /N <sup>2</sup>	Land	Methode	Literatur	Datum
Alpaka	5,6	20/356	Peru	Immunoblot	WOLF et al.	2005
Alpaka	33,3	4/12	Deutschland	Immunoblot	WOLF et al.	2005
Elenantilope	36,8	7/19	Zimbabwe	MAT <sup>3)</sup>	HOVE und DUBEY	1999
Rappenantilope	11,9	8/67	Zimbabwe	MAT	HOVE und DUBEY	1999
Streifengnu	14,5	10/69	Zimbabwe	MAT	HOVE und DUBEY	1999
Nyala	90	9/10	Zimbabwe	MAT	HOVE und MUKARATIRWA	2005
Bison	1	2/241	Alaska/USA	MAT	ZARNKE et al.	2000
Büffel	5,6	1/18	Zimbabwe	MAT	HOVE und DUBEY	1999
Wasserbüffel	0	0/40	China	ELISA <sup>4)</sup>	YU et al.	2007
Wasserbüffel	3,9	4/104	Brasilien	LAT <sup>5)</sup>	PITA GONDIM et al.	1999
Wasserbüffel	8,8	34/385	Iran	IFAT <sup>6)</sup>	NAVIDPOUR et al.	1998
Rothirsch	7,7	44/571	Norwegen	DAT <sup>7)</sup>	VIKØREN et al.	2004
Damhirsch	22,8	18/79	Spanien	MAT	GAUSS et al.	2006
Damhirsch	17	24/143	Tschechien	IFAT	BÁRTOVÁ et al.	2007
Weißwedelhirsch	44	7/16	USA	DAT	LINDSAY et al.	1991
Weißwedelhirsch	30	415/1.367	USA	MAT	VANEK et al.	1996
Lama	55,8	24/43	Peru	IFAT	CHÁVEZ-VELÁSQUEZ et al.	2005
Lama	33,5	95/283	USA	MAT	DUBEY et al.	1992
Lama	8,6	7/81	Peru	Immunoblot	WOLF et al.	2005
Lama	50	10/20	Deutschland	Immunoblot	WOLF et al.	2005
Mähnenspringer	10	1/10	Spanien	MAT	GAUSS et al.	2006
Mufflon	14,8	4/27	Spanien	MAT	GAUSS et al.	2006
Mufflon	9	9/105	Tschechien	IFAT	BÁRTOVÁ et al.	2007
Pyrenäen Gämse	20	2/10	Spanien	MAT	GAUSS et al.	2006
Reh	21,2	7/33	Spanien	MAT	GAUSS et al.	2006
Reh	24	19/79	Tschechien	IFAT	BÁRTOVÁ et al.	2007
Reh	33,9	258/760	Norwegen	DAT	VIKØREN et al.	2004
Ren	50	1/2	Tschechien	IFAT	BÁRTOVÁ et al.	2007
Ren	6	14/241	Alaska/USA	MAT	ZARNKE et al.	2000
Ren	1	9/866	Norwegen	DAT	VIKØREN et al.	2004
Ren	0	0/390	Spitzbergen	DAT	PRESTRUD et al.	2007
Steinbock	14,8	4/27	Spanien	MAT	GAUSS et al.	2006
Vikunja	5,5	11/200	Peru	IFAT	CHÁVEZ-VELÁSQUEZ et al.	2005
Vikunja	2,6	3/114	Peru	Immunoblot	WOLF et al.	2005

<sup>1)</sup> Anzahl positiv<sup>2)</sup> Anzahl untersucht<sup>3)</sup> Modified Agglutination Test<sup>4)</sup> Enzyme Linked Immunosorbent Assay<sup>5)</sup> Latex Agglutination Test<sup>6)</sup> Indirect Fluorescence Antibody Test<sup>7)</sup> Direct Agglutination Test

### 2.2.2.7 Seroprävalenz bei anderen Haus- und Wildtieren

Von den lebensmittelliefernden Haustieren sind neben den bereits behandelten Tierarten Schwein, Schaf und Ziege vor allem Kaninchen stark mit *T. gondii*-Zysten belastet (ASPÖCK, 1994; TENTER et al., 1999). Entsprechend wurde bei einer Untersuchung von drei Kaninchenzuchtbetrieben eine Gesamtprävalenz von 26,9 % ermittelt. Hierbei erwiesen sich Tiere eines Betriebes mit hohem Aufzuchtstandard als deutlich seltener seropositiv (18,7 %) als Tiere aus dem familiär geführten (33,3 %) bzw. dem Betrieb mit mittlerem Aufzuchtstandard (39,7 %) (FIGUEROA-CASTILLO et al., 2006).

Bei kommerziell gehaltenem Geflügel und Pferden wurden Toxoplasmen dagegen nur selten nachgewiesen (ASPÖCK, 1994; TENTER et al., 1999). Für Hühner scheint die Haltungsform von entscheidender Bedeutung zu sein. Während bei zwei Studien in Intensivhaltung keines der Hühner Antikörper besaß (SROKA, 2001; GHAZAEI, 2005), lagen die ermittelten Prävalenzen bei Tieren aus Freilandhaltung zwischen 26 % und 50 % (DUBEY et al., 2003; DUBEY et al., 2004; DUBEY et al., 2005).

Die Seroprävalenz bei Pferden lag in Schweden und den USA bei lediglich 1 % bzw. 6,9 % (UGGLA et al., 1990; DUBEY et al., 1999). Die deutlich darüber liegende Prävalenz von 20,6 % in einer türkischen Provinz (AKCA et al., 2004) verdeutlicht jedoch, dass auch bei dieser Spezies höhere Infektionsraten vorkommen, die möglicherweise auf Haltungsbedingungen zurückzuführen sind (AKZA et al., 2004).

Eine Auswahl an Studien zur Seroprävalenz verschiedenster Säugetiere und Vögel ist in den *Tabellen 14* und *15* zusammengestellt. Diese sollen einen abschließenden Eindruck über die globale Verbreitung der Antikörperprävalenz bei verschiedensten sowohl wildlebenden als auch domestizierten Tieren vermitteln (GUSTAFSSON und UGGLA, 1994; AKCA et al., 2004; NEGASH et al., 2004; CHÁVEZ-VELÁSQUEZ et al., 2005; GHAZAEI, 2005; KLUN et al., 2006).

**Tabelle 14: Seroprävalenz von *T. gondii* bei domestizierten und wildlebenden Säugetieren**

Tierart	Prävalenz in %	Prävalenz n <sup>1</sup> /N <sup>2</sup>	Land	Methode	Literatur	Datum
Schwarzbär	84	120/143	USA	MAT <sup>3)</sup>	NUTTER et al.	1998
Grizzly Bär	25	220/892	Alaska/USA	MAT	ZARKE et al.	1997
Schwarzbär	43	62/143	Alaska/USA	MAT	ZARKE et al.	2000
Eisbär	6	30/500	Alaska/USA	LAT <sup>4)</sup>	RAH et al.	2005
Walross	6	1/17	Spitzbergen	DAT <sup>5)</sup>	PRESTRUD et al.	2007
Elefant	10,5	2/19	Zimbabwe	MAT	HOVE und DUBEY	1999
Elefant	45,5	71/156	Thailand	MAT	TUNTASUVAN et al.	2001
Elefant	10	2/20	Zimbabwe	MAT	HOVE und MUKARATIRWA	2005
Kaninchen	14,2	65/456	Spanien	MAT	ALMERÍA et al.	2004
Kaninchen	26,9	77/286	Mexiko	ELISA <sup>6)</sup>	FIGUEROA-CASTILLO et al.	2006
Pferd	1	2/219	Schweden	ELISA	UGGLA et al.	1990
Pferd	6,9	124/1788	USA	MAT	DUBEY et al.	1999
Pferd	20,6	39/189	Türkei	SFT <sup>7)</sup>	AKCA et al.	2004
Feldhase	0	0/176	Schweden	DAT/ELISA	GUSTAFSSON und UGGLA	1994
Opossum	20,4	82/396	Brasilien	MAT	YAI et al.	2003
Giraffe	10	1/10	Zimbabwe	MAT	HOVE und MUKARATIRWA	2005
Spitzmaulnashorn	27,3	3/11	Zimbabwe	MAT	HOVE und MUKARATIRWA	2005

1) Anzahl positiv

4) Latex Agglutination Test

7) Sabin Feldmann Test

2) Anzahl untersucht

5) Direct Agglutination Test

3) Modified Agglutination Test

6) Enzyme Linked Immunosorbent Assay

**Tabelle 15: Seroprävalenz von *T. gondii* bei domestizierten und wildlebenden Vögeln**

Tierart	Prävalenz in %	Prävalenz n <sup>1</sup> /N <sup>2</sup>	Land	Methode	Literatur	Datum
Dreizehenmöve	0	0/58	Spitzbergen	DAT <sup>3)</sup>	PRESTRUD et al.	2007
Ente	15,8	3/19	Ägypten	MAT <sup>4)</sup>	DUBEY et al.	2003
Eismöve	0	0/27	Spitzbergen	DAT	PRESTRUD et al.	2007
Gans	5,9	7/34	Polen	DAT	SROKA	2001
Haushuhn	0	0/65	Polen	DAT	SROKA	2001
Haushuhn	0	0/150	IRAN	ELISA <sup>5)</sup>	GHAZAEI	2005
Haushuhn <sup>3)</sup>	26	13/50	Peru	MAT	DUBEY et al.	2004a
Haushuhn <sup>3)</sup>	40,4	49/121	Ägypten	MAT	DUBEY et al.	2003
Haushuhn <sup>3)</sup>	52	53/102	Grenada	MAT	DUBEY et al.	2005
Strauss	48	24/50	Zimbabwe	MAT	HOVE und MUKARATIRWA	2005
Weißer Storch	13,6	6/44	Polen	IFT <sup>6)</sup>	ANDRZEJEWSKA et al.	2004

1) Anzahl positiv

4) Modified Agglutination Test

6) Indirect Fluorescence Test

2) Anzahl untersucht

3) Direct Agglutination Test

5) Enzyme Linked Immunosorbent Assay

### **2.2.3 Symptomatik der Toxoplasmose**

Die Toxoplasmose ist eine weltweit verbreitete Erkrankung, die sowohl Menschen als auch Tiere befällt (Zoonose) (LIN, 1998; SILVA et al., 2005; JITTAPALAPONG et al., 2007). Durch erkrankungsbedingte Ausfälle in der Tierproduktion ist sie zum Einen von ökonomischer Bedeutung, zum Anderen verkörpert sie durch z. T. schwerwiegende Erkrankungsbilder ein Problem der öffentlichen Gesundheit (LIN, 1998; JITTAPALAPONG et al., 2007).

Normalerweise parasitiert *T. gondii* sowohl in End- als auch in Zwischenwirten, ohne diese zu beeinträchtigen. Die Schädigung eines Wirtes tritt folglich sehr selten auf und ist eher als Missgeschick des Erregers zu betrachten (DUBEY, 1993; SEITZ, 1994).

#### **2.2.3.1 Toxoplasmose des Menschen**

Die *Toxoplasma*-Infektion wird außer bei immunsupprimierten Patienten und kongenital infizierten Kindern in der Regel als asymptomatische oder milde Erkrankung beschrieben (DUBEY, 1993; GROß et al., 2001; EFSA, 2007). Entsprechend wird die klinische Symptomatik unterteilt in die postnatale Toxoplasmose des Immunkompetenten und des Immunsupprimierten sowie die pränatale *Toxoplasma*-Infektion (RKI, 2007b).

##### **2.2.3.1.1 Immunkompetente Personen**

Die Infektion mit *T. gondii* führt bei Immunkompetenten nur sehr selten zu schweren Erkrankungen (DUBEY, 1993; EFSA 2007). Bei ca. 80 % der Individuen verläuft sie vollkommen asymptomatisch, führt aber zu lebenslanger Persistenz des Erregers in Form bradyzoitenhaltiger Zysten (GROß et al., 2001; EFSA, 2007). Eine beachtliche Anzahl von Fällen mit milden Symptomen wird entweder vom Patienten nicht wahrgenommen oder aufgrund der unspezifischen Krankheitsanzeichen nicht der Toxoplasmose zugeordnet (EFSA, 2007). In der Regel treten klinische Symptome 10 bis 14 Tage nach der Infektion auf und manifestieren sich primär als Lymphadenitis (DUBEY, 1993; RKI, 2007b; EFSA, 2007). Obwohl alle Lymphknoten in das Krankheitsgeschehen involviert sein können, sind die tiefen Zervikallymphknoten am häufigsten betroffen (DUBEY, 1993). Die Lymphadenitis kann mit

nicht charakteristischen Krankheitserscheinungen in Form einer grippe-ähnlichen Symptomatik (Fieber, Abgeschlagenheit, Muskelschmerzen, kurzzeitige Diarrhöen) vergesellschaftet sein (DUBEY, 1993; GROß et al., 2001). Darüberhinaus können anikterische Hepatitiden, sowie in äußerst seltenen Fällen Enzephalitiden und Retinochorioiditiden auftreten, wobei die Inzidenz der erworbenen okulären Toxoplasmose möglicherweise noch unzureichend erfasst wird (siehe 2.2.3.1.4). Chronische *Toxoplasma*-Infektionen verlaufen meist völlig latent (DUBEY, 1993; GROß et al., 2001; RKI, 2007b; EFSA, 2007).

### **2.2.3.1.2 Immunsupprimierte Personen**

Während eine *Toxoplasma*-Infektion für immunkompetente Personen relativ ungefährlich ist, stellt sie für immunsupprimierte Patienten, z. B. infolge immunsupprimierender Erkrankungen wie AIDS oder medikamenteninduzierter Suppression nach Organtransplantationen eine lebensbedrohliche Gefahr dar (GROß et al., 2001; MELE et al., 2002).

Primäre Infektionen unter Immunsuppression können zu interstitiellen Pneumonien führen, treten aber nur sehr selten auf (MELE et al., 2002; RKI, 2007b). Die Mehrheit der *Toxoplasma*-Infektionen immunsupprimierter Menschen ist auf Reaktivierungen früherer Infektionen oder auf Reaktivierungen von Gewebssystemen transplanteder Organe und Knochenmark zurückzuführen (MELE et al., 2002; EFSA, 2007; RKI, 2007b). Die klinischen Ausprägungen reichen von asymptomatischer Reaktivierung bis hin zu schweren disseminierten Leiden mit Enzephalitis, Meningoenzephalitis und tumorbedingten Läsionen. Weitere frequent auftretende Symptome wie Motorisches Syndrom, Bewusstseinsstörungen und Krämpfe sind klinisch nicht von ZNS-Folgeschäden anderer Genesen zu unterscheiden (EFSA, 2007). In Folge einer disseminierten, generalisierten Ausbreitung der Erkrankung können noch zahlreiche andere Organe (insbesondere Lungen und Augen) involviert werden (EFSA, 2007; RKI, 2007b). Nicht entdeckte und entsprechend nicht frühzeitig behandelte reaktivierte Toxoplasmosen sind für immunsupprimierte Patienten lebensbedrohlich (EFSA, 2007).

Für AIDS-Patienten gehört die Toxoplasmose zu den Krankheiten, die am häufigsten zum Tode führen. Obwohl alle Organe, inklusive der Hoden, der Haut sowie das Rückenmark beteiligt sein können, ist die Enzephalitis, insbesondere bei CD-4 T-Zell Zahlen  $< 100/\mu\text{l}$  die häufigste Manifestationsform (DUBEY, 1993; EFSA, 2007). Vor der Einführung von HAART

(Highly Active Antiretroviral Therapy) erkrankten bis zu 30 % der *Toxoplasma*-positiven HIV-Patienten an Enzephalitis (EFSA, 2007). Die Mehrheit dieser Patienten leidet unter beidseitigen schweren und persistierenden Kopfschmerzen mit nur geringer Reaktion auf Schmerzmittel. Im weiteren Verlauf können sich Verwirrung, Lethargie, Ataxie und Koma anschließen (ref. in DUBEY, 1993). Unbehandelt führt die zerebrale Toxoplasmose immer zum Tod (HAPPE et al., 2002).

### **2.2.3.1.3      Kongenitale Toxoplasmose**

Eine kongenitale Übertragung der Infektion ist in der Regel nur bei einer Erstinfektion der Mutter während der Schwangerschaft zu befürchten, wobei die Schwere der Erkrankung vom Graviditätsstadium der Mutter zum Zeitpunkt der Infektion abhängig ist (DUBEY, 1993; FRIESE, 1994; GROß et al., 2001; EFSA, 2007; RKI, 2007b). Obwohl bei der Mutter nur selten Symptome auftreten, besteht trotzdem eine temporäre Parasitämie, in deren Folge fokale Läsionen in der Plazenta entstehen und es zur Infektion des Feten kommen kann (DUBEY, 1993).

Das klinische Bild der konnatalen Toxoplasmose ist sehr variabel und umfasst sowohl subklinische als auch schwere Verlaufsformen bis hin zu fetalem und neonatalem Tod (HANDRICK und PADEL, 1994; EFSA, 2007). Das Risiko einer diaplazentaren Übertragung steigt mit zunehmender Progression der Schwangerschaft. Die Schwere des Krankheitsbildes beim Kind nimmt dagegen ab (DUBEY, 1993; GROß et al., 2001; EFSA, 2007; RKI, 2007b). Das ZNS und die Augen sind nahezu immer beteiligt, zusätzlich können aber auch weitere Organe (Leber, Milz, Niere, Lunge) involviert sein. Erfolgt die Infektion in einem frühen Schwangerschaftsstadium kann dies zum Verlust des Kindes oder zu schweren Schädigungen (Chorioretinitis, intrakranielle Verkalkung, Hydro- oder Mikrocephalus) führen. Infektionen während der späten Schwangerschaft verlaufen beim Neugeborenen dagegen zumeist subklinisch (EFSA, 2007). Die in der früheren Literatur als häufigste Manifestationsform beschriebene klassische Symptomentrias bestehend aus retinochorioiditischen Narben, intracerebraler Verkalkung und Hydrocephalus tritt nach neuerer Ansicht nur in sehr seltenen Fällen und dann unmittelbar *post natum* auf (HANDRICK und PADEL, 1994; EFSA, 2007; RKI, 2007b).

#### **2.2.3.1.4 Okuläre Toxoplasmose**

Die okuläre Toxoplasmose führt bei fast 25 % der Patienten zumindest auf einem Auge zu einem dauerhaften Verlust des Sehvermögens (BOSCH-DRIESSEN et al., 2002). Obwohl die okuläre Erkrankung bei einem großen Prozentsatz kongenital infizierter Personen auftritt, ist die herkömmliche Ansicht, dass die meisten Fälle auf kongenitale Infektionen zurückzuführen sind, in letzter Zeit umstritten (GLASNER et al., 1992; GILBERT und STANFORD, 2000; EFSA, 2007). Zu berücksichtigen ist, dass es mit keinem momentan zur Verfügung stehendem Test möglich ist, zwischen kongenitaler und postnatal erworbener Toxoplasmose zu unterscheiden. Aufgrund neuerer Untersuchungen wird vermutet, dass mindestens zwei Drittel der okulären Toxoplasmose-Erkrankungen auf postnatale Infektionen zurückzuführen sind (GILBERT und STANFORD, 2000; EFSA, 2007).

Das klinische Erscheinungsbild der okulären Erkrankung ist abhängig von der Dauer der retinalen Infektion und der Ausprägung der Entzündung. Die häufigste Manifestationsform ist eine nekrotisierende Retinitis (EFSA, 2007). Die sich entwickelnden Läsionen können sowohl ein- als auch beidseitig auftreten (BOSCH-DRIESSEN et al., 2002). Andere Manifestationen wie anteriore Uveitis, Skleritis oder Papillitis sind selten (EFSA, 2007).



### 2.2.3.2 Toxoplasmose der Tiere

Es ist anzunehmen, dass alle warmblütigen Tiere, sowohl Säuger als auch Vögel für *T. gondii* empfänglich sind (ASPÖCK et al., 1994; LIN, 1998; TENTER et al., 1999). Wie beim Menschen beschrieben, verlaufen die meisten postnatal erworbenen Infektionen auch bei der überwiegenden Mehrheit der Tiere, unter der Voraussetzung, dass diese ansonsten gesund und insbesondere immunkompetent sind, symptomlos bzw. kommt es zur Ausprägung nur geringfügiger Krankheitsanzeichen (ASPÖCK, 1994). Dessen ungeachtet ist der Erreger in der Lage bei Tieren schwere Erkrankungen hervorzurufen. *Rinder* und *Pferde* sind von den Nutztieren am resistantesten gegen die Erkrankung, obwohl bei beiden Tierarten Infektionen nachgewiesen wurden (UGGLA et al., 1990; DUBEY, 1993; ARIAS et al., 1994; SROKA, 2001; AKCA et al., 2004; YU et al., 2006; HAMZAVI et al., 2007). Bei *Schafen* und *Ziegen* verursacht die Infektion durch embryonalen Tod und Resorption, fetalen Tod und Mumifikation, Abort, Todgeburt und neonatalen Tod große Verluste (ref. in DUBEY, 1993; ASPÖCK, 1994). Da sich bei Schafen ein durch den Erreger induzierter Abort nicht wiederholt, können und sollten die betroffenen Muttertiere für die weitere Zucht bewahrt werden.

Bei *Schweinen* wurden Toxoplasmose-induzierte Krankheitsausbrüche aus verschiedenen Ländern gemeldet. Hierbei ist die Sterberate junger Tiere höher als die ausgewachsener Schweine (ref. in DUBEY, 1993). In Ferkelerzeugerbetrieben sollte die *T. gondii*-Infektion beim Auftreten von Aufzuchtsschwierigkeiten und enzootischen Aborten zumindest differentialdiagnostisch in Erwägung gezogen werden. Symptomatisch können bei Absatzferkeln während einer etwa 5 Tage andauernden Fieberphase Durchfall, Anorexie und Apathie beobachtet werden (BOCH, 1980). Darüberhinaus sind Pneumonien, Myokarditiden, Enzephalitiden und plazentare Nekrosen möglich (DUBEY, 1993).

Beim *Hund* sind Atemnot, Ataxie und Diarrhö als klinische Manifestationen zu beobachten. Auftretende Pneumonien scheinen zumeist auf eine gleichzeitige *Toxoplasma*- und Staupe-Virus-Infektion zurückführbar zu sein. Hierbei verursacht die Staupe-Infektion eine Immunsuppression, in deren Folge sich *T. gondii* vermehrt (ref. in DUBEY, 1993).

*Katzen* können ebenfalls klinisch an einer *Toxoplasma*-Infektion erkranken (ASPÖCK, 1994). Neben der Pneumonie, als der wichtigsten klinischen Manifestationsform, sind auch Hepatitiden, pankreatische Nekrosen, Myositiden, Myokarditiden und Enzephalitiden beschrieben. Diarrhöen treten trotz der starken Vermehrung im Darm der Tiere nur selten

auf. Erkrankte Katzen können jedoch auch ohne ein vorheriges Auftreten von Krankheitsanzeichen plötzlich versterben (ref. in DUBEY, 1993).

Erwähnenswert ist, dass bestimmte Tierarten die aus z. B. öko- oder epidemiologischen Gründen keinen Kontakt zu dem Erreger hatten zumeist auch keine Schutzmechanismen entwickelt haben. Diese Tiere sind häufig besonders empfänglich und empfindlich für eine *Toxoplasma*-Infektion. Dies gilt u. a. für hoch in den Bäumen lebende Neuweltaffen und die Beuteltiere Australiens (ASPÖCK, 1994).

## 2.2.4 Prävention und Therapie

Präventivmaßnahmen zur Verhinderung einer Infektion können vom Lebenszyklus des Parasiten abgeleitet werden (*Abbildung 12*) und sind vor allen Dingen für nicht immune Frauen während der Schwangerschaft und immunsupprimierte Patienten von Bedeutung (GROß et al., 2001; GROß, 2004).

- ✓ Katzenkontakt meiden, bzw. die Reinigung der Katzentoilette täglich von anderen Personen durchführen lassen
- ✓ bei der Gartenarbeit Handschuhe tragen
- ✓ Gemüse und Obst vor dem Verzehr gründlich waschen
- ✓ im Umgang mit rohem Fleisch Handschuhe tragen
- ✓ nach Garten- und Küchenarbeit Hände mit Seife waschen
- ✓ nur ausreichend erhitztes (> 67°C) Fleisch essen bzw. dieses vorher bei mindestens -12°C lagern

**Abbildung 12: Präventivmaßnahmen gegen *Toxoplasma*-Infektionen (mod. nach GROß et al., 2001; GROß, 2004)**

Angriffspunkte für die Toxoplasmose-Therapie sind insbesondere die Folsäure- und Proteinsynthese des Erregers, wobei sich die Wirkung hauptsächlich auf Tachyzoiten beschränkt, Bradyzoiten gegenüber ist nur eine geringe Wirksamkeit beschrieben (RKI, 2007b).

Das Robert-Koch-Institut spricht in seinem Ratgeber „Infektionskrankheiten“ (2007) Empfehlungen zur Therapie der Toxoplasmose aus. Hiernach werden die Antibiotika Spiramycin, Pyrimethamin, Sulfadiazin und Clindamycin am häufigsten therapeutisch eingesetzt (RKI, 2007b).

Die Behandlung immunkompetenter Personen ist auf die Anwesenheit von Symptomen beschränkt (EFSA, 2007; RKI, 2007b). Bei Vorliegen nur milder klinischer Erscheinungen werden über den Zeitraum der Krankheitserscheinungen Spiramycin, Sulfadiazin-Pyrimethamin oder Cotrimoxazol angewendet. Ein positiver Nutzen dieser Behandlung ist indes jedoch nicht bewiesen. Fälle schwerer Toxoplasmosen werden mit Sulfadiazin-Pyrimethamin behandelt (EFSA, 2007). Zur Behandlung der Toxoplasmose-Encephalitis immunsupprimierter Patienten kommt über einen Zeitraum von mindestens vier Wochen ebenfalls die Kombination aus Sulfadiazin und Pyrimethamin zur Anwendung (EFSA, 2007). Darüberhinaus wird auf den möglichen Einsatz von Atavogone verwiesen (RKI, 2007b).

Für Schwangere bei denen eine Infektion gemutmaßt wird ist der positive Nutzen einer Behandlung bisher nicht bewiesen (EFSA, 2007). Zur Therapie wird vor der 16. Schwangerschaftswoche eine Monotherapie mit Spiramycin empfohlen, danach wird auf eine Kombination bestehend aus Pyrimethamin und Sulfadiazin umgestellt. Um einer Knochenmarksschädigung vorzubeugen, ist die gleichzeitige Gabe von Folsäure erforderlich. Im Anschluss an die Geburt erfolgt die weitergehende Behandlung der Neugeborenen mithilfe der gleichen Medikamente über einen Zeitraum von zwei bis sechs Monaten bei subklinischen bzw. ein bis zwei Jahren bei klinischen Erkrankungen (EFSA, 2007; RKI, 2007b).

Die Behandlung von Retinochorioditiden kann alternativ zur Kombinationstherapie mit Clindamycin durchgeführt werden (RKI, 2007b).

## 2.3 Nachweismethoden

Die Symptomatik der *Toxoplasma*-Infektion ist für eine Diagnosestellung zu unspezifisch. Zur Anwendung kommen in der Praxis daher biologische, serologische, histologische und molekularbasierte Methoden oder Kombinationen der genannten Verfahren (HILL und DUBEY, 2002).

### 2.3.1 Serologischer Nachweis beim Menschen

Der Nachweis spezifischer Antikörper in humanem Serum oder anderen Körperflüssigkeiten wird als Beweis für eine Infektion mit dem Parasiten interpretiert (GROß, 1994; EFSA, 2007). Die serologische Diagnose der Erkrankung stützt sich in vielen europäischen Mitgliedsstaaten auf qualitätsgeprüfte und automatisierte *in vitro*-Verfahren. Diese Testsysteme erlauben sowohl eine qualitative als auch quantitative Bestimmung von IgG-, IgM- und IgA-Antikörpern (EFSA, 2007). Bei der Auswertung der Testergebnisse ist zu berücksichtigen, dass ein hoher IgM-Spiegel bei einem immunkompetenten Patienten auf eine floride Infektion hinweist. Im Gegensatz dazu treten IgG-Antikörper erst zwei bis drei Wochen nach einer Infektion auf, zeigen für sechs bis acht Wochen einen steigenden Titerverlauf und sinken danach langsam auf einen bestehenbleibenden Basistiter ab (KRAUSS et al., 2004).

Für die Diagnostik der Toxoplasmose von *immunkompetenten Personen* ist der serologische Erregernachweis die Methode der Wahl, wobei der Schwerpunkt auf der quantitativen IgM- und IgA-Bestimmung liegt. Das Robert-Koch-Institut empfiehlt bei dieser Personengruppe ein stufendiagnostisches Vorgehen. Zunächst wird ein *Toxoplasma*-Antikörper-Suchtest durchgeführt, wobei sowohl Tests auf spezifische *Toxoplasma*-Gesamt- (IgG und IgM) als auch nur auf IgG-Antikörper zur Anwendung kommen. Bei einem negativen *Toxoplasma*-Gesamtergebnis kann eine Infektion ausgeschlossen werden. Das negative Ergebnis eines alleinigen IgG-Suchtests (in der Frühphase der Infektion möglicherweise negativ) muss hingegen durch einen IgM-Test ergänzt werden. Ergeben beide Untersuchungen ein negatives Ergebnis, kann eine Infektion ausgeschlossen werden (RKI, 2007b).

Ein positiver IgG-Befund kann sowohl auf eine aktive als auch eine inaktive Infektion zurückzuführen sein. In diesem Fall muss sich eine Folgeuntersuchung auf IgM-Antikörper anschließen. Ist der IgM-Nachweis negativ, kann von einer inaktiven (latenten) Infektion

ausgegangen werden. Ein positives IgM-Ergebnis muss hingegen mithilfe von Abklärungsverfahren weiter verfolgt werden. Zu den *Toxoplasma*-Abklärungsverfahren gehören die IgA-Antikörperbestimmung, der Immunoblot und die IgG-Aviditätsbestimmung. Gelingt es anhand dieser Methoden nicht, das Infektionsstadium zu bestimmen, ist im Abstand von 14 Tagen mindestens eine Folgeuntersuchung durchzuführen (RKI, 2007b). Eine zusammenfassende Übersicht über die Ergebnisinterpretation gibt *Tabelle 16*.

**Tabelle 16: Ergebnisinterpretation der serologischen Diagnostik (mod. nach RKI, 2007b)**

IgG	IgM	IgG-Avidität	wahrscheinliches Ergebnis
positiv	negativ	-	latente Infektion
positiv	positiv	hoch	abklingende oder latente Infektion
positiv	positiv	gering	akute Infektion möglich

Mithilfe der IgG-Aviditäts-Bestimmung kann in vielen Fällen auf eine Nachuntersuchung verzichtet werden. Das Verfahren beruht auf einer unterschiedlichen Bindungsstärke (Avidität) des Antikörpers zum Antigen. In der frühen Phase der Infektion besteht noch eine relativ schwache Avidität zum Antigen. Diese nimmt mit zunehmender Dauer der Infektion zu, so dass stark bindende Antikörper folglich auf eine schon länger zurückliegende Infektion hinweisen (SUTER et al., 1999).

Insbesondere für *Schwangere* ist von Bedeutung, dass nur das gleichzeitige Vorliegen eines positiven IgG-Befundes und eines negativen IgM-Nachweises auf eine Immunität schließen lassen. Der rein qualitative IgM-Nachweis bzw. eine niedrige IgG-Avidität bedeutet jedoch nicht zwingend eine akute Infektion. Aus diesem Grund sollte bei Schwangeren mit positivem IgM-Befund in jedem Fall nach 14 Tagen mindestens eine Nachuntersuchung erfolgen (RKI, 2007b).

Im Rahmen der Diagnostik beim *Neugeborenen* gilt der Nachweis von spezifischen IgM- und bzw. oder IgA-Antikörpern als Infektionsbeweis. Werden bei der Erstuntersuchung nach der Geburt lediglich IgA-Antikörper nachgewiesen, sollte nach etwa vier bis sechs Wochen eine Verlaufskontrolle durchgeführt werden. Darüberhinaus können vergleichende Immunoblots (gleichzeitige Untersuchung von fetalem und maternalem Serum) mit Bestimmung der IgG-Antikörper zu einer Diagnosestellung herangezogen werden (RKI, 2007b).

Bei *okulären* und *reaktivierten Toxoplasmose-Erkrankungen* beweist die Anwesenheit spezifischer Antikörper (oft nur IgG) eine vermutete Infektion. Der Nachweis einer akuten Infektion kann jedoch meistens nur durch eine direkte Erreger- bzw. DNA- Bestimmung

erfolgen. Lokale Infektionen am Auge können durch den Nachweis spezifischer IgA-Antikörper aus dem Augenkammerwasser identifiziert werden (RKI, 2007b).

### 2.3.2 Serologischer Nachweis bei Tieren

Für den serologischen Nachweis einer *Toxoplasma*-Infektion stehen viele verschiedene Verfahren zur Verfügung und befinden sich in Anwendung. Problematisch kann hierbei die nicht immer gewährleistete Vergleichbarkeit der Ergebnisse sein, die sich unter anderem aus den unterschiedlichen Testsystemen, den Modifikationen der Protokolle und den variierenden Grenzwerten ergibt. Darüberhinaus sind einige Verfahren nicht für alle Tierarten geeignet und Kreuzreaktionen mit Antikörpern verwandter Parasiten können zudem falsch-positive Ergebnisse nach sich ziehen (EFSA, 2007).

Als „Goldener Standard“ gilt noch immer der bereits 1948 von SABIN und FELDMANN entwickelte „Dye Test“ (DT/SFT). Der Nachweis dieses Verfahrens beruht auf der Anfärbbarkeit lebender Toxoplasmen mit Methylenblau. Durch Inkubation des Erregers mit spezifischen Antikörpern kommt es zu einer Lyse der Parasitenmembran, wodurch sich die Erreger nicht mehr anfärben lassen (GROß, 1994). Dieser Test fand breite Anwendung im Bereich des humanen Nachweises des Erregers und wird auch für die Untersuchung tierischer Seren herangezogen (BOCH et al., 1964; NISHRI et al., 1978; BUDDHIRONGAWATR et al., 2006; EFSA, 2007). Aufgrund der anspruchsvollen Handhabung, der Kostenintensität und des Gefährdungspotentials (infektiöse Tachyzoiten) ist die Anwendung dieses Verfahrens in veterinärmedizinischen Labors jedoch wenig verbreitet (EFSA, 2007).

Die meisten der in den letzten Jahren durchgeführten serologischen Studien bei Tieren wurden mithilfe des MAT (Modified Agglutination Test) durchgeführt (DUBEY et al., 1997; HOVE und DUBEY, 1999; ZARNKE et al., 2000; GAUSS et al., 2006; KLUN et al., 2006; EFSA, 2007). Dieses Verfahren ist sehr einfach in der Durchführung, verlässlich im Ergebnis und benötigt keine Spezies-spezifischen Reagenzien. Nachteilig sind der relativ hohe Zeitaufwand und die Subjektivität bei der Interpretation der Ergebnisse (EFSA, 2007).

Ebenfalls einfach in der Durchführung und oft verwendet ist der IFAT (Immunofluorescence Antibody Test) (LUTZ, 1997; BÁRTOVÁ et al., 2006; ARIAS et al., 2007; EFSA, 2007; HAMZAVI et al., 2007). Benötigt werden Formalin-behandelte Tachyzoiten sowie Spezies-spezifische

Konjugate, was sich aufgrund der nicht immer gegebenen Verfügbarkeit limitierend auf die Anwendung auswirken kann. Zudem besteht auch bei diesem Test eine gewisse Subjektivität bei der Interpretation der Ergebnisse mithilfe des Fluoreszenzmikroskops (EFSA, 2007).

Desweiteren steht der sehr einfach zu handhabende *DAT* (Direkt Agglutination Test) zum Infektionsnachweis zur Verfügung (EFSA, 2007). Dieses kommerziell erhältliche Verfahren ist sowohl sensitiv als auch spezifisch und wird vielfach eingesetzt (LINDSAY et al.; 1991; VIKØREN et al., 2004; EFSA, 2007; PRESTRUD et al., 2007).

Der *IHAT* (Indirect Haemagglutination Test) und *LAT* (Latex Agglutination Test) werden ebenfalls zur Untersuchung tierischer Seren verwendet (HASHEMI-FESHARKI et al., 1996; NIETO et al., 1998; PITA GONDIM et al., 1999; EFSA, 2007). Bei diesen Verfahren ist jedoch zu berücksichtigen, dass bei niedrigen Titern möglicherweise Kreuzreaktionen mit anderen Kokzidien auftreten können (EFSA, 2007).

Ein vielfach angewendetes Verfahren zur Untersuchung tierischer Seren ist der *ELISA* (Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay) (SEINECKE, 1996; NEGASH et al., 2004; VITALIANO et al., 2004; EFSA, 2007; YU et al., 2007). Durch die mögliche Automatisierung des Verfahrens erlaubt diese Methode die Untersuchung großer Probenmengen (EFSA, 2007). Eine von HILL et al. (2006) durchgeführte vergleichende Studie von sechs unterschiedlichen Nachweisverfahren zur Bestimmung einer *T. gondii*-Infektion bei Schweinen (Serum-ELISA > MAT > Gewebsflüssigkeits-ELISA > Real Time-PCR > Semi-nested PCR > direkte PCR) deklarierte den Serum-ELISA darüberhinaus als die sensitivste Methode.



### 2.3.3 Direkte Nachweismethoden

Da der direkte Nachweis des Erregers - oder seiner DNA - die Diagnose sichert, ist diese Art des Nachweises grundsätzlich anzustreben (RKI, 2007b). Er kann aus Sekreten, Exkreten, Körperflüssigkeiten und Gewebeproben, gewonnen durch Biopsie oder Autopsie, erfolgen (HILL und DUBEY, 2002). Zu den konventionellen direkten Nachweismethoden gehört die Inokulation in Versuchsmäuse oder Zellkulturen sowie die mikroskopische Untersuchung. Der Nachteil des Mäuse-Versuches ist eine relativ große Zeitspanne von bis zu drei Wochen bis zum Vorliegen von Ergebnissen. Da Tierversuche zudem eingeschränkt werden sollten, sucht man seit langem nach verlässlichen Alternativen. *T. gondii* ist in der Lage, *in vitro* kernhaltige Zellen zu infizieren, weswegen die Inokulation auch in Zellkulturen erfolgen kann. Auch bei diesem Verfahren beträgt der Zeitaufwand bis zu zwei Wochen (GROß, 1994). Der entscheidende Vorteil der Erregeranzucht in Zellkultur oder im Tierversuch ist der Beweis einer aktiven Infektion mit vermehrungsfähigen Tachyzoiten (GROß, 1994, RKI, 2007b). Eine schnelle Diagnosestellung kann hingegen mithilfe mikroskopischer Untersuchungen von Abklatschpräparaten erfolgen. Nach dem Trocknen (10 bis 30 min) werden die Präparate in Methylalkohol fixiert und z. B. mit GIEMSA gefärbt (HILL und DUBEY, 2002).

Für den direkten Erregernachweis vermehrt eingesetzt wird jedoch die PCR. Wie aussagekräftig das Ergebnis ist, hängt von mehreren Faktoren ab. Von Bedeutung sind neben der technischen Qualität die bestehende Fragestellung und insbesondere die kritische Interpretation der Ergebnisse. Zu berücksichtigen ist, dass ein positives PCR-Ergebnis zwar beweisend für eine Infektion ist, aber keinen Anhaltspunkt dafür liefert, ob es sich um eine latente oder akute Infektion handelt. Darüber hinaus wirkt sich der meist sehr geringe Erregergehalt der zu untersuchenden Proben einschränkend auf die diagnostische Verwertbarkeit der Ergebnisse aus (RKI, 2007b).

### 2.3.3.1 Einsatz der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Nach Einführung der PCR in den 1980er Jahren (NEWTON und GRAHAM, 1994) gelang BURG et al. bereits 1989 der Nachweis eines einzelnen *T. gondii*-Organismus aus einem Zelllysate bzw. von 10 Organismen in der Gegenwart von 100 000 Leukozyten, was vergleichbar ist mit der Zellinfiltration in 1 ml der Zerebrospinalflüssigkeit eines Patienten mit zerebraler Toxoplasmose. GROVER et al. (1990) bezeichneten die PCR aufgrund der schnellen Durchführbarkeit und der hohen Sensitivität bereits ein Jahr später als die vielversprechendste Methode für die pränatale Diagnostik kongenitaler Toxoplasmose-Erkrankungen; in Untersuchungen von HOHLFELD et al. (1994) bestach die PCR durch eine den anderen verwendeten herkömmlichen Methoden weit überlegene Sensitivität (97,4 % gegenüber 89,5 %) bei der Bestimmung von *T. gondii* aus Amnionflüssigkeit.

Für die Diagnose einer pränatalen Infektion kann die PCR aus Fruchtwasser und Nabelblut entscheidende Ergebnisse liefern. Beim Neugeborenen kann ein Nachweis aus EDTA-Blut, Liquor oder Geburtsmaterial erfolgen. Zu beachten ist jedoch, dass ein positiver Befund zwar beweisend für eine vorliegende Infektion ist, ein negatives Ergebnis diese jedoch nicht ausschließt (RKI, 2007b).

Während beim Immunkompetenten die Serologie als Methode der Wahl anzusehen ist, stellt der direkte Erregernachweis mittels PCR (bzw. Mäuse oder Zellkultur) bei Immunsupprimierten die sicherste Methode dar. Ein weiteres Einsatzgebiet der PCR ist die Untersuchung kommerzieller Fleischerzeugnisse auf die Anwesenheit von *T. gondii* im Hinblick auf eine mögliche Infektionsgefahr der Verbraucher (WARNEKULASURIYA et al., 1998; ASPINALL et al., 2002).

Entsprechend dieser Ausführungen hat sich die PCR als adäquate Methode für den Nachweis von *T. gondii* aus verschiedensten Matrizes bewährt. Trotzdem gilt es, einige Faktoren zu beachten. Die Sensitivität und Spezifität PCR-basierter Methoden sind abhängig von den gewählten DNA-Isolationstechniken, der für die Amplifikation ausgewählten DNA-Sequenz und den Parametern der Amplifikation selber (SWITAJ et al., 2005). Wenig problematisch ist die Auswahl des DNA-Extraktionsverfahrens, da bei der Anwendung von Standardverfahren - und ausreichendem Proteinase K-Verdau - gute Ausbeuten an genomischer *T. gondii*-DNA erzielt werden (REISCHL et al., 2003b). Die sich anschließende erste Stufe der Amplifikation beinhaltet die Hybridisierung ausgewählter Primer an eine geeignete Zielsequenz. Hierbei erhöht sich die Sensitivität der PCR, wenn die Ziel-Sequenz als Spezies-spezifische Mehrfach-

Kopie im Genom vorliegt. Eine potentielle Zielsequenz ist das TGR1<sub>E</sub>-Gen, welches Spezies-spezifisch ist und in hoher Kopienanzahl vorliegt. Aufgrund der Sequenzheterogenität existieren jedoch bis jetzt keine Primer, die alle Sequenzvarianten erfassen können. Das 18S rRNA-Gen (110 Kopien) besitzt nur einzelne Nukleotidpositionen die für *T. gondii* spezifisch sind, so dass die Gefahr von Kreuzreaktionen der Primer mit ähnlichen Sequenzen anderer Eukaryoten besteht (GUAY et al., 1993; REISCHL et al., 2003b). Andere repetitive Sequenzen (100 bis 500 Kopien, OSSORIO et al., 1991) besitzen MGE's (Mobile-Genetic-Elements) und sind ebenfalls nicht vollständig Spezies-spezifisch. Die meist genutzte Sequenz von *T. gondii* ist das in 35-facher Kopienanzahl im Genom vorliegende B1-Gen (SWITAJ et al., 2005). Die Spezifität dieses erstmals von BURG et al. (1989) beschriebenen Gens ist inzwischen gut etabliert, seine Funktion ist allerdings weiterhin unbekannt (SWITAJ et al., 2005). Diese Sequenz galt über viele Jahre als der „Goldene Standard“ für diagnostische PCR-Untersuchungen (REISCHL et al., 2003b). Im Jahr 2000 etablierten HOMAN et al. (2000) das 529-bp-Fragment, das eine 200- bis 300-fache Repetitivität im Genom aufweist und sich dem B1-Gen gegenüber als sensitiver erwies. Dies konnte in einer Studie von REISCHL et al. (2003a) bestätigt werden. Die erzielbare Sensitivität mittels des 529-bp-Fragmentes war um das 10- bis 100-fache höher, als bei Verwendung des parallel getesteten B1-Gens. Auch EDVINSSON et al. (2006) vertreten die Meinung, dass diese neue Sequenz zu einer Erhöhung der diagnostischen Genauigkeit und Sensitivität beiträgt. REISCHL et al. (2003b) sehen in dieser Sequenz sogar den potentiellen neuen „Goldenen Standard“ für PCR-Untersuchungen.

### **2.3.3.2 Konventionelle PCR**

Auf einer nächtlichen Autofahrt sinnierte Kary Mullis darüber, wie er durch eine DNA-Sequenzierung spezielle Basen nachweisen könnte; dies führte 1985 zur Entwicklung der PCR-Methode (NEWTON und GRAHAM, 1994). Mithilfe dieses Verfahrens ist eine sehr schnelle und sensitive *in vitro*-Amplifizierung spezifischer Genabschnitte minimalster DNA-Mengen möglich. Benötigt werden zwei Startersequenzen (Primer), die das zu amplifizierende DNA-Fragment einrahmen. Die Primärstruktur der Primer muss sich zu der des zu vervielfältigenden Abschnittes komplementär verhalten. Die Synthese der Ziel-DNA erfolgt im Wesentlichen in drei Schritten. Im ersten „Denaturierungs“-Schritt werden die DNA-Stränge voneinander getrennt. Der sich anschließende „Hybridisierungs“-Schritt dient der Bindung der Primer an die jeweils komplementären DNA-Abschnitte der Zielsequenz. Darauf folgt die eigentliche spezifische DNA-Synthese durch das Enzym DNA-Polymerase aus im Reaktionsmix zugesetzten Desoxyribonukleotiden. Diese drei Schritte werden zu einem Zyklus zusammengefasst, der vielfach wiederholt wird, um eine ausreichende DNA-Menge zu generieren (WILFINGSEDER und STOIBER, 2002). Die entstehende große Kopienanzahl des amplifizierten spezifischen DNA-Fragmentes wird im Allgemeinen durch Färbung mit Ethidiumbromid auf Agarosegelen unter ultraviolettem Licht sichtbar gemacht (EDVINSSON, 2006).

### **2.3.3.3 Real Time-PCR**

Konventionelle PCR-Verfahren basieren auf der Endpunkt-Detektion der amplifizierten Produkte. Eine Darstellung der Reaktion von Beginn bis Ende mit dem Ziel einer Quantifizierung der Templatemenge ist nicht möglich (EDVINSSON, 2006). Die Real Time-PCR stellt in dieser Hinsicht einen erheblichen technologischen Fortschritt dar. Unter Verwendung fluoreszenzmarkierter Reportersonden kann hier die Entstehung spezifischer PCR-Produkte während der exponentiellen Phase der Amplifikation direkt im Reaktionsgefäß verfolgt werden (REISCHL et al., 2003b).

Den Grundstein für die Entwicklung der heutigen Real Time-PCR legten HIGUCHI et al. (1992, 1993), indem sie der Reaktion Ethidiumbromid (EtBr) zusetzten. Dieses Fluorophor bindet unspezifisch an doppelsträngige DNA und wird durch UV-Licht angeregt. Durch Ergänzung

der PCR-Maschine mit einer UV-Lampe und einer CCD-Kamera konnte die Fluoreszenz gemessen und so die Konzentration der Ziel-DNA bestimmt werden. Heutzutage werden andere interkalierende Farbstoffe verwendet, wobei zwischen solchen mit unspezifischer und spezifischer Interaktion mit der Ziel-DNA unterschieden wird. Ähnlich wie EtBr lagert sich SYBR<sup>®</sup>-Green unspezifisch in den DNA-Doppelstrang ein. Vorteil dieses Fluorophors ist zum Einen die hohe Signalstärke, da jedes DNA-Molekül mehrere Fluorophore binden kann, und zum Anderen die aufgrund der unspezifischen Bindung universelle Einsetzbarkeit in jede beliebige PCR. Die unspezifische Bindung führt allerdings dazu, dass keine Unterscheidung zwischen korrektem Produkt und Artefakt bzw. Primerdimeren möglich ist. Dies ist nur in einem nachgeschalteten Schritt mithilfe einer Schmelzkurvenanalyse möglich. Einen Fortschritt in dieser Hinsicht stellen spezifische Hybridisierungs sonden, wie die TaqMan<sup>®</sup>-Sonde, dar. Diese Sonden arbeiten mit einem zusätzlichen Oligonukleotid, der TaqMan<sup>®</sup>-Probe, die zwischen den beiden spezifischen Primern liegt. TaqMan<sup>®</sup>-Proben sind an ihrem 5'-Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff und einem intern eingebauten bzw. am 3'-Ende befindlichen Quencher ausgestattet. Solange die Sonde intakt ist, wird die Fluoreszenzemission des Reporters durch die Nähe des Quenchers unterdrückt. Kommt es im Rahmen der Neustrangsynthese zur Fragmentierung der TaqMan<sup>®</sup>-Probe durch die Taq-Polymerase, wird der Reporter vom Quencher gelöst, die Fluoreszenz des Reporters wird frei und somit messbar (WILFINGSEDER und STOIBER, 2002).

Unabhängig von der Art des verwendeten interkalierenden Farbstoffes steigt die Fluoreszenz proportional zur Produktmenge. Zu Beginn des PCR-Laufes ist die Reporterfluoreszenz aufgrund der noch geringen Templatekonzentration meist nicht nachweisbar und wird von der Hintergrundfluoreszenz überlagert. Derjenige PCR-Zyklus, bei dem die Reporterfluoreszenz die Basisfluoreszenz signifikant übersteigt, wird „cycle threshold“ (Schwellenwert-Zyklus, C<sub>T</sub>-Wert) genannt. Da zu diesem Zeitpunkt die Amplifikation exponentiell verläuft und noch keine limitierenden Faktoren (Primer-, Nukleotidmangel, nachlassende Enzymaktivität etc.) vorhanden sind, wird dieser Zyklus als Grundlage für die Quantifizierung anhand der Reaktionskinetik des PCR-Laufes herangezogen. Zusätzlich werden bekannte Templatemengen amplifiziert und daraus eine Standardkurve erstellt, mithilfe derer bei einem bestimmten C<sub>T</sub>-Wert auf die gesuchte Templatekonzentration geschlossen werden kann (WILFINGSEDER und STOIBER, 2002).

#### **2.3.3.4 Interne Amplifikationskontrolle**

Generell wird ein negatives PCR-Ergebnis dahingehend gedeutet, dass keine Erreger-DNA im Versuchsansatz enthalten war. Als Ursache müssen jedoch ebenfalls Fehlfunktionen und Inhibitionen in Betracht gezogen werden, da eine Vielzahl von Gründen (z.B. Instrumentenversagen, degradierte oder nicht funktionstüchtige Reagenzien, Fehler beim Herstellen des Reaktionsmixes, organische Lösungen oder andere PCR inhibitorische Substanzen in der extrahierten DNA) zum Scheitern einer PCR führen können (EDVINSSON, 2006).

Ist kein PCR-Zielprodukt vorhanden, erlaubt die Anwesenheit eines PCR-Kontrollproduktes die Unterscheidung zwischen richtig- und falsch-negativen Ergebnissen (ABDULMAWJOOD et al., 2002). Externe Amplifikationskontrollen werden von der eigentlichen Amplifikation separiert mitgeführt (EDVINSSON, 2006). Im Gegensatz dazu besteht die Interne Amplifikationskontrolle (IAC) aus einer nicht Ziel-DNA-Sequenz, die im selben Reaktionsgefäß amplifiziert wird wie die Ziel-DNA. Darüberhinaus wird zwischen kompetitiven (c) und nicht kompetitiven (n) IAC's unterschieden (EDVINSSON et al., 2006). Als nIAC kann prinzipiell jegliche DNA dienen, die durch ein anderes Primerpaar amplifiziert wird, als die Ziel-DNA (EDVINSSON, 2006). Im Gegensatz dazu wird die cIAC durch die selben Primer amplifiziert wie die Ziel-DNA, da sie aus den Primer bindenden Sequenzen der Selbigen besteht, die lediglich in der Mitte durch eine zusätzliche DNA-Sequenz ergänzt wird. Die cIAC wird als spezifischeres Kontrollsystem angesehen, da sie auf denselben diagnostischen Primern beruht und ein Zusatz weiterer Primer zudem nicht notwendig ist (EDVINSSON et al., 2006). Größere Mengen cIAC können allerdings als Konkurrenz für die Ziel-DNA zu einer verminderten Amplifikation und damit zu einer geringeren analytischen Sensitivität führen (EDVINSSON, 2006). EDVINSSON et al. (2006) stellten jedoch fest, dass bei Verwendung des hochrepetitiven 529-bp-Fragmentes der Einsatz einer cIAC nicht zu einer Verminderung der diagnostischer Leistung führt.

### 3. Material und Methoden

**Tabelle 17: Allgemeine Laborausstattung**

Gerät/Material	Typus	Firma
Dampfsterilisator	Typ Varioklav H+P 500 EP	H+P Labortechnik GmbH
Einmalhandschuhe	Touch NT-Nitril	Ansell
Einmalpapiertücher	<sup>1)</sup>	Torx
Falcon Tubes	/	Nerbe plus
Flächendesinfektionsmittel	Buraton® rapid	Schülke & Mayer
Glasfläschchen	Schraubverschluss (Vol. 25 ml)	Schott-Duran
Glasflasche	Schraubverschluss (Vol. 250 ml)	Schott-Duran
Gefrierschrank	GS 5203 Index 10 / 4000 342 Ausführung 001	Liebherr
Gefrierschrank	GS 5D 14A	Bosch
Kühl-Gefrierkombination	Glass line KGK 4055 Index 23	Liebherr
Kühlschrank	Typ Profi Line 200071 Ausführung 001	Liebherr
Kühl- und Gefrierzelle	168966	Grünzweig & Hartmann AG
Labor-Spülautomat	67883	Miele & Cie KG
Messkolben	DIN 12664 Genauigkeits- klasse A	
Messpipetten	1 und 10 ml	VWR International
Metallspatel	/	Roth
Moulinette	DPA1	Moulinex
Pipettierball	Peleusball	VWR International
Pinzetten	Präzision	Roth
Reinigungsautomat	25-06	Gilowy
Sicherheitsheitsschrank	2.22.925	Duperthal Sicherheitstechnik GmbH & CoKG
Skalpellgriff	/	Heyland
Skalpellklinge	/	Braun
Tiefkühlagertruhe	HFC 586 Top Freezer Nr. 51019566,	Kendro Laboratory Products GmbH
Tiefkühlzelle	4750 021	Viessmann Kältetechnik AG
Trockenschrank	FED 400	WTC Binder GmbH
Waage	PM 4600 Delta Range	Mettler
Waage	PL-1200	Mettler
Wasserbad	3041	Köttermann
Wasserbad	3043	Köttermann

<sup>1)</sup> keine Angabe

### 3.1 Etablierung der *T. gondii* *in vitro*-Kultur (Stamm ME 49)

Verwendung fand der aus tierischem Material isolierte *T. gondii*-Stamm ME 49, da dieser als Maus-apathogen und Zysten-bildend angesehen wird [freundlicherweise von Prof. Dr. Liesenfeld (Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Charité–Universitätsmedizin Berlin) in Form von Gehirnen infizierter NMRI-Mäuse zur Verfügung gestellt]. Die Toxoplasmen wurden im Institut für Parasitologie (Justus-Liebig-Universität Gießen) mithilfe der Pepsin-Verdauungsmethode nach DUBEY (1998a) aufgearbeitet und in VERO-Zellen kultiviert. Die aus dem Überstand gewonnenen Tachyzoiten wurden mehrfach in VERO-Zellen passagiert. Die ebenfalls im Institut für Parasitologie (Justus-Liebig-Universität Gießen) durchgeführte Überprüfung der Tachyzoiten erfolgte mittels konventioneller PCR nach JALAL et al. (2004).

**Tabelle 18: Material für die Etablierung der *T. gondii* *in vitro*-Kultur**

Gerät/Material	Typus	Firma
Gaze	/ <sup>1)</sup>	Klinikumsapotheke
Gehirne	<i>T. gondii</i> -infizierter BALB/c-Mäuse	Prof. Dr. Liesenfeld <sup>2)</sup>
Kryoröhrchen	/	Greiner
Mörser	/	Roth
Pasteurpipetten	/	Roth
Pepsin-Acid	2,6 g Pepsin, 5 g NaCL, 7 ml 37 %-ige HCL ad 500 ml	Roth
Pipetten	steril (5 ml)	Greiner
Pipetten	steril (10 ml)	Greiner
Pistill	/	Roth
Reaktionsgefäße	1,5 ml	Sarstedt
Reaktionsgefäße	0,5 ml	Greiner
<i>T. gondii</i> -Tachyzoiten ME 49	/	Institut für Parasitologie <sup>3)</sup>
Vero-Zellkulturen	/	/
Zellkulturflaschen	25 cm <sup>2</sup>	Greiner
Zellkulturflaschen	75 cm <sup>2</sup>	Greiner
Zellkulturmedium	RPMI/ 1 % Penicillin-Streptomycin	Biowest
Zellkulturmedium	RPMI/ 10 % FKS/ 1 % Penicillin- Streptomycin	Biowest
Zentrifugationsröhrchen	15 ml	Nunc
Zentrifugationsröhrchen	50 ml	Nunc

<sup>1)</sup> keine Angabe

<sup>2)</sup> Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Charité–Universitätsmedizin Berlin

<sup>3)</sup> Justus-Liebig-Universität Gießen



### 3.2 Entwicklung der Real Time-PCR

Für den qualitativen und quantitativen Nachweis von *T. gondii* in Rohwurst-Erzeugnissen und Mäusegeweben wurde ein Real Time-PCR-Verfahren, basierend auf dem Nachweis des 529-bp-Fragmentes sowie eine interne Amplifikationskontrolle entwickelt.

**Tabelle 19: Material für die Entwicklung und Durchführung der Real Time-PCR**

Gerät/Material	Typus/Volumina	Firma
Abzugsschrank	7593 F	Köttermann
Analysenwaage	BA210S-0D1 / MC BB 100	Sartorius AG
Analysenwaage	A 200 S	Sartorius AG
Aufbewahrungsbox	/ <sup>1)</sup>	Sarstedt
DNA Away	250 ml	Molecular Bio Products
DNA Blood and Tissue Kit	/	Quiagen
Dispergier und Emulgiergerät	T 25	Janke & Kunkel
Ultra Turrax		
Ethanol	/	Roth
Filter-Tipps	10, 200 und 1.000 µl	Nerbe Plus
Klebefolie	MicroAmp	Applied Biosystems
Lagerbox	/	Roth
Mettwurst	500 g	Rewe
PCR-Platte	für ABI PRISM	Nerbe plus
PCR-Reaktionsgefäßständer	/	Eppendorf
Petrischalen	mit und ohne Nocken	Nerbe plus
Plastikbeutel	/	Grade
Pipettenspitzen	10, 200 und 1.000 µl	Nerbe Plus
Pipetten	Reference, Research	Eppendorf
Reagenzgefäße	(1,5 und 2 ml)	Biozym, Nerbe Plus
Reagenzglasschüttler	VV3	VWR
Reagenzröhrchen	Flachboden (5 ml)	Nerbe Plus
Reaktionsgefäßgestell	/	Kartell
Real-Time Cycler	ABI PRISM 7000 Sequence	Applera
Ribolyser	FastPrep 120	SAVANT Instruments
Salami	500 g	Rewe
Schnitzelfleisch	500 g	Rewe
SiLibeads® Keramikkügelchen	/	Sigmund Lindner
TaqMan® Universal PCR	/	Applied Biosystems
Mastermix (2x)		
<i>T. gondii</i> -Erreger Suspension	3,4 x 10 <sup>7</sup> Tachyzoiten	Institut für Parasitologie <sup>2)</sup>
Teewurst	500 g	Rewe
UV-Kabinett	UVCIT-M-AR	Kiskar
Thermomixer	5436	Eppendorf
Thermomixer	Comfort	Eppendorf
Tischzentrifuge	5415C	Eppendorf
Wasserbad	1002	Gesellschaft für Labortechnik
Zentrifuge	Centrifuge 5403	Eppendorf

<sup>1)</sup> keine Angabe

<sup>2)</sup> Justus-Liebig-Universität Gießen

### **3.2.1 Herkunft und Herstellung der für die Etablierung der Real Time-PCR verwendeten *T. gondii*-Tachyzoiten**

Die für die Etablierung der Real Time-PCR benötigte *T. gondii*-DNA wurde von Frau Dr. A. Taubert (Institut für Parasitologie, Justus-Liebig-Universität Gießen) zur Verfügung gestellt. Hierfür wurden kryokonservierte Tachyzoiten des RH-Stammes intraperitoneal an BALB/c-Mäuse verabreicht und zweimalig passagiert. Im Anschluss an die letzte Verabreichung wurden die Tachyzoiten 48 Stunden später über Waschungen der Bauchhöhle gewonnen und zur Infektion von VERO-Zellen verwendet. Die Applikationsmenge betrug ca.  $5 \times 10^4$  Tachyzoiten pro  $\text{cm}^2$  geschlossenem Vero-Zellrasen. Die im Anschluss an die Wirtszellyse frei im Überstand befindlichen Tachyzoiten wurden nach zwei bis drei Tagen gewonnen, in einer Neubauer-Kammer gezählt und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert. Die Überprüfung der *in vitro*-generierten *T. gondii*-Tachyzoiten erfolgte mithilfe einer konventionellen PCR unter Amplifikation des spezifischen B1-Gens (JALAL et al., 2004) ebenfalls im Institut für Parasitologie (Justus-Liebig-Universität Gießen).

### **3.2.2 Entwicklung der Primer und Sonden**

Als *T. gondii*-spezifische Genabschnitte sind auf der Basis von Literaturrecherchen das B1-Gen und das 529-bp-Fragment ausgewählt und für die Etablierung der Real Time-PCR verwendet worden.

Die Oligonukleotidsequenzen der Primer des verwendeten B1-Gens wurden aus der Literatur übernommen (EDVINSSON et al., 2006). Die Entwicklung und Überprüfung der Oligonukleotid-Primer des 529-bp-Fragmentes sowie der Sonden erfolgte unter Verwendung der Computerprogramme MS-Oligo, Version 4.0, Primer Express® (Fa. Applied Biosystems) und des Softwarepaketes DNASTAR® (Fa. DNASTAR) sowie BLAST® [(National Center for Biotechnology Information (NCBI))].

Um eine zusätzliche Steigerung der Bindungsaffinität zu erzielen, wurde eine spezifische und fluoreszenzfarbstoffmarkierte Sonde im TaqMan®-Format ausgewählt. Hierbei wurde die Sonde am 5'-Ende mit einem minor groove binder (mgb)-Quencher gekoppelt und an das 3'-Ende der Sequenz wurde der Fluoreszenzfarbstoff FAM angehängt.

Die Primer wurden nach spezifischen, institutseigenen Angaben bei der Firma MWG Biotech in Auftrag gegeben; die Zustellung erfolgte in lyophilisierter Form. Nach Herstellerangaben wurden aus diesen Lyophilisaten (B1-IFTN-F/B1-IFTN-R und 529-bp-IFTN-F/529-bp-IFTN-R) mit Aqua dest. (für PCR-Zwecke) Stammlösungen mit einer Konzentration von 100 pmol/ $\mu$ l hergestellt. Die Lagerung bei -18 °C ermöglichte eine Verwendung über einen Zeitraum von mindestens einem Jahr.

Die TaqMan<sub>mgb</sub><sup>®</sup>-Sonden (Toxo-B1, Toxo-529-pb-repeat) wurden von der Firma Applied Biosystems bezogen. Direkt vor dem Gebrauch erfolgte die Verdünnung der TaqMan<sub>mgb</sub><sup>®</sup>-Sonden-Lösung von 100 auf 2  $\mu$ M mit Aqua dest. (für PCR-Zwecke).

Zur Überprüfung der Eignung der Oligonukleotidprimer für die Real Time-PCR-Analyse wurde zunächst SybrGreen<sup>®</sup> verwendet. Die genutzten Reagenzien sind in Form eines Fertigmastermixes als SybrGreen<sup>®</sup> PCR Core Reagents (Produkt-Nr.: 4304886, Fa. Applied Biosystems) verfügbar. Im Anschluss erfolgte die Austestung mithilfe der TaqMan<sub>mgb</sub><sup>®</sup>-Sonde; hier fand der 2x TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR Mastermix (Produkt-Nr.: 4304437, Fa. Applied Biosystems) Anwendung.

### DNA-Amplifikationstechniken

Die Beschickung der PCR-Reaktionsgefäße erfolgte räumlich getrennt von sonstigen Arbeitsschritten in UV-Kabinetten nach den in den *Tabellen 20 und 21* wiedergegebenen Protokollen. Bei SybrGreen<sup>®</sup> gestützten Amplifikationen kam das Quantitect SybrGreen<sup>®</sup> PCR Kit (Produkt-Nr. 204143, Fa. Qiagen) nach Angaben des Herstellers zur Anwendung (*Tabelle 20*).

#### A) Pipettierprotokoll: SybrGreen<sup>®</sup>

**Tabelle 20: Pipettierprotokoll für die Real Time-PCR unter Verwendung von SybrGreen<sup>®</sup>**

Zusätze	Pipettiermenge pro Ansatz
Aqua dest.	18,0 $\mu$ l
2x QuantiTect SybrGreen <sup>®</sup> PCR Mastermix	25,0 $\mu$ l
Polymerase-Puffer mit Mg <sup>2+</sup> (10x, Fa. Quiagen)	je 1,0 $\mu$ l
Primer: 529-bp-IFTN-3F/3R bzw-B1-F/B1-R	2,5 $\mu$ l
Ziel-DNA	47,5 $\mu$ l
Inhalt pro Reaktionsgefäß	

Bei der Verwendung von TaqMan® erfolgte die Verwendung des 2x TaqMan® Universal PCR Mastermixes (Produkt-Nr. 440 054, Fa. Applied Biosystems) nach Vorgaben des Herstellers.

### B) Pipettierprotokoll: TaqMan®

**Tabelle 21: Pipettierprotokoll für die Real Time-PCR unter Verwendung der TaqMan<sub>mgb</sub>®-Fluoreszenzsonde**

Zusätze	Pipettiermenge pro Ansatz
Aqua dest.	18,5 µl
TaqMan Universal PCR Mastermix (2x, Fa. Applied Biosystems)	25,0 µl
Primer: 529-bp-IFTN-3-F -R bzw. B1-F/-R	je 1,0 µl
TaqMan <sub>mgb</sub> ®-Fluoreszenzsonde: 529-bp-repeat bzw. B1-Gen	2,0 µl
Ziel-DNA	2,5 µl
Inhalt pro Reaktionsgefäß	50 µl

Die zur Anwendung gekommenen Thermocycler-Konditionen sind *Tabelle 22* zu entnehmen.

**Tabelle 22: Thermocycler-Konditionen der Real Time-PCR**

Thermocyclerprogramm	Temperatur	Zeit	Anzahl Zyklen	Thermocycler
initiale UNG-Inkubation	50 °C	2 min	1x	ABI Prism 7000
Initiale Denaturierung	95 °C	10 min	1x	
Denaturierung	95 °C	15 sec	} 45x	
Annealing/Extension	60 °C	1 min		

### 3.2.3 Herstellung der Kontrollen

Bei den TaqMan® Real Time-PCR-Untersuchungen der Fleisch-, Wurst- und Organproben wurden sowohl Aufbereitungs- als auch DNA-Kontrollen mitgeführt. Als negative Aufbereitungs-Kontrolle fand natives Schweinefleisch Anwendung, für die Positiv-Kontrolle wurde dieses mit *T. gondii*-haltiger Erregersuspension versetzt.

Zur Überprüfung des ordnungsgemäßen Ablaufs der Real Time-PCR wurde als Negativ-Kontrolle *Neospora caninum*-DNA (ein *T. gondii* sehr nahe verwandter Parasit) eingesetzt, als Positiv-Kontrolle diente *T. gondii*-DNA. Die Aufbereitung erfolgte mithilfe eines konventionellen DNA-Extraktionskits (DNeasy Blood and Tissue Kit, Fa. Quiagen). Zusätzlich wurden ein Aufbereitungs- und Mastermix-Leerwert mitgeführt.

### 3.2.4 Ermittlung der Sensitivität

Die Validierung der entwickelten Methodik erfolgte anhand von drei seriellen Verdünnungsreihen. Die Ausgangskonzentration betrug jeweils  $3,4 \times 10^7$  Tachyzoiten/ml. Zur Herstellung der Verdünnungsreihen wurden je Reagenzglas 9 ml Verdünnungslösung (DIN EN ISO 6887-1) vorgelegt. Anschließend wurde 1 ml der Erregersuspension in das erste Verdünnungslösung enthaltende Reagenzglas überführt. Dies ergab die Verdünnungsstufe  $10^{-1}$ . Von dieser Verdünnung wurde wiederum 1 ml in das zweite Reagenzgefäß überführt, um die Verdünnungsstufe  $10^{-2}$  zu erhalten. Die Erstellung der restlichen Verdünnungsreihe bis zur Stufe  $10^{-7}$  erfolgte analog. Zwischen den einzelnen Verdünnungsschritten wurden die Röhrchen durch Vortexen (ca. 20 sec) gut durchmischt. Aus jeder Verdünnungsstufe wurde 1 ml der Tachyzoitensuspension entnommen und abzentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde dann nach dem IFTN-Labor spezifizierten Arbeitsprotokoll zur *T. gondii*-DNA-Extraktion gemäß *Abbildung 13* (aufgrund der Einwaagemenge sind die lila gedruckten Volumina dieser Abbildung zu berücksichtigen) aufbereitet. Im Anschluss wurde die Verdünnungsreihe in die Real Time-PCR eingesetzt, um so die Sensitivität zu bestimmen.

### 3.2.5 Bestimmung der Nachweisgrenze und relativen Häufigkeit

Zur Bestimmung der Nachweisgrenze sowie der Nachweiswahrscheinlichkeit wurden drei Einmischversuche durchgeführt. Die hierfür benötigten Rohwurst-Erzeugnisse (Salami, Mett- und Teewurst) sowie die Schweinemuskulatur entstammten dem Lebensmittelhandel. Die Proben wurden zunächst in einer Moulinette einer Vorzerkleinerung unterzogen. Das so vorbereitete Material wurde im Verhältnis 1:1 mit Verdünnungslösung versetzt und solange im Ultra Turrax homogenisiert, bis eine für die folgenden Arbeitsschritte annehmbare Konsistenz erreicht war. Von jeder Probenart (Schweinemuskulatur, Salami, Mett- und Teewurst) wurden 7 x 9 g in Plastikbeutel eingewogen. Hierin erfolgte die artifizielle Kontamination mit den in *Punkt 3.2.4* hergestellten Verdünnungsreihen. Eingemischt wurde jeweils 1 ml der Verdünnungsstufen  $10^{-2}$  bis  $10^{-6}$ . An ein sorgfältiges Durchmischen der Proben schloss sich, jeweils im Doppelansatz, die Einwaage von 50 mg je Verdünnungsstufe und Probenart an. Hierbei wurde besondere Sorgfalt darauf verwendet, das Material für die Einwaage von verschiedenen Stellen zu entnehmen. Die eingewogenen Proben wurden nach dem IFTN-Labor spezifizierten Arbeitsprotokoll zur *T. gondii*-DNA-Extraktion aus Geweben gemäß *Abbildung 13* (aufgrund der Einwaagemenge sind die lila gedruckten Volumina dieser *Abbildung* zu berücksichtigen) aufbereitet. Im Anschluss erfolgte die Untersuchung mithilfe des Real Time-PCR-Verfahrens. Aus den  $C_T$ -Werten wurden die Nachweisgrenze und die relative Häufigkeit rechnerisch bestimmt.

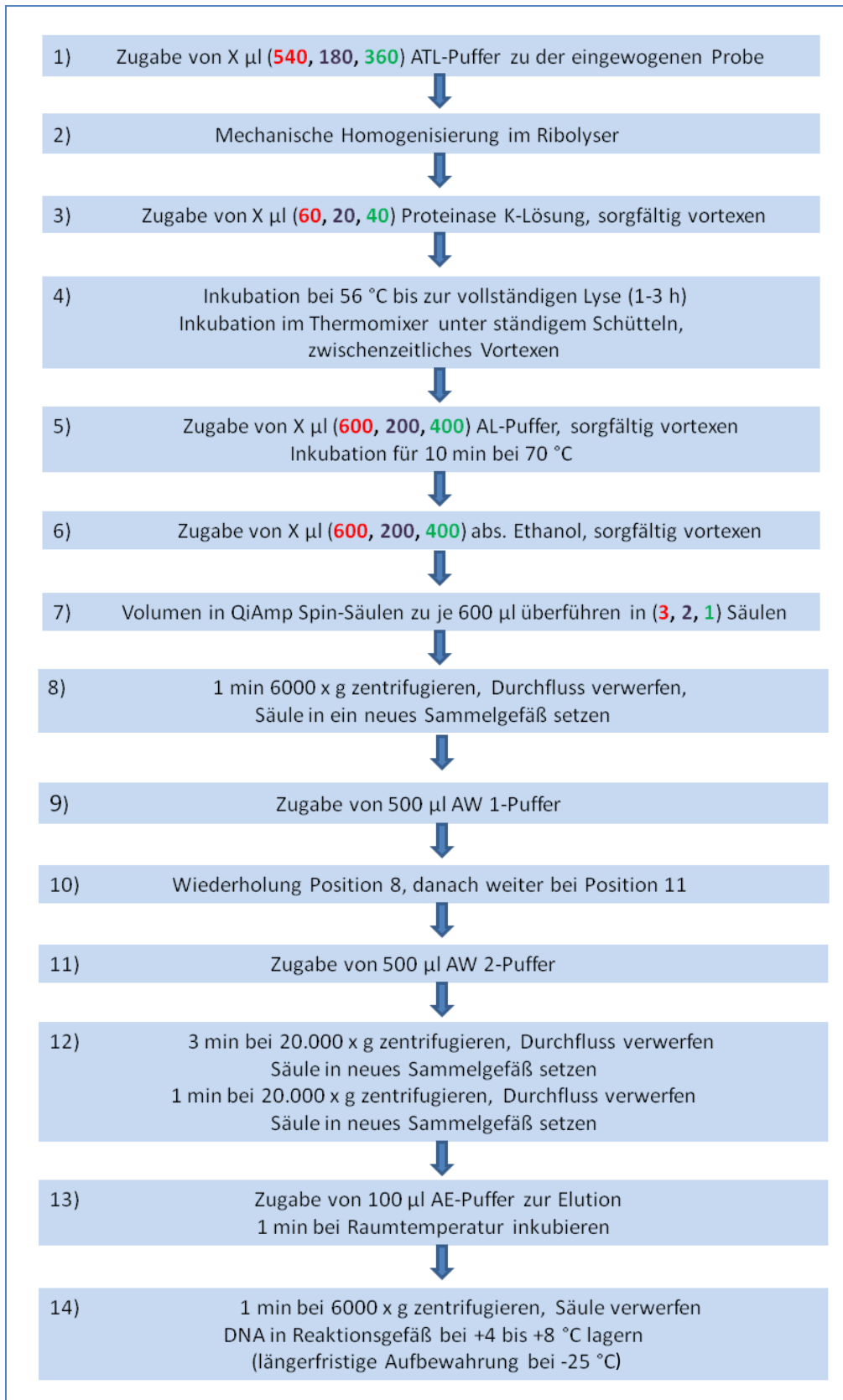


Abbildung 13: IFTN-spezifisiertes Arbeitsprotokoll zur Isolierung von *T. gondii*-DNA

### **3.2.6 Entwicklung der Internen Amplifikationskontrolle**

Die Entwicklung erfolgte mithilfe des kommerziell erhältlichen Plasmids pUC 19 in einem vorgeschalteten PCR-Verfahren (ABDULMAWJOOD et al., 2002), passend zu dem *T. gondii*-spezifischen Primerpaar 529-bp-IFTN-3-F und 529-bp-IFTN-3-R. Das dabei entstehende Amplifikat besitzt eine Größe von 101 Basenpaaren und wurde mit dem Quiaquick PCR Purification-Kit der Firma Qiagen nach dem entsprechend vorgeschriebenen Protokoll aufgereinigt und bei -18 °C gelagert. Das aufgereinigte Amplifikat konnte über einen Zeitraum von einem Jahr verwendet werden.

Die Gebrauchsverdünnung  $10^{-10}$  wurde in Reaktionsgefäße mit jeweils 100 µl TE - Puffer (pH 8) für PCR-Zwecke überführt und gelagert. Zur Visualisierung wurde in der Real Time-PCR eine entsprechende mit dem Fluoreszenzfarbstoff VIC markierte TaqMan-Sonde (Universal-IAK-TaqMan®-Sonde) verwendet.

### **3.2.7 Auswertung der Real Time-PCR-Ergebnisse**

Alle Signalkurven, die einen sigmoiden Verlauf zeigten und bei  $C_T$ -Werten  $\leq 40,00$  detektiert wurden, erzielten eine positive Bewertung. Als negativ beurteilt wurden Proben, die  $C_T$ -Werte  $> 40,00$  aufwiesen sowie Signalkurven, die unterhalb der Schwellenwertlinie (die Festlegung erfolgte automatisch durch die verwendete 7000 System SDS Software) lagen. Für ein auswertbares Ergebnis des Real Time-PCR-Laufes waren schlüssige Ergebnisse der Aufbereitungs- und DNA-Kontrollen Voraussetzung. Bei Einsatz der Internen Amplifikationskontrolle mussten negative Proben ein positives IAK-Signal aufzeigen; bei schwach-positiven Proben war sowohl ein positives Ergebnis, als auch das Ausbleiben einer Detektion der IAK möglich.



### 3.3 Schweine-Infektionsversuch

**Tabelle 23: Material für den Schweine-Infektionsversuch\***

Gerät/Material	Typus/Volumina	Firma
Ferkel	männlich, geboren 10.02.2007	Oberer Hardthof, Gießen
96-well-Platten	/ <sup>1)</sup>	Nunc
Cellognost Toxoplasmosis	H Testkit	Dade Behring
Digitales Fieberthermometer	/	Swiss Design
Einwegspritzen	10 ml	Sarstedt
Masthybrid	Absatzferkel	Oberer Hardthof, Gießen
Monovetten	9 ml	Sarstedt
Pipettenspitzen	/	Sarstedt
Reaktionsgefäße	1,5 ml	Sarstedt
Sterile Kanülen Lanzettenschliff	1,2 x 75 mm	TSK Supra
Treibbrett	120 x 76 cm	Siepmann
Zentrifugationsröhrchen	15 ml	Nunc

\*für den Tierversuch zuständige Behörde: Regierungspräsidium Gießen, Dezernat V 54-Veterinärwesen; zugehörige Ordnungsnummer:48/2006

<sup>1)</sup> keine Angabe

Zur Auswahl geeigneter Versuchstiere wurden serologische Untersuchungen durchgeführt. Die Blutentnahme erfolgte mit Einwegspritzen und –nadeln an der *Vena cava cranialis* unter Fixierung der Tiere mit einer Drahtschlinge. Nach Zentrifugation des geronnenen Blutes erfolgte die Untersuchung des Serums mit dem schnell durchzuführenden Immunhämagglutinationstest (IHAT) im Institut für Parasitologie (Justus-Liebig-Universität Gießen), sowie mithilfe des Western-Blots durch Dr. Schares (Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit).

Im Anschluss an die serologischen Untersuchungen wurden zwei Tiere im Alter von ca. drei Monaten intravenös in den Versuchstierstallungen des Institutes für Parasitologie (Justus-Liebig-Universität Gießen) (*Vena cava cranialis*) mit Einwegspritzen und –nadeln mit  $10^4$  *T. gondii*-Tachyzoiten infiziert. Als Inokulum wurden Tachyzoiten des *T. gondii*-Stammes ME 49 verwendet.

Zur Kontrolle des Infektionserfolges wurden weitere serologische Untersuchungen mithilfe des IHA (Institut für Parasitologie, Justus-Liebig-Universität Gießen) und des Western-Blots (Dr. Schares, Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit) durchgeführt. Überdies erfolgte eine Temperaturverlaufskontrolle über einen Zeitraum von drei Wochen. Die Messungen erfolgten ab dem Tag der Infektion, jeweils morgens und abends mit einem digitalen Fieberthermometer (als Nullwert diente die Normaltemperatur, gemessen am Tag vor der Infektion). Nach Erreichen des typischen Mastalters von ca. sechs

Monaten erfolgte die Tötung im Gießener Schlachthof. Die Tierkörperhälften verblieben zum Kühlen über Nacht in der Kühlkammer des Schlachtbetriebes und wurden am folgenden Morgen in die Fleisch- und Wursttechnologie des Institutes für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde überführt.

### 3.4 Produktion der Rohwurst-Erzeugnisse

**Tabelle 24: Material für die Produktion der Rohwurst-Erzeugnisse**

Gerät/Material	Typus/Volumina	Firma
AquaLab	CX-2	IUL Instruments GmbH
Ausbeinmesser	/ <sup>1)</sup>	Dick
Fleischwolf	Elektro-Wolf 106	Krämer & Grebe
Fleischmesser	/	Dick
Füllmaschine	20	Handtmann
Glukose	Dextrose	Enders
Gewürze: traditionelle Rezeptur	Nitritpökelsalz, weißer Pfeffer, gemahlene Muskatnuss, edelsüße Paprika, Kardamom, Ingwer	Enders
Gewürze: ökologische Rezeptur	weißer Pfeffer, Muskatnuss, edelsüße Paprika, Ingwer Meersalz Kardamom	Ulbricht Walter GmbH Rapunzel Naturkost AG Sonnentor GmbH
Knoblauch	frisch	Rewe
Klimakammer	T 1800 618	Fessmann
pH-Meter	pH 320	WTW
pH-Meter	inoLab pH 720	WTW
Black Level Jamaica Rum	73 %	Captain Morgan
Starterkulturen	T-SC 150, S-SX	Chr. Hansen GmbH
Schneidmischer	67/108/66	Krämer & Grebe
Universal-Laborkammer	ULK 1-0/E	Autotherm

<sup>1)</sup> keine Angabe

Zur Überprüfung der Überlebensfähigkeit von *T. gondii* in Bezug auf die lebensmitteltechnologischen Verfahren der Rohwurst-Herstellung und -Reifung wurden verschiedene Rohwurst-Erzeugnisse produziert. Eine Chargenübersicht ist *Tabelle 25* zu entnehmen.

**Tabelle 25: Übersicht über die im IFTN hergestellten Rohwurst-Chargen**

Chargen (je 10 kg)	Produktions- Datum	Schwein I		Schwein II	
		Traditionell	Ökologisch	Traditionell	Ökologisch
Mettwurst	08.08.2007	Sw <sup>1)</sup> 1CH <sup>2)</sup> 1	Sw1CH2	Sw2CH1	Sw2CH2
Teewurst	09.08.2007	Sw1CH3	Sw1CH4	Sw2CH3	Sw2CH4
Salami	10.08.2007	Sw1CH5	Sw1CH6	Sw2CH5	Sw2CH6

<sup>1)</sup> Schwein

<sup>2)</sup> Charge

Nach dem Eingang der Tierkörperhälften in der institutseigenen Technologie wurden diese zerlegt und das Fleisch für die einzelnen Produkte vorsortiert. Dabei wurde besonderes Augenmerk darauf gerichtet, möglichst bei jeder Charge Fleisch von sämtlichen Körperpartien zu verwenden. Bis zur weiteren Verarbeitung in den folgenden Tagen erfolgte die Lagerung im Kühlhaus bei +2 °C. Die genauen Rezepturen sowie die Arbeitsanweisungen sind *Anhang I* zu entnehmen.

Zur Überprüfung der Rohwurst-Reifung wurden verschiedene Parameter erhoben. Für alle Chargen erfolgte die Aufzeichnung der pH-Werte in Abhängigkeit von der jeweiligen Messtemperatur in verschiedenen Reifestadien. Bei der Salami wurde zusätzlich eine  $a_w$ -Wert-Bestimmung zur Kontrolle der Abtrocknung durchgeführt.

### 3.5 Mäuse-Infektionsversuch

**Tabelle 26: Material für den Mäuse-Infektionsversuch**

Gerät/Material	Typus/Volumina	Firma
BALB/c Mäuse	weiblich, Liefergewicht [Juli] 17-20 g	Charles River
CO <sub>2</sub> -Gas	/ <sup>1)</sup>	/
Ethanol	/	Roth
Pasteurpipetten	/	Roth
Pinzette	/	/
Reagenzgefäße	1,5 ml	Sarstedt
Reisszwecken	/	/
Schere	/	/
Steckbrett	/	OBI
Tierversuchsboxen	/	/

\*für den Tierversuch zuständige Behörde: Regierungspräsidium Gießen, Dezernat V 54-Veterinärwesen; zugehörige Ordnungsnummer:48/2006

<sup>1)</sup> keine Angabe

Die in der institutsinternen Fleisch- und Wursttechnologie produzierten Rohwurst-Chargen wurden an BALB/c-Mäuse verfüttert. Jeweils acht Tiere bildeten eine Versuchsgruppe mit dem gleichen Inokulum. Jede Rohwurst-Charge (Teewurst, Mettwurst, Salami; jeweils handwerklich und ökologisch) wurde in drei unterschiedlichen Reifestadien an die Tiere verfüttert. Zusätzlich wurden eine Negativ- (Gruppe eins) und eine Positiv-Kontrollgruppe (Gruppe zwei) sowie je eine Versuchsgruppe pro Versuchsschwein (Gruppen drei und vier) zur Überprüfung der Infektiosität der rohen Muskulatur mitgeführt. Für die Positiv-Kontrollen wurden die entsprechenden Versuchstiere über Verabreichung von jeweils acht *Toxoplasma*-Gehirnzysten peroral infiziert, Negativkontrollen erhielten dagegen PBS (Phosphate Buffered Saline). Eine genaue Auflistung des Inokulationschemas ist *Tabelle 27* zu entnehmen.

Im Institut für Parasitologie (Justus-Liebig-Universität Gießen) wurden die Mäuse vor und nach der Inokulation des jeweiligen Testmaterials zu je acht Tieren in einem Käfig auf Sägespäneinstreu in klimatisierten Räumen (20 °C, rel. Luftfeuchte ca. 70 %) gehalten und mit Standardfutter und Trinkwasser *ad libitum* versorgt. Die Inokulation der Versuchsgruppen verlief über vier Tage. Am jeweils ersten Tag wurden die ansonsten in den Versuchsgruppen zusammengehaltenen Tiere einzeln gesetzt und für 24 Stunden nüchtern belassen. Am zweiten und dritten Tag erfolgte die orale Verfütterung von 6 g Rohwurst pro Versuchsaus. Hierbei wurde die Wurst als Stück in die Versuchsbox gelegt und von der

Maus bereitwillig aufgenommen. Während dieser Inokulationsphase stand den Tieren neben der Rohwurst und Wasser *ad libitum* keine andere Nahrungsquelle zur Verfügung. Am vierten Tag folgte die Wiedereingliederung in die Gruppe mit Umstellung auf das ansonsten übliche Futter.

In den nächsten 40 bis 50 Tagen wurden die Tiere in ihren Gruppen belassen. Die sich anschließende Tötung erfolgte unter Kohlendioxid-Narkose. Nach Erreichen der Bewusstlosigkeit wurden die Tiere mit Genickbruch getötet, mit Reißnägeln auf einem Korkbrett fixiert und die Organe zeitnah mit Schere und Pinzette entnommen. Nach der Organentnahme wurden die Tierkörper unschädlich beseitigt.

**Tabelle 27: Übersicht über Inokulationsart und –datum der Mäuse-Versuchsgruppen sowie den Tötungszeitpunkt**

Gr <sup>1)</sup>	Inokulum	Zeitpunkt <sup>2)</sup>	Inokulation	Tötung
1	Negativkontrolle (PBS)	/ <sup>3)</sup>	06.-09.08.2007	24.09.2007
2	Positivkontrolle (Gehirnzysten)	/	06.-09.08.2007	24.09.2007
3	Muskelprobe Schwein 1	/	06.-09.08.2007	24.09.2007
4	Muskelprobe Schwein 2	/	06.-09.08.2007	24.09.2007
5	Mettwurst/Handwerk Schwein 1	Prod. <sup>4)</sup>	07.-10.08.2007	26.09.2007
6	Mettwurst/Ökologisch Schwein 1	Prod.	07.-10.08.2007	26.09.2007
7	Mettwurst/Handwerk Schwein 2	Prod.	07.-10.08.2007	26.09.2007
8	Mettwurst/Ökologisch Schwein 2	Prod.	07.-10.08.2007	26.09.2007
9	Teewurst/Handwerk Schwein 1	Prod.	08.-11.08.2007	27.09.2007
10	Teewurst/Ökologisch Schwein 1	Prod.	08.-11.08.2007	27.09.2007
11	Teewurst/Handwerk Schwein 2	Prod.	08.-11.08.2007	27.09.2007
12	Teewurst/Ökologisch Schwein 2	Prod.	08.-11.08.2007	27.09.2007
13	Salami/Handwerk Schwein 1	Prod.	09.-12.08.2007	01.10.2007
14	Salami/Ökologisch Schwein 1	Prod.	09.-12.08.2007	01.10.2007
15	Salami/Handwerk Schwein 2	Prod.	09.-12.08.2007	01.10.2007
16	Salami/Ökologisch Schwein 2	Prod.	09.-12.08.2007	01.10.2007
17	Mettwurst/Handwerk Schwein 1	IVK <sup>5)</sup>	09.-12.08.2007	01.10.2007
18	Mettwurst/Handwerk Schwein 2	IVK	09.-12.08.2007	01.10.2007
19	Teewurst/ Handwerk Schwein 1	IVK	10.-13.08.2007	01.10.2007
20	Teewurst/ Handwerk Schwein 2	IVK	10.-13.08.2007	01.10.2007
21	Mettwurst/Ökologisch Schwein 1	IVK	12.-15.08.2007	04.10.2007
22	Mettwurst/Ökologisch Schwein 2	IVK	12.-15.08.2007	04.10.2007
23	Teewurst/Ökologisch Schwein 1	IVK	13.-16.08.2007	04.10.2007
24	Teewurst/Ökologisch Schwein 2	IVK	13.-16.08.2007	04.10.2007
25	Salami/Handwerk Schwein 1	IVK	17.-20.08.2007	09.10.2007
26	Salami/Handwerk Schwein 2	IVK	17.-20.08.2007	09.10.2007
27	Salami/Ökologisch Schwein 1	IVK	21.-24.08.2007	09.10.2007
28	Salami/Ökologisch Schwein 2	IVK	21.-24.08.2007	09.10.2007
29	Mettwurst/Handwerk Schwein 1	MHD <sup>6)</sup>	21.-24.08.2007	09.10.2007
30	Mettwurst/Ökologisch Schwein 1	MHD	21.-24.08.2007	09.10.2007
31	Mettwurst/Handwerk Schwein2	MHD	21.-24.08.2007	10.10.2007
32	Mettwurst/Ökologisch Schwein 2	MHD	21.-24.08.2007	10.10.2007
33	Teewurst/Handwerk Schwein 1	MHD	22.-25.08.2007	10.10.2007
34	Teewurst/Ökologisch Schwein 1	MHD	22.-25.08.2007	10.10.2007
35	Teewurst/Handwerk Schwein 2	MHD	22.-25.08.2007	10.10.2007
36	Teewurst/Ökologisch Schwein 2	MHD	22.-25.08.2007	10.10.2007
37	Salami/Handwerk Schwein 1	MHD	06.-09.09.2007	24.10.2007
38	Salami/Ökologisch Schwein 1	MHD	06.-09.09.2007	24.10.2007
39	Salami/Handwerk Schwein 2	MHD	06.-09.09.2007	24.10.2007
40	Salami/Handwerk Schwein 2	MHD	06.-09.09.2007	24.10.2007

1) Gruppennummer

2) Verfütterungszeitpunkt

3) kein Verfütterungszeitpunkt

4) Produktionstag

5) Tag des theoretischen In-Verkehr-Bringens

6) Ende des Mindesthaltbarkeitsdatums

### 3.6 Nachweis von *T. gondii* mittels Real Time-PCR

Der Nachweis der *T. gondii*-DNA in Schweinefleischproben, Rohwurst-Erzeugnissen und Mäuseorganen erfolgte mit der unter *Punkt 3.2* dargestellten Real Time-PCR.

**Tabelle 28: Material für den Nachweis von *T. gondii* mittels Real Time-PCR**

Gerät/Material	Typus/Volumina	Firma
Abzugsschrank	7593 F	Köttermann
Analysewaage	A 200 S	Sartorius
Aufbewahrungsbox	/ <sup>1)</sup>	Sarstedt
DNA Away	250 ml	Molecular Bio Products
DNA Blood and Tissue Kit	/	Quiagen
Dispergier- und Emulgiergerät Ultra Turrax	T 25	Janke & Kunkel
Ethanol	/	Roth
Filter-Tipps	Volumina: 10, 200, 1.000 µl	Nerbe Plus
Klebefolie	MicroAmp	Applied Biosystems
Lagerbox	/	Roth
Mettwurst	500 g	Rewe
PCR-Platte	für ABI PRISM	Nerbe Plus
PCR-Reaktionsgefäßständer	/	Eppendorf
Petrischale	mit und ohne Nocken	Nerbe Plus
Plastikbeutel	steril und ohne Filter	Grade
Pipetten	Reference, Research	Eppendorf
Pipettenspitzen	10, 200, 1.000 µl	Nerbe Plus
Reagenzgefäße	1,5 und 2 ml	Biozym
Reagenzgefäße	1,5 und 2 ml	Nerbe Plus
Reagenzglasschüttler	VV3	VWR
Reagenzröhrchen	Flachboden (5 ml)	Nerbe Plus
Reaktionsgefäßgestell	/	Kartell
Real-Time Cycler	ABI PRISM 7000 Sequence	Applera
Ribolyser	FastPrep 120	SAVANT Instruments
TaqMan Universal PCR Mastermix (2x)	/	Applied Biosystems
Salami	500 g	Rewe
Schnitzfleisch	500 g	Rewe
SiLibeads® Keramikkügelchen	/	Sigmund Lindner
<i>T. gondii</i> -Erreger Suspension	1 ml á 3,4 x 10 <sup>7</sup> Tachyzoiten	Institut für Parasitologie
Teewurst	500 g	Rewe
UV-Kabinett	UVCIT-M-AR	Kiskar
Thermomixer	5436	Eppendorf
Thermomixer	Comfort	Eppendorf
Tischzentrifuge	5415C	Eppendorf
Wasserbad	1002	Labortechnik GmbH
Zentrifuge	Centrifuge 5403	Eppendorf

<sup>1)</sup> keine Angabe

### **3.6.1 Methodik des Erregernachweises in Schweine-Geweben**

Um sicherzustellen, dass die intravenöse Infektion der Versuchsschweine zu einer Zystenbildung geführt hat, wurden direkt im Anschluss an die Schlachtung aus zehn verschiedenen Körperregionen jeweils ca. 3 cm<sup>3</sup> große Gewebeproben entnommen. Diese wurden zunächst mithilfe von Pinzette und Skalpell grob zerkleinert und anschließend im Ultra Turrax homogenisiert. Um einer zu großen Hitzeeinwirkung entgegenzuwirken und eine für die folgenden Arbeitsschritte vorteilhafte Konsistenz zu erzielen, erfolgte eine Verdünnung der Proben mit Verdünnungslösung (DIN EN ISO 6887-1) im Verhältnis 1:1. Aus diesen Aufbereitungs-Homogenisaten wurden jeweils 150 mg in Reaktionsgefäße eingewogen und diese nach dem IFTN-Labor spezifizierten Arbeitsprotokoll zur *T. gondii*-DNA-Extraktion aus Geweben aufbereitet (*Abbildung 13*; Volumina rot gedruckt). Hierbei wurde besondere Sorgfalt darauf verwendet, Material von verschiedenen Entnahmestellen für die Einwaage zu berücksichtigen. Bei der Überführung der Probe auf die Spin-Columns erfolgte eine Aufteilung des Volumens auf drei Säulen, so dass pro entnommener Probe drei PCR-Ansätze untersucht werden konnten. Das erhaltene Eluat wurde in der Real Time-PCR auf das Vorhandensein von *T. gondii*-DNA untersucht.

### **3.6.2 Methodik des Erregernachweises in Rohwurst-Erzeugnissen**

Sämtliche Rohwurst-Chargen wurden mithilfe der Real Time-PCR auf das Vorhandensein von *T. gondii*-DNA untersucht. Hierfür erfolgte direkt im Anschluss an die Herstellung eine grobe Vorzerkleinerung des Bräts der einzelnen Chargen unter Zuhilfenahme von Pinzette, Skalpell und Schere. Das so vorbereitete Material wurde im Verhältnis 1:1 mit Verdünnungslösung versetzt und solange im Ultra Turrax homogenisiert, bis eine für die folgenden Arbeitsschritte annehmbare Konsistenz erreicht war.

Von jeder Rohwurst-Charge wurden 3 x 15 g Wurstbrät (Aufbereitungen Ia, Ib, Ic) eingewogen. Aus diesen Aufbereitungen wurden jeweils 2 x 50 mg Probenmaterial in Reagenzgefäße überführt und diese nach dem IFTN-Labor-spezifizierten Arbeitsprotokoll zur *T. gondii*-DNA-Extraktion aus Geweben aufbereitet (die Vorgehensweise entspricht der Darstellung in *Abbildung 13*, Volumina lila gedruckt). Da nicht in allen Chargen im ersten



Versuchsdurchgang positive Ergebnisse erzielt werden konnten, wurden unter Beibehaltung der Aufbereitungs-Methodik weitere Ansätze homogenisiert und untersucht.

### 3.6.3 Methodik des Erregernachweises in Mäuse-Geweben

Die aus den Mäusen entnommenen Organe (Gehirn, Herz, Milz) wurden am Tag der Entnahme zeitnah mit Skalpell und Pinzette in einem Petrischalen-Deckel zerkleinert, homogenisiert und in Reagenzgefäße (1,5 ml) überführt.

Es wurden je Maus 50 mg Herz- und Gehirn- sowie 20 mg Milzgewebe eingewogen (die Einwaagemenge richtete sich nach der Herstelleranweisung der Firma Quiagen). Die geringere Milzeinwaage erklärt sich aus dem höheren Zell- und damit DNA-Gehalt dieses Organs.

Die so vorbereiteten Proben wurden in Reagenzgefäßen mit Keramik-Kügelchen (zur besseren mechanischen Aufbereitung) zwischenzeitlich tiefgefroren und bis zur endgültigen Bearbeitung bei -25 °C gelagert.

Nach dem Auftauen erfolgte die Aufbereitung der Proben nach dem IFTN-Labor-spezifizierten Arbeitsprotokoll zur *T. gondii*-DNA-Extraktion aus Geweben (die Vorgehensweise entspricht der Darstellung in *Abbildung 13*, Volumina grün gedruckt).

Die Probenbezeichnung ist am Beispiel der ersten Versuchsmaus der ersten Gruppe exemplarisch dargestellt (*Tabelle 29*). Für alle weiteren Untersuchungsproben gilt dies analog.

**Tabelle 29: Beispielhafte Darstellung der Probenbezeichnung der Versuchsmäuse**

Gruppe	Tier Nr.	Organ	PCR-Kennzeichnung
1	1	Hirn	Gr <sup>1)</sup> 1 Ms <sup>2)</sup> 1 Hi <sup>3)</sup> A <sup>4)</sup>
	1		Gr1 Ms1 Hi B <sup>5)</sup>
	1	Herz	Gr1 Ms1 He <sup>6)</sup> A
	1		Gr1 Ms1 He B
	1	Milz	Gr1 Ms1 Mz <sup>7)</sup> A
	1		Gr1 Ms1 Mz B

<sup>1)</sup> Gruppe  
<sup>5)</sup> Ansatz B

<sup>2)</sup> Maus  
<sup>6)</sup> Herz

<sup>3)</sup> Hirn  
<sup>7)</sup> Milz

<sup>4)</sup> Ansatz A

### 3.7 Nachweis von Antikörpern gegen *T. gondii* mithilfe des Western-Blot-Verfahrens

Zusätzlich zu den Real Time-PCR-Untersuchungen wurden die Seren der 320 Versuchsmäuse sowie der beiden Schweine auch mithilfe des Western-Blot-Verfahrens auf eine stattgefundene Infektion überprüft (freundlicherweise durchgeführt von Dr. Schares, Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit).

Der RH-Stamm von *T. gondii* (SABIN, 1941) wurde in Vero-Zellkulturen etabliert und aufgereinigt (SCHARES et al., 1998, 1999). Die auf diese Weise gewonnenen Tachyzoiten wurden bis zur Verwendung für den Immunoblot bzw. die Antigenaufreinigung bei -80 °C in Pelletform tiefgefroren.

Die Gewinnung und Aufreinigung des für den Immunoblot benötigten Oberflächenantigens p 30 (TgSAG1) von *T. gondii* erfolgte mittels Affinitätschromatographie unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers P 30/3 (ISL, UK) (SCHARES et al., 2000).

Die Durchführung des Immunoblots fand wie bei SCHARES et al., 1998 beschrieben statt. Das aufgereinigte P 30 (0,05 µg) von *T. gondii* wurde in nicht reduzierendem Puffer (2 % [w/v] Sodium Dodecyl Sulfat (SDS), 10 % [v/v] Glycerol, 62 mM TrisHCL, pH 6,8) für eine Minute (94 °C) inkubiert, danach in 12 %-igem SDS-Polyacrylamid-Minigel (60 x 70 x 1) separiert und anschließend auf PVDF-Membrane (Immobilon-P, Millipore) übertragen. Nach der Übertragung wurden die Membrane mit PBS-TG (PBS mit 0,05 % [Tween 20 (Sigma) und 2 % [v/v] flüssiger Fisch-Gelatine (Serva, Deutschland)) geblockt und in 50 Streifen geschnitten.

Zum Nachweis der Antikörper gegen die *T. gondii*-Tachyzoiten-Antigene wurden die Westernblot-Streifen - wie für *Neospora caninum* beschrieben (SCHARES et al., 1998) - behandelt. Die Seren wurden 1:10 in PBS-TG verdünnt. Als Positivkontrolle diente das Serum einer experimentell mit *T. gondii*-infizierten Maus (Daten nicht publiziert). Seren mit einer Einzelbande von 30 kDa wurden als reaktiv gewertet. Für alle Immunoblots fanden mit Peroxidase konjugierte „Affini Pure goat anti-mouse IgG (H + L)“ (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA, USA) mit 1:250 PBS-TG verdünnt, Anwendung (persönliche Mitteilung Dr. Schares, Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit).

### **3.8            Statistische Auswertung**

Die Datenhaltung und –auswertung sowie die Erstellung der grafischen Abbildungen im Rahmen der Ergebnispräsentation erfolgte auf den Rechnern im lokalen Rechnernetzwerk (LAN) der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen. Die statistischen Auswertungen wurden mit Hilfe des Statistikprogrammpakets BMDP/Dynamic, Release 7.0 (DIXON, 1993), sowie der LOGXACT-TURBO Software (MEHTA und PATEL, 1992) durchgeführt. Dabei kamen in Anlehnung an den Versuchsplan die Verfahren der multiplen logistischen Regression mit drei Einflussfaktoren (BMDPLR, DIXON, 1993), der multiplen exakten logistischen Regression (LOGXACT-TURBO, MEHTA und PATEL, 1992) sowie der exakte Test von Fischer (ACKERMANN, 1998) zur Anwendung.

Bei der Bewertung der statistischen Signifikanzen wurde das Signifikanzniveau  $\alpha = 0,05$  zugrunde gelegt, d. h. Ergebnisse mit  $p \leq 0,05$  wurden als statistisch signifikant angesehen. Zusätzlich wird soweit möglich der errechnete p-Wert angegeben (Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung, Justus-Liebig-Universität Gießen).

## **4. Ergebnisse**

### **4.1 Etablierung der *T. gondii* in vitro-Kultur (Stamm ME 49)**

Die von Prof. Dr. Liesenfeld (Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Charité–Universitätsmedizin Berlin) zur Verfügung gestellte *T. gondii* ME 49-Charge konnte im Institut für Parasitologie (Justus-Liebig-Universität Gießen) erfolgreich in Zellkultur etabliert werden. Die gewonnenen Tachyzoiten wurden daraufhin in selbigem Institut mittels einer konventionellen PCR unter Amplifikation des spezifischen B1-Gens (nach JALAL et al. (2004)) überprüft und nach erfolgreicher Bestätigung zur Infektion der Versuchsschweine verwendet.

### **4.2 Entwicklung der Real Time-PCR**

#### **4.2.1 Herkunft und Herstellung der für die Etablierung der Real Time-PCR verwendeten *T. gondii*-Tachyzoiten**

Die zur Etablierung der Real Time-PCR sowie zur Herstellung der positiven Aufbereitungskontrollen für die Durchführung der Untersuchungen benötigte *T. gondii*-DNA (RH-Stamm) wurde von Frau Dr. A. Taubert (Institut für Parasitologie, Justus-Liebig-Universität Gießen) zur Verfügung gestellt. Die in vorgenanntem Institut vorgenommene Überprüfung der Toxoplasmen erfolgte unter Amplifikation des spezifischen B1-Gens mithilfe der konventionellen PCR nach JALAL et al. (2004). Als Ergebnis wurde ein Amplifikat mit der erwarteten Größe von 469 bp erhalten. Die als Negativ-Kontrolle mitgeführte *Neospora caninum*-DNA wurde nicht amplifiziert.

#### **4.2.2 Entwicklung der Primer und Sonden**

Auf der Basis von Literaturrecherchen wurden das B1-Gen und das 529-bp-Fragment von *T. gondii* als Grundlage für die Primer und Sonden verwendet. Die verwendeten Oligonukleotidsequenzen sowie die zugehörigen Amplifikatgrößen sind den *Tabellen 30* und *31* zu entnehmen.

**Tabelle 30: Primer- und Sondensequenzen des B1-Gens**

Primer	Zielgen	Sequenz	Größe	Amplifikat	Referenz
B1-F (Vorwärtsprimer)	B1-Gen <sup>1)</sup>	5'-CGTCCGTCGTAATATCAG-3'	18mer	103 bp	Edvinsson et al., 2006
B1-R (Rückwärtsprimer)		5'-GACTTCATGGGACGATATG-3'	19mer		Edvinsson et al., 2006
B1-Gene-TaqMan <sup>®</sup> -Sonde		VIC- CTGTTTCGCTGTCTGTCT-mgb <sup>®</sup>	17mer		Eigene Entw.

<sup>1)</sup> Bezogen auf das B1-Gen (Genbank-Zugriffs-Nr. AF179871)

**Tabelle 31: Primer -und Sondensequenzen des 529-bp-Fragmentes**

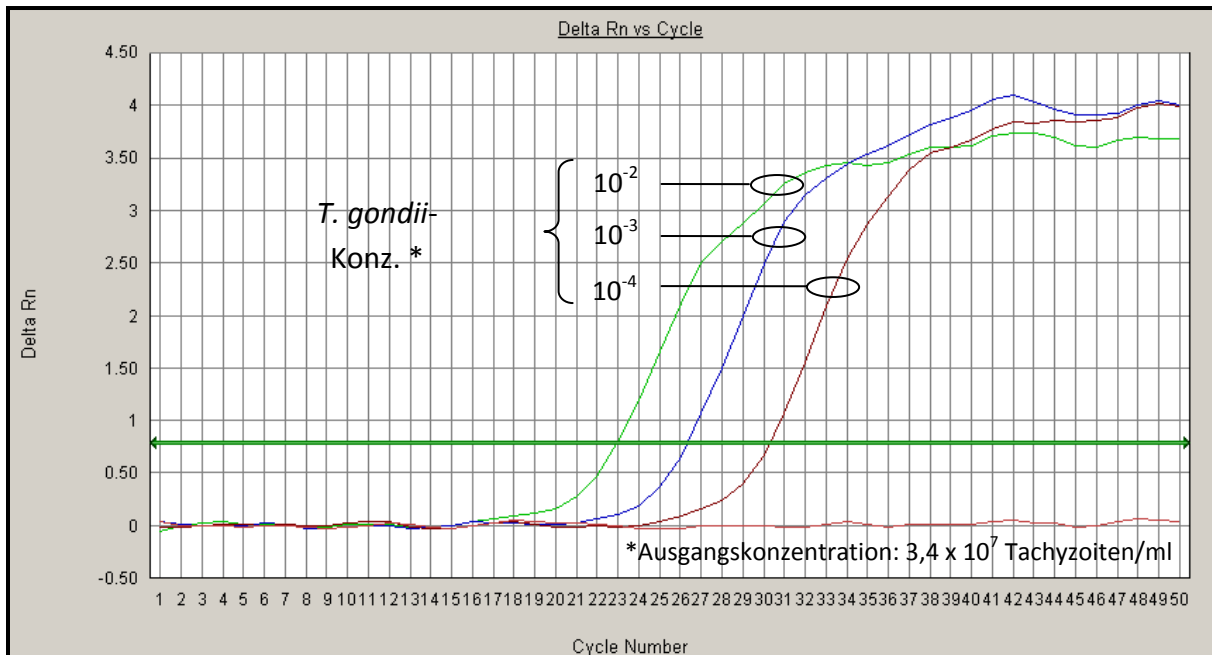
Primer	Zielgen	Sequenz	Größe	Amplifikat	Referenz
529-bp-IFTN-3-F (Vorwärtsprimer)	529-bp-repeat <sup>1)</sup>	5'-GTCGGAGAGGGAGAAGATGTTTC-3'	23mer	92 bp	Eigene Entw.
529-bp-IFTN-3-R (Rückwärtsprimer)		5'-AAAGCGTCGTCTCGTCTGGAT-3'	21mer		
529-bp-repeat-Gene-TaqMan <sup>®</sup> -Sonde		FAM-CTTGGCTGCTTTTC-mgb <sup>®</sup>	14mer		
Universal-IAK-TaqMan <sup>®</sup> -Sonde		VIC-CGAGTTACATGATCCC-mgb <sup>®</sup>	16mer		

<sup>1)</sup> Bezogen auf das 529-bp-Fragment (Genbank-Zugriffs-Nr. AF146527)

Die Sequenzüberprüfung des in den Real Time-PCR-Untersuchungen eingesetzten 529-bp-Fragmentes erfolgte mithilfe der BLAST<sup>®</sup> (Basic Local Alignment Search Tool) Computersoftware im Internet. Sowohl der Forward als auch der Reverse Primer zeigten nur für die Spezies *T. gondii* eine 100 %-ige Übereinstimmung. Als zusätzliches Oligonukleotid wurde die TaqMan<sub>mgb</sub><sup>®</sup>-Sonde für die Real Time-PCR verwendet.

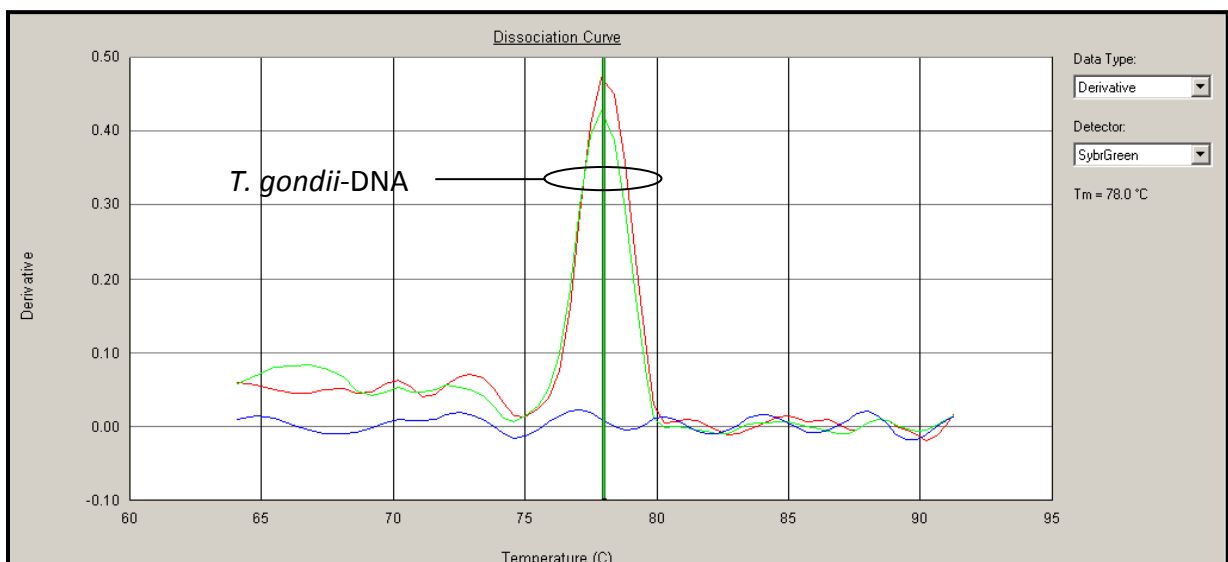
Neben der Sequenzüberprüfung wurde die Eignung der Oligonukleotidprimer (B1-Gen und 529-bp-Fragment) für die Real Time-PCR zunächst mit SybrGreen<sup>®</sup> überprüft. Im Anschluss erfolgte die Austestung mittels der TaqMan<sup>®</sup>-Sonde.

Abbildung 14 zeigt die spezifische Amplifikation verschiedener *T. gondii*-Tachyzoitensuspensions-Konzentrationen mittels der entwickelten Oligonukleotidprimer für das B1-Gen unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes SybrGreen<sup>®</sup>.



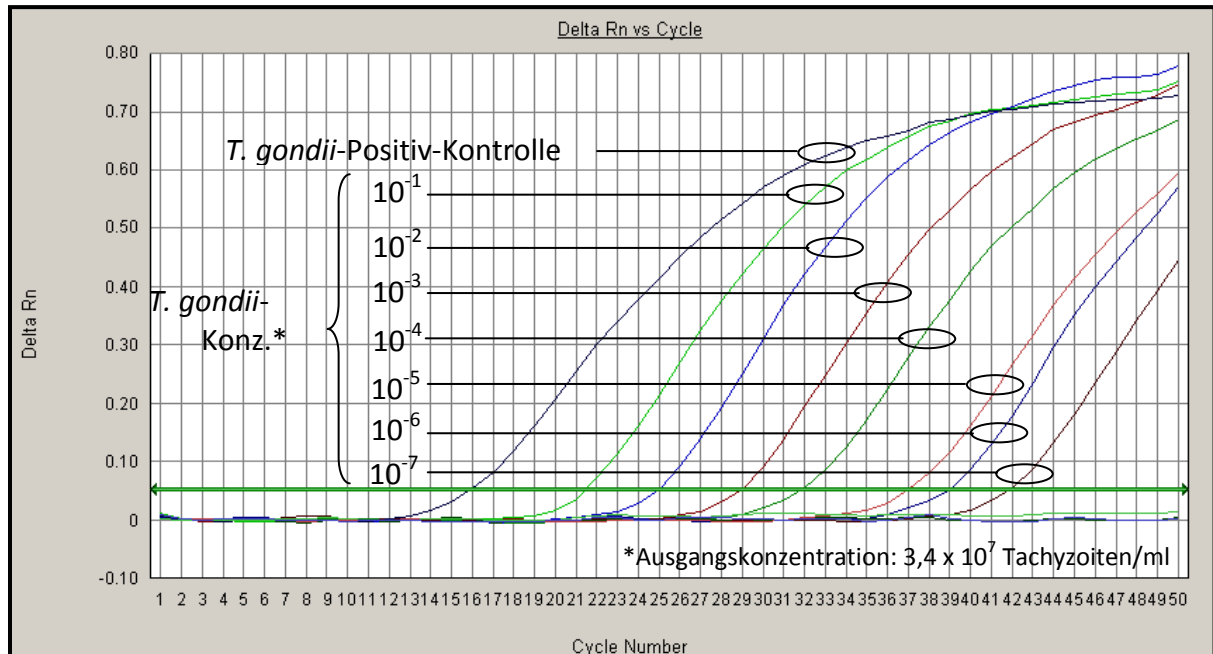
**Abbildung 14: B1-Gen-basierte Real Time-PCR-Amplifikationssignale verschiedener *T. gondii*-Konzentrationen unter Verwendung von SybrGreen®**

Um im Falle eines fraglichen Real Time-PCR-Ergebnisses späterer Untersuchungsproben eine eindeutige Zuordnung vornehmen zu können, wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Das B1-Gen-Amplifikat (103 bp) besaß eine Schmelztemperatur von 78,0 °C (Abbildung 15).



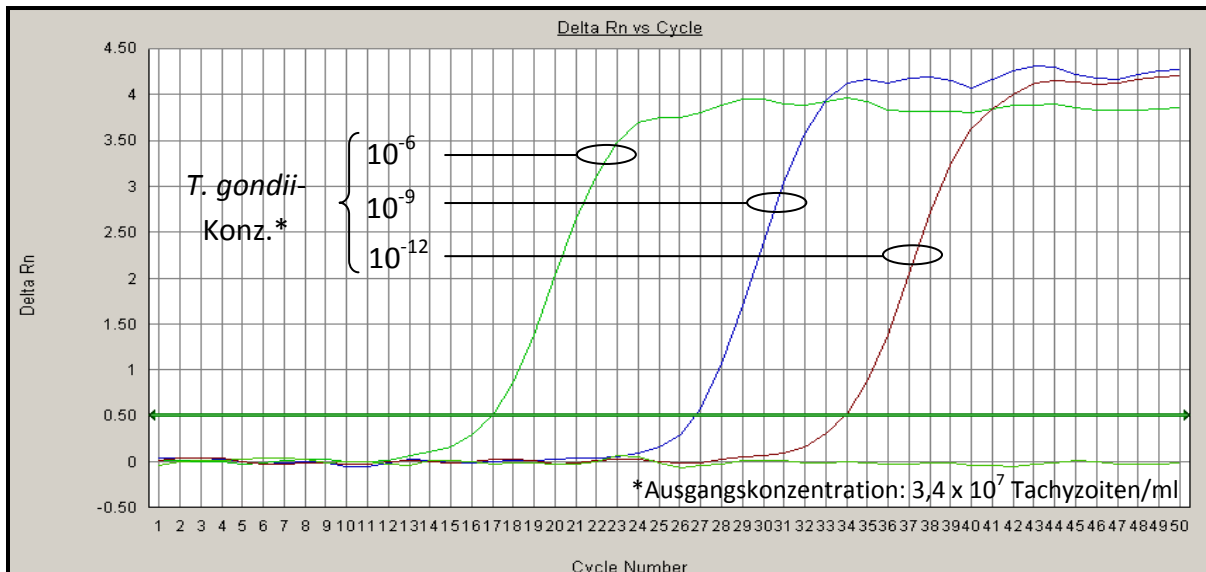
**Abbildung 15: B1-Gen-basierte Schmelzkurvenanalyse der *T. gondii*-DNA**

In nachfolgender *Abbildung 16* sind die Ergebnisse der auf der TaqMan®-Technologie basierenden Untersuchung unterschiedlicher *T. gondii*-Tachyzoitensuspensions-Konzentrationen unter Verwendung des B1-Gens illustriert.



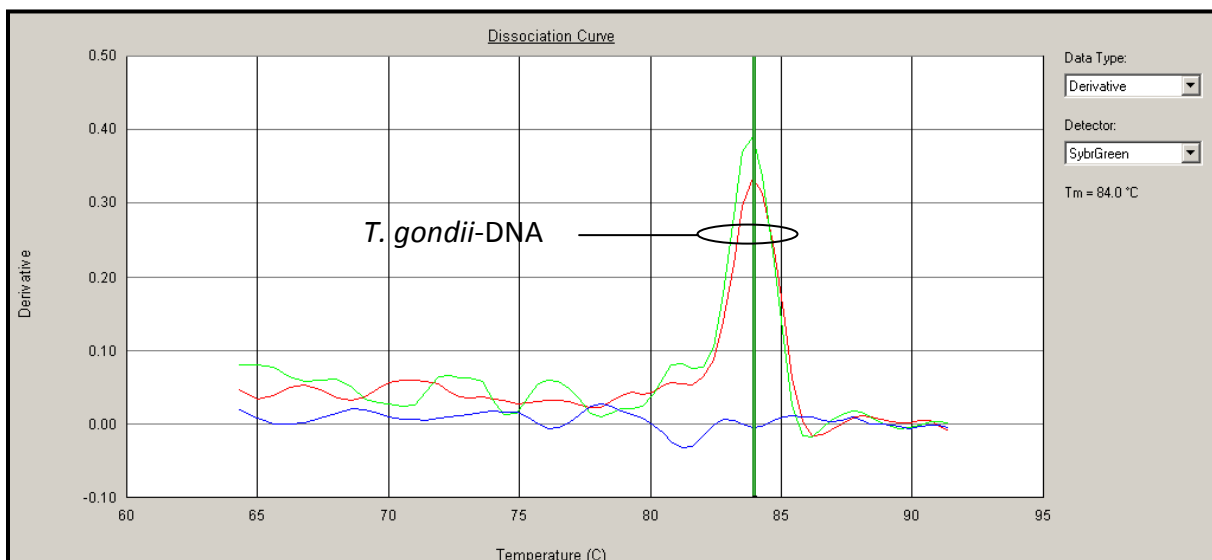
**Abbildung 16: B1-Gen-basierte Real Time-PCR-Amplifikationssignale verschiedener *T. gondii*-Konzentrationen unter Verwendung von TaqMan®**

Analog der auf den B1-Gen basierten Untersuchungen zeigt *Abbildung 17* die spezifische Amplifikation verschiedener *T. gondii*-Tachyzoitensuspensions-Konzentrationen mittels der entwickelten Oligonukleotidprimer für das 529-bp-Fragment unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes SybrGreen®.



**Abbildung 17: 529-bp-Fragment-basierte Real Time-PCR-Amplifikationssignale verschiedener *T. gondii*-Konzentrationen unter Verwendung von SybrGreen®**

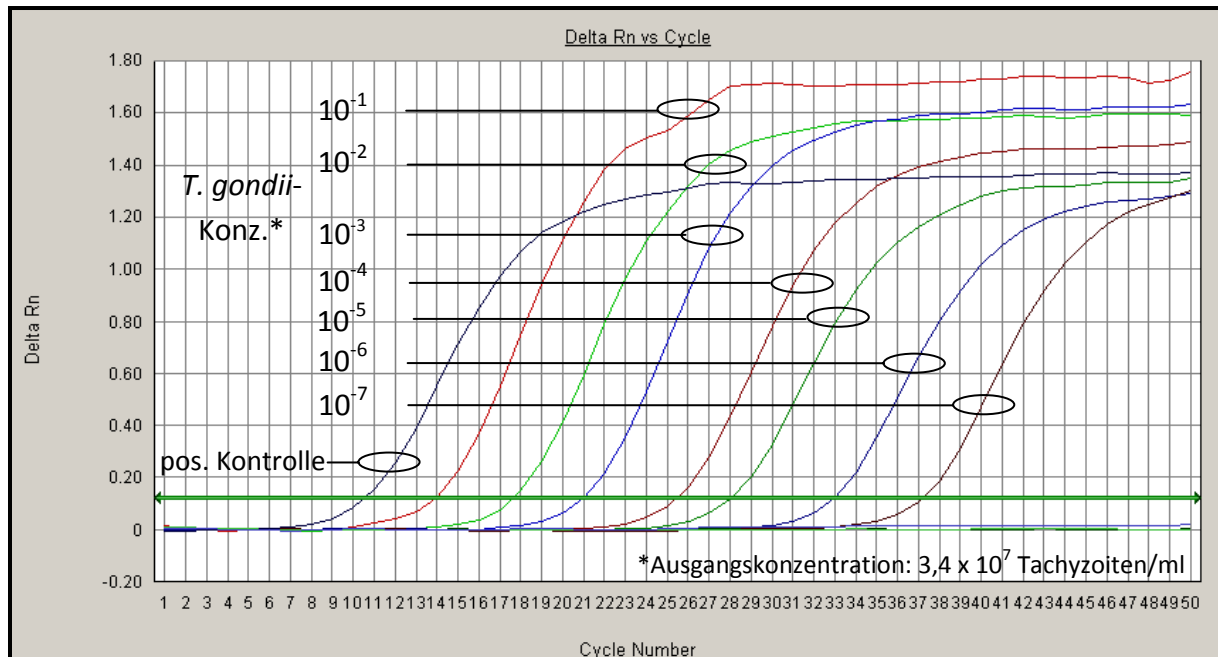
Abbildung 18 zeigt die zugehörige Schmelzkurvenanalyse für das 529-bp-Fragment-Amplifikat (92 bp) mit einer Schmelztemperatur von 84,0 °C.



**Abbildung 18: 529-bp-Fragment-basierte Schmelzkurvenanalyse der *T. gondii*-DNA**

Die für das 529-bp-Fragment vorgenommene Überprüfung mithilfe der TaqMan®-Technologie ist in Abbildung 19 dargestellt.





**Abbildung 19: 529-bp-Fragment-basierte Real Time-PCR-Amplifikationssignale verschiedener *T. gondii*-Konzentrationen unter Verwendung von TaqMan®**

Die entwickelten Oligonukleotidprimer (B1-Gen, 529-bp-Fragment) haben sich für den Nachweis von *T. gondii* als geeignet erwiesen. Aufgrund vergleichender Untersuchungen wurde im Folgenden jedoch ausschließlich das 529-bp-Fragment als Grundlage für die Real Time-PCR-Analysen der Rohwurst-Erzeugnisse sowie der Schweine- und Mäuse-Matrizes verwendet.

#### 4.2.3 Überprüfung der Kontrollen

Die für die Untersuchung der Schweine-, Rohwurst- und Mäuseproben notwendigen positiven (mit *T. gondii*-artifiziiell kontaminierten Wurstproben) und negativen (*T. gondii*-negativen Wurstproben) Real Time-PCR-Aufbereitungskontrollen wurden ebenso wie die *T. gondii*-DNA und die als negative DNA-Kontrolle verwendete *Neospora caninum*-DNA mithilfe der Real Time-PCR untersucht. Alle getesteten Positiv-Kontrollen erzeugten ein positives Amplifikationssignal. Die Negativ-Kontrollen wurden ausnahmslos negativ getestet.

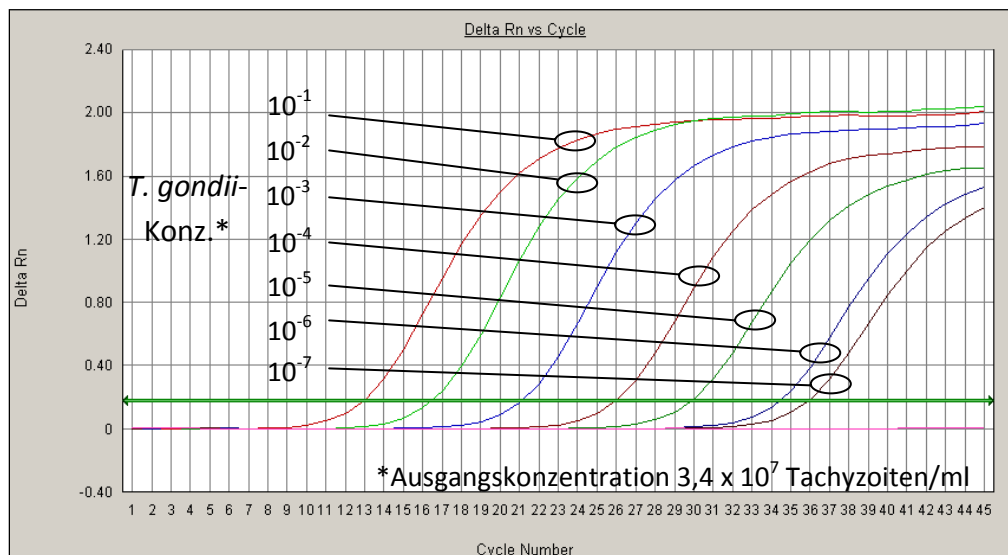
#### 4.2.4 Bestimmung der Sensitivität

Die zur Bestimmung der Sensitivität in die Real Time-PCR eingesetzten Verdünnungsstufen der Ansätze 1 bis 3 ergaben die in *Tabelle 32* gelisteten  $C_T$ -Werte. Die Ausgangskonzentration der drei Verdünnungsreihen lag bei  $3,4 \times 10^7$  Tachyzoiten/ml.

**Tabelle 32: Real Time-PCR-Ergebnisse der *T. gondii*-Verdünnungsreihen 1-3**

Verdünnung	Erregerkonzentration Tachyzoiten/ml	$C_T$ -Werte Ansatz I	$C_T$ -Werte Ansatz II	$C_T$ -Werte Ansatz III
$10^{-1}$	$3,4 \times 10^6$	11,49	12,32	12,18
$10^{-2}$	$3,4 \times 10^5$	15,11	16,37	16,24
$10^{-3}$	$3,4 \times 10^4$	19,72	19,79	19,56
$10^{-4}$	$3,4 \times 10^3$	24,51	24,34	24,05
$10^{-5}$	$3,4 \times 10^2$	28,37	28,32	27,26
$10^{-6}$	$3,4 \times 10^1$	33,01	31,23	31,79
$10^{-7}$	$3,4 \times 10^0$	34,39	34,51	34,03

Die *Abbildungen 20 bis 25* zeigen die Amplifikationssignale der Real Time-PCR-Verfahren der dekadischen Verdünnungsreihen mit den Verdünnungsstufen  $10^{-1}$  bis  $10^{-7}$  des *T. gondii* RH-Stammes sowie die zugehörigen Standardkurven. Die Steigung der Geraden variiert zwischen - 3,73 und - 4,02, das Bestimmtheitsmaß liegt bei  $\geq 0,99$ .



**Abbildung 20: Real Time-PCR-Amplifikationssignale der 1. dekadischen Verdünnungsreihe zur Bestimmung der Sensitivität**

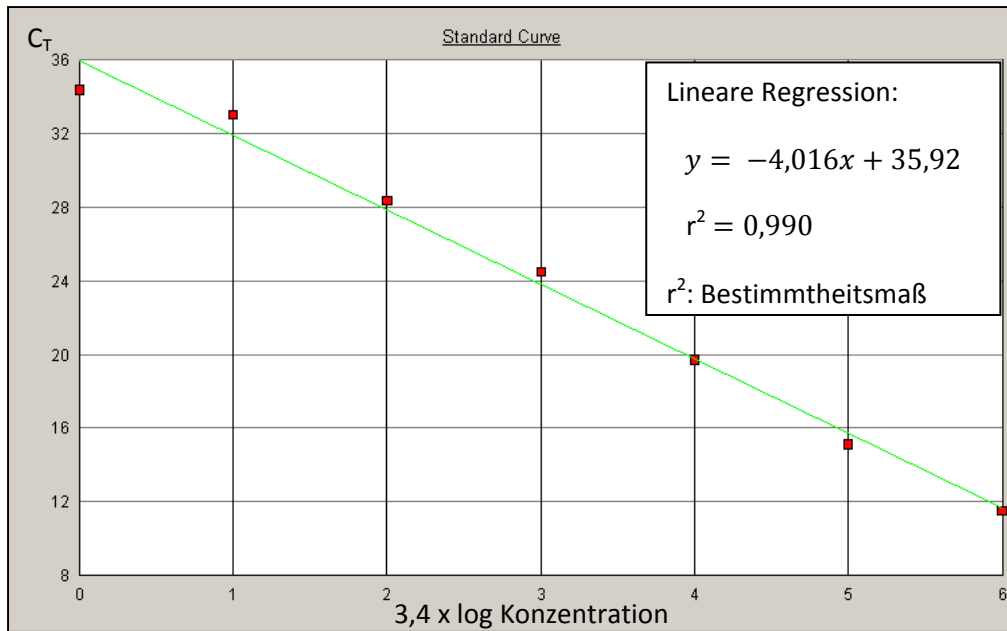


Abbildung 21: Standardkurve der 1. dekadischen Verdünnungsreihe zur Bestimmung der Sensitivität der Real Time-PCR

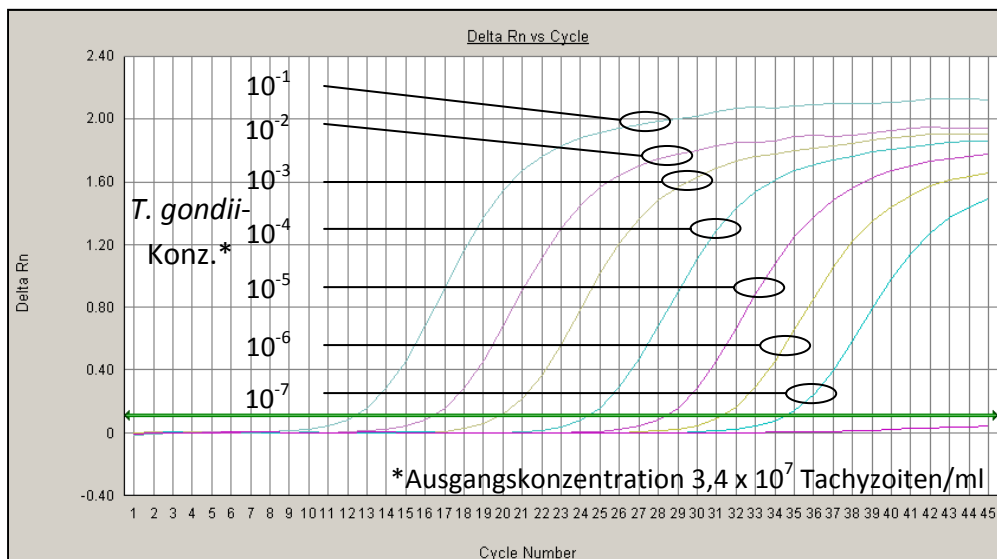


Abbildung 22: Real Time-PCR-Amplifikationssignale der 2. dekadischen Verdünnungsreihe zur Bestimmung der Sensitivität

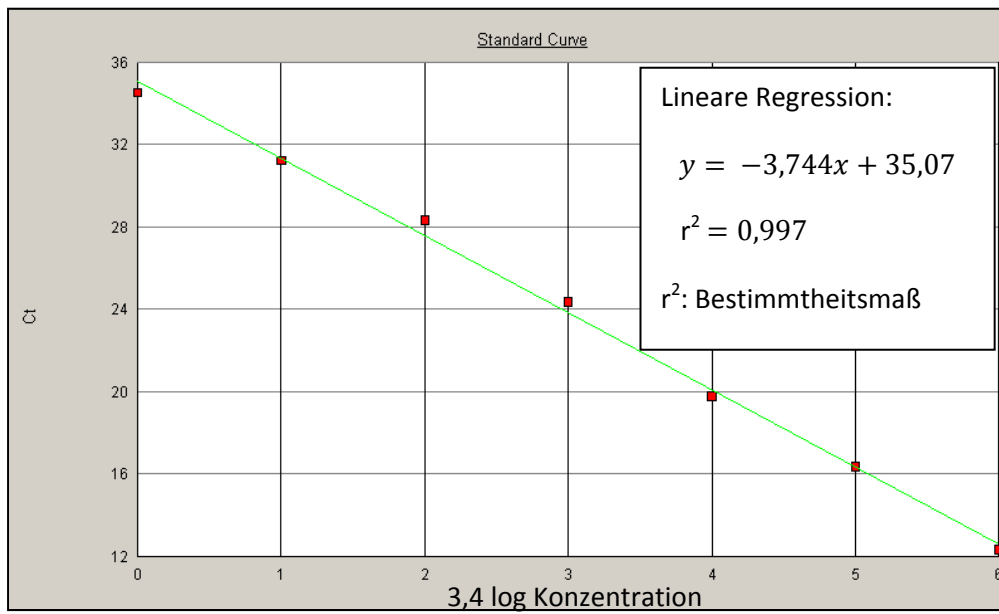


Abbildung 23: Standardkurve der 2. dekadischen Verdünnungsreihe zur Bestimmung der Sensitivität der Real Time-PCR

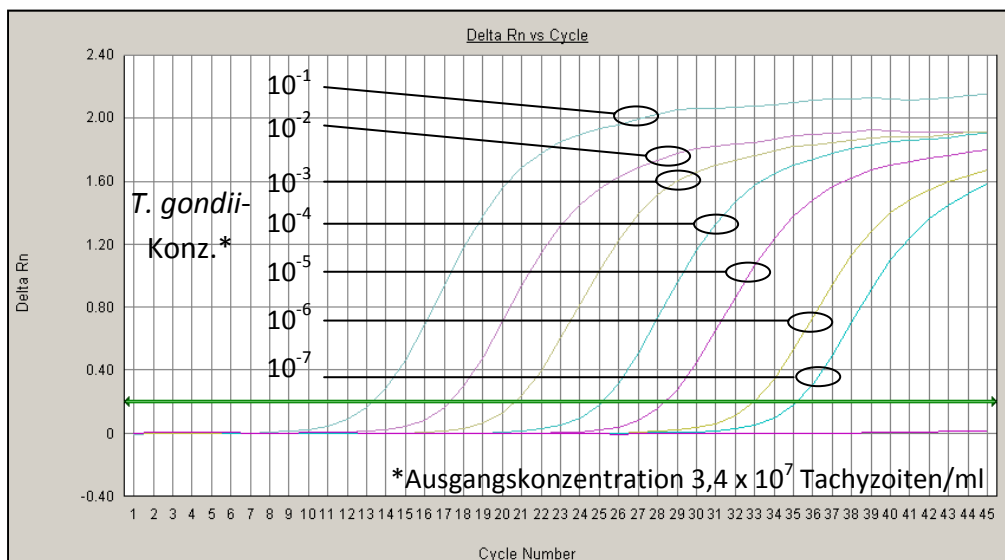
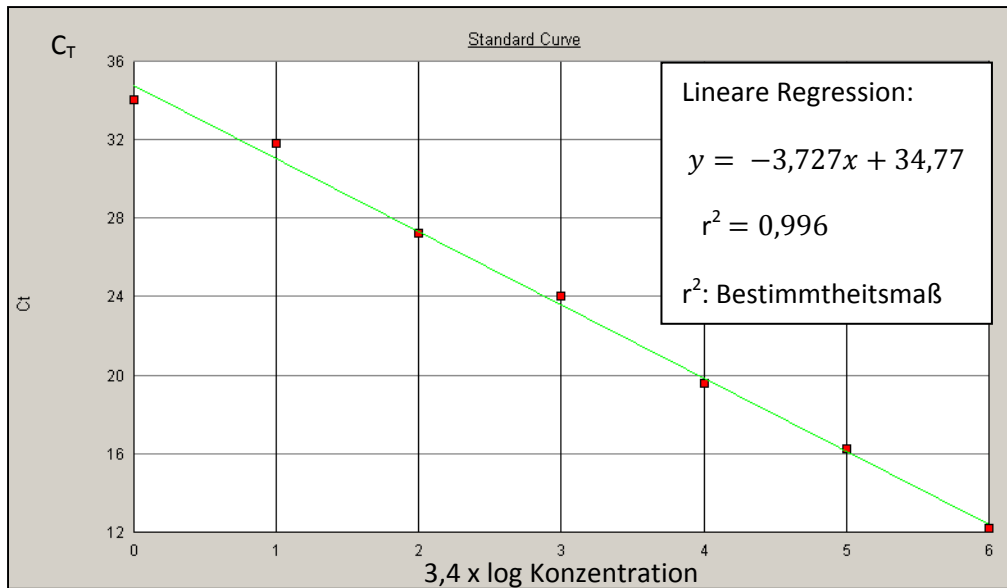


Abbildung 24: Real Time-PCR-Amplifikationssignale der 3. dekadischen Verdünnungsreihe zur Bestimmung der Sensitivität



**Abbildung 25: Standardkurve der 3. dekadischen Verdünnungsreihe zur Bestimmung der Sensitivität der Real Time-PCR**

Anhand der Verdünnungsreihen wurde die Sensitivität der Real Time-PCR ermittelt. Das entwickelte Verfahren erlaubt einen sicheren Nachweis des Erregers ab der Verdünnungsstufe  $10^{-7}$ , dies entspricht einer Konzentration von  $3,4 \times 10^0$  Tachyzoiten/ml.

#### 4.2.5 Bestimmung der Nachweisgrenze und der relativen Häufigkeit

Zur Bestimmung der Nachweisgrenze sowie der relativen Häufigkeit des Real Time-PCR-Verfahrens wurden drei unabhängige Einmischversuche mit Muskulatur und verschiedenen Rohwurst-Erzeugnissen durchgeführt. Als Grundlage für die artifizielle Kontamination dienten die unter den *Punkten 3.2.4* und *4.2.4* genannten Verdünnungsreihen, die sich aufgrund der analytischen Ergebnisse als geeignet für die Kontamination erwiesen haben. Daran anschließend erfolgte die DNA-Extraktion mithilfe des DNA Blood & Tissue Kits der Firma Quiagen nach dem IFTN-Labor spezifizierten Arbeitsprotokoll zur *T. gondii*-DNA-Extraktion aus Geweben (*Abbildung 13*). Die C<sub>T</sub>-Werte der Einmischversuche sind in den *Tabellen 33 bis 35* gelistet. Die positiven Amplifikationssignale sind farbig hinterlegt.

**Tabelle 33: Real Time PCR-Ergebnis bei dem 1. Einmischversuch**

Tachyzoiten/g	Muskulatur		Mettwurst		Teewurst		Salami	
0 (nativ)	n.d. <sup>1)</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
$3,4 \times 10^0$	37,53	n.d.	n.d.	n.d.	40,00	42,44	n.d.	n.d.
$3,4 \times 10^1$	n.d.	36,36	34,81	35,93	36,80	36,09	n.d.	n.d.
$3,4 \times 10^2$	31,52	31,50	32,25	31,78	32,24	31,47	32,19	32,86
$3,4 \times 10^3$	29,36	31,61	28,45	28,18	28,16	28,46	28,47	29,21
$3,4 \times 10^4$	26,17	25,49	24,38	24,64	24,40	24,64	24,46	24,43

<sup>1)</sup> nicht detektiert

**Tabelle 34: Real Time PCR-Ergebnis bei dem 2. Einmischversuch**

Tachyzoiten/g	Muskulatur		Mettwurst		Teewurst		Salami	
0 (nativ)	n.d. <sup>1)</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
$3,4 \times 10^0$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	35,51	n.d.	36,73
$3,4 \times 10^1$	34,55	36,72	35,12	37,03	36,50	34,62	39,15	36,46
$3,4 \times 10^2$	32,84	32,38	33,10	32,26	32,45	33,01	33,46	33,61
$3,4 \times 10^3$	29,81	29,38	29,21	28,56	28,63	29,67	29,28	29,98
$3,4 \times 10^4$	25,75	25,59	25,79	25,61	25,30	26,18	27,00	26,70

<sup>1)</sup> nicht detektiert

**Tabelle 35: Real Time-PCR-Ergebnis bei dem 3. Einmischversuch**

Tachyzoiten/g	Muskulatur		Mettwurst		Teewurst		Salami	
0 (nativ)	n.d. <sup>1)</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
$3,4 \times 10^0$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	36,88	39,44	n.d.
$3,4 \times 10^1$	34,26	35,51	36,43	33,62	n.d.	35,57	36,83	38,03
$3,4 \times 10^2$	31,34	31,13	32,22	31,50	30,40	31,45	32,84	33,72
$3,4 \times 10^3$	28,63	28,42	29,20	28,93	28,96	28,35	28,36	30,07
$3,4 \times 10^4$	24,82	24,78	24,95	25,47	26,00	25,29	25,98	26,26

<sup>1)</sup> nicht detektiert

Wie aus den in den *Tabellen 33 bis 35* fixierten  $C_T$ -Werten ersichtlich, lässt sich der Erreger ab einer Konzentration von  $3,4 \times 10^0$  Tachyzoiten/g nachweisen. Dies gelang in der Matrix Muskulatur in einer von sechs Untersuchungen und für die Matrizes Salami und Teewurst in zwei bzw. drei der jeweils sechs Ansätze. Nicht nachgewiesen wurde diese Konzentration in der Matrix Mettwurst. Für die Konzentration  $3,4 \times 10^1$  Tachyzoiten/g ergaben sich höhere Nachweisraten von vier von sechs für die untersuchte Matrix Salami, fünf von sechs für die Matrizes Muskulatur und Teewurst und sechs von sechs für die Matrix Mettwurst. Ab einer

Erregerkonzentration von  $3,4 \times 10^2$  Tachyzoiten/g lag die relative Häufigkeit für den Nachweis des Erregers Matrix-unabhängig bei 1. Eine Übersicht über die Nachweisraten sowie die relativen Häufigkeiten in Abhängigkeit der verschiedenen Matrices ist in *Tabelle 36* wiedergegeben.

**Tabelle 36: Nachweisraten und relative Häufigkeiten bei den Einmischversuchen 1 - 3**

Tachyzoiten/g	Muskulatur		Mettwurst		Teewurst		Salami	
	NR <sup>1)</sup>	RH <sup>2)</sup>	NR	RH	NR	RH	NR	RH
$3,4 \times 10^0$	1/6	0,17	0/6	0	3/6	0,50	2/6	0,33
$3,4 \times 10^1$	5/6	0,83	6/6	1	5/6	0,83	4/6	0,67
$3,4 \times 10^2$	6/6	1	6/6	1	6/6	1	6/6	1
$3,4 \times 10^3$	6/6	1	6/6	1	6/6	1	6/6	1
$3,4 \times 10^4$	6/6	1	6/6	1	6/6	1	6/6	1

<sup>1)</sup> absolute Nachweisrate

<sup>2)</sup> relative Häufigkeit

#### 4.2.6 Entwicklung der Internen Amplifikationskontrolle

Die zum Ausschluss falsch-negativer Ergebnisse entwickelte Interne Amplifikationskontrolle (IAC) besteht aus nicht-Ziel-DNA, die in demselben Reaktionsansatz amplifiziert wird wie die Erreger-DNA. Die stichprobenartig zur Anwendung gekommene kompetitive Interne Amplifikationskontrolle (ciAC) hat die gleichen Primer-Andockstellen wie die Ziel-DNA, besitzt jedoch zusätzlich eine ergänzende DNA-Sequenz, welche eine Unterscheidung ermöglicht. Hierdurch erfolgt die Amplifikation durch dieselben Primer wie bei der Ziel-DNA (EDVINSSON et al., 2006). Problematisch kann die sich hieraus ergebende Konkurrenz bei der Amplifikation der Erreger- und IAC-DNA sein. Zur Minimierung dieses negativen Einflusses auf die Nachweisgrenze des Erregers soll die Konzentration der ciAC infolgedessen möglichst gering gehalten werden (EDVINSSON, 2006). Anhand der folgenden Abbildungen und *Tabelle 37* kann die erzielte Nachweisgrenze mit und ohne ciAC verglichen werden.

**Tabelle 37: Gegenüberstellung der C<sub>T</sub>-Werte der Real Time-PCR mit und ohne kompetitive Interne Amplifikationskontrolle**

Verdünnungsstufe	C <sub>T</sub> -Wert ohne ciAC	C <sub>T</sub> -Wert mit ciAC
$10^{-6}$	33,56	33,60
$10^{-6}$	34,44	33,02
$10^{-6}$	34,95	33,72

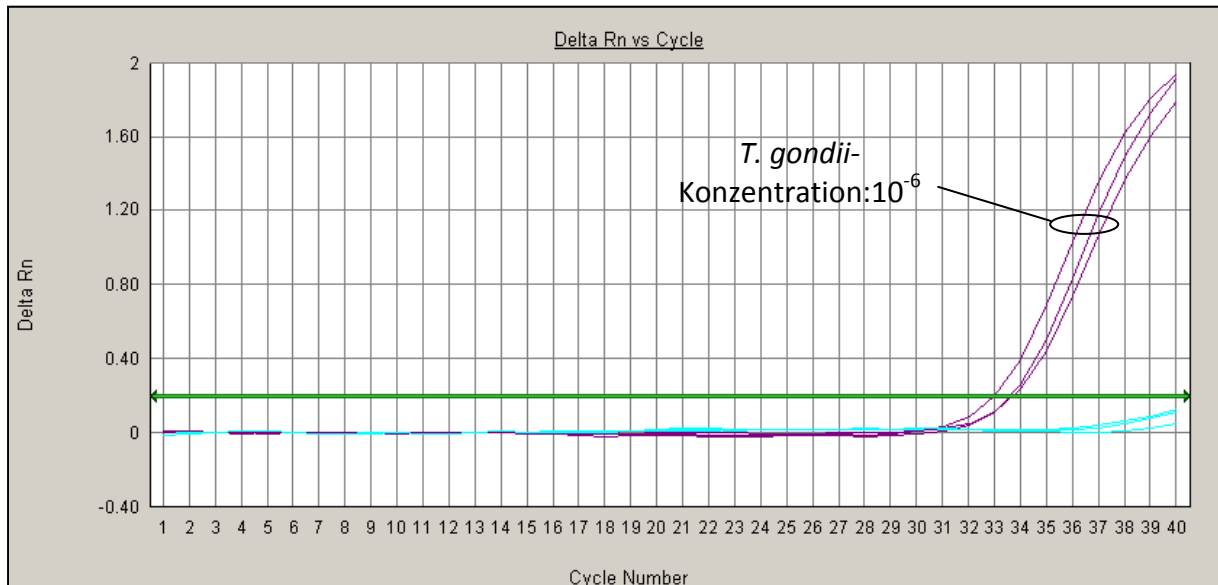


Abbildung 26: Real Time-PCR-Amplifikationssignale von *T. gondii* mit Anwendung der cIAC

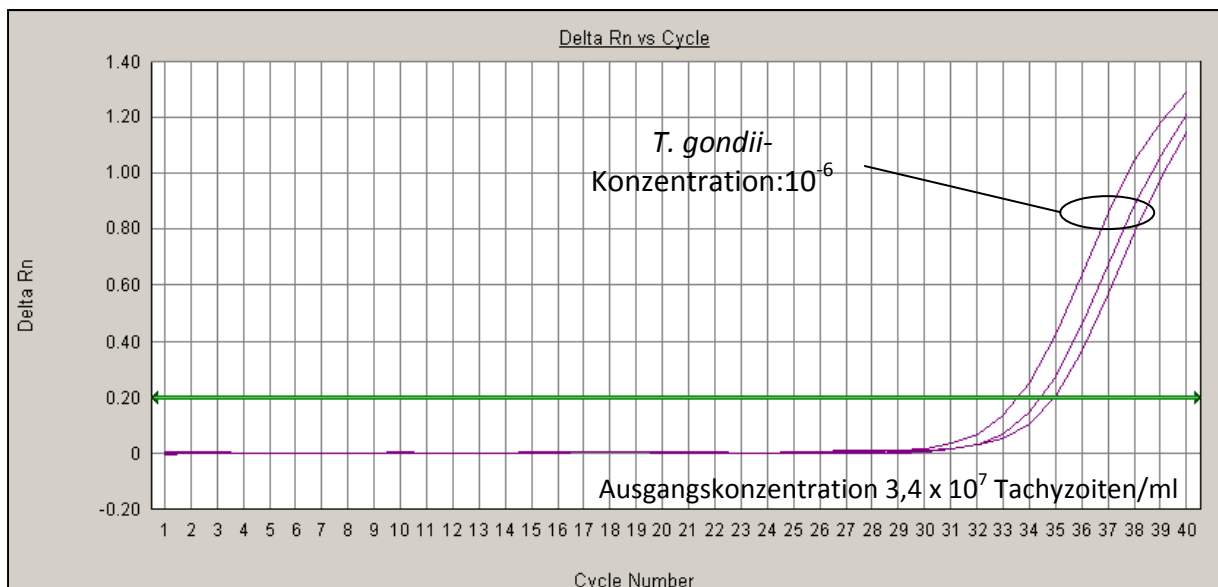
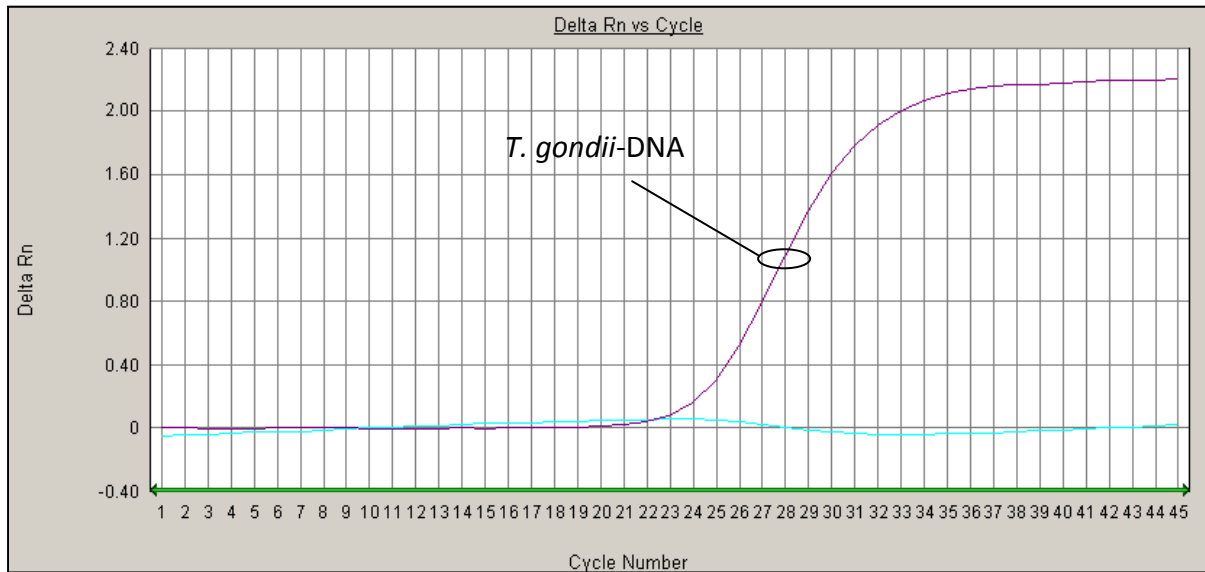


Abbildung 27: Real Time-PCR-Amplifikationssignale ohne Anwendung der kompetitiven Internen Amplifikationskontrolle

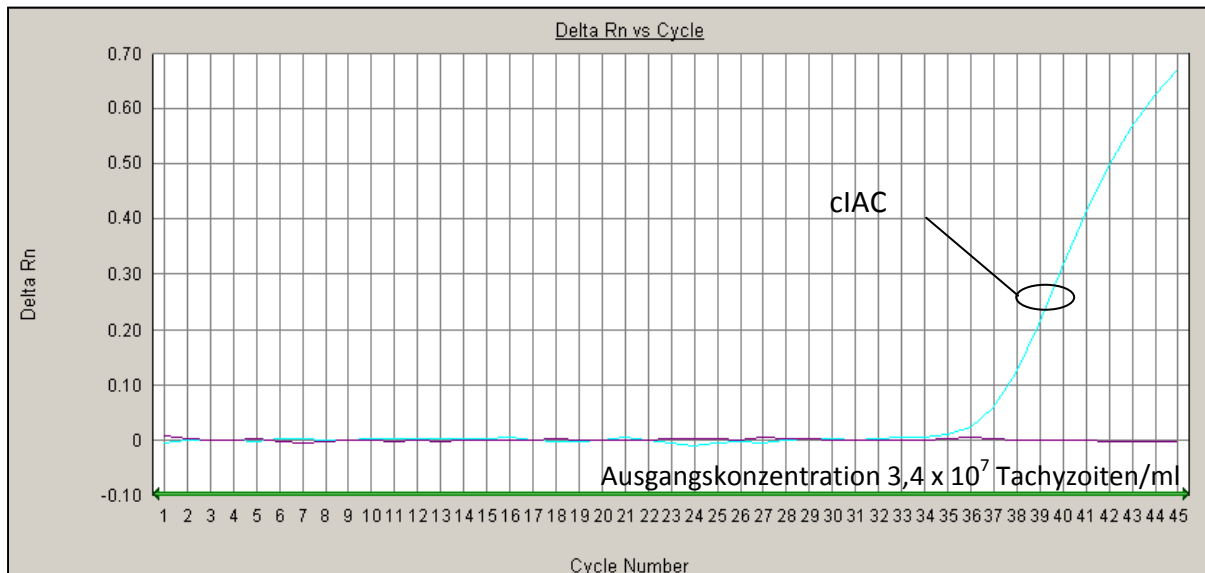
Es ist ersichtlich, dass die Zugabe der entwickelten cIAC keinen negativen Einfluss auf die Nachweisgrenze ausübt. Von weiterem Interesse ist der korrekte Nachweis der Ziel- bzw. Sondenregion. *Abbildung 28* zeigt die Amplifikation einer stark positiven *T. gondii*-Probe. In diesem Fall führt lediglich die FAM-markierte Sonde der Zielregion zu einem positiven Amplifikationssignal.





**Abbildung 28: Real Time-PCR mit kompetitiver Interner Amplifikationskontrolle bei einer stark positiven Probe**

Bei der Untersuchung einer *T. gondii*-negativen Probe in *Abbildung 29* führt hingegen die VIC-markierte cIAC-Sonde zu einem Amplifikationssignal.



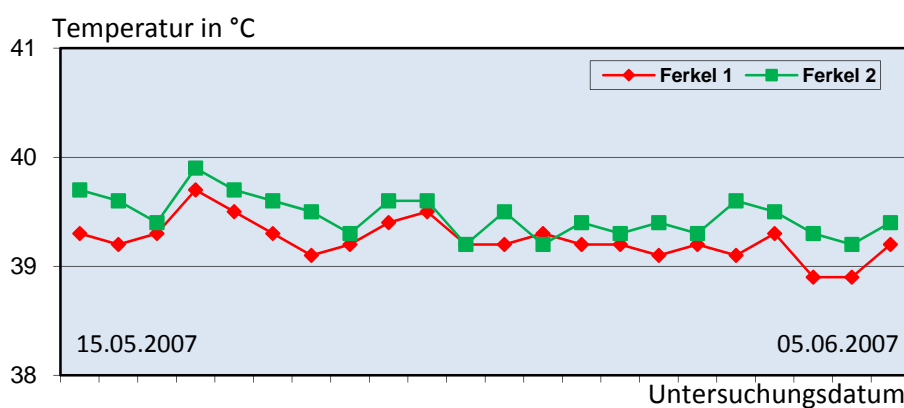
**Abbildung 29: Real Time-PCR mit kompetitiver Interner Amplifikationskontrolle bei einer negativen Probe**

Auf der Basis dieser Ergebnisse kann die entwickelte kompetitive interne Amplifikationskontrolle zum Ausschluss falsch negativer-Ergebnisse als geeignet angesehen werden.

### 4.3 Schweine-Infektionsversuch

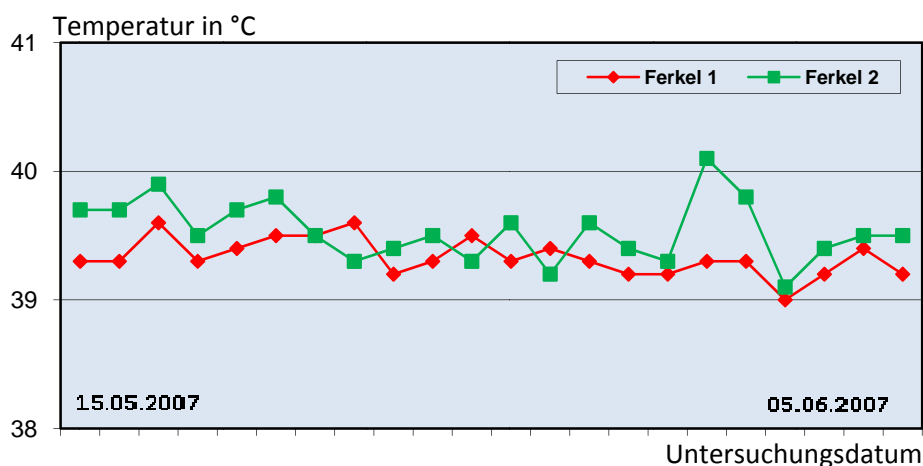
Zur Prüfung der Seronegativität der Versuchsschweine wurden zwei Tiere im Alter von ungefähr sechs Wochen mit Hilfe zweier Verfahren auf das Vorhandensein spezifischer Antikörper untersucht. Beide Proben ergaben in dem Immunhämagglutinationstest (IHAT) (Institut für Parasitologie, Justus-Liebig-Universität Gießen) ein negatives Ergebnis. Zur weitergehenden Absicherung wurden die Seren von Dr. Schares (Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesinstitut für Tiergesundheit) zusätzlich mithilfe des analytisch sensitiveren Western-Blot-Verfahrens untersucht. Mithilfe dieser Methode erwiesen sich die Seren als positiv. Nach fünf Wochen (im Alter von ca. 11 Wochen) wurden erneut Blutproben der Versuchstiere im Western-Blot untersucht. Bei einem Tier zeigte sich eine schwach-positive Reaktion, das Andere erwies sich als *T. gondii*-negativ; woraufhin auf das Vorliegen maternaler Antikörper geschlossen wurde. In Folge dieser Ergebnisse wurden die Tiere intravenös mit  $10^4$  *T. gondii*-Tachyzoiten infiziert.

Bei der zur Kontrolle des Infektionserfolges vorgenommenen Temperaturmessung konnte kein nennenswerter Anstieg der Körpertemperatur festgestellt werden. Die Temperaturkurven sind den *Abbildungen 30* und *31* zu entnehmen.



**Abbildung 30: Körpertemperaturverlauf der morgens durchgeführten Untersuchung über einen Zeitraum von 3 Wochen ab einem Tag vor der Infektion**

Zur Sicherstellung des Infektionserfolges wurden weitere IHAT- und Western-Blot-Untersuchungen durchgeführt. Hierbei reagierten die Seren beider Versuchstiere bereits bei der ersten Untersuchung - drei Wochen nach der Infektion – deutlich *T. gondii*-positiv. Das gleiche Ergebnis ergaben zwei folgende Kontrolluntersuchungen mithilfe der IHAT. Die Infektion konnte infolgedessen als erfolgreich angesehen werden, so dass die Tiere im Gießener Schlachthof auf konventionelle Art der Schlachtung zugeführt wurden.



**Abbildung 31: Körpertemperaturverlauf der abends durchgeführten Untersuchung über einen Zeitraum von 3 Wochen ab einem Tag vor der Infektion**

#### 4.4 Produktion der Rohwurst-Erzeugnisse

Die nach 24-stündiger Kühlung in die Technologie des Institutes für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde überführten Schlachttierkörper dienten jeweils separat zur Herstellung von Mett-, Teewurst und Salami. Dabei wurden die jeweiligen Chargen einmal auf konventionelle Art und einmal unter Berücksichtigung ökologischer Prinzipien hergestellt.

Um eventuelle Unterschiede der Infektiösität in Abhängigkeit der handwerklichen bzw. der ökologischen Erzeugnisse auf unterschiedliche Reifungsparameter erfassen zu können, wurden in verschiedenen Abständen Messungen des pH-Wertes und bei der Salami zusätzlich noch des  $a_w$ -Wertes vorgenommen. Diese Daten können *Anhang V* entnommen werden. Die produzierten Erzeugnisse genügten sensorischen Qualitätsansprüchen. Auf eine geschmackliche Untersuchung wurde aufgrund der möglichen Infektiösität verzichtet.

## **4.5 Mäuse-Infektionsversuch**

Zur Überprüfung der Infektiosität wurden die produzierten Rohwurst-Erzeugnisse an Mäuse verfüttert. Die Futteraufnahme wurde kontrolliert. Jede Maus nahm mindestens zwei Drittel der 2 x 6 g Wurst bereitwillig oral auf. Die Inokulation verlief somit in allen Fällen erfolgreich. Im Versuchsverlauf kam es zu sechs ungeklärten Todesfällen. Ungefähr 45 Tage nach der Inokulation erfolgte die Tötung der Mäuse unter CO<sub>2</sub>-Betäubung und im Anschluss die Organentnahme für die Real Time-PCR-Untersuchung auf eine mögliche Infektion.

## **4.6 Nachweis von *T. gondii*-DNA mittels Real Time-PCR**

### **4.6.1 Real Time-PCR-Nachweis von *T. gondii* in Schweine-Geweben**

Um sicherzustellen, dass die artifizielle Infektion der Versuchstiere zu einer Zystenbildung in der Muskulatur geführt hat, wurde das Fleisch der Schlachttierkörper mit der entwickelten Real Time-PCR-Methode auf das Vorhandensein des Erregers untersucht. Beprobte wurden die Vorder- und Hinterbeine, Bauch, Rücken, Zwerchfell, Zunge, Herz und Gehirn beider Tiere. Die Real Time-PCR-Untersuchung der entnommenen Proben wurde jeweils im Dreifachansatz durchgeführt.

In den 60 untersuchten Ansätzen wurde der Erreger zweimal nachgewiesen. Bei Schwein Nummer eins konnte in einer Probe des rechten Hinterbeines (C<sub>T</sub>-Wert: 38,00) und bei Schwein Nummer zwei in einer Probe des rechten Vorderbeines (C<sub>T</sub>-Wert: 39,16) *T. gondii*-DNA nachgewiesen werden. Die Zystenbildung wurde somit bestätigt, so dass die Tierkörper für die Rohwurst-Herstellung verwendet werden konnten. Eine tabellarische Auflistung der durchgeführten Real-Time-PCR-Untersuchungen ist *Anhang II* zu entnehmen.

#### 4.6.2 Real Time-PCR Nachweis in Rohwurst-Erzeugnissen

Bei der Rohwurst-Herstellung wurde größte Sorgfalt auf eine homogene Gewebeverteilung der Schlachttierkörper verwendet. Zur Gewährleistung der Erregerhaltigkeit wurde jede Charge mithilfe der Real Time-PCR untersucht. *T. gondii* wurde in allen Rohwurst-Sorten, sowohl in den konventionell als auch in den ökologisch gefertigten, nachgewiesen. Ein positiver Erregernachweis gelang in 30 von 210 (14,29 %) durchgeführten Untersuchungen.

Bei differenzierter Betrachtung ist festzustellen, dass der Erreger bei 16,67 % der Erzeugnisse des ersten Schlachttierkörpers nachgewiesen wurde. Die Nachweisrate bei Produkten des zweiten Tieres lag bei 13,33 %. Die mit Hilfe der multiplen logistischen Regression mit drei Einflussfaktoren (DIXON, 1993) durchgeführte statistischen Analyse ergab, dass der Unterschied nicht signifikant ( $p = 0,48$ ) ist (Tabelle 38).

**Tabelle 38: Real Time-PCR-Ergebnisse bei Rohwurst-Erzeugnissen unter Berücksichtigung der Schlachttierkörper**

Schlachttierkörper	Probenanzahl untersucht	Probenanzahl positiv (%)
Schwein 1	60	10 (16,67)
Schwein 2	150	20 (13,33)

} Unterschied statistisch nicht signifikant:  $p = 0,48$

Die Gegenüberstellung der untersuchten Herstellungsarten zeigte, dass der Real Time-PCR Nachweis in 18,52 % der ökologisch gefertigten Erzeugnisse und in 9,80 % der traditionell hergestellten Produkte positiv ausfiel. Auch dieser Unterschied erwies sich in der statistischen Analyse als nicht signifikant [ $p = 0,06$ ; Verfahren der multiplen logistischen Regression mit drei Einflussfaktoren, (DIXON, 1993)] (Tabelle 39).

**Tabelle 39: Real Time-PCR-Ergebnisse der Rohwurst-Erzeugnisse in Abhängigkeit der Herstellungsverfahren**

Herstellungsverfahren	Probenanzahl untersucht	Probenanzahl positiv (%)
Handwerklich	102	10 (9,80)
Ökologisch	108	20 (18,52)

} Unterschied statistisch nicht signifikant:  $p = 0,06$

Der Vergleich des Nachweises zwischen den drei produzierten Rohwurstsorten ergab einen signifikanten Unterschied mit  $p = 0,016$  (Verfahren der multiplen logistischen Regression mit

drei Einflussfaktoren, (DIXON, 1993). Hierbei gelang der Nachweis bei Mettwürsten in 15,00 %, bei Teewürsten in 27,08 % und bei den Salami-Erzeugnissen in lediglich 7,84 % der Proben (*Tabelle 40*).

**Tabelle 40: Real Time-PCR-Ergebnisse bei Rohwurst-Erzeugnissen in Abhängigkeit von der Rohwurst-Sorte**

Rohwurstsorte	Probenanzahl untersucht	Probenanzahl positiv (%)
Mettwurst	60	9 (15,00)
Teewurst	48	13 (27,08)
Salami	102	8 (7,84)

} Unterschied  
statistisch  
signifikant: p = 0,016

Die C<sub>T</sub>-Werte der Real Time-PCR-Assays sind *Anhang IV* zu entnehmen.

### 4.6.3 Real Time-PCR Nachweis in verschiedenen Mäuse-Geweben

Pro Maus erfolgten DNA-Aufbereitungen von Hirn, Herz und Milz (jeweils im Doppelansatz). Diese wurden in die Real Time-PCR eingesetzt. Die zur Kontrolle mitgeführte Negativ-Kontrollgruppe war ausnahmslos *T. gondii*-DNA-negativ, die mit *T. gondii*-infizierte Positiv-Kontrollgruppe bis auf zwei Milz-Aufbereitungen positiv. Aus den Gruppen drei und vier, die mit dem am Schlachthof entnommenem Fleisch der Schweine eins und zwei inokuliert worden waren, erwiesen sich vier (4/7) bzw. zwei (2/8) Tiere positiv. Der Unterschied zwischen den beiden Tierkörpern war statistisch nicht signifikant ( $p = 0,31$ ; Exakter Test von Fischer, ACKERMANN, 1998). Die Ergebnisse sind in *Tabelle 41* verzeichnet. Eine ausführliche Darstellung der durchgeführten Untersuchungen der Versuchsgruppen eins bis vier ist in *Anhang III* dargestellt.

**Tabelle 41: Anzahl positiv getesteter Mäuse in den Mäuse-Kontrollgruppen 1-4**

Mäuse	Gruppe 1 n <sup>1)</sup> /N <sup>2)</sup>	Gruppe 2 n/N	Gruppe 3 n/N	Gruppe 4 n/N
Maus 1	0/6	6/6	4/6	0/6
Maus 2	0/6	6/6	1/6	0/6
Maus 3	0/6	6/6	0/6	0/6
Maus 4	0/6	6/6	1/6	2/6
Maus 5	0/6	4/6	2/6	0/6
Maus 6	0/6	6/6	0/6	0/6
Maus 7	0/6	6/6	0/6	0/6
Maus 8	0/6	6/6	/ <sup>3)</sup>	1/6

<sup>1)</sup> Anzahl positiver C<sub>T</sub>-Signale

<sup>2)</sup> Anzahl durchgeführter Untersuchungen

<sup>3)</sup> Versuchstier verstorben

Bei acht stichprobenartigen Nachuntersuchungen (eine Untersuchung pro Versuchsmouse) konnten die positiven Signale der zweiten Gruppe reproduziert werden. Die positiven Proben der Gruppen drei und vier wurden sämtlich wiederholt; dabei konnte das Signal einer DNA-Aufbereitung der Gruppe 3 (Gr3Ms4HiA) und zwei der Gruppe 4 (Gr4Ms4HiB, Gr4Ms8HiA) nicht bestätigt werden. Auch bei der folgenden Untersuchung dieser Proben im Dreifachansatz war kein Nachweis möglich. Die Ergebnisse sind in *Tabelle 42* wiedergegeben.

**Tabelle 42: Real Time-PCR-Ergebnisse der 1. Untersuchung und der 1./2. Nachuntersuchungen der Gruppen 2-4**

Probenkennzeichnung	C <sub>T</sub> -Wert	C <sub>T</sub> -Wert 1. NU <sup>1)</sup>	C <sub>T</sub> -Wert 2. NU <sup>2)</sup>		
Gr <sup>3)</sup> 2 Ms <sup>4)</sup> 1 Hi <sup>5)</sup> A <sup>6)</sup>	23,17	21,59	/ <sup>7)</sup>	/	/
Gr 2 Ms 2 Mz <sup>8)</sup> B <sup>9)</sup>	32,87	28,91	/	/	/
Gr 2 Ms 3 He <sup>10)</sup> A	28,65	27,80	/	/	/
Gr 2 Ms 4 Mz B	32,72	31,84	/	/	/
Gr 2 Ms 5 Hi A	20,64	19,75	/	/	/
Gr 2 Ms 6 He A	26,67	25,35	/	/	/
Gr 2 Ms 7 Mz A	30,64	28,79	/	/	/
Gr 2 Ms 8 Hi A	18,42	17,11	/	/	/
Gr 3 Ms 1 Hi A	38,49	36,46	/	/	/
Gr 3 Ms 1 He A	36,65	35,14	/	/	/
Gr 3 Ms 1 He B	35,86	36,10	/	/	/
Gr 3 Ms 1 Mz A	36,17	35,91	/	/	/
Gr 3 Ms 2 He A	39,91	35,76	/	/	/
Gr 3 Ms 4 Hi A	34,14	n. d. <sup>11)</sup>	n. d.	n. d.	n. d.
Gr 3 Ms 5 He A	34,00	31,62	/	/	/
Gr 3 Ms 5 He B	33,74	32,06	/	/	/
Gr 4 Ms 4 Hi A	34,14	38,86	/	/	/
Gr 4 Ms 4 Hi B	38,00	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Gr 4 Ms 8 Hi A	39,74	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Gr 4 Ms 8 Mz A	41,00	41,00	/	/	/

<sup>1)</sup> 1. Nachuntersuchung – Einfachansatz

<sup>3)</sup> Gruppe

<sup>4)</sup> Maus

<sup>5)</sup> Hirn

<sup>8)</sup> Milz

<sup>9)</sup> Ansatz B

<sup>10)</sup> Herz

<sup>2)</sup> 2. Nachuntersuchung – Dreifachansatz

<sup>6)</sup> Ansatz A

<sup>7)</sup> keine Angabe

<sup>11)</sup> nicht detektiert

Daraufhin erfolgte, analog zum 1. Versuchsansatz, eine nochmalige DNA-Aufbereitung aller drei Organe der betroffenen Mäuse im Doppelansatz. Dabei konnte eine Herzaufbereitung der Maus 8 aus Gruppe 4 erneut mit einem C<sub>T</sub>-Wert von 39,00 detektiert werden (Tabelle 43).



**Tabelle 43: Real Time-PCR-Ergebnisse der 3. Nachuntersuchung der Gruppen 3 und 4**

Probenkennzeichnung	C <sub>T</sub> -Wert Hi <sup>1)</sup> C <sup>2)</sup>	C <sub>T</sub> -Wert Hi D <sup>3)</sup>	C <sub>T</sub> -Wert He <sup>4)</sup> C	C <sub>T</sub> -Wert He D	C <sub>T</sub> -Wert Mz <sup>5)</sup> C	C <sub>T</sub> -Wert Mz D
Gr <sup>6)</sup> 3 Ms <sup>7)</sup> 4	n. d. <sup>8)</sup>	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Gr 4 Ms 4	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Gr 4 Ms 8	n. d.	n. d.	39,00	n. d.	n. d.	n. d.

1) Hirn

2) Ansatz C

3) Ansatz D

4) Herz

5) Milz

6) Gruppe

7) Maus

8) nicht detektiert

Die Untersuchung von 1728 DNA-Aufbereitungen der mit Rohwurst-Erzeugnissen gefütterten 288 Versuchsmäuse ergab vier positive C<sub>T</sub>-Werte sowie ein Signal, welches oberhalb des Grenzwertes von 40 PCR-Zyklen lag (*Tabelle 44*). Die zur Bestätigung der Ergebnisse durchgeführte Nachuntersuchung im Einfachansatz der jeweilig positiven Proben ergab ausschließlich negative Ergebnisse.

**Tabelle 44: Real Time-PCR Ergebnisse der 1. Untersuchung und der 1. Nachuntersuchung der positiv getesteten Mäuse**

Mäusekennzeichnung	C <sub>T</sub> -Wert	NU <sup>1)</sup>
Gr <sup>2)</sup> 7 Ms <sup>3)</sup> 1 Mz <sup>4)</sup> A <sup>5)</sup>	41,00	n. d. <sup>6)</sup>
Gr 18 Ms 6 Mz B	39,00	n. d.
Gr 21 Ms 6 Hi <sup>7)</sup> A	40,00	n. d.
Gr 25 Ms 8 Mz A	37,00	n. d.
Gr 34 Ms 3 Mz B	39,61	n. d.

1) 1. Nachuntersuchung

2) Gruppe

3) Maus

4) Milz 5) Ansatz A

6) nicht detektiert

7) Hirn

Anschließend erfolgte eine erneute Überprüfung der vorhandenen DNA-Aufbereitungen positiv getesteter Mäuse (*Tabelle 44*) analog dem ursprünglichen Versuchsansatz (Hirn, Herz, Milz im Doppelansatz). Darüberhinaus wurde die DNA-Aufbereitung, die ein positives Signal erzeugt hatte, in einem weiteren Doppelansatz untersucht. Dennoch konnte keines der ursprünglich positiven Signale bestätigt werden.

Daraufhin wurden alle drei Organe der betroffenen Mäuse im Doppelansatz neu aufbereitet. Bei zwei Mäusen konnte durch aussagekräftige C<sub>T</sub>-Werte *T. gondii*-DNA nachgewiesen werden. Bei Maus 1 der Gruppe 7 wurde erneut ein C<sub>T</sub>-Wert oberhalb der Nachweisgrenze erzielt, im Gegensatz zur ersten Untersuchung jedoch in einer Hirn-, nicht in einer Milzprobe. Obwohl bei dieser Maus das Vorliegen einer sehr geringen Konzentration von *T. gondii*-DNA

nicht ausgeschlossen werden kann, ist diese Probe nicht als positiv zu werten. Die Daten sind aus *Tabelle 45* ersichtlich.

**Tabelle 45: Real Time-PCR Ergebnisse der 3. Nachuntersuchung der positiv getesteten Mäuse**

Probenbezeichnung	C <sub>T</sub> -Wert HI <sup>1)</sup> C <sup>2)</sup>	C <sub>T</sub> -Wert HI D <sup>3)</sup>	C <sub>T</sub> -Wert HE <sup>4)</sup> C	C <sub>T</sub> -Wert HE D	C <sub>T</sub> -Wert Mz <sup>5)</sup> C	C <sub>T</sub> -Wert Mz D
Gr <sup>6)</sup> 7 Ms <sup>7)</sup> 1	41,58	n. d. <sup>8)</sup>	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Gr 18 Ms 6	n. d.	n. d.	38,88	38,48	n. d.	n. d.
Gr 21 Ms 6	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	36,43	37,93
Gr 25 Ms 8	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Gr 34 Ms 3	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.

<sup>1)</sup> Hirn

<sup>2)</sup> Ansatz C

<sup>3)</sup> Ansatz D

<sup>4)</sup> Herz

<sup>5)</sup> Milz

<sup>6)</sup> Gruppe

<sup>7)</sup> Maus

<sup>8)</sup> nicht detektiert

In Bezug auf den möglicherweise unterschiedlichen Einfluss verschiedener Rohwurst-Sorten und Herstellungsverfahren ist festzuhalten, dass alle in die Untersuchung einbezogenen Rohwurst-Erzeugnisse und beide Herstellungsverfahren zu Infektionen geführt haben. Eine Übersicht über die verschiedenen Inokula, die den positiv getesteten Versuchstieren verabreicht wurden, gibt *Tabelle 46*.

**Tabelle 46: Charakterisierung der Inokula bei positiven Versuchsmäusen**

Versuchstier (Gr <sup>1)</sup> /Tr <sup>2)</sup> )	Inokulum
18/6	Mettwurst/Handwerklich/Schwein2/In-Verkehr-Bringen
21/6	Mettwurst/Ökologisch/Schwein2/In-Verkehr-Bringen
25/8	Salami/Handwerklich/Schwein1/In-Verkehr-Bringen
34/3	Teewurst/Ökologisch/Schwein1/MHD

<sup>1)</sup> Gruppennummer

<sup>2)</sup> Tiernummer

Die Unterschiede der erhobenen Parameter Rohwurstsorte, Herstellungsart und Verfütterungszeitpunkt erwiesen sich als statistisch nicht signifikant [Rohwurstsorte ( $p = 1,0$ ), Herstellungsart ( $p = 1,0$ ), Verfütterungszeitpunkt ( $p = 0,33$ ), Schlachttierkörper ( $p = 0,37$ ); Verfahren der multiplen exakten logistischen Regression, (MEHTA und PATEL, 1992)].

#### **4.7 Nachweis von Antikörpern gegen *T. gondii* mithilfe des Western-Blot-Verfahrens**

Die serologische Untersuchung der 320 Versuchstierseren (freundlicherweise durchgeführt von Dr. Schares, Friedrich Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit) ergab bei allen Tieren der Positiv-Kontrollgruppe einen „stark positiven“ Antikörpernachweis; sämtliche Tiere der Negativ-Kontrollgruppe wurden negativ getestet. Bei den Mäusen der Kontrollgruppen drei und vier, welche mit unbehandelter Muskulatur der beiden Schweine gefüttert worden waren, konnten keine Antikörper nachgewiesen werden.

Die Untersuchung der mit verschiedenen Rohwurst-Erzeugnissen gefütterten Mäuse ergab lediglich bei einem Tier eine „deutlich positive“ Reaktion; die Untersuchung 16 weiterer Versuchstierseren ergab nicht eindeutig interpretierbare „schwach positive“ Ergebnisse.

## 5. Diskussion

Ansatzpunkt für die in dieser Arbeit dargestellten Untersuchungen war die Frage nach der Bedeutung von Rohwurst-Erzeugnissen als Infektionsquelle für die Erkrankung an der weitverbreiteten und unter Umständen folgenschweren Toxoplasmose des Menschen (LIN, 1998; DUBEY, 2004; GROß, 2004; KLUN et al., 2006).

Untersuchungen zur Seroprävalenzsituation lebensmittelliefernder Tiere verdeutlichen, dass mit dem Vorkommen zystenhaltigen Fleisches in der Lebensmittelkette gerechnet werden muss (SEINECKE, 1996; SROKA, 2001; CAVALCANTE et al., 2006; KLUN et al., 2006; LUDEWIG et al., 2007). Eine deutsche Studie geht von Prävalenzen bei Ziegen von 42 % und bei Schafen von 33 % aus (SEINECKE, 1996). Bei Schweinen taxierte SEINECKE die Infektionsrate 1996 auf unter 1 %, aktuellen Studien zufolge muss aber mit einem erneuten Anstieg der Prävalenzen, insbesondere in ökologisch bewirtschafteten Betrieben, gerechnet werden. Ermittelte Infektionsraten lagen bei 2,5 % bzw. 3,8 % bei Tieren aus konventionellen Haltungssystemen, in ökologischen Betrieben wurden sogar Infektionsraten von 9 % bis über 11 % festgestellt (SCHULZIG und FEHLHABER, 2006; LUDEWIG et al., 2007). Die von infizierten Schweineschlachttierkörpern ausgehende erhebliche Infektionsgefahr wird durch die Darstellung von BUHR und FEHLHABER (2006) verdeutlicht. Aus ihren Untersuchungen zur Gesamtprävalenz von 4,1 % schlossen sie auf der Grundlage von ca. 47 Millionen Schweineschlachtungen (2005) auf ungefähr 1,9 Millionen infizierte Schweineschlachttierkörper, die in die Lebensmittelkette gelangen. Auch der direkte Erregernachweis aus Fleischproben beweist die Existenz des Erregers in Nahrungsmitteln. Bereits 1965 isolierten GROßKLAUS et al. Toxoplasmen aus „Hackepeter“-Proben und auch bei FEHLHABER et al. (2003) erwiesen sich von 240 untersuchten Hackfleischproben 5,4 % als *T. gondii*-seropositiv. ASPINALL et al. (2002) wiesen den Erreger sogar in 19 von 57 (10,8 %) Schweinefleisch-erzeugnissen nach.

Die Inaktivierung von Toxoplasmen durch Temperaturen  $< -13$  und  $> 67$  °C kann als gesichert angesehen werden (KOTULA et al., 1991; DUBEY et al., 1990). In vielen Studien belegt ist hingegen die bedeutende Rolle von nicht bzw. unzureichend erhitzten Fleischerzeugnissen als Infektionsquelle für eine Toxoplasmose-Erkrankung (KAPPERUD et al., 1996; CHOI et al., 1997; COOK, et al., 2000; SUKTHANA et al., 2000). Besonderes Augenmerk ist demnach u. a. auf die Sicherheit von Rohwurst-Erzeugnissen zu richten, da sicher schützende Präventivmaßnahmen wie Erhitzungsschritte im Herstellungsprozess fehlen. Beruhend auf

den Untersuchungen von SOMMER et al. (1965), werden langgereifte Produkte gemeinhin als sicher angesehen (TENTER und FEHLHABER, 2002; BfR, 2005; BfR, 2006). Das BfR warnt jedoch vor einer möglichen Infektionsgefahr bei dem Verzehr von Tartar, Mett- und Teewürsten (BfR, 2005). Ebenfalls näherer Untersuchung bedürfen ökologisch gefertigte Produkte, da hier einerseits mit einem erhöhten Vorkommen von *T. gondii* in den Schlachttierkörpern zu rechnen ist (SCHULZIG und FEHLHABER, 2006), andererseits kann der bei ökologisch gefertigten Produkten oftmalige Verzicht auf Nitritpökelsalz ebenso wie vielfach festgestellte Qualitätsschwankungen bei der Herstellung von Rohwurst-Erzeugnissen das Überleben von Erreger-Zysten begünstigen (SOMMER et al., 1965; MÜLLER et al., 1994). Um Antworten auf die sich aus diesen Literaturangaben ergebenden Fragestellungen zu bekommen, wurde der in dieser Arbeit dargestellte Versuchsaufbau gewählt. Hierbei wurden zur möglichst realitätsnahen Nachahmung des natürlichen Infektionsweges zwei Schweine im Alter von drei Monaten intravenös mit dem Erreger infiziert und der Infektionserfolg serologisch überprüft. Nach Erreichen des üblichen Schlachalters von sechs Monaten wurde das Fleisch der Tiere nach konventioneller Schlachtung zu verschiedenen Rohwurst-Erzeugnissen verarbeitet. Um die potentielle Infektionsgefahr lang- und kurzgereifter Erzeugnisse miteinander vergleichen zu können, wurde Salami als Beispiel einer langgereiften Rohwurst ausgewählt, Mett- und Teewürste dienten als Beispiel kurzgereifter Produkte. Um der Frage Rechnung zu tragen, ob die ökologische Produktion eine erhöhte Infektionsgefahr nach sich zieht, wurden alle Rohwurst-Sorten sowohl konventionell als auch unter Berücksichtigung ökologischer Rezepturen hergestellt. Zur Gewährleistung eines schnellen und sensitiven Nachweises diente eine neu entwickelte Real Time-PCR als Detektionsmethode. Da mithilfe dieses molekularbasierten Verfahrens lediglich die Anwesenheit von Erreger-DNA in den Rohwurst-Erzeugnissen nachgewiesen werden kann, erfolgte die Überprüfung der Infektiosität der Produkte im Mäuse-Infektionsversuch. Adäquate Mengen der zu untersuchenden Proben wurden in die Versuchstiere inokuliert und eine mögliche Infektion der Mäuse mithilfe der Real Time-PCR der Organe untersucht.

## 5.1 Entwicklung der Real Time-PCR

Die PCR hat sich in vielen Untersuchungen sowohl für die Bestimmung des epidemiologischen Status von *T. gondii*, als auch für dessen Nachweis aus klinischen Proben und Lebensmitteln bewährt (GROß et al., 1992; WASTLING et al., 1993; GUY et al., 1996; PUJOL-RIQUÉ et al., 1999; LIN et al., 2000; JAUREGUI et al., 2001; CONTINI et al., 2005). Da zu Projektbeginn unserer Kenntnis nach lediglich SybrGreen®-basierte Real Time-PCR-Verfahren zur Verfügung standen, wurde auf der Basis dieser Informationen am Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde (Justus-Liebig-Universität Gießen) zum Nachweis von *T. gondii* aus verschiedenen Matrices eine TaqMan®-gestützte Real Time-PCR entwickelt und etabliert. Als Grundlage für die Primer wurde das B1-Gen und das 529-bp-Fragment verwendet. In eigenen vergleichenden Untersuchungen hat sich das 529-bp-Fragment gegenüber dem B1-Gen als sensitiver erwiesen; dieses steht im Einklang mit den Erfahrungen anderer Autoren (HOMAN et al., 2000; REISCHL et al., 2003a; EDVINSSON et al., 2006). Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde für den weiteren Versuchsverlauf lediglich das 529-bp-Fragment für die Real Time-PCR-Untersuchungen verwendet.

Die Überprüfung der Spezifität des entwickelten Verfahrens erfolgte anhand der Sequenzüberprüfung der in den Real Time-PCR-Untersuchungen eingesetzten Primer des 529-bp-Fragmentes mithilfe der BLAST®- (Basic Local Alignment Search Tool) Computersoftware im Internet. Sowohl der Forward als auch der Reverse Primer zeigte nur für die Spezies *T. gondii* eine 100 %-ige Übereinstimmung. Darüberhinaus wurde die Eignung mithilfe von SybrGreen® und TaqMan® überprüft. Die zur weiteren Kontrolle der Spezifität mitgeführte *Neospora caninum*-DNA sowie die negativen Aufbereitungskontrollen wurden in keinem Lauf nachgewiesen. Die entwickelte Methode hat sich, auf der Basis der durchgeführten Kontrollen, als geeignet für den Nachweis von *T. gondii*-DNA erwiesen. Die Sensitivität der entwickelten Methode wurde anhand von seriellen Verdünnungsreihen bestimmt. Das Bestimmtheitsmaß der zugehörigen Standardkurven lag bei  $r^2 \geq 0,99$ , die Steigung der Geraden variierte zwischen -3,73 und -4,02. Es ließ sich eine Erregerkonzentration von  $3,4 \times 10^0$  Tachyzoiten/ml nachweisen. Bei entsprechenden Untersuchungen von JAUREGUI et al. (2001) gelang mithilfe einer Real Time-PCR (ITS1-abgeleitete Primer) der Nachweis von 100 fg DNA, dies ist äquivalent zu einem Bradyzoiten. HOMAN et al. (2000) detektierten auf der Basis des 529-bp-Fragmentes (Quantitative-Competitive-PCR) in einem Bereich von  $10^2$  und  $10^4$  Tachyzoiten pro PCR-Ansatz.

Anhand von Einmischversuchen erfolgte die Untersuchung der Nachweisgrenzen von *T. gondii* aus verschiedenen Rohwurst-Erzeugnissen sowie aus Schweinemuskulatur. Hierbei variierte die Nachweisgrenze in Abhängigkeit der untersuchten Matrix zwischen  $3,4 \times 10^0$  und  $3,4 \times 10^1$  Tachyzoiten/g. Ab einer Erregerkonzentration von  $3,4 \times 10^2$  Tachyzoiten/g lag die relative Nachweishäufigkeit Matrix-unabhängig bei 1. Im Vergleich detektierten WARNEKULASURIJA et al. (1998) (P 30 Gen, PCR) aus artifiziell kontaminierten Fleischproben bis zu einer Konzentration von  $10^3$  Trophozoiten/g und JAUREGUI et al. (2001) zwischen  $4$  und  $3,7 \times 10^5$  Parasiten/g in gespikten Schweineproben. Hierbei hatte insbesondere die Salzkonzentration einen negativen Einfluss auf die Sensitivität des verwendeten PCR-Verfahrens (WARNEKULASURIJA et al., 1998).

Die zum Ausschluss falsch-negativer Ergebnisse entwickelte IAC hatte keinen negativen Effekt auf die Sensitivität der Real Time-PCR. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Untersuchungen von EDVINSSON et al. (2006). Auch die im Rahmen dieser Studie entwickelte cIAC zeigte keinen negativen Einfluss auf die diagnostische Leistungsfähigkeit der Real Time-PCR, obwohl die Amplifikation der cIAC mit der von *T. gondii* konkurriert. Nach Meinung der Autoren kann die Verminderung der Sensitivität verhindert werden, wenn die Zielsequenz in sehr großer Kopienzahl im Genom vorliegt und die Menge an cIAC auf das notwendige Mindestmaß reduziert wird.

## 5.2 Schweine-Infektionsversuch

Die für den Infektionsversuch ausgewählten Schweine wurden vor Versuchsbeginn auf *T. gondii*-Antikörper untersucht. Beide Tiere reagierten zwar im IHAT negativ, der Western-Blot hingegen war für beide Tiere positiv auf den Nachweis von *T. gondii*-Antikörpern. Nach vier Wochen wurde den Tieren erneut Blut abgenommen und dieses im Western-Blot untersucht; hierbei erwies sich ein Tier als negativ und das Andere als deutlich schwächer positiv als bei der ersten Untersuchung. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Erkenntnissen von SCHULZIG (2004). In dieser epidemiologischen Studie traten bei 12 % bis 23 % der neugeborenen Ferkel *T. gondii*-Antikörper auf. Die Antikörperspiegel fielen jedoch innerhalb der nächsten Wochen stark ab. Während der Läuferzeit wurden bei keinem Tier Antikörper nachgewiesen. Weiterhin auffällig war, dass nur Ferkel *T. gondii*-positiver Mottersauen und immer der gesamte Wurf betroffen waren. SCHULZIG (2004) schließt hierdurch auf die Anwesenheit maternaler Antikörper bei neugeborenen Ferkeln. Unterstützt wird diese Vermutung durch Untersuchungen von BOCH et al. (1965). Blutproben neugeborener Ferkel vor dem ersten Saugakt erwiesen sich sämtlich als negativ, bereits zwei Stunden nach dem ersten Saugakt traten hingegen bei allen Ferkeln Antikörper auf. Basierend auf diesen Informationen wurden die Schweine im Anschluss an die Kontrolluntersuchung intravenös mit dem Erreger infiziert und der Infektionserfolg durch weitere Blutuntersuchungen kontrolliert. Bei beiden Tieren bewies ein deutlicher Titeranstieg die stattgefunden Infektion. Ein die Infektion begleitender Temperaturanstieg wurde nicht beobachtet. Dies ist nicht ungewöhnlich, da *T. gondii*-Infektionen oft symptomlos verlaufen (DUBEY, 1993; ASPÖCK, 1994).

Um eine Zystenbildung sicherzustellen, wurden nach der Schlachtung Organproben beider Versuchstiere mithilfe der Real Time-PCR erfolgreich auf das Vorhandensein von *T. gondii*-DNA untersucht. Von jedem der Schweine wurden zehn Gewebeproben entnommen und diese im Dreifachansatz untersucht. *T. gondii*-DNA wurde in zwei von 60 (3,33 %) Proben nachgewiesen. Somit konnten die positiven serologischen Ergebnisse mithilfe der Real Time-PCR bestätigt werden.

Eine mögliche Erklärung für die wenigen positiven Testergebnisse ist die geringe Anzahl an Gewebszysten in der Muskulatur lebensmittelliefernder Tiere. Schätzungen zufolge ist in 100 g Fleisch mit lediglich einer Gewebszyste zu rechnen (HILL und DUBEY, 2002). Diese geringe Zystendichte in Kombination mit einer unregelmäßigen Verteilung der Erreger im



Gewebe sowie der geringe Probenumfang im Rahmen der Untersuchung wird, insbesondere bei großen Tieren, als Ursache für negative PCR-Ergebnisse angesehen (ESTEBAN-REDONDO et al., 1999; HILL und DUBEY, 2002; HILL et al., 2006). Diese Informationen legen die Vermutung nahe, dass in der Mehrzahl der für die Real Time-PCR entnommenen Gewebeproben keine Zysten vorhanden waren und diese infolgedessen negativ getestet wurden.

### 5.3 Rohwurst-Produktion

Nach der Schlachtung wurden die Tierkörper im Anschluss an das 24-stündige Kühlen in die Technologie des Institutes für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde (Justus-Liebig-Universität Gießen) überführt und dort zu verschiedenen Rohwurst-Erzeugnissen (Mett- und Teewurst, Salami; jeweils handwerklich und ökologisch) verarbeitet. Danach erfolgte die Untersuchung dieser Produkte auf das Vorhandensein von *T. gondii*-Zysten mithilfe der Real Time-PCR. Es war möglich, die DNA des Erregers in allen produzierten Chargen nachzuweisen. Ähnlich wie bei den nativen Schweine-Gewebeproben zeigten jedoch viele Ansätze ein negatives Testergebnis. Lediglich 30 der 210 (14,29 %) untersuchten Wurstproben waren positiv auf den Nachweis von *T. gondii*-DNA.

Analog der Ergebnisse der nativen Schlachttierkörperproben scheinen auch bei der Untersuchung der Rohwurst-Erzeugnisse die geringe Zystendichte in der Muskulatur lebensmittelliefernder Tiere, deren unregelmäßige Verteilung im Tierkörper, sowie der geringe Probenumfang im Rahmen der PCR-Untersuchung als limitierende Faktoren für den Nachweis des Parasiten in Erscheinung zu treten (ESTEBAN-RODONDO et al., 1999; HILL und DUBEY, 2002; HILL et al., 2006).

Der Vergleich des Erregernachweises in den Rohwurst-Erzeugnissen der beiden Schlachttierkörper ergibt einen statistisch nicht signifikanten Unterschied mit  $p = 0,48$  (Verfahren der multiplen logistischen Regression mit drei Einflussfaktoren; DIXON, 1993). Dieses Ergebnis ist aufgrund der gleichen Infektionsdosis beider Versuchstiere nachvollziehbar.

Obwohl der Real Time-PCR-Nachweis aus den ökologisch gefertigten Produkten mit 18,52 % häufiger gelang als bei den traditionell gefertigten Erzeugnissen (9,80 %), erwies sich die statistische Analyse (Verfahren der multiplen logistischen Regression mit drei Einflussfaktoren; DIXON, 1993) auch für den Parameter Herstellungsart mit  $p = 0,06$  als knapp nicht signifikant.

Der Vergleich des Nachweises zwischen den drei produzierten Rohwurstsorten ergab hingegen einen signifikanten Unterschied mit  $p = 0,016$  (Verfahren der multiplen logistischen Regression mit drei Einflussfaktoren). Der Real Time-PCR Nachweis gelang hierbei mit 27,08 % am häufigsten aus der Teewurst. Bei den Mettwürsten konnte eine Nachweisrate von 15,00 % erzielt werden, bei der Salami wurde der Erreger lediglich bei 7,84 % der untersuchten Proben nachgewiesen. Diesen Ergebnissen zufolge scheint *T. gondii*-DNA

häufiger aus kurzgereiften Rohwürsten nachweisbar zu sein, als aus langgereiften Erzeugnissen.

Da diese Untersuchung jedoch lediglich die Anwesenheit *T. gondii*-spezifischer DNA beweist, erfolgte die Überprüfung der Infektiösität der produzierten Erzeugnisse im Tierversuch.

## 5.4 Mäuse-Infektionsversuch

### 5.4.1 Molekularbiologischer Erregernachweis

Nach dem erfolgreichen DNA-Nachweis in den Schlachttierkörpern und den Rohwurst-Erzeugnissen wurde die Infektiösität der erzeugten Produkte durch Inokulation von jeweils 2 x 6 g Wurst in Labormäuse überprüft. Jeweils acht Tiere bildeten eine Versuchsgruppe und erhielten die gleiche Art von Probenmaterial. Durch Vereinzelung der Tiere in einstreulose Käfige (während der Fütterungsperiode) konnte bei allen Tieren eine gute Futteraufnahme sichergestellt werden. Jedes Tier nahm mindestens zwei Drittel der Untersuchungsprobe auf. Die Überprüfung auf eine stattgefundene Infektion erfolgte mithilfe von Real Time-PCR Untersuchungen. Hierfür wurden die Organe Hirn, Herz und Milz unter sterilen Kautelen entnommen und nach dem IFTN standardisierten DNA-Extraktionsprotokoll aufbereitet. Daran schloss sich die Untersuchung der aufbereiteten Proben (im Doppelansatz) mittels Real Time-PCR an. Zur Gewährleistung der Sensitivität und Spezifität des eingesetzten Verfahrens dienten neben *Neospora caninum*-(Negativ-Kontrolle) und *T. gondii*-DNA (Positiv-Kontrolle) positive und negative Aufbereitungs-Kontrollen. Darüberhinaus wurden noch eine *T. gondii*-positive (*T. gondii*-Gehirnzysten als Inokulum) und -negative Mäuse-Kontrollgruppe (PBS als Inokulum) mitgeführt. Die negative Kontrollgruppe wurde mithilfe des verwendeten Verfahrens ausnahmslos negativ detektiert. Bei der Untersuchung der Positiv-Kontrollgruppe konnte bei jedem der Tiere eine Infektion eindeutig nachgewiesen werden. Stichprobenartig durchgeführte Nachkontrollen (eine pro Versuchsmouse) reproduzierten die positiven Ergebnisse.

Um die Infektiösität des Ausgangsmaterials beurteilen zu können, wurden zwei Versuchsgruppen (Gruppen 3 und 4) mit am Schlachthof entnommener Muskulatur der beiden Schlachttierkörper inokuliert. Die Real Time-PCR wies bei 57,14 % (4/7) der Mäuse des ersten Schweines bzw. 25,00 % (2/8) bei denen des Zweiten eine Infektion nach. Damit waren insgesamt 40,00 % (6/15) der mit rohem Fleisch der Schlachttierkörper gefütterten Tiere *T. gondii*-DNA-positiv. Analog den Untersuchungen der Rohwurst-Erzeugnisse lag die Nachweisrate bei den mit den Erzeugnissen des ersten Schweines gefütterten Mäusen mit 57,14 % höher als bei denen des Zweiten mit 25,00 %. Die statistische Analyse ergab jedoch auch auf dieser Versuchsebene einen nicht signifikanten Unterschied zwischen den beiden Schlachttierkörpern mit  $p = 0,31$  (Exakter Test von Fischer, ACKERMANN; 1998). Vermutlich

ist die Kombination aus der geringen Anzahl (geschätzt wird eine Zyste auf 100 g Fleisch) und der unregelmäßigen Verteilung der Erregerzysten (ESTEBAN-REDONDO et al., 1999; HILL und DUBEY, 2002; FEHLHABER et al., 2003; HILL et al., 2006) als Ursache für die nicht infizierten Mäuse zu sehen. Dessen ungeachtet ist die Infektiösität des rohen Schweinefleisches durch die sechs positiven Mäuse zweifelsfrei nachgewiesen. Dies steht im Einklang mit früheren Untersuchungen (SOMMER et al., 1965; GROßKLAUS und BAUMGARTEN, 1967) und entspricht der allgemein anerkannten Auffassung, dass rohes oder ungenügend erhitztes Fleisch eine wichtige Quelle für eine *Toxoplasma*-Infektion ist (CHOI et al., 1997; ANONYM, 1999; COOK et al., 2000; SUKTHANA et al., 2000; HILL und DUBEY, 2002; BfR, 2005; BfR, 2006; HILL et al., 2006).

Bei den Real Time-PCR Untersuchungen der 288 mit unterschiedlichen Rohwurst-Erzeugnissen in verschiedenen Reifungsstadien gefütterten Versuchsmäuse wurden lediglich vier positive Signale erzeugt. Die nachgewiesene Infektionsrate liegt demnach bei 1,39 % (4/288) bzw. 1,41 % [4/283 (5 Todesfälle)] der mit Untersuchungsmaterial inokulierten Mäuse. In Bezug auf die Anzahl *T. gondii*-positiver Tiere sind einige Aspekte zu bedenken. Zuallererst ist hierbei die relativ geringe Inokulationsmenge von lediglich ca. 8 bis 12 g Wurstmasse pro Versuchsmaus zu berücksichtigen. Da nach Schätzungen durchschnittlich mit lediglich einer Zyste in 100 g Fleisch zu rechnen ist (HILL und DUBEY, 2002), ist davon auszugehen, dass einige Versuchsmäuse kein infektiöses Material aufgenommen haben. Analog wurde nur in 3,33 % der untersuchten Schweinefleischproben *T. gondii*-DNA nachgewiesen, obwohl mithilfe serologischer Methoden die Infestation der Schlachttierkörper in mehrfachen Tests bewiesen wurde. Ebenso erzeugten lediglich 14,29 % der untersuchten Wurstproben ein positives Real Time-PCR-Signal. Ferner sind in diesem Zusammenhang die nicht wiederholbaren positiven Real Time-PCR-Ergebnisse mehrerer Mäuse sowohl aus den Schlachttierkörper- als auch den Rohwursttestgruppen zu nennen. Obwohl bei diesen Tieren die positive Reaktion eine Infektion eindeutig bewiesen hat, konnten diese Ergebnisse in einigen Fällen nicht reproduziert werden. Dies weist darauf hin, dass auch bei nachgewiesenermaßen vorhandener Erreger-DNA im Untersuchungsgut nicht jeder Ansatz positiv detektiert wird. Entsprechend könnten diese Ergebnisse auf eine zu geringe Zystendichte zurückzuführen sein, die zur Folge hat, dass in einigen für die Real Time-PCR-Ansätze entnommenen Aliquots kein Erreger enthalten war.

Darüberhinaus ist denkbar, dass die Konzentration der Erreger-DNA in einigen Fällen unterhalb der Nachweisgrenze des verwendeten Verfahrens lag. Einen Hinweis darauf geben die positiven Real Time-PCR-Ergebnisse zweier Versuchsmäuse, die jedoch oberhalb des cut-offs ( $C_T$ -Wertes  $> 40,00$ ) lagen. Eine Maus gehörte zu einer Rohwurst-Testgruppe (Maus 1, Gruppe 7), die andere zu der eindeutig positiven Muskel-Kontrollgruppe (Maus 8, Gruppe 4). Bei beiden Tieren konnte das erzeugte Signal in Wiederholungsuntersuchungen ein weiteres Mal bestätigt werden, jedoch wiederum oberhalb des gesetzten Grenzwertes, so dass diese Tiere nicht in die Auswertung mit einbezogen werden konnten. Trotzdem weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass bei einigen Tieren die Erreger-Konzentration möglicherweise unterhalb der Nachweisgrenze lag und so eine erfolgte Infektion nicht nachgewiesen werden konnte.

*Schlussfolgernd ergeben sich drei Faktoren, die sich möglicherweise limitierend auf eine Infektion bzw. deren Nachweis ausgewirkt haben:*

- keine Aufnahme erregerhaltigen Probenmaterials aufgrund zu geringer Zystendichte und inhomogener Verteilung im Schlachttierkörper und der daraus produzierten Rohwurst-Erzeugnisse
- keine Erreger-DNA in für die Real Time-PCR entnommenen Aliquots der Mäuseorganproben aufgrund zu geringer Zystendichte und inhomogener Verteilung
- Konzentration an Erreger-DNA in den untersuchten Mäuse-Organ-Proben unterhalb der Nachweisgrenze der verwendeten Methode

Unabhängig von diesen Überlegungen beweist selbst die geringe Anzahl infizierter Tiere die Möglichkeit der Übertragung der Toxoplasmose über das Lebensmittel Rohwurst. Die weitergehenden Fragestellungen bezogen sich auf unterschiedliche Gefährdungspotentiale verschiedener Rohwurst-Sorten und unterschiedlicher Herstellungsverfahren. Zu diesem Zweck wurden Mett- und Teewürste als Beispiel kurzgereifter Produkte und Salami als langgereifte Rohwurst für den Versuch ausgewählt. Überdies erfolgte die Herstellung zum Einen auf handwerklich-traditionelle Art und zum Anderen unter Berücksichtigung ökologischer Prinzipien. Um eine eventuelle Abnahme der Infektiösität durch längere Reifung und Lagerung beurteilen zu können, erfolgte die Verfütterung an die Versuchstiere am Produktionstag, zum Zeitpunkt des theoretischen In-Verkehr-Bringens der

Fleischprodukte und am Ende des Mindesthaltbarkeitsdatums. Entsprechend dieser Gesichtspunkte wurden 36 Versuchstiergruppen mit unterschiedlichen Rohwurst-Erzeugnissen gefüttert.

Aufgrund der geringen Anzahl positiver Tiere kann jedoch keine Aussage über unterschiedliche Gefährdungspotentiale in Abhängigkeit vom Rohwurst-Erzeugnis bzw. vom Herstellungsverfahren getroffen werden. Die Unterschiede der genannten Parameter sind statistisch nicht signifikant. Um eine eventuelle Abhängigkeit von der pH-Wert- bzw. bei der Salami zusätzlich der  $a_w$ -Wert-Entwicklung untersuchen zu können, wurden diese Parameter nach der Herstellung in regelmäßigen Abständen untersucht. Auch hier konnte jedoch aufgrund der geringen Tierzahl keine Aussage über eine pH- oder  $a_w$ -Wert-abhängige Infektionsminderung getroffen werden.

Zu resümieren ist, dass alle drei einbezogenen Wurstsorten zu einer Infektion führten. In Bezug auf die Mett- und Teewurst, stellvertretend für kurzgereifte Rohwurst-Erzeugnisse, wurde die vielfach vertretene Ansicht einer von diesen Produkten ausgehenden Verbrauchergefahr (TENTER und FEHLHABER, 2002; BfR, 2005; BfR, 2006;) somit bestätigt. Unerwartet war hingegen der positive Infektionsnachweis einer mit Salami gefütterten Maus. Dies steht im Gegensatz zur bisherigen Auffassung, nach welcher langgereifte Rohwürste gemeinhin als sicher angesehen werden (SOMMER et al., 1965; TENTER und FEHLHABER, 2002, BfR, 2005; BfR, 2006). Die Ergebnisse lassen weiterhin den Schluss zu, dass Würste zum Zeitpunkt des In-Verkehr-Bringens und ebenso am Ende des MHD's noch infektiös sein können, da nachgewiesen werden konnte, dass eine Teewurst selbst zum Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums und zwei Mettwürste und eine Salami zum Zeitpunkt des In-Verkehr-Bringens zu einer Infektion geführt haben. Folglich ist davon auszugehen, dass auch die frisch produzierten Erzeugnisse *T. gondii*-Infektionen verursachen. In diesem Zusammenhang zu beachten sind die im Versuchsverlauf aufgetretenen sechs Todesfälle. Hiervon betroffen war ein Tier aus der Schlachttierkörperkontrollgruppe Nummer 3, die verbleibenden fünf Tiere gehörten verschiedenen Rohwurst-Testgruppen an. Diese mit Rohwurst-Erzeugnissen inokulierten Tiere waren alle mit Material vom Produktionstag gefüttert worden. Da die Mäuse innerhalb von wenigen Tagen nach der Infektion verstorben sind, kann eine *T. gondii*-Infektion mit Todesfolge aufgrund der nicht durchgeführten pathologischen Untersuchung zwar nicht bewiesen, aber auch nicht ausgeschlossen werden. Darüberhinaus kann auch eine zweimal oberhalb des gesetzten Grenzwertes der Real Time-

PCR detektierte Maus (Maus 1, Gruppe 7), gefüttert mit Erzeugnissen vom Produktionstag, als Indiz dafür angesehen werden, dass sich weitere Tiere infiziert haben, was aber mithilfe der verwendeten Methode nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte.

#### **5.4.2 Serologischer Erregernachweis**

Die zum Vergleich durchgeführte serologische Untersuchung der 320 Versuchsmäuse ergab von den Real Time-PCR-Untersuchungen teilweise abweichende Ergebnisse. Zwar wurden mittels des angewendeten Western-Blot-Verfahrens (freundlicherweise durchgeführt von Dr. Schares, Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit) sowohl die Negativ- als auch die artifiziell infizierte Positiv-Kontrollgruppe richtig erkannt, bei den mit unbehandelter Muskulatur gefütterten Mäusen der Gruppen drei und vier konnte, im Gegensatz zur Real Time-PCR-Analyse, jedoch bei keinem Tier eine Infektion nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurde bei einer Maus der Gruppe 29 (gefüttert mit handwerklich produzierter Mettwurst, zum Ende des Mindesthaltbarkeitsdatums) eine deutlich positive Reaktion festgestellt. Dieses Ergebnis konnte in mehrfachen Wiederholungsuntersuchungen mittels Real Time-PCR, wobei auch neue DNA-Aufbereitungen einbezogen wurden, molekularbiologisch nicht bestätigt werden. Bei 16 weiteren Tieren wurden „schwach positive“ Ergebnisse erzielt, die nicht eindeutig interpretierbar sind. Mithilfe der Real Time-PCR konnte nur bei einer (Maus acht, Gruppe 25) dieser 16 Mäuse eine Infektion nachgewiesen werden. Diese Übereinstimmung der Untersuchungsergebnisse weist zwar auf die Möglichkeit hin, dass bei den anderen 15 Tieren ebenfalls eine Infektion vorgelegen haben könnte, diese Vermutung kann jedoch nicht bestätigt werden.

In diesem Zusammenhang zu berücksichtigen sind die bei serologischen *Toxoplasma*-Untersuchungen grundsätzlich nicht vollkommen auszuschließenden Kreuzreaktionen mit nahe verwandten Parasiten, in deren Folge es zu falsch positiven Ergebnissen kommen kann sowie unterschiedliche Ansichten über anzusetzende Cut-off-Werte (EFSA, 2007; LUNDÉN et al., 2002; TENTER et al., 2000).

Entsprechend diesen Ausführungen kann mithilfe dieses Verfahrens auf der Grundlage der nicht eindeutig interpretierbaren Ergebnisse der „schwach positiv“ getesteten Versuchsmäuse keine Aussage über die Infektionswahrscheinlichkeit getroffen werden.



Trotzdem weisen auch die mit dieser Methode erzielten Ergebnisse auf eine mögliche Übertragbarkeit des Erregers über das Lebensmittel Rohwurst hin.

## **6. Schlussfolgerung**

Als Ergebnis dieser Studie muss demnach bei im Handel befindlichen Rohwurst-Erzeugnissen mit dem Vorkommen infektionsfähiger *T. gondii*-Entwicklungsstadien gerechnet werden. Entsprechend der allgemeinen Auffassung (TENTER und FEHLHABER, 2002; BfR, 2005) haben sich kurzgereifte Mett- und Teewürste als potentielle Infektionsquellen erwiesen. Der positive Nachweis einer Infektion bei einer mit gereifter Salami gefütterten Maus ist sehr überraschend und sollte ebenso Gegenstand weiterer Forschung sein wie der möglicherweise unterschiedliche Einfluss verschiedener Herstellungsverfahren (handwerklich/ökologisch), der nicht abschließend geklärt werden konnte.

Das Risiko einer Infektion erscheint unter Zugrundelegung der hier vorgestellten Ergebnisse [Infektionsrate 1,39 %, (Real Time-PCR)] relativ gering. Zu bedenken ist jedoch, dass der Mensch bei dem Verzehr von Rohwurst-Erzeugnissen in der Regel größere Mengen aufnimmt, als die in diesem Versuch an die Mäuse verfütterten Inokula. Unter Berücksichtigung des Aspektes, dass die *T. gondii*-Infektionsdosis für den Menschen nicht bekannt ist, auf der Grundlage mehrere Untersuchungen bei verschiedenen Tieren aber davon auszugehen ist, dass bereits eine Zyste für eine Infektion ausreicht (DUBEY, 1996; DUBEY et al., 1996; WAINRIGHT et al., 2007), könnte die Infektionsrate für den Menschen höher liegen. Entsprechend sollten, im Einklang mit vielfachen Empfehlungen, immunsupprimierte Personen und immunologisch nicht geschützte schwangere Frauen als Präventivmaßnahme auf den Verzehr von rohem, unzureichend gegartem Fleisch sowie auf kurzgereifte Rohwurst-Erzeugnisse verzichten (BfR, 2006; GROß, 2004). In Anlehnung an die eigenen Untersuchungen sollte der Verzicht bis zur endgültigen Klärung auf alle Rohwurst-Erzeugnisse ausgedehnt werden.

## 7. Zusammenfassung

Die *T. gondii*-Infektion wird durch kontaminierte Lebensmittel übertragen. Sie kann diaplazentar erfolgen oder durch zufälligen Kontakt entstehen (z.B. Katzentoilette, Sandkasten, Gartenarbeit). Neben mit Oozysten kontaminierter Nahrung (Obst, Gemüse, Trinkwasser) spielt vor allem rohes bzw. unzureichend erhitztes Fleisch eine entscheidende Rolle für die alimentäre Übertragung der Erkrankung (KAPPERUD et al., 1996; CHOI et al., 1997; COOK et al., 2000; SUKTHANA et al., 2000).

Aufgrund fehlender Erhitzungsschritte im Herstellungsprozess von Rohwurst-Erzeugnissen ist das Infektionspotential dieser Produkte nicht geklärt (TENTER und FEHLHABER, 2002). Beruhend auf den Ergebnissen von SOMMER et al. (1965) werden langgereifte Erzeugnisse (z. B. Salami) gemeinhin als sicher angesehen (TENTER und FEHLHABER, 2002; BfR, 2005; BfR, 2006). Das BfR warnt jedoch vor einer möglichen Infektionsgefahr bei dem Verzehr kurzgereifter Produkte, wie Mett- und Teewürsten (BfR, 2005). Darüberhinaus bedürfen ökologische Erzeugnisse ebenfalls genauerer Betrachtung, da einerseits mit einem erhöhten Vorkommen von *T. gondii* in den Schlachttierkörpern zu rechnen ist (SCHULZIG und FEHLHABER, 2006) und andererseits der bei ökologisch gefertigten Produkten oftmalige Verzicht auf Nitritpökelsalz ebenso wie vielfach festgestellte Qualitätsschwankungen bei der Herstellung von Rohwurst-Erzeugnissen das Überleben von Erreger-Zysten begünstigen können (SOMMER et al., 1965; MÜLLER et al., 1994; TENTER und FEHLHABER, 2002).

Auf der Basis dieser Literaturangaben war das Ziel dieses Projektes einen Beitrag zur Einschätzung des möglichen Gefährdungspotentials von Rohwurst-Erzeugnissen für den Verbraucher zu leisten. Hierfür wurden zwei Schweine intravenös mit dem Erreger infiziert und der Infektionserfolg serologisch mithilfe des IHA- und des Western-Blot-Verfahrens (freundlicherweise durchgeführt von Dr. Schares, Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit) überprüft. Im Alter von 6 Monaten wurden die Tiere geschlachtet und die Schlachttierkörper mithilfe einer für dieses Projekt am Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde der Justus-Liebig-Universität Gießen entwickelten Real Time-PCR untersucht. Das Fleisch der Tiere wurde zu verschiedenen Rohwurst-Erzeugnissen verarbeitet und diese ebenfalls auf *T. gondii*-DNA untersucht. Um die potentielle Infektionsgefahr lang- und kurzgereifter Erzeugnisse miteinander vergleichen zu können, wurde Salami als Beispiel einer langgereiften Rohwurst ausgewählt, Mett- und Teewürste

dienten als Beispiel kurzgereifter Erzeugnisse. Darüberhinaus wurden alle Rohwurst-Sorten sowohl konventionell als auch unter Berücksichtigung ökologischer Rezepturen hergestellt. Zur Überprüfung der Infektiösität der erzeugten Produkte wurden diese an BALB/c Mäuse verfüttert. Nach ungefähr 45 Tagen wurden die Tiere getötet und die Organe (Hirn, Herz, Milz) mithilfe der Real Time-PCR auf eine stattgefundene Infektion untersucht. Es gelang, den Erreger sowohl in beiden Schlachttierkörpern als auch in jeder produzierten Rohwurst-Charge nachzuweisen. Folglich konnte eine Erregerhaltigkeit der verwendeten Rohwurst-Inokula bewiesen werden. Bei der Real Time-PCR-Untersuchung der Mäuse konnte bei jedem Tier der Positivkontrollgruppe eine Infektion detektiert werden, die Negativkontrollgruppe ergab hingegen ausnahmslos negative Ergebnisse. Bei zwei weiteren mit unbehandelter Schweinemuskulatur der Schlachttierkörper gefütterten Mäusegruppen gelang der Nachweis bei vier von sieben bzw. zwei von acht Versuchsmäusen. Dies bestätigt die allgemein vertretene Auffassung, dass rohes Fleisch eine wichtige Quelle für eine *Toxoplasma*-Infektion ist.

Von den 288 mit Rohwurst-Erzeugnissen gefütterten Mäusen wurden vier positiv auf *T. gondii*-DNA getestet. Aufgrund der geringen positiven Tierzahl kann keine Aussage über unterschiedliche Gefährdungspotentiale in Abhängigkeit vom Rohwurst-Erzeugnis bzw. vom Herstellungsverfahren getroffen werden; die unterschiedlichen Ergebnisse erwiesen sich als statistisch nicht signifikant. Zu beachten ist, dass alle drei einbezogenen Wurstsorten zu einer Infektion geführt haben. In Bezug auf die Mett- und Teewurst wurde somit die vielfach vertretene Ansicht einer von diesen Produkten ausgehenden Verbrauchergefahr bestätigt. Unterwartet war hingegen der positive Infektionsnachweis einer mit Salami gefütterten Maus. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zur bisherigen Auffassung, nach welcher langgereifte Rohwürste gemeinhin als sicher angesehen werden.

Als Ergebnis dieser Studie ist demnach bei im Handel befindlichen Rohwurst-Erzeugnissen eine Verbrauchergefahr gegeben, die Übertragungswahrscheinlichkeit erscheint jedoch relativ gering. Ein möglicherweise unterschiedliches Gefährdungspotential verschiedener Rohwurst-Sorten und Herstellungsverfahren konnte nicht abschließend geklärt werden. Entsprechend besteht zur Sicherung der hier vorgestellten Ergebnisse weiterer Forschungsbedarf.

## 8. Summary

*T. gondii*-infections basically occur on account of contaminated foodstuffs, are passed over diaplacentally or through casual contact (e.g. cat litter box, sandpit, gardening). Besides foodstuffs contaminated with oocysts (fruits, vegetables, drinking water), raw or insufficiently heated meat products play a decisive role for nutrition-based infections (KAPPERUD et al., 1996; CHOI et al., 1997; COOK et al., 2000; SUKTHANA et al., 2000). On account of missing heating while manufacturing raw sausages the actual infection risk of these products has not been evaluated yet (TENTER und FEHLHABER, 2002). Based on results of SOMMER et al. (1965) long-ripened products (e. g. Salami) are generally considered as being safe (TENTER et al., 2000; BfR, 2005; BfR, 2006), nevertheless the BfR has brought out a warning regarding consumption of short-ripened products, such as “Mettwurst” and “Teewurst” (BfR, 2005). Furthermore ecologically produced sausages also require closer examination since on the one hand an increasing number of contagioned carcasses might occur (SCHULZIG und FEHLHABER, 2006); on the other hand, the omitting of nitrite-salt as well as frequently observed variations of quality during the ecological manufacturing process might lead to a prolonged survival of cysts (SOMMER et al., 1965; MÜLLER et al., 1994; TENTER und FEHLHABER, 2002).

Based on these literature statements an estimation of the potential risk of raw sausages was goal of this investigation. Therefore two pigs were infected with the pathogen. The success of the infection was proved serologically by using the IHA- and the Western Blot technique (kindly carried out by Dr. Schares, Friedrich-Loeffler-Institut, Federal Research Institute for Animal Health). At the age of six months the animals were slaughtered. The carcasses were tested positively for oocysts with a Real Time-PCR, newly developed and established for this project at the Institute of Veterinary Food Science in Gießen. The obtained meat has been manufactured into different kinds of raw sausages which were also tested for *T. gondii*-DNA. To be able to compare the potential infection risk of long and short ripened products, Salami served as an example for long-ripened sausages, “Mett-“ and “Teewürste” represented short-ripened products. Furthermore all kinds of raw sausages were produced traditionally as well as ecologically. To achieve basic knowledge about the infectivity of the products the raw sausages were fed to BALB/c mice. After about 45 days the laboratory animals were

killed, and their organs (brain, heart and spleen) were tested for an occurred infection, again by using the Real Time-PCR.

The pathogen was detected in the carcasses as well as in each of the raw sausages. On account of this it can be taken for granted that the fed raw sausage-inocula contained *T. gondii*. The Real Time-PCR of the mice proved an infection in each of the positive control group animals, the negative control group was detected negative without exception. The parasite-DNA was also found in four of seven, respectively two of eight animals out of the two groups fed with unhandled meat taken from the carcasses on the slaughtering day. This confirms the general conception, where raw meat is considered to be an important source of a *Toxoplasma*-infection.

Four mice – out of a total of 288 mice fed with raw sausages – were positively detected for *T. gondii*-DNA. Because of the low number of positive animals no statement can be made regarding different risk potentials neither due to the raw sausage type nor due to the manufacturing process; the different results turned out to be statistically not significant. It certainly has to be noted that all three kinds of sausages led to an infection. Considering the “Mett-“ and “Teewurst” the results confirm the common opinion of a consumer hazard coming from these products. An unexpected result was the detected infection of a mouse which had been inoculated with Salami. This is contradictory to the general opinion seeing long-ripened sausages commonly as safe.

As a result of this study a consumer hazard by commercial raw sausage products has to be considered as probable even though the probability of an infestation appears to be quite low. The possibility of different risk potentials regarding different raw sausage types and their manufacturing processes could not be resolved. In order to confirm the achieved results further investigations are required.

## Anhang I: Rezepturen



### A) Hessische Bauern-Mettwurst

Leitsätze für Fleisch- und Fleischerzeugnisse

Leitsatzkennziffer: 2.211.10

Mindestanforderungen (chemisch):

BEFFE: nicht < 12%

BEFFE/FE: nicht < 75%

Bei strenger Fleischsortierung und Annahme von 10 % Gewichtsverlust sind folgende Analysenwerte zu erwarten:

BEFFE:	12,4 %	FETT:	39,5 %
BEFFE/FE:	87,0 %	WASSER:	43,3 %
FE:	14,3 %	FREMDWASSER:	0,0 %

#### MATERIALZUSAMMENSETZUNG

Menge	Material
2,0 kg	Schweinefleisch S II
5,0 kg	Schweinefleisch S IV
3,0 kg	Schweinefleisch S V

#### GEWÜRZE UND ZUTATEN PRO KG WURSTMASSE

Menge	Zutaten und Gewürze
26,0 g	Nitritpökelsalz
4,0 g	Pfeffer, weiß, gemahlen
0,5 g	Muskatnuss, gemahlen (fakultativ)
0,2 g	Knoblauch, frisch
3,0 g	Glucose (Dextrose)
nach Herstelleranweisung (25 g/ 100 kg)	T-SC 150

#### ARBEITSABLAUF

1. Durchkühlen sämtlicher Ausgangsmaterialien für 24 Stunden bei ca. +2 °C
2. Fleischmaterial mit allen Zutaten und Gewürzen gut durchmischen und anschließend wölfen (3mm Scheibe)
3. Um eine bindige Konsistenz zu erhalten, wird das Brät vor dem Füllen gut durchmischt
4. Anschließend erfolgt eine luftfreie Abfüllung in Cellophanhüllen (Kaliber 38/40)
5. 24 h: Reifen bei + 24° C und einer rel. Luftfeuchtigkeit von ca. 94 %
6. 12 h: Reifen bei + 20° bis + 22° C und einer rel. Luftfeuchtigkeit von ca. 85 - 90 %
7. 12 h: Kaltrauch bei ≤ + 20° C (goldgelb räuchern)
8. Aufbewahren bei ca. + 15° C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 70 % - 75 %

## B) Hessische ÖKO Bauern-Mettwurst

Leitsätze für Fleisch- und Fleischerzeugnisse

Leitsatzkennziffer: 2.211.10

Mindestanforderungen (chemisch):

BEFFE: nicht < 12 %

BEFFE/FE: nicht < 75 %

Bei strenger Fleischsortierung und Annahme von 15 % Gewichtsverlust sind folgende Analysenwerte zu erwarten:

BEFFE:	12,4 %	FETT:	39,5 %
BEFFE/FE:	87,0 %	WASSER:	43,3 %
FE:	14,3 %	FREMDWASSER:	0,0 %

### MATERIALZUSAMMENSETZUNG

Menge	Material
2,0 kg	Schweinefleisch S II
5,0 kg	Schweinefleisch S IV
3,0 kg	Schweinefleisch S V

### GEWÜRZE UND ZUTATEN PRO KG WURSTMASSE

Menge	Zutaten und Gewürze
26,0 g	Meersalz
4,0 g	Pfeffer, weiß, gemahlen
0,5 g	Muskatnuss, gemahlen
0,2 g	Knoblauch, frisch
3,0 g	Glucose (Dextrose)
nach Herstelleranweisung (25 g/ 100 kg)	Starterkulturen T-SC 150, S-SX

### ARBEITSABLAUF

1. Durchkühlen sämtlicher Ausgangsmaterialien für 24 Stunden bei ca. +2° C
2. Fleischmaterial mit allen Zutaten und Gewürzen gut durchmischen und anschließend wölfen (3mm Scheibe)
3. Um eine bindige Konsistenz zu erhalten, wird das Brät vor dem Füllen gut durchmischt
4. Luftfreie Abfüllung in Cellophanhüllen (Kaliber 38/40)
5. 24 h: Reifen bei +24 °C und einer rel. Luftfeuchtigkeit von ca. 94 %
6. 72 h: Reifen bei +20 °bis + 22°C und einer rel. Luftfeuchtigkeit von ca. 85 – 90 %
7. 24 h: Kaltrauch bei ≤ + 20 °C (goldgelb räuchern)
8. Aufbewahren bei ca. + 15 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 70 % - 75 %

## C) Teewurst

Leitsätze für Fleisch- und Fleischerzeugnisse:

Leitsatzkennziffer: 2.212.1

Mindestanforderungen (chemisch):

BEFFE: 10 %

BEFFE/FE: 85 %

Bei strenger Fleischsortierung und Annahme von 5 % Gewichtsverlust sind folgende Analysenwerte zu erwarten:

BEFFE:	11,0 %	FETT:	42,4 %
BEFFE/FE:	88,5 %	WASSER:	42,1 %
FE:	12,5 %	FREMDWASSER:	0,0 %

### MATERIALZUSAMMENSETZUNG

Menge	Material
3,0 kg	Schweinefleisch S II
2,0 kg	Schweinefleisch S I
5,0 kg	Schweinefleisch S X

### GEWÜRZE UND ZUTATEN (pro kg Wurstmasse)

Menge	Zutaten und Gewürze
24,0 g	Nitritpökelsalz
2,0 g	Pfeffer, weiß, gemahlen
1,5 g	Paprika, edelsüß, gemahlen
0,2 g	Kardamom, in der Schale gemahlen
0,4 g	Ingwer, gemahlen
2,0 g	Rum mit Wacholder
3,0 g	Glukose
nach Herstelleranweisung (25 g/ 100 kg)	Starterkulturen T-SC 150

### ARBEITSABLAUF

1. Durchkühlen sämtlicher Ausgangsmaterialien für 24 Stunden bei ca. +2 °C
2. Fleischmaterial mit allen Zutaten und Gewürzen gut durchmischen und anschließend wolfen (3mm Scheibe)
3. Mit Gewürzen und Zusatzstoffen feinkuttern bis die gewünschte sahnige Konsistenz erreicht ist
4. Nitritpökelsalz zum Schluß zusetzen und bis zur gleichmäßigen Salzverteilung fertigungskuttern (Kutterendtemperatur: +16 °C)
5. Füllen in Cellophanhüllen (Kaliber 42/20)
6. 48 h bei ca. 22 °C und 85 % rel. Luftfeuchtigkeit umröten lassen
7. Im Kaltrauch bei ca. 20 °C und 75 % rel. Luftfeuchtigkeit zugluftfrei räuchern
8. Aufbewahren bei + 12 bis + 14 °C, 75 % rel. Luftfeuchtigkeit, dunkler zugluftfreier Raum



## D) ÖKO Teewurst

Leitsätze für Fleisch- und Fleischerzeugnisse:

Leitsatzkennziffer: 2.212.1

Mindestanforderungen (chemisch):

BEFFE:	10 %
BEFFE/FE:	85 %

Bei strenger Fleischsortierung und Annahme von 5 % Gewichtsverlust sind folgende Analysenwerte zu erwarten:

BEFFE:	11,0 %	FETT:	42,4 %
BEFFE/FE:	88,5 %	WASSER:	42,1 %
FE:	12,5 %	FREMDWASSER:	0,0 %

### MATERIALZUSAMMENSETZUNG

Menge	Material
3,0 kg	Schweinefleisch S II
2,0 kg	Schweinefleisch S I
5,0 kg	Schweinefleisch S X

### GEWÜRZE UND ZUTATEN (pro kg Wurstmasse)

Menge	Zutaten und Gewürze
24,0 g	Meersalz
2,0 g	Pfeffer, weiß, gemahlen
1,5 g	Paprika, edelsüß, gemahlen
0,2 g	Kardamom, in der Schale gemahlen
0,4 g	Ingwer, gemahlen
2,0 g	Rum mit Wacholder
3,0 g	Glukose
nach Herstelleranweisung (25 g/ 100 kg)	Starterkulturen T-SC 150, S-SX

### ARBEITSABLAUF

1. Durchkühlen sämtlicher Ausgangsmaterialien für 24 Stunden bei ca. + 2 °C
2. Fleischmaterial mit allen Zutaten und Gewürzen gut durchmischen und anschließend wolfen (3mm Scheibe)
3. Mit Gewürzen und Zusatzstoffen feinkuttern bis die gewünschte sahnige Konsistenz erreicht ist
4. Meersalz zum Schluß zusetzen und bis zur gleichmäßigen Salzverteilung fertigungskuttern (Kutterendtemperatur: + 16 °C)
5. Füllen in Cellophanhüllen (Kaliber 42/20)
6. 96 h bei ca. + 22 °C und 85 % rel. Luftfeuchtigkeit umröten lassen
7. 24h im Kaltrauch bei ca. + 20 °C und 75 % rel. Luftfeuchtigkeit zugluftfrei räuchern
8. Aufbewahren bei + 12 bis + 14 °C, 75 % rel. Luftfeuchtigkeit, dunkler zugluftfreier Raum

## E) Salami (mittelgrob)

Leitsätze für Fleisch- und Fleischerzeugnisse:

Leitsatzkennziffer: 2.211.05

Mindestanforderungen (chemisch):

BEFFE: 12 %

BEFFE/FE: 80 %

Bei strenger Fleischsortierung und Annahme von 15 % Gewichtsverlust sind folgende Analysenwerte zu erwarten:

BEFFE:	15,4 %	FETT:	34,1 %
BEFFE/FE:	91,9 %	WASSER:	45,1 %
FE:	16,7 %	FREMDWASSER:	0,0%

### MATERIALZUSAMMENSETZUNG

Menge	Material
5,0 kg	Schweinefleisch S VIII
15,0 kg	Schweinefleisch S II

### GEWÜRZE UND ZUTATEN PRO KG GESAMTMASSE

Menge	Zutaten und Gewürze
30,0 g	Nitritpökelsalz
4,0 g	Pfeffer, weiß, gemahlen
6,0 g	Glukose
2 Stück	Knoblauchzehen
nach Herstelleranweisung (25 g/ 100 kg)	Starterkulturen T-SC 150, S-SX

### ARBEITSANWEISUNG

1. Schweinefleisch S II kuttern (Erbsengröße), alle Gewürze und Zutaten bis auf das Nitritpökelsalz dazugeben
2. Schweinefleisch S VIII ca. 15 Runden unterkuttern
3. Schweinefleisch S II frisch einkuttern; ca. 10 Runden vor Schluss Salz zugeben
4. Füllen in Hukkihüllen (Kaliber 40/43)
5. Reifen: 2 - 10 h bei Raumtemperatur abtrocknen
 

4,0 h	+ 24 °C	88 % r. F.	Umluft 100 %	
24,0 h	+ 24 °C	94 % r. F.	Umluft 50 %	
23,5 h	+ 22 °C	92 % r. F.	Umluft 50 %	
0,5 h	+ 22 °C	92 % r. F.	Umluft 100 %	Glimmrauch
12,0 h	+ 20 °C	90 % r. F.	Umluft 30 %	
23,5 h	+ 18 °C	88 % r. F.	Umluft 30 %	
0,5 h	+ 18 °C	88 % r. F.	Umluft 100 %	Glimmrauch
48,0 h	+ 18 °C	88 % r. F.	Umluft 30 %	

Ab dem 6. Tag können die Würste fertig geräuchert werden und bei einer Temperatur von ca. 15 °C und einer rel. Luftfeuchtigkeit von ca. 75 % zugluftfrei gelagert werden.

## F) ÖKO Salami (mittelgrob)

Leitsätze für Fleisch- und Fleischerzeugnisse:

Leitsatzkennziffer: 2.211.05

Mindestanforderungen (chemisch):

	BEFFE:	12 %
	BEFFE/FE:	80 %

Bei strenger Fleischsortierung und Annahme von 15 % Gewichtsverlust sind folgende Analysenwerte zu erwarten:

BEFFE:	15,4 %	FETT:	34,1%
BEFFE/FE:	91,9 %	WASSER:	45,1 %
FE:	16,7 %	FREMDWASSER:	0,0 %

### MATERIALZUSAMMENSETZUNG FÜR

Menge	Material
5,0 kg	Schweinefleisch S VIII
15,0 kg	Schweinefleisch S II

### GEWÜRZE UND ZUTATEN PRO KG GESAMTMASSE

Menge	Zutaten und Gewürze
30,0 g	Meersalz
4,0 g	Pfeffer, weiß, gemahlen
6,0 g	Glukose
2 Stück	Knoblauchzehen
nach Herstelleranweisung (25g/100kg)	Starterkulturen T-SC 150, S-SX

### ARBEITSANWEISUNG

1. Schweinefleisch S II kuttern (Erbsengröße), alle Gewürze und Zutaten bis auf das Meersalz dazugeben.
2. Schweinefleisch SVIII ca. 15 Runden unterkuttern.
3. Schweinefleisch S II frisch einkuttern; ca. 10 Runden vor Schluss Meersalz zugeben.
4. Füllen in Hukkihüllen (Kaliber 40/43).
5. Reifen: 2 - 10 h bei Raumtemperatur abtrocknen.
 

4,0 h + 24° C	88 % r. F.	Umluft	100 %	
24,0 h + 24° C	94 % r. F.	Umluft	50 %	
23,5 h + 22° C	92 % r. F.	Umluft	50 %	
0,5 h + 22° C	92 % r. F.	Umluft	100 %	Glimmrauch
12,0 h + 20° C	90 % r. F.	Umluft	30 %	
23,5 h + 18° C	88 % r. F.	Umluft	30 %	
0,5 h + 18° C	88 % r. F.	Umluft	100 %	Glimmrauch
48,0 h + 18° C	88 % r. F.	Umluft	30 %	

Ab dem 6. Tag können die Würste fertig geräuchert und bei einer Temperatur von ca. 15° C und einer rel. Luftfeuchtigkeit von ungefähr 75 % zugluftfrei gelagert werden.

## Anhang II: Real Time-PCR-Ergebnisse der nativen Schweinegewebe

Probe	Schwein I			Schwein II		
	Bezeichnung		C <sub>T</sub> -Wert	Bezeichnung		C <sub>T</sub> -Wert
<b>Vorderbein, links (VBL)</b>	Sw1 <sup>1)</sup> VBL a <sup>2)</sup>		n. d. <sup>3)</sup>	Sw2 <sup>4)</sup> VBL a		n. d.
	Sw1 VBL b <sup>5)</sup>		n. d.	Sw2 VBL b		n. d.
	Sw1 VBL c <sup>6)</sup>		n. d.	Sw2 VBL c		n. d.
<b>Vorderbein, rechts (VBR)</b>	Sw1 VBR a		n. d.	Sw2 VBR a		39,16
	Sw1 VBR b		n. d.	Sw2 VBR b		n. d.
	Sw1 VBR c		n. d.	Sw2 VBR c		n. d.
<b>Hinterbein, links (HBL)</b>	Sw1 HBL a		n. d.	Sw2 HBL a		n. d.
	Sw1 HBL b		n. d.	Sw2 HBL b		n. d.
	Sw1 HBL c		n. d.	Sw2 HBL c		n. d.
<b>Hinterbein, rechts (HBR)</b>	Sw1 HBR a		43,31	Sw2 HBR a		n. d.
	Sw1 HBR b		38,00	Sw2 HBR b		n. d.
	Sw1 HBR c		n. d.	Sw2 HBR c		n. d.
<b>Bauch (B)</b>	Sw1 B a		n. d.	Sw2 B a		n. d.
	Sw1 B b		n. d.	Sw2 B b		n. d.
	Sw1 B c		n. d.	Sw2 B c		n. d.
<b>Rücken</b>	Sw1 R a		n. d.	Sw2 R a		n. d.
	Sw1 R b		n. d.	Sw2 R b		n. d.
	Sw1 R c		n. d.	Sw2 R c		n. d.
<b>Zwerchfell (Zf)</b>	Sw1 Zf a		n. d.	Sw2 Zf a		n. d.
	Sw1 Zf b		n. d.	Sw2 Zf b		n. d.
	Sw1 Zf c		n. d.	Sw2 Zf c		n. d.
<b>Zunge (Zu)</b>	Sw1 Zu a		n. d.	Sw2 Zu a		n. d.
	Sw1 Zu b		n. d.	Sw2 Zu b		n. d.
	Sw1 Zu c		n. d.	Sw2 Zu c		n. d.
<b>Herz (He)</b>	Sw1 He a		n. d.	Sw2 He a		n. d.
	Sw1 He b		n. d.	Sw2 He b		n. d.
	Sw1 He c		n. d.	Sw2 He c		n. d.
<b>Gehirn (Hi)</b>	Sw1 Hi a		n. d.	Sw2 Hi a		n. d.
	Sw1 Hi b		n. d.	Sw2 Hi b		n. d.
	Sw1 Hi c		n. d.	Sw2 Hi c		n. d.

1) Schwein 1

2) Ansatz A

3) nicht detektiert

4) Schwein 2

5) Ansatz b

6) Ansatz C

## Anhang III: Real Time-PCR-Ergebnisse der Mäusegruppen 1 bis 4

Mäusekennzeichnung	C <sub>T</sub> -Werte Gr. <sup>1</sup> . 1	C <sub>T</sub> -Werte Gr. 2	C <sub>T</sub> -Werte Gr. 3	C <sub>T</sub> -Werte Gr. 4
Ms <sup>1</sup> 1 Hi <sup>2</sup> A <sup>3</sup>	n. d. <sup>4</sup>	23,17	38,49	n. d.
Ms 1 Hi B <sup>5</sup>	n. d.	23,58	n. d.	n. d.
Ms 1 He <sup>6</sup> A	n. d.	29,51	36,65	n. d.
Ms 1 He B	n. d.	29,48	35,86	n. d.
Ms 1 Mz <sup>7</sup> A	n. d.	27,97	36,17	n. d.
Ms 1 Mz B	n. d.	28,83	n. d.	n. d.
Ms 2 Hi A	n. d.	24,01	n. d.	n. d.
Ms 2 Hi B	n. d.	24,52	n. d.	n. d.
Ms 2 He A	n. d.	31,89	39,91	n. d.
Ms 2 He B	n. d.	31,59	n. d.	n. d.
Ms 2 Mz A	n. d.	31,64	n. d.	n. d.
Ms 2 Mz B	n. d.	32,87	n. d.	n. d.
Ms 3 Hi A	n. d.	31,86	n. d.	n. d.
Ms 3 Hi B	n. d.	31,36	n. d.	n. d.
Ms 3 He A	n. d.	28,65	n. d.	n. d.
Ms 3 He B	n. d.	28,92	n. d.	n. d.
Ms 3 Mz A	n. d.	23,36	n. d.	n. d.
Ms 3 Mz B	n. d.	23,68	n. d.	n. d.
Ms 4 Hi A	n. d.	21,85	34,14	34,17
Ms 4 Hi B	n. d.	22,70	n. d.	38,00
Ms 4 He A	n. d.	27,67	n. d.	n. d.
Ms 4 He B	n. d.	28,77	n. d.	n. d.
Ms 4 Mz A	n. d.	32,09	n. d.	n. d.
Ms 4 Mz B	n. d.	32,72	n. d.	n. d.
Ms 5 Hi A	n. d.	20,64	n. d.	n. d.
Ms 5 Hi B	n. d.	21,54	n. d.	n. d.
Ms 5 He A	n. d.	26,82	34,00	n. d.
Ms 5 He B	n. d.	27,16	33,74	n. d.
Ms 5 Mz A	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Ms 5 Mz B	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Ms 6 Hi A	n. d.	23,19	n. d.	n. d.
Ms 6 Hi B	n. d.	23,98	n. d.	n. d.
Ms 6 He A	n. d.	26,67	n. d.	n. d.
Ms 6 He B	n. d.	27,25	n. d.	n. d.
Ms 6 Mz A	n. d.	31,95	n. d.	n. d.
Ms 6 Mz B	n. d.	32,00	n. d.	n. d.
Ms 7 Hi A	n. d.	22,93	n. d.	n. d.
Ms 7 Hi B	n. d.	23,81	n. d.	n. d.
Ms 7 He A	n. d.	28,70	n. d.	n. d.
Ms 7 He B	n. d.	29,35	n. d.	n. d.
Ms 7 Mz A	n. d.	30,64	n. d.	n. d.
Ms 7 Mz B	n. d.	31,02	n. d.	n. d.

## Fortsetzung der Tabelle: Real Time-PCR-Ergebnisse der Mäusegruppen 1 bis 4

Mäusekennzeichnung	C <sub>T</sub> -Werte Gr. 1	C <sub>T</sub> -Werte Gr. 2	C <sub>T</sub> -Werte Gr. 3	C <sub>T</sub> -Werte Gr. 4
<b>Ms 8 Hi A</b>	n. d.	18,42	/ <sup>8)</sup>	39,74
<b>Ms 8 Hi B</b>	n. d.	19,36	/	n. d.
<b>Ms 8 He A</b>	n. d.	24,54	/	n. d.
<b>Ms 8 He B</b>	n. d.	25,19	/	n. d.
<b>Ms 8 Mz A</b>	n. d.	27,13	/	41,00
<b>Ms 8 Mz B</b>	n. d.	27,32	/	n. d.

1) Maus

2) Hirn

3) Ansatz A

4) nicht detektiert

5) Ansatz B

6) Herz

7) Milz

8) Versuchstier verstorben

## Anhang IV: Real Time-PCR-Ergebnisse der Rohwurst-Erzeugnisse

### A) Handwerklich produzierte Mettwurst

Probe	Schwein I		Schwein II	
	Bezeichnung	C <sub>T</sub> -Wert	Bezeichnung	C <sub>T</sub> -Wert
	Sw1 <sup>1)</sup> CH1 <sup>2)</sup> a <sup>3)</sup>	n. d. <sup>4)</sup>	Sw2 <sup>5)</sup> CH1 a	n. d.
	Sw1 CH1 b	n. d.	Sw2 CH1 b	n. d.
	Sw1 CH1 c	n. d.	Sw2 CH1 c	n. d.
	Sw1 CH1 d	n. d.	Sw2 CH1 d	n. d.
	Sw1 CH1 e	n. d.	Sw2 CH1 e	39,50
	Sw1 CH1 f	n. d.	Sw2 CH1 f	38,34
	Sw1 CH1 g	n. d.	/ <sup>6)</sup>	/
	Sw1 CH1 h	n. d.	/	/
	Sw1 CH1 i	n. d.	/	/
	Sw1 CH1 j	n. d.	/	/
	Sw1 CH1 k	n. d.	/	/
<b>Mettwurst, Handwerk</b>	Sw1 CH1 l	n. d.	/	/
	Sw1 CH1 m	n. d.	/	/
	Sw1 CH1 n	n. d.	/	/
	Sw1 CH1 o	n. d.	/	/
	Sw1 CH1 p	n. d.	/	/
	Sw1 CH1 q	n. d.	/	/
	Sw1 CH1 r	n. d.	/	/
	Sw1 CH1 s	n. d.	/	/
	Sw1 CH1 t	n. d.	/	/
	Sw1 CH1 u	38,91	/	/
	Sw1 CH1 v	n. d.	/	/
	Sw1 CH1 w	n. d.	/	/
	Sw1 CH1 x	n. d.	/	/

<sup>1)</sup> Schwein Nummer 1

<sup>2)</sup> Charge 1

<sup>3)</sup> Buchstaben a—x entsprechen den Ansätzen a-x

<sup>4)</sup> nicht detektiert

<sup>5)</sup> Schwein Nummer 2

<sup>6)</sup> keine Angabe

## B) Ökologisch produzierte Mettwurst

Probe	Schwein I		Schwein II	
	Bezeichnung	C <sub>T</sub> -Wert	Bezeichnung	C <sub>T</sub> -Wert
Mettwurst, ÖKO	Sw1 <sup>1)</sup> Ch2 <sup>2)</sup> a <sup>3)</sup>	n. d. <sup>4)</sup>	Sw2 <sup>5)</sup> CH2 a	n. d.
	Sw1 Ch2 b	36,04	Sw2 CH2 b	n. d.
	Sw1 Ch2 c	n. d.	Sw2 CH2 c	n. d.
	Sw1 Ch2 d	n. d.	Sw2 CH2 d	n. d.
	Sw1 Ch2 e	33,91	Sw2 CH2 e	n. d.
	Sw1 Ch2 f	n. d.	Sw2 CH2 f	n. d.
	/ <sup>6)</sup>	/	Sw2 CH2 g	n. d.
	/	/	Sw2 CH2 h	n. d.
	/	/	Sw2 CH2 i	n. d.
	/	/	Sw2 CH2 j	n. d.
	/	/	Sw2 CH2 k	n. d.
	/	/	Sw2 CH2 l	n. d.
	/	/	Sw2 CH2 m	n. d.
	/	/	Sw2 CH2 n	n. d.
	/	/	Sw2 CH2 o	n. d.
	/	/	Sw2 CH2 p	n. d.
	/	/	Sw2 CH2 q	n. d.
	/	/	Sw2 CH2 r	n. d.
	/	/	Sw2 CH2 s	38,34
	/	/	Sw2 CH2 t	39,15
/	/	Sw2 CH2 u	n. d.	
/	/	Sw2 CH2 v	n. d.	
/	/	Sw2 CH2 w	37,74	

<sup>1)</sup> Schwein Nummer 1

<sup>4)</sup> nicht detektiert

<sup>2)</sup> Charge 2

<sup>5)</sup> Schwein Nummer 2

<sup>3)</sup> Buchstaben a—w entsprechen den Ansätzen a-w

<sup>6)</sup> keine Angabe



### C) Handwerklich produzierte Teewurst

Probe	Schwein I		Schwein II	
	Bezeichnung	C <sub>T</sub> -Wert	Bezeichnung	C <sub>T</sub> -Wert
Teewurst, Handwerk	Sw1 <sup>1)</sup> CH3 <sup>2)</sup> a <sup>3)</sup>	n. d. <sup>4)</sup>	Sw2 <sup>5)</sup> CH3 a	n. d.
	Sw1 CH3 b	n. d.	Sw2 CH3 b	n. d.
	Sw1 CH3 c	38,64	Sw2 CH3 c	n. d.
	Sw1 CH3 d	n. d.	Sw2 CH3 d	n. d.
	Sw1 CH3 e	n. d.	Sw2 CH3 e	n. d.
	Sw1 CH3 f	n. d.	Sw2 CH3 f	n. d.
	/ <sup>6)</sup>	/	Sw2 CH3 g	n. d.
	/	/	Sw2 CH3 h	n. d.
	/	/	Sw2 CH3 i	n. d.
	/	/	Sw2 CH3 j	n. d.
	/	/	Sw2 CH3 k	n. d.
	/	/	Sw2 CH3 l	n. d.
	/	/	Sw2 CH3 m	n. d.
	/	/	Sw2 CH3 n	n. d.
	/	/	Sw2 CH3 o	n. d.
	/	/	Sw2 CH3 p	n. d.
/	/	Sw2 CH3 q	38,58	
/	/	Sw2 CH3 r	39,96	

<sup>1)</sup> Schwein Nummer 1

<sup>2)</sup> Charge 3

<sup>3)</sup> Buchstaben a-r entsprechen den Ansätzen a-r

<sup>4)</sup> nicht detektiert

<sup>5)</sup> Schwein Nummer 2

<sup>6)</sup> keine Angabe

## D) Ökologisch produzierte Teewurst

Probe	Schwein I		Schwein II	
	Bezeichnung	C <sub>T</sub> -Wert	Bezeichnung	C <sub>T</sub> -Wert
Teewurst, ÖKO	Sw1 <sup>1)</sup> CH4 <sup>2)</sup> a <sup>3)</sup>	39,30	Sw2 <sup>4)</sup> CH4 a	n. d. <sup>5)</sup>
	Sw1 CH4 b	35,99	Sw2 CH4 b	n. d.
	Sw1 CH4 c	n. d.	Sw2 CH4 c	n. d.
	Sw1 CH4 d	35,55	Sw2 CH4 d	n. d.
	Sw1 CH4 e	40,00	Sw2 CH4 e	n. d.
	Sw1 CH4 f	n. d.	Sw2 CH4 f	n. d.
	/ <sup>6)</sup>	/	Sw2 CH4 g	n. d.
	/	/	Sw2 CH4 h	n. d.
	/	/	Sw2 CH4 i	n. d.
	/	/	Sw2 CH4 j	n. d.
	/	/	Sw2 CH4 k	n. d.
	/	/	Sw2 CH4 l	n. d.
	/	/	Sw2 CH4 m	37,65
	/	/	Sw2 CH4 n	36,35
	/	/	Sw2 CH4 o	39,31
	/	/	Sw2 CH4 p	37,61
	/	/	Sw2 CH4 q	40,00
/	/	Sw2 CH4 r	39,82	

<sup>1)</sup> Schwein Nummer 1<sup>2)</sup> Charge 4<sup>3)</sup> Buchstaben a-r entsprechen den Ansätzen a-r<sup>4)</sup> Schwein Nummer 2<sup>5)</sup> nicht detektiert<sup>6)</sup> keine Angabe

## E) Handwerklich produzierte Salami

Probe	Schwein I		Schwein II	
	Bezeichnung	C <sub>T</sub> -Wert	Bezeichnung	C <sub>T</sub> -Wert
Salami, Handwerk	Sw1 <sup>1)</sup> CH5 <sup>2)</sup> a <sup>3)</sup>	n. d. <sup>4)</sup>	Sw2 <sup>5)</sup> CH5 a	n. d.
	Sw1 CH5 b	n. d.	Sw2 CH5 b	n. d.
	Sw1 CH5 c	37,64	Sw2 CH5 c	n. d.
	Sw1 CH5 d	n. d.	Sw2 CH5 d	n. d.
	Sw1 CH5 e	n. d.	Sw2 CH5 e	n. d.
	Sw1 CH5 f	n. d.	Sw2 CH5 f	n. d.
	/ <sup>6)</sup>	/	Sw2 CH5 g	n. d.
	/	/	Sw2 CH5 h	n. d.
	/	/	Sw2 CH5 i	n. d.
	/	/	Sw2 CH5 j	n. d.
	/	/	Sw2 CH5 k	n. d.
	/	/	Sw2 CH5 l	n. d.
	/	/	Sw2 CH5 m	n. d.
	/	/	Sw2 CH5 n	n. d.
	/	/	Sw2 CH5 o	n. d.
	/	/	Sw2 CH5 p	n. d.
	/	/	Sw2 CH5 q	n. d.
	/	/	Sw2 CH5 r	n. d.
	/	/	Sw2 CH5 s	n. d.
	/	/	Sw2 CH5 t	n. d.
	/	/	Sw2 CH5 u	n. d.
	/	/	Sw2 CH5 v	n. d.
	/	/	Sw2 CH5 w	n. d.
	/	/	Sw2 CH5 x	n. d.
	/	/	Sw2 CH5 y	n. d.
	/	/	Sw2 CH5 z	n. d.
	/	/	Sw2 CH5 Aa	n. d.
	/	/	Sw2 CH5 Ab	n. d.
	/	/	Sw2 CH5 Ac	n. d.
	/	/	Sw2 CH5 Ad	n. d.
	/	/	Sw2 CH5 Ae	37,94
	/	/	Sw2 CH5 Af	n. d.
/	/	Sw2 CH5 Ag	n. d.	
/	/	Sw2 CH5 Ah	n. d.	
/	/	Sw2 CH5 Ai	n. d.	
/	/	Sw2 CH5 Aj	n. d.	
/	/	Sw2 CH5 Ak	n. d.	
/	/	Sw2 CH5 Al	n. d.	
/	/	Sw2 CH5 Am	38,93	
/	/	Sw2 CH5 An	n. d.	
/	/	Sw2 CH5 Ao	n. d.	
/	/	Sw2 CH5 Ap	39,00	

<sup>1)</sup> Schwein Nummer 1<sup>2)</sup> Charge 5<sup>3)</sup> Buchstaben a-Ap entsprechen den Ansätzen a-Ap<sup>4)</sup> nicht detektiert<sup>5)</sup> Schwein Nummer 2<sup>6)</sup> keine Angabe

## F) Ökologisch produzierte Salami

Probe	Schwein I		Schwein II	
	Bezeichnung	C <sub>T</sub> -Wert	Bezeichnung	C <sub>T</sub> -Wert
Salami, ÖKO	Sw1 <sup>1)</sup> CH6 <sup>2)</sup> a <sup>3)</sup>	n. d. <sup>4)</sup>	Sw2 <sup>5)</sup> CH6 a	n. d.
	Sw1 CH6 b	n. d.	Sw2 CH6 b	n. d.
	Sw1 CH6 c	n. d.	Sw2 CH6 c	n. d.
	Sw1 CH6 d	n. d.	Sw2 CH6 d	n. d.
	Sw1 CH6 e	n. d.	Sw2 CH6 e	n. d.
	Sw1 CH6 f	n. d.	Sw2 CH6 f	n. d.
	Sw1 CH6 g	n. d.	Sw2 CH6 g	n. d.
	Sw1 CH6 h	n. d.	Sw2 CH6 h	n. d.
	Sw1 CH6 i	n. d.	Sw2 CH6 i	n. d.
	Sw1 CH6 j	n. d.	Sw2 CH6 j	n. d.
	Sw1 CH6 k	36,74	Sw2 CH6 k	n. d.
	Sw1 CH6 l	n. d.	Sw2 CH6 l	n. d.
	/ <sup>6)</sup>	/	Sw2 CH6 m	n. d.
	/	/	Sw2 CH6 n	n. d.
	/	/	Sw2 CH6 o	n. d.
	/	/	Sw2 CH6 p	n. d.
	/	/	Sw2 CH6 q	n. d.
	/	/	Sw2 CH6 r	n. d.
	/	/	Sw2 CH6 s	n. d.
	/	/	Sw2 CH6 t	n. d.
	/	/	Sw2 CH6 u	n. d.
	/	/	Sw2 CH6 v	n. d.
	/	/	Sw2 CH6 w	n. d.
	/	/	Sw2 CH6 x	n. d.
	/	/	Sw2 CH6 y	n. d.
	/	/	Sw2 CH6 z	n. d.
	/	/	Sw2 CH6 Aa	n. d.
	/	/	Sw2 CH6 Ab	n. d.
	/	/	Sw2 CH6 Ac	n. d.
	/	/	Sw2 CH6 Ad	n. d.
	/	/	Sw2 CH6 Ae	38,42
	/	/	Sw2 CH6 Af	n. d.
/	/	Sw2 CH6 Ag	n. d.	
/	/	Sw2 CH6 Ah	n. d.	
/	/	Sw2 CH6 Ai	38,62	
/	/	Sw2 CH6 Aj	n. d.	
/	/	Sw2 CH6 Ak	n. d.	
/	/	Sw2 CH6 Al	n. d.	
/	/	Sw2 CH6 Am	n. d.	
/	/	Sw2 CH6 An	n. d.	
/	/	Sw2 CH6 Ao	n. d.	
/	/	Sw2 CH6 Ap	39,35	

<sup>1)</sup> Schwein Nummer 1<sup>4)</sup> nicht detektiert<sup>2)</sup> Charge 6<sup>5)</sup> Schwein Nummer 2<sup>3)</sup> Buchstaben a-Ap entsprechen den Ansätzen a-Ap<sup>6)</sup> keine Angabe

## Anhang V: pH- und $a_w$ -Wert-Entwicklung der Rohwurst-Erzeugnisse

### A) Übersicht zur pH-Wert-Entwicklung der Mettwurst

Datum	Charge	Zeitpunkt	pH-Wert 1	Temp. <sup>1)</sup> 1	pH-Wert 2	Temp. 2	Mittelwert pH-Wert
08.08.07	Sw1 <sup>2)</sup> CH1 <sup>3)</sup>	Produktion	5,48	23,1	5,47	23,1	5,48
	Sw1CH2 <sup>4)</sup>	Produktion	5,47	22,4	5,47	22,4	5,47
	Sw2 <sup>5)</sup> CH1	Produktion	5,44	23,2	5,45	23,4	5,45
	Sw2CH2	Produktion	5,51	21,5	5,52	21,5	5,52
09.08.07	Sw1CH1	Kontrolle	5,18	22,1	5,18	22,1	5,18
	Sw1CH2	Kontrolle	5,04	21,2	5,03	21,2	5,04
	Sw2CH1	Kontrolle	5,16	21,3	5,16	22,1	5,16
	Sw2CH2	Kontrolle	4,99	22,4	5,01	22,3	5,00
	Sw1CH1	IVK <sup>6)</sup>	4,97	22,3	4,93	22,3	4,95
10.08.07	Sw1CH2	Kontrolle	4,86	22,3	4,85	22,2	4,86
	Sw2CH1	IVK	4,95	22,4	4,97	22,4	4,96
	Sw2CH2	Kontrolle	4,86	22,1	4,87	22,1	4,87
13.08.07	Sw1CH2	IVK	4,97	23,6	5,03	23,3	5,00
	Sw2CH2	IVK	4,89	22,8	4,92	22,6	4,91
17.08.07	Sw1CH1	Kontrolle	4,84	16,1	4,83	16,6	4,84
	Sw1CH2	Kontrolle	4,83	16,0	4,84	15,7	4,84
	Sw2CH1	Kontrolle	5,08	16,0	5,02	16,2	5,05
	Sw2CH2	Kontrolle	4,98	15,1	4,97	15,0	4,98
21.08.07	Sw1CH1	MHD <sup>7)</sup>	4,94	19,1	4,95	18,7	4,95
	Sw1CH2	MHD	5,08	18,0	5,1	17,3	5,09
	Sw2CH1	MHD	4,92	16,9	4,88	16,8	4,90
	Sw2CH2	MHD	5,02	17,0	5,02	16,5	5,02

1) Temperatur

2) Schwein Nummer 1

3) Charge 1

4) Charge

5) Schwein Nummer 2

6) Zeitpunkt des theoretischen In-Verkehr-Bringens

7) Mindesthaltbarkeitsdatum

## B) Übersicht zur pH-Wert-Entwicklung der Teewurst

Datum	Charge	Zeitpunkt	pH-Wert 1	Temp. <sup>1)</sup> 1	pH-Wert 2	Temp. 2	Mittelwert pH-Wert
09.08.07	Sw1 <sup>2)</sup> CH3 <sup>3)</sup>	Produktion	5,42	22,1	5,44	22,1	5,43
	Sw1CH4 <sup>4)</sup>	Produktion	5,45	22,3	5,46	22,3	5,46
	Sw2 <sup>5)</sup> CH3	Produktion	5,43	21,4	5,45	21,3	5,44
	Sw2CH4	Produktion	5,52	22,3	5,53	22,3	5,53
10.08.07	Sw1CH3	Kontrolle	5,12	22,5	5,10	22,2	5,11
	Sw1CH4	Kontrolle	4,99	22,2	4,97	22,1	4,98
	Sw2CH3	Kontrolle	5,00	22,2	5,03	22,2	5,02
	Sw2CH4	Kontrolle	4,97	22,0	4,96	21,9	4,97
11.08.07	Sw1CH3	IVK <sup>6)</sup>	4,71	23,0	4,72	22,8	4,72
	Sw2CH3	IVK	4,75	22,6	4,75	22,6	4,75
14.08.07	Sw1CH4	IVK	4,81	22,7	4,82	22,5	4,82
	Sw2CH4	IVK	4,82	22,4	4,82	22,3	4,82
17.08.07	Sw1CH3	Kontrolle	4,80	15,8	4,80	16,0	4,80
	Sw1CH4	Kontrolle	4,74	16,0	4,74	15,9	4,74
	Sw2CH3	Kontrolle	4,87	15,8	4,87	15,7	4,87
	Sw2CH4	Kontrolle	4,89	15,5	4,88	15,4	4,89
22.08.07	Sw1CH3	MHD <sup>7)</sup>	4,78	16,5	4,77	16,6	4,78
	Sw1CH4	MHD	4,91	16,5	4,91	16,9	4,91
	Sw2CH3	MHD	4,78	16,2	4,76	16,5	4,77
	Sw2CH4	MHD	4,92	16,7	4,93	16,6	4,93

<sup>1)</sup> Temperatur

<sup>2)</sup> Schwein Nummer 1

<sup>3)</sup> Charge 3

<sup>4)</sup> Charge 4

<sup>5)</sup> Schwein Nummer 2

<sup>6)</sup> Zeitpunkt des theoretischen In-Verkehr-Bringens

<sup>7)</sup> Mindesthaltbarkeitsdatum

### C) Übersicht zur pH-Wert-Entwicklung der Salami

Datum	Charge	Zeitpunkt	pH-Wert 1	Temp <sup>1)</sup> . 1	pH-Wert 2	Temp. 2	Mittelwert pH-Wert
10.08.2007	Sw1 <sup>2)</sup> CH5 <sup>3)</sup>	Produktion	5,42	22,0	5,43	22,0	5,43
	Sw1CH6 <sup>4)</sup>	Produktion	5,39	23,3	5,41	23,3	5,40
	Sw2 <sup>5)</sup> CH5	Produktion	5,47	22,3	5,46	22,3	5,47
	Sw2CH6	Produktion	5,39	21,5	5,39	21,5	5,39
13.08.2007	Sw1CH5	Kontrolle	4,76	21,8	4,76	21,8	4,76
	Sw1CH6	Kontrolle	4,84	23,4	4,87	23,4	4,86
	Sw2CH5	Kontrolle	4,72	24,9	4,73	24,9	4,73
	Sw2CH6	Kontrolle	4,87	24,6	4,87	24,6	4,87
15.08.2007	Sw1CH5	Kontrolle	4,78	19,5	4,79	19,6	4,79
	Sw1CH6	Kontrolle	4,70	20,9	4,73	20,6	4,72
	Sw2CH5	Kontrolle	4,83	22,2	4,85	20,5	4,84
	Sw2CH6	Kontrolle	4,83	20,3	4,89	20,2	4,86
18.08.2007	Sw1CH5	Kontrolle	4,75	20,0	4,78	19,4	4,77
	Sw1CH6	Kontrolle	5,02	19,4	4,95	18,8	4,99
	Sw2CH5	Kontrolle	4,78	19,3	4,9	19,1	4,79
	Sw2CH6	Kontrolle	4,82	20,1	4,88	19,6	4,85
20.08.2007	Sw1CH5	IVK <sup>6)</sup>	4,89	19,6	4,90	19,6	4,90
	Sw2CH5	IVK	4,83	19,9	4,86	19,8	4,85
22.08.2007	Sw1CH6	IVK	4,96	21,5	4,98	21,3	4,97
	Sw2CH6	IVK	5,02	20,5	5,13	20,4	5,08
31.08.2007	Sw1CH5	Kontrolle	5,06	18,2	5,06	18,1	5,06
	Sw1CH6	Kontrolle	4,98	17,9	5,04	17,9	5,01
	Sw2CH5	Kontrolle	5,25	18,9	5,28	18,8	5,27
	Sw2CH6	Kontrolle	5,22	18,6	5,22	18,4	5,22
06.09.2007	Sw1CH5	MHD <sup>7)</sup>	5,07	18,9	5,06	18,8	5,07
	Sw1CH6	MHD	5,25	17,8	5,23	17,6	5,24
	Sw2CH5	MHD	5,03	17,6	5,06	17,6	5,05
	Sw2CH6	MHD	5,21	17,2	5,23	17,0	5,22

1) Temperatur

2) Schwein Nummer 1

3) Charge 5

4) Charge 6

5) Schwein Nummer 2

6) Zeitpunkt des theoretischen In-Verkehr-Bringens

7) Mindesthaltbarkeitsdatum

## D) Übersicht zur a<sub>w</sub>-Wert-Entwicklung der Salami

Datum	Charge	Zeitpunkt der Untersuchung	a <sub>w</sub> -Wert	Temperatur
10.08.2007	Sw1 <sup>1)</sup> CH5 <sup>2)</sup>	Produktion	0,973	23,1
	Sw1 CH6 <sup>3)</sup>	Produktion	0,964	23,1
	Sw2 <sup>4)</sup> CH5	Produktion	0,977	23,4
	Sw2 CH6	Produktion	0,969	23,3
13.08.2007	Sw1 CH5	Kontrolle	0,967	23,6
	Sw1 CH6	Kontrolle	0,967	23,4
	Sw2 CH5	Kontrolle	0,967	24,9
	Sw2 CH6	Kontrolle	0,972	24,6
15.08.2007	Sw1 CH5	Kontrolle	0,952	23,4
	Sw1 CH6	Kontrolle	0,961	24,2
	Sw2 CH5	Kontrolle	0,967	23,9
	Sw2 CH6	Kontrolle	0,960	23,9
18.08.2007	Sw1 CH5	Kontrolle	0,950	24,6
	Sw1 CH6	Kontrolle	0,960	23,4
	Sw2 CH5	Kontrolle	0,942	22,5
	Sw2 CH6	Kontrolle	0,943	22,3
20.08.2007	Sw1 CH5	IVK <sup>5)</sup>	0,944	23,0
	Sw2 CH5	IVK	0,938	23,2
22.08.2007	Sw1 CH6	IVK	0,933	23,8
	Sw2 CH6	IVK	0,945	23,3
31.08.2007	Sw1 CH5	Kontrolle	0,905	22,2
	Sw1 CH6	Kontrolle	0,903	21,6
	Sw2 CH5	Kontrolle	0,906	21,8
	Sw2 CH6	Kontrolle	0,904	22,2
06.09.2007	Sw1 CH5	MHD <sup>6)</sup>	0,888	21,2
	Sw1 CH6	MHD	0,885	20,4
	Sw2 CH5	MHD	0,890	19,9
	Sw2 CH6	MHD	0,879	19,8

<sup>1)</sup> Schwein Nummer 1

<sup>2)</sup> Charge 5

<sup>3)</sup> Charge 6

<sup>4)</sup> Schwein Nummer 2

<sup>5)</sup> Zeitpunkt des theoretischen In-Verkehr-Bringens

<sup>6)</sup> Mindesthaltbarkeitsdatum



## Literaturverzeichnis

- Abdulmawjood, A., S. Roth und M. Bülte (2002). Two methods for construction of internal amplification controls for the detection of *Escherichia coli* 0157 by polymerase chain reaction. *Mol. Cell. Probes*. 16, 335 - 339
- Ackermann, H. (1998). BIAS, für Windows, Biometrische Analyse von Stichproben. Version 7.0 Epsilon Verlag. Hochheim. Darmstadt
- Ahmed, B. A., Gaafar, S. M., W. E. Weirich und C. L. Kanitz (1983). Relationship of *toxoplasma* infections to other diseases in dogs. *Vet. Parasitol.* 12, 199 – 203
- Ajioka, J. W., J. M. Fitzpatrick und C. P. Reitter (2001). *Toxoplasma gondii* genomics: shedding light on pathogenesis and chemotherapy. *Exp. Rev. Mol. Med.* 3, 1 – 19
- Ajzenberg, D., N. Cogné, L. Paris, M.-H. Bessières, P. Thulliez, D. Filisetti, H. Pelloux, P. Marty und M.-L. Dardé (2002). Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings. *J. Infect. Dis.* 186, 684 – 689
- Akca, A., C. Babur, M. O. Arslan, Y. Gicik, M. Kara und S. Kilic (2004). Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in horses in the province of Kars, Turkey. *Vet. Med.- Czech.* 49, 9 – 13
- Ali, C. N., J. A. Harris, J. D. Watkins und A. A. Adesiyun (2003). Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* in dogs in Trinidad and Tobago. *Vet. Parasitol.* 113, 179 – 187
- Allain, J. P., C. R. Palmer und G. Pearson (1998). Epidemiological study of latent and recent infection by *Toxoplasma gondii* in pregnant women from a regional population in the U. K.. *J. Infect.* 36, 189 – 196
- Almería, S., C. Calvete, A. Pagés, C. Gauss und J. P. Dubey (2004). Factors affecting the seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) from Spain. *Vet. Parasitol.* 123, 265 – 270
- Alvarado-Esquivel, C., O. Liesenfeld, R. G. Herrera-Flores, B. E. Ramírez-Sánchez, A. González-Herrera, S. A. Martínez-García und J. P. Dubey (2007). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in cats from Durango City, Mexiko. *J. Parasitol.* 93, 1214 – 1216
- Amin, A. M. und T. A. Morsy (1997). Anti-*toxoplasma* antibodies in butchers and slaughtered sheep and goats in Jeddah Municipal abattoir, Saudi Arabia. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 27, 913 -918
- Andrzejewska, I., P. Tryjanowski, P. Zduniak, P. T. Dolata, J. Ptaszyk und P. C'Wiernia (2004). *Toxoplasma gondii* antibodies in the white stork *Ciconia ciconia*. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 117, 274 – 275

- Anonymus (1999). Toxoplasmose bei Mutter und Kind – Erkennung, Behandlung und Verhütung. Bundesgesundheitsbl.-Gesundheitsforsch.-Gesundheitsschutz 42, 606 – 609
- Aramini, J. J., C. Stephen und J. P. Dubey (1998). *Toxoplasma gondii* in Vancouver Island cougars (*Felis concolor vancouverensis*): serology and oocyst shedding. J. Parasitol. 84, 438 – 440
- Aramini, J. J., C. Stephen, J. P. Dubey, C. Engelstoft, H. Schwantje und C. S. Ribble (1999). Potential contamination of drinking water with *Toxoplasma gondii* oocysts. Epidemiol. Infect. 122, 305 – 315
- Arias, M. L., L. Reyes, M. Chinchilla und E. Linder (1994). Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* (Apicomplexa) in meat producing animals in Costa Rica. Rev. Biol. Trop. 42, 15 – 20
- Arko-Mensah. J., K. M. Bosompem, E. A. Canacoo, J. M. Wastling und B. D. Akanmori (2000). The seroprevalence of toxoplasmosis in pigs in Ghana. Acta Trop. 76, 27 – 31
- Aslantaş, Ö., V. Özdemir, S. Kiliç, C. Babür (2005). Seroepidemiology of leptospirosis, toxoplasmosis, and leishmaniosis among dogs in Ankara, Turkey. Vet. Parasitol. 129, 187 – 191
- Aspinall, T. V., D. Marlee, J. E. Hyde und P. F. G. Sims (2002). Prevalence of *Toxoplasma gondii* in commercial meat products as monitored by polymerase chain reaction – food for thought? Int. J. Parasitol. 32, 1193 – 1199
- Aspöck, H. (1994). Historische Übersicht. In: H. D. Pohle und J. S. Remington, Toxoplasmose – Erreger und Krankheit. Upjohn GmbH, 7 -23
- Asthana, S. P., C. N. L. MacPherson, S. H. Weiss, R. Stephens, T. N. Denny, R. N. Sharma und J. P. Dubey (2006). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in pregnant women and cats in Grenada, West Indies. J. Parasitol. 92, 644–645
- Azevedo, S. S., C. S. A. Batista, S. A. Vasconcellos, D. M. Aguiar, A. M. A. Ragozo, A. A. R. Rodrigues, C. J. Alves und S. M. Gennari (2005). Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in dogs from the state of Paraíba, Northeast region of Brazil. Res. Vet. Sci. 79, 51 – 56
- Bahia-Oliveira, L. M., J. L. Jones, J. Azevedo-Silva, C. C. Alves, F. Oréfice und D. G. Addiss (2003). Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro State, Brazil. Emerg. Inf. Dis. 9, 55 – 62
- Barbier, D., T. Ancelle und G. Martin-Bouyer (1983). Seroepidemiological survey of toxoplasmosis in La Guadeloupe, French West Indies. Am. J. Trop. Med. Hyg. 32, 935 – 942

- Barcán, L. A., M. L. Dallurzo, L. O. Clara, A. Valledor, S. Maćias, E. Zorkin, S. Gerona und B. Livellara (2002). *Toxoplasma gondii* pneumonia in liver transplantation: survival after a severe case of reactivation. *Transpl. Infect. Dis.* 4, 93 – 96
- Bártová, E., K. Sedlák und I. Literák (2006). Prevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* antibodies in wild boars in the Czech Republic. *Vet. Parasitol.* 142, 150 – 153
- Bártová, E., K. Sedlak, I. Pavlik und I. Literak (2007). Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in wild ruminants from the countryside or captivity in the Czech Republic. *J. Parasitol.* 93, 1216 - 1218
- Behbehani, K. und T. Al-Karmi (1980). Epidemiology of toxoplasmosis in Kuwait. I. Detection of antibodies to *Toxoplasma gondii* and percentage distribution among the inhabitants. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 74, 209 – 212
- BfR (Bundesinstitut für Risikobewertung) (2005). Rohwurst kann eine Infektionsquelle für Toxoplasmose sein. Stellungnahme Nr. 039/2005.  
[www.bfr.bund.de/cm/208/rohwurst\\_kann\\_eine\\_infektionsquelle\\_fuer\\_toxoplasmos\\_e\\_sein.pdf](http://www.bfr.bund.de/cm/208/rohwurst_kann_eine_infektionsquelle_fuer_toxoplasmos_e_sein.pdf)
- BfR (Bundesinstitut für Risikobewertung) (2006). Technologie spielt Schlüsselrolle. *Fleischwirtsch.* 1, 43 – 44
- Black, M. W. und J. C. Boothroyd (2000). Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 607 – 623
- Bobić, B., I. Jevremović, J. Marinković, D. Sibalić und O. Djurković-Djaković (1998). Risk factors for *Toxoplasma* infection in a reproductive age female population in the area of Belgrade, Yugoslavia. *Eur. J. Epidemiol.* 14, 605 – 610
- Boch, J. (1980). Die Toxoplasmose der Haustiere – Vorkommen, Diagnose und hygienische Bedeutung. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 93, 385 – 391
- Boch, J., A. Bierschenck, M. Erber und G. Weiland (1979). Sarcocystis- und *Toxoplasma*-Infektionen bei Schlachtschafen in Bayern. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 92, 137 – 141
- Boch, J. und B. Neurohr (1982). Vorkommen latenter *Toxoplasma*-Infektionen bei Schweinen in Süddeutschland und deren Nachweis mit IAFT und IHA. *Tierärztl. Umsch.* 37, 820 – 826
- Boch, J., M. Rommel und K. Janitschke (1964). Beiträge zur Toxoplasmose des Schweines: II. Untersuchungen von Schlachtschweinen auf *Toxoplasma*-Infektionen. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 77, 244 – 247

- Boch, J., M. Rommel und K. Janitschke (1965). Beiträge zur Toxoplasmose des Schweines: III. Untersuchungen über die Möglichkeit konnataler Infektionen. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 78, 115 -120
- Bosch-Driessen, L. E., T. T. Berendschot, J. V. Ongkosuwito und A. Rothova (2002). Ocular toxoplasmosis: Clinical features and prognosis of 154 patients. Ophthalmol. 109, 869 – 877
- Bou, G., M. S. Figueroa, P. Martí-Belda, E. Navas und A. Guerrero (1999). Value of PCR for detection of *Toxoplasma gondii* in aqueous humor and blood samples from immunocompetent patients with ocular toxoplasmosis. J. Clin. Microbiol. 37, 3465 – 3468
- Bouratbine, A., E. Siala, M. K. Chahed, K. Aoun und R. B. Ismail (2001). Sero-epidemiologic profile of toxoplasmosis in northern Tunisia. Parasite. 8, 61 – 66
- Bowie, W. R., A. S. King, D. H. Werker, J. L. Isaac-Renton, A. Bell, S. B. Eng und S. A. Marion (1997). Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. Lancet. 350, 173 – 177
- Bresciani, K. D. S., S. M. Gennari, A. C. M. Serrano, A. A. R. Rodrigues, T. Ueno, L. G. Franco, S. H. V. Perri und A. F. T. Amarante (2007). Antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in domestic cats from Brazil. Parasitol. Res. 100, 281 – 285
- Buddhirongawatr, R., S. Tungsudjai, K. Chaichoune, C. Sangloun, N. Tantawiwattananon, R. Phonaknguen und Y. Sukthana (2006). Detection of *Toxoplasma gondii* in captive wild felids. Southeast Asian J. Trop. Med. Publ. Health 37, 15 – 17
- Buhr, de, K. und K. Fehlhaber (2006). Eine deutschlandweite Seroprävalenzstudie zu *Toxoplasma gondii* bei Schlachtschweinen. Amtstierärztlicher Dienst und Lebensmittelkontrolle, Sonderheft 26.-29.9.2006, 47. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der DVG, Garmisch-Partenkirchen
- Burg, J. L., C. M. Grover, P. Pouletty und J. C. Boothroyd (1989). Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by Polymerase Chain Reaction. J. Clin. Microbiol. 27, 1787 – 1792
- Cavalcante, G. T., D. M. Aguiar, D. Chiebao, J. P. Dubey, V. L. Ruiz, R. A. Dias, L. M. Camargo, M. B. Labruna und S. M. Gennari (2006). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in cats and pigs from rural Western Amazon, Brazil. J. Parasitol. 92, 863 – 864
- Carme, B., F. Bissuel, D. Ajzenberg, R. Bouyne, C. Aznar, M. Demar, S. Bichat, D. Louvel, A. M. Bourbigot, C. Peneau, P. Neron und M. L. Dardé (2002). Severe acquired toxoplasmosis in immunocompetent adult patients in French Guiana. J. Clin. Microbiol. 40, 4037 – 4044

- Chávez-Velásquez, A., G. Álvarez-García, M. Gómez-Bautista, E. Casas-Astos, E. Serrano Martínez und L. M. Ortega-Mora (2005). *Toxoplasma gondii* infection in adult llamas (*Lama glama*) and vicunas (*Vicugna vicugna*) in the Peruvian Andean region. *Vet. Parasitol.* 130, 93 – 97
- Chiappino, M. L., B. A. Nichols und G. R. O'Connor (1984). Scanning electron microscopy of *Toxoplasma gondii*: parasite torsion and host-cell responses during invasion. *J. Protozool.* 31, 288 – 292
- Choi, W. Y., H. W. Nam, N. H. Kwak, W. Huh, Y. R. Kim, M. W. Kang, S. Y. Cho und J. P. Dubey (1997). Foodborne outbreaks of human toxoplasmosis. *J. Infect. Dis.* 175, 1280-1282
- Contini, C., S. Seraceni, R. Cultrera, C. Incorvaia, A. Sebastiani und S. Picot (2005). Evaluation of a Real-time PCR-based assay using the lightcycler system for detection of *Toxoplasma gondii* bradyzoite genes in blood specimens from patients with toxoplasmic Retinochoroiditis. *Int. J. Parasitol.* 35, 275 – 283
- Cook, A. J. C., R. E. Gilbert, W. Buffolano, J. Zufferey, E. Petersen, P. A. Jenum, W. Foulon, A. E. Semprini und D. T. Dunn (2000). Sources of *toxoplasma* infection in pregnant women: European multicentre case-control study. *Br. Med. J.* 321, 142 – 147
- Dabriz, H. A., M. A. Miller, E. R. Atwill, I. A. Gardner, C. M. Leutenegger, A. C. Melli und P. A. Conrad (2007). Detection of *Toxoplasma gondii*-like oocysts in cat feces and estimates of the environmental oocyst burden. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 231, 1676 – 1684
- Damriyasa, I.M. und C. Bauer (2005). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in sows in Münsterland, Germany. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 112, 223 - 224
- Damriyasa, I. M., C. Bauer, R. Edelhofer, K. Failing, P. Lind, E. Petersen, G. Schares, A. M. Tenter, R. Volmer und H. Zahner (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, 271 – 286
- Dar, F. K., T. Alkarmi, S. Uduman, Y. Abdulrazzaq, H. Grundsell und P. Hughes (1997). Gestational and neonatal toxoplasmosis: regional seroprevalence in the United Arab Emirates. *Eur. J. Epidemiol.* 13, 567 – 571
- Davis, S. W. und J. P. Dubey (1995). Mediation of immunity to *Toxoplasma gondii* oocyst shedding in cats. *J. Parasitol.*, 81, 882 – 886
- Defeo, M. L., J. P. Dubey, T. N. Mather und R. C. Rhodes (2002). Epidemiologic investigation of seroprevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in cats and rodents. *Am. J. Vet. Res.* 63, 1714 – 1717

- Desmonts, G., J. Courvreur, f. Alison, J. Baudelot, J. Gerbeaux und M. Lelong (1965). Étude épidémiologique sur la toxoplasmose: de l'influence de la cuisson des viandes de boucherie sur la fréquence de l'infection humaine. Rev. Fr. Etud. Clin. Biol. 10, 952 – 958. Zitiert in Dubey, J. P. (1993). *Toxoplasma, Neospora, Sarcocystis*, and other tissue cyst-forming coccidian of humans and animals. In: J.P. Kreier (Hrsg.): Parasitic Protozoa. Bd. 6, 2. Aufl., Academic Press, S. 1-158
- Dhumne M., C. Sengupta, G. Kadival, A. Tathinaswamy und A. Velumani (2007). National seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in India. J. Parasitol. 93, 1520 – 1521
- Dias, R. A., I. T. Navarro, B.B. Ruffolo, F. M. Bugni, M. V. Castro und R. L. Freire (2005). *Toxoplasma gondii* in fresh pork sausage and seroprevalence in butchers from factories in Londrina, Paraná State, Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 47, 185 – 189
- Dixon, W. J. (chief editor) (1993). BMDP Statistical Software Manual, Vol. 1 und 2. University of California Press, Berkeley, Los Angeles, London
- Dubey, J. P. (1979). Direct development of enteroepithelial stages of *Toxoplasma* in the intestines of cats fed cysts. Am. J. Vet. Res. 40, 1634 – 1637
- Dubey, J. P. (1993). *Toxoplasma, Neospora, Sarcocystis*, and other tissue cyst-forming coccidian of humans and Animals. In: J. P. Kreier (Hrsg.): Parasitic Protozoa. Bd. 6, 2. Aufl., Academic Press, S. 1-57
- Dubey, J. P. (1995). Duration of immunity to shedding of *Toxoplasma gondii* oocysts by cats. J. Parasitol. 81, 410 – 415
- Dubey, J. P. (1996). Pathogenicity and infectivity of *Toxoplasma gondii* oocysts for rats. J. Parasitol., 82, 951 – 956
- Dubey, J. P. (1998a). Refinement of pepsin digestion method for isolation of *Toxoplasma gondii* from infected tissues. Vet. Parasitol. 74, 75 – 77
- Dubey, J. P. (1998b). Re-examination of resistance of *Toxoplasma gondii* tachyzoites and bradyzoites to pepsin and trypsin digestion. Parasitol. 116, 43 - 50
- Dubey, J. P. (2004). Toxoplasmosis – a waterborne zoonosis. Vet. Parasitol. 126, 57 – 72
- Dubey, J. P. und D. S. Adams (1990). Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in dairy goats from 1982 to 1984. J. Am. Vet. Med. Assoc. 196, 295 – 296
- Dubey, J. P., M. I. Bhaiyat, C. de Allie, C. N. L. Macpherson, R. N. Sharma, C. Sreekumar, M. C. B. Vianna, S. K. Shen, O. C. H. Kwok, K. B. Miska, D. E. Hill und T. Lehman (2005). Isolation, tissue distribution, and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from chickens in Grenada, West Indies. J. Parasitol. 91, 557 – 560

- Dubey, J. P. und J. F. Frenkel (1976). Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of *Toxoplasma* cysts. J. Protozool. 23, 537 – 546
- Dubey, J. P., D. H. Graham, E. Dahl, M. Hilali, A. El-Ghaysh, C. Sreekumar, O. C. H. Kwok, S. K. Shen und T. Lehmann (2003). Isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from chickens and ducks from Egypt. Vet. Parasitol. 114, 89 – 95
- Dubey, J. P., L. T. T. Huong, N. Sundar und C. Su (2007a). Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates in dogs from Vietnam suggests their South American origin. Vet. Parasitol. 146, 347 – 351
- Dubey, J. P., A. W. Kotula, a. Sharar, C. D. Andrews und D. S. Lindsay (1990). Effect of high temperature on infectivity of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork. J. Parasitol. 76, 201 – 204
- Dubey, J. P., J. C. Leighty, V. C. Beal, W. R. Anderson, C. D. Andrews und Ph. Thulliez (1991). National seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in pigs. J. Parasitol. 77, 517 – 521
- Dubey, J. P., M. Z. Levy, C. Sreekumar, O. C. H. Kwok, S. K. Shen, E. Dahl, P. Thulliez und T. Lehman (2004a). Tissue distribution and molecular characterization of chicken isolates of *Toxoplasma gondii* from Peru. J. Parasitol. 90, 1015 – 1018
- Dubey, J. P., D. S. Lindsay und C. A. Speer (1998). Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and biology and development of tissue cysts. Clin. Microbiol. Rev. 11, 267 – 299
- Dubey, J. P., J. K. Lunney, S. K. Shen, O. C. Kwok, D. A. Ashford und P. Thulliez (1996). Infectivity of low numbers of *Toxoplasma gondii* oocysts to pigs. J. Parasitol. 82, 438 – 443
- Dubey, J. P., N. L. Miller und J. K. Frenkel (1970). Characterization of the new fecal form of *Toxoplasma gondii*. J. Parasitol. 56, 447 – 456
- Dubey, J. P., I. T. Navarro, C. Sreekumar, E. Dahl, R. L. Freire, H. H. Kawabata, M. C. Vianna, O. C. Kwok, S. K. Shen, P. Thulliez und T. Lehmann (2004b ). *Toxoplasma gondii* infection in cats from Paraná, Brazil: seroprevalence, tissue distribution, and biologic and genetic characterization of isolates. J. Parasitol. 90, 721 – 726
- Dubey, J. P., L. G. Rickard, G. L. Zimmermann und D. M. Mulrooney (1992). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in llamas (*Lama glama*) in the northwest USA. Vet. Parasitol. 44, 295 – 298
- Dubey, J. P., E. A. Roller, K. Smith, O. C. H. Kwok and P. Thulliez (1997). Low seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in feral pigs from a remote island lacking cats. J. Parasitol. 83, 839 – 841
- Dubey, J. P., W. J. Saville, J. F. Stanek und S. M. Reed (2002). Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in domestic cats from rural Ohio. J. Parasitol. 88, 802 – 803

- Dubey, J. P., C. Su, J. A. Cortés, N. Sundar, J. E. Gomez-Marin, L. J. Polo, L. Zambrano, L. E. Mora, F. Lora, J. Jimenez, O. C. H. Kwok, S. K. Shen, X. Zhang, A. Nieto und P. Thulliez (2006). Prevalence of *Toxoplasma gondii* in cats from Colombia, South America and genetic characterization of *T. gondii* isolates. *Vet. Parasitol.* 141, 42 – 47
- Dubey, J. P., P. Thulliez, S. Romand, O. C. H. Kwok, S. K. Shen und H. R. Gamble (1999). Serologic prevalence of *Toxoplasma gondii* in horses slaughtered for food in North America. *Vet. Parasitol.* 86, 235 – 238
- Dubey, J. P., R. M. Weigel, A. M. Siegel, P. Thulliez, U. D. Kitron, M. A. Mitchell, A. Mannelli, N. E. Mateus-Pinilla, S. K. Shen, O. C. H. Kwok und K. S. Todd (1995). Sources and reservoirs of *Toxoplasma gondii* infection on 47 swine farms in Illinois. *J. Parasitol.* 81, 723 – 729
- Dubey, J. P., X. Q. Zhu, N. Sundar, H. Zhang, O. C. Kwok und C. Su (2007b). Genetic and biologic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates of cats from China. *Vet. Parasitol.* 145, 352 – 356
- Eckert, J., K. T. Friedhoff, H. Zahner und P. Deplazes (2005). Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin. Enke Verlag
- Edvinsson, B. (2006). Molecular diagnosis of infection with *Toxoplasma gondii* in immunocompromised patients. Dis., Karolinska Institute, Stockholm
- Edvinsson, B., M. Lappalainen und B. Evengård (2006). Real time-PCR targeting a 529-bp repeat element for diagnosis of toxoplasmosis. *Clin. Microbiol. Infect.* 12, 131 – 136
- EFSA (European Food Safety Authority) (2007). Surveillance and monitoring of *Toxoplasma* in humans, food and animals. Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards. *EFSA J.* 583, 1 – 64
- Ertug, S., P. Okyay, M. Turkmen und H. Yuksel (2005). Seroprevalence and risk factors for *toxoplasma* infection among pregnant women in Aydin province, Turkey. *BMC Public Health*, 5. <http://www.biomedcentral.com/1471-2458/5/66>
- Esteban-Redondo, I., S. W. Maley, K. Thomson, S. Nicoll, S. Wright, D. Buxton und E. A. Innes (1999). Detection of *T. gondii* in tissues of sheep and cattle following oral infection. *Vet. Parasitol.* 86, 155 – 171
- Fehlhaber, K. (2005). Konventionell und ökologisch erzeugte Lebensmittel – ein Vergleich aus der Sicht mikrobiell und parasitär bedingter Risiken. Werkstattbericht 11 der Heinrich-Stockmeyer-Stiftung
- Fehlhaber, K., P. Hintersdorf und G. Krüger (2003). Prävalenz bei Schlachtschweinen aus verschiedenen Haltungsformen und in handelsüblichen Hackfleischproben. *Fleischwirtsch.* 2, 97 – 99



- Fiedler, K., C. Hülse, W. Straube und V. Briese (1999). Toxoplasmosis-antibody seroprevalence in Mecklenburg-Western Pomerania. Zentralbl. Gynakol. 121, 239 – 243
- Figuroa-Castillo, J. A., V. Duarte-Rosas, M. Juárez-Acevedo, H. Luna-Pastén und D. Correa (2006). Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) from Mexiko. J. Parasitol. 92, 394 – 395
- Frenkel, J. K. (1973). *Toxoplasma* in and around us. BioScience, 23, 343 – 352
- Friese, K. (1994). Toxoplasmose und Schwangerschaft. In: Pohle, D. und J. S. Remington, Toxoplasmose: Erreger und Krankheit. Upjohn GmbH, 122 – 129
- Fuentes, I., J. M. Rubio, C. Ramírez und J. Alvar (2001). Genotypic Characterization of *Toxoplasma gondii* strains associated with human toxoplasmosis in Spain: Direct analysis from clinical samples. J. Clin. Microbiol. 39, 1566 – 1570
- Galván Ramírez, M. de la Luz, G. Sánchez Vargas, M. Vielma Sandoval und J. L. Soto Mancilla (1999). Presence of anti-*Toxoplasma* antibodies in humans and their cats in the urban zone of Guadalajara. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 32, 483 - 488
- Gamble, H. R., R. C. Brady und J. P. Dubey (1999). Prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic pigs in the New England states. Vet. Parasitol. 82, 129 – 136
- Gauss, C. B. L., S. Almería, A. Ortuño, F. Garcia und J. P. Dubey (2003). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in domestic cats from Barcelona, Spain. J. Parasitol. 89, 1067 – 1068
- Gauss, C. B. L., J. P. Dubey, D. Vidal, O. Cabezón, F. Ruiz-Fons, J. Vicente, I. Marco, S. Lavin, C. Gortazar und S. Almería (2006). Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in red deer (*Cervus elaphus*) and other wild ruminants from Spain. Vet. Parasitol. 136, 193 – 200
- Gauss, C. B. L., J. P. Dubey, D. Vidal, F. Ruiz, J. Vicente, I. Marco, S. Lavin, C. Gortazar und S. Almería (2005). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in wild pigs (*Sus scrofa*) from Spain. Vet. Parasitol. 131, 151 – 156
- Ghazaei, C. (2005). Serological survey of antibodies to *Toxoplasma*. Internet J. Vet. Med. 2. <http://www.ispub.com/ostia/index.php?xmlFilePath=journals/ijvm/vol2n1/toxoplasma.xml>
- Gilbert, R. E. und M. R. Stanford (2000). Is ocular toxoplasmosis caused by prenatal or postnatal infection? Br. J. Ophthalmol. 84, 224 – 226
- Glasner, P. D., C. Silveira, D. Kruszon-Moran, M. C. Martins, M. Burnier, S. Silveira, M. E. Camargo, R. B. Nussenblatt, R. A. Kaslow und R. Belfort (1992). An unusually high prevalence of ocular toxoplasmosis in southern Brazil. Am. J. Ophthalmol. 114, 136 – 144

- Gonçalves, D. D., P. S. Teles, C. R. Reis, F. M. Lopes, R. L. Freire, I. T. Navarro, L. A. Alves, E. E. Muller und J. C. Freitas (2006). Seroepidemiology and occupational and environmental variables for leptospirosis, brucellosis and toxoplasmosis in slaughterhouse workers in the Paraná State, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 48, 135 – 140
- Groß, U. (1994). Neue Möglichkeiten der Toxoplasmose-Diagnostik. In: Pohle, D und J. S. Remington, *Toxoplasmose: Erreger und Krankheit*. Upjohn GmbH, 78 – 111
- Groß, U. (2004). Prävalenz und Public-Health-Aspekte der Toxoplasmose. *Bundesgesundheitsbl.-Gesundheitsforsch.-Gesundheitsschutz* 47, 692-697
- Groß, U., W. Böhne, M. Soête, J. F. Dubremetz (1996). Developmental Differentiation between Tachyzoites and Bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Parasit. Today*. 12, 30 – 33
- Groß, U., A. Roggenkamp, K. Janitschke und J. Heesemann (1992). Improved sensitivity of the polymerase chain reaction for detection of *Toxoplasma gondii* in biological and human clinical specimens. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 11, 33 – 39
- Groß, U., T. Roos und K. Friese (2001). Toxoplasmose in der Schwangerschaft. *Dtsch. Ärztebl.* 98, A 3293 - 3300
- Großklaus, D. und H.-J. Baumgarten (1967). Die Überlebensdauer von Toxoplasmen in Schweinefleisch. *Fleischwirtsch.* 12, 1372 – 1374
- Großklaus, D., G. Lessing und H.-J. Baumgarten (1965). Zum Vorkommen von Toxoplasmen in Schweinehackfleisch des Handels. *Arch. Lebensmittelhyg.* 8, 172 – 175
- Grover, C. M., P. Thulliez, J. S. Remington und J. C. Boothroyd (1990). Rapid prenatal diagnosis of congenital *Toxoplasma* Infection by using Polymerase Chain Reaction and amniotic fluid. *J. Clin. Microbiol.* 28, 2297 – 2301
- Guay, J.-M., D. Dubois, M.-J. Morency, S. Gagnon, J. Mercier und R. C. Levesque (1993). Detection of the pathogenic parasite *Toxoplasma gondii* by specific amplification of ribosomal sequences using comultiplex polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 31, 203 – 207
- Gustafsson, K. und A. Uggla (1994). Serologic survey for *Toxoplasma gondii* infection in the brown hare (*Lepus europaeus*) in Sweden. *J. Wildl. Dis.* 30, 201 – 204
- Gustafsson, K., A. Uggla und B. Järplid (1997). *Toxoplasma gondii* infection in the Mountain Hare (*Lepus timidus*) and domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). I. Pathology. *J. Comp. Path.* 117, 351 – 360

- Guy, E. C., H. Pelloux, M. Lappalainen, H. Aspöck, A. Haßl, K. K. Melby, M. Holberg-Pettersen, E. Petersen, J. Simon und P. Ambroise-Thomas (1996). Interlaboratory comparison of Polymerase Chain Reaction for the detection of *Toxoplasma gondii* DNA added to samples of amniotic fluid. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 15, 836 – 839
- Haldar, P. K., U. Ganguly, B. Gangopadhyay, P. K. Raha und S. Basak (1993). Serological study of human toxoplasmosis in Calcutta. J. Indian Med. Assoc. 91, 252 – 254
- Hamilton, C. M., R. Gray, S. E. Wright, B. Gangadharan, K. Laurenson und E. A. Innes (2005). Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in red foxes (*Vulpes vulpes*) from around the U. K. Vet. Parasitol. 130, 169 – 173
- Hamzavi, Y., A. Mostafaie und B. Nomanpour (2007). Serological Prevalence of toxoplasmosis in meat producing animals. Iran. J. Parasitol. 2, 7 – 11
- Handrick, W. und H. Padelt (1994). Toxoplasmose des Kindes. In: Pohle, D und J. S. Remington, Toxoplasmose: Erreger und Krankheit. Upjohn GmbH, 130 – 140
- Happe, S., A. Fischer, Ch. Heese, D. Reichelt, U. Grüneberg, M. Freund, S. Kloska, St. Evers und I.-W. Husstedt (2002). HIV-assoziierte zerebrale Toxoplasmose. Nervenarzt 73, 1174 – 1178
- Hashemi-Fesharki, R. (1996). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in cattle, sheep and goats in Iran. Vet. Parasitol. 61, 1-3
- Havelaar, A. H., J. M. Kemmeren und L. M. Kortbeek (2007). Disease burden of congenital toxoplasmosis. Clin. Infect. Dis. 44, 1467 – 1474
- Hecking-Veltman, J., A. M. Tenter und A. Dausgchies (2001). Studien zur Parasitenfauna bei streunenden Katzen im Raum Mönchengladbach. Prakt. Tierarzt 82, 563 – 569
- Heydorn, A. O. (1979). Die Katze als Überträger zystenbildender Kokzidien. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 92, 214 – 220
- Higuchi, R., G. Dollinger, P. S. Walsh und R. Griffith (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. Biotechnology (N Y) 10, 413 – 417
- Higuchi, R., C. Fockler, G. Dollinger und R. Watson (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. Biotechnology (N Y) 11, 1026 – 1030
- Hill, D. E., S. Chirukandoth, J. P. Dubey, J. K. Lunney und H. R. Gamble (2006). Comparison of detection methods for *Toxoplasma gondii* in naturally and experimentally infected swine. Vet. Parasitol. 141, 9 – 17
- Hill, D. E. und J. P. Dubey (2002). *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. Clin. Microbiol. Infect. 8, 634 – 640

- Hohlfeld, P., F. Daffos, J.-M. Costa, P. Thulliez, F. Forestier und M. Vidaud (1994). Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis with a Polymerase-Chain-Reaction test on amniotic fluid. *N. Engl. J. Med.* 331, 695 – 699
- Homan, W. L., M. Vercammen, J. De Braekeleer und H. Verschueren (2000). Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii* and its use for diagnostic and quantitative PCR. *Int. J. Parasitol.* 30, 69 – 75
- Horio, M., K. Nakamura und M. Shimada (2001). Risk of *Toxoplasma gondii* infection in slaughterhouse workers in Kitakyushu City. *J. UOEH.* 23, 233 – 243
- Hove, T. und J. P. Dubey (1999). Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in sera of domestic pigs and some wild game species from Zimbabwe. *J. Parasitol.* 85, 372 – 373
- Hove, T. und S. Mukaratirwa (2005). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in farm-reared ostriches and wild game species from Zimbabwe. *Acta Trop.* 94, 49 – 53
- Howe, D. K., S. Honoré, F. Derouin und L. D. Sibley (1997). Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. *J. Clin. Microbiol.* 35, 1411 – 1414
- Howe, D. K. und L. D. Sibley (1995). *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J. Infect. Dis.* 172, 1561 – 1566
- Howe, D. K., B. C. Summers und L. D. Sibley (1996). Acute virulence in mice is associated with markers on chromosome VIII in *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* 64, 5193 – 5198
- Hutchison, W. M. (1965). Experimental transmission of *Toxoplasma gondii*. *Nature* 206, 961 – 962
- Jackson, M. H. und W. M. Hutchison (1989). The prevalence and source of *Toxoplasma* infection in the environment. *Adv. Parasitol.* 28, 55 – 105
- Jacobs, L. und M. I. Melton (1966). Toxoplasmosis in chickens. *J. Parasitol.* 52, 1158 - 1162
- Jacquier, P., D. Nadel, P. Zuber und J. Eckert (1995). The status of infection with *Toxoplasma gondii* in the Swiss population: contribution of a seroepidemiologic study from the Zurich canton. *Schweiz. Med. Wochenschr. Suppl.* 65, 23 – 28
- Jalal, S., C. E. Nord, M. Lappalainen und B. Evengård (2004). Rapid and sensitive diagnosis of *T. gondii* infections by PCR. *Clin. Microbiol. Infect.* 10, 937 – 939
- Janitschke, K. (1999). Pränatale Übertragung der Toxoplasmen von der Mutter auf das Kind. *Bundesgesundheitsbl. Gesundheitsforsch. Gesundheitsschutz* 42, 548 – 552

- Janitschke, K., H. Werner und W. Hasse (1974). Robert-Koch-Institut, Laboratoriumsgruppe Medizinische Parasitologie (Leiter: Prof. Dr. H. Werner) und Berliner Blutspendedienst (Leiter: Med.-Direktor Dr. W. Hasse) Untersuchungen über die Möglichkeit der Übertragung von Toxoplasmen durch Bluttransfusionen. Blut, Band XXIX, 407 – 415
- Janku, J. (1923). Pathogenesá a patologická anatomie tak nazveného vrozeného kolobomu zluté skvrany voku normálne velikém a mikrophthalmickém s nálezem parazitu v sitnici. Cas Lék'ces, 62, 1021 – 1138. Zitiert in: Aspöck, H. (1994). Historische Übersicht, In: Pohle, D und J. S. Remington, Toxoplasmose: Erreger und Krankheit, Upjohn GmbH, 7 – 23
- Jauregui, L. H., J. Higgins, D. Zarlenga, J. P. Dubey und J. K. Lunney (2001). Development of a Real-Time PCR assay for detection of *Toxoplasma gondii* in pig and mouse tissues. J. Clin. Microbiol. 39, 2065 – 2071
- Jittapalapong, S., B. Nimsupan, N. Pinyopanuwat, W. Chimnoi, H. Kabeya und S. Maruyama (2007). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in stray cats and dogs in the Bangkok metropolitan area, Thailand. Vet. Parasitol. 145, 138 – 141
- Johnson, A. M. (1997). Speculation on possible life cycles for the clonal lineages in the genus *Toxoplasma*. Parasitol. Today, 13, 393 – 397. Jones, J. L., D. Kruszon-Moran, K. Sanders-Lewis and M. Wilson (2007). *Toxoplasma gondii* infection in the United States, 1999-2004, decline from the prior decade. Am. J. Trop. Med. Hyg. 77, 405 – 410
- Kapperud, G., P. A. Jenum, B. Stray-Pedersen, K. K. Melby, A. Eskild und J. Eng (1996). Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy: results of a prospective case-control study in Norway. Am. J. Epidemiol. 144, 405-412
- Kijlstra, A., O. A. Eissen, J. Cornelissen, K. Munniksmá, I. Eijck und T. Kortbeek (2004). *Toxoplasma gondii* infection in animal-friendly pig production systems. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 45, 3165 – 3169
- Kijlstra, A., B. Meerburg, J. Cornelissen, S. De Craeye, P. Vereijken und E. Jongert (2008). The role of rodents and shrews in the transmission of *Toxoplasma gondii* to pigs. Vet. Parasitol. (im Druck); doi: 10.1016/j.vetpar.2008.05.030
- Kim, K. und L. M. Weiss (2008). *Toxoplasma*: The next hundred years. Microb. Infect. (im Druck). Doi:10.1016/j.micinf.2008.07.015
- Klein, B. U. und E. Müller (2001). Seroprävalenz von Antikörpern gegen *Neospora caninum* bei Hunden mit und ohne klinischen Neosporoseverdacht in Deutschland. Prakt. Tierarzt 82, 437 – 440
- Klun, I., O. Djurković-Djaković, S. Katić-Radiovojević und A. Nikolić (2006). Cross-sectional survey on *Toxoplasma gondii* infection in cattle, sheep and pigs in Serbia: seroprevalence and risk factors. Vet. Parasitol. 135, 121 – 131

- Ko, R. C., F. W. Wong, D. Todd und K. C. Lam (1980). Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in the Chinese population of Hong Kong. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 74, 351 – 354
- Konishi, Y. Houki, K. Harano, R. S. Mibawani, D. Marsudi, S. Alibasah und Y. P. Dachlan (2000). High prevalence of antibody to *Toxoplasma gondii* among humans in Surabaya, Indonesia. *Jpn. J. Infect. Dis.* 53, 238 – 241
- Kotula, A. W., J. P. Dubey, A. K. Sharar, C. D. Andrews, S. K. Shen und D. S. Lindsay (1991). Effect of freezing on infectivity of *Toxoplasma gondii* cysts in pork. *J. Food Protect.* 54, 687 – 690
- Krauss, H., A. Weber, M. Appel, B. Enders, A. Graevenitz, H. D. Isenberg, G. G. Schäfer, W. Slenczeka und H. Zahner (2004). *Zoonosen*. Deutscher Ärzte-Verlag, Köln, 407 – 415
- Kuk, S. und M. Ozden (2007). A four-year investigation of the seropositivity of *Toxoplasma gondii* in our hospital. *Turkiye Parazitol. Derg.* 31, 1 – 3
- Langoni, H., J. R. Modolo, S. B. Pezerico, R. C. Silva, A. P. B. Castro, A. V. Da Silva, C. R. Padovani (2006). Serological profile of anti- *Toxoplasma gondii* antibodies in apparently healthy dogs of the city of Botucatu, São Paulo State, Brazil. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.* 12, 142 – 148
- Lappin, M. (1999). Feline toxoplasmosis. *In Pract.* 21, 578 – 589
- Laveran, M. (1900). Au sujet de l'hématozoaire endoglobulaire de *Padda oryzivora*. *Compt. Rend. Soc. Biol.* 52, 19 – 21
- Lee, H.-Y., H.-J. Noh, O.-S. Hwang, S.-K. Lee und D.-W. Shin (2000). Seroepidemiological study of *Toxoplasma gondii* infection in the rural area Okcheon-gun, Korea. *Kor. J. Parasitol.* 38, 251 – 256
- Lehmann, T., P. L. Marcet, D. H. Graham, E. R. Dahl und J. P. Dubey (2006). Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103, 11423 – 11428
- Levaditi, C. (1928). Au sujet de certaines protozooses héréditaires humaines á localization oculaires et nerveuses. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 98, 297 – 299. Zitiert in: Aspöck, H. (1994). Historische Übersicht, In: Pohle, D und J. S. Remington, *Toxoplasmose: Erreger und Krankheit*. Upjohn GmbH, 7 – 23
- Lin, D.-S. (1998). Seroprevalences to *Toxoplasma gondii* in privately-owned dogs in Taiwan. *Prev. Vet. Med.* 35, 21 – 27
- Lin, M.-H., T.-C. Chen, T.-T. Kuo, C.-C. Tseng und C.-P. Tseng (2000). Real-Time PCR for quantitative detection of *Toxoplasma gondii*. *J. Clin. Microbiol.* 38, 4121 – 4125

- Lindsay, D. S., B. L. Blagburn und J. P. Dubey (1997). Feline toxoplasmosis and the importance of the *Toxoplasma gondii* oocyst. *Comp. Cont. Ed. Pract. Vet.* 19, 448 – 461,506
- Lindsay, D. S., B. L. Blagburn, J. P. Dubey und W. H. Mason (1991). Prevalence and isolation of *Toxoplasma gondii* from white-tailed deer in Alabama. *J. Parasitol.* 77, 62 – 64
- Lindsay, D. S., M. V. Collins, D. Holliman, G. J. Flick und J. P. Dubey (2006). Effects of high-pressure processing on *Toxoplasma gondii* tissue cysts in ground pork. *J. Parasitol.* 92, 195 – 196
- Lindsay, D. S., J. P. Dubey, J. M. Butler und B. L. Blagburn (1997). Mechanical transmission of *Toxoplasma gondii* oocysts by dogs. *Vet. Parasitol.* 73, 27 – 33
- Lopes, A. P., L. Cardoso und M. Rodrigues (2008). Serological survey of *Toxoplasma gondii* infection in domestic cats from northeastern Portugal. *Vet. Parasitol.* 155, 184 – 189
- Ludewig, M., K. de Buhr und K. Fehlhaber (2007). *Toxoplasma gondii*-Seroprävalenz in Mastschweinebeständen – Ergebnisse aus einer deutschlandweiten Studie. *J. Verbr. Lebensm.* 2, 454 – 456
- Lundén, A., P. Lind, E. O. Engvall, K. Gustavsson, A. Uggla und I. Vagsholm (2002). Serological survey of *Toxoplasma gondii* infection in pigs slaughtered in Sweden. *Scand. J. Infect. Dis.* 34, 362 – 365
- Lundén, A., und A. Uggla (1992). Infectivity of *Toxoplasma gondii* in mutton following curing, smoking, freezing or microwave cooking. *Int. J. Food Microbiol.* 15, 357 – 363
- Lutz, W. (1997). Serologischer Nachweis von Antikörpern gegen *Toxoplasma gondii* und *Leptospira* bei Schwarzwild. *Z. Jagdwiss.* 43, 283 – 287
- Luyasu V., A. Robert, D. Lissenko, M. Bertrand, E. Bohy, M. Wacquez und M. de Bruyere (1997). A seroepidemiological study on toxoplasmosis. *Acta. Clin. Belg.* 52, 3 – 8
- McGregor, C. G. A., D. G. Fleck, J. Nagington, P. G. I. Stovin, R. Cory-Pearce und T. A. H. English (1984). Disseminated toxoplasmosis in cardiac transplantation. *J. Clin. Pathol.* 37, 74 – 77
- Mehlhorn, H. und J. K. Frenkel (1980). Ultrastructural comparison of cysts and zoites of *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis muris* and *Hammondia hammondii* in skeletal muscle of mice. *J. Parasitol.* 66, 59 – 67
- Mehta, C. und N. Patel (1992). LOGXACT-TURBO. CYTEL Software Corporation
- Mele, A., P. J. Paterson, H. G. Prentice, P. Leoni und C. C. Kibbler (2002). Infections post transplant. Toxoplasmosis in bone marrow transplantation: A report of two cases and systematic review of the literature. *Bone Marrow Transplant.* 29, 691 – 698

- Mineo, T. W. P., D. A. O. Silva, K. Näslund, C. Björkman, A. Uggla und J. R. Mineo (2004). *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* serological status of different canine populations from Uberlândia, Minas Gerais. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 56, 414 – 417
- Miró, G. A. Montoya, S. Jiménez, C. Frisuelos, M. Mateo und I. Fuentes (2004). Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* and intestinal parasites in stray, farm and household cats in Spain. *Vet. Parasitol.* 126, 249 – 255
- Morris, A. und M. Croxson (2004). Serological evidence of *Toxoplasma gondii* infection among pregnant women in Auckland. *N. Z. Med. J.* 117, 1189 – 1192
- Moura, L., P. Kelley, R. Krecek und J. Dubey (2007). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in cats from Sr. Kitts, West Indies. *J. Parasitol.* 93, 952 – 953
- Müller, M., A. Moll und G. Hildebrandt (1994). Bio-Rohwurst. Sensorische, substantielle und mikrobiologische Beschaffenheit. *Fleischwirtsch.* 74, 607 – 614
- Navidpour, S. und N. Hoghooghi-rad (1998). Seroprevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in buffaloes in Khoozestan province, Iran. *Vet. Parasitol.* 77, 191 – 194
- Negash, T., G. Tilahun, S. Patton, F. Prévot und Ph. Dorchie (2004). Serological survey on toxoplasmosis in sheep and goats in Nazareth, Ethiopia. *Revue Méd. Vét.* 155, 486 – 487
- Newton, C. R. und A. Graham (1994). PCR. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg-Berlin-Oxford, 14-19
- Nichols, B. A., M. L. Chiappino und G. R. O'Connor (1983). Secretion from the rhoptries of *Toxoplasma gondii* during host-cell invasion. *J. Ultrastruct. Res.* 83, 85 – 98
- Nicolle, C. und L. Manceaux (1908). Sur une infection à corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. *Compt. Rend. de l'Acad Sci.* 147, 763 – 766
- Nicolle, C. und L. Manceaux (1909). Sur un protozoaire nouveau du gondi. *C. R. Hebd. Séances Acad. Sci.*, 148, 369 – 372. Zitiert in: Tenter, A., A. Heckenroth und L. M Weiss (2000). *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *J. Parasitol.* 30, 1217 – 1258
- Nieto, S. O. und R. D. Meléndez (1998). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in goats from arid zones of Venezuela. *J. Parasitol.* 84, 190 – 191
- Nishri, Z., Y. Yoshpe-Purer, C. Costin, S. Ever-Hadani und T. A. Schwartz (1978). Toxoplasmosis in Israel, 1970-73: evaluation of laboratory data. *Isr. J. Med. Sci.* 14, 1039 – 1047



- Nogami, S., A. Tabata, T. Moritomo und Y. Hayashi (1999). Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibody in wild boar, *Sus scrofa riukiuanus*, on Iriomote Island, Japan. *Vet. Res. Comm.* 23, 211 – 214
- Nutter, F. B., J. P. Dubey, J. F. Levine, E. B. Breitschwerdt, R. B. Ford und M. K. Stoskopf (2004). Seroprevalences of antibodies against *Bartonella henselae* and *Toxoplasma gondii* and fecal shedding of *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp. and *Toxocara cati* in feral and pet domestic cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 255, 1394 – 1398
- Nutter, F. B., J. F. Levine, M. K. Stoskopf, H. R. Gamble und J. P. Dubey (1998). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Trichinella spiralis* in North Carolina black bears (*Ursus americanus*). *J. Parasitol.* 84, 1048 – 1050
- Ossorio, P. N., L. D. Sibley und J. C. Boothroyd (1991). Mitochondrial-like DNA sequences flanked by direct and inverted repeats in the nuclear genome of *Toxoplasma gondii*. *J. Mol. Biol.* 222, 525 – 536
- Paul, M. (1998). Potential risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in cases with recently acquired toxoplasmosis. *Przegl. Epidemiol.* 52, 447 – 454
- Paul, M., E. Petersen, Z. S. Pawlowski und J. Szczapa (2000). Neonatal screening for congenital toxoplasmosis in the Poznań region of Poland by analysis of *Toxoplasma gondii*-specific IgM antibodies eluted from filter paper blood spots. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 19, 30 – 36
- Paul, M., E. Petersen und J. Szczapa (2001). Prevalence of congenital *Toxoplasma gondii* infection among newborns from the Poznań region of Poland: validation of a new combined enzyme immunoassay for *Toxoplasma gondii*-specific immunoglobulin A and immunoglobulin M antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 39, 1912 – 1916
- Pena, H. F. J., R. M. Schares, M. Amaku, J. P. Dubey und S. M. Gennari (2006). *Toxoplasma gondii* infection in cats from Sao Paulo state, Brazil: Seroprevalence, oocyst shedding, isolation in mice, and biologic and molecular characterization. *Res. Vet. Sci.* 81, 58 – 67
- Peyron, F., J. R. Lobry, K. Musset, J. Ferrandiz, J. E. Gomez-Marin, E. Petersen, V. Meroni, B. Rausher, C. Mercier, S. Picot und M.-F. Cesbron-Delauw (2006). Serotyping of *Toxoplasma gondii* in chronically infected pregnant women: predominance of type II in Europe and types I and III in Colombia (South America). *Microb. Infect.* 8, 2333 – 2340
- Pita-Gondim, L. F., H. V. Barbosa Jr., C. H. A. Ribeiro Filho und H. Saeki (1999). Serological survey of antibodies to *Toxoplasma gondii* in goats, sheep, cattle and water buffaloes in Bahia States, Brazil. *Vet. Parasitol.* 82, 273 – 276

- Prestrud, K. W., K. Asbakk, E. Fuglei, T. Mørk, A. Stien, E. Ropstad, M. Tryland, G. W. Gabrielsen, C. Lydersen, K. M. Kovacs, M. J. Loonen, K. Sagerup und A. Oksanen (2007). Serosurvey for *Toxoplasma gondii* in arctic foxes and possible sources of infection in the high Arctic of Svalbard. *Vet. Parasitol.* 150, 6 – 12
- Price, J. H. (1969). *Toxoplasma* infection in an urban community. *Br. Med. J.* 4, 141 – 143
- Puije, van der W. N., K. M. Bosompem, E. A. Canacoo, J. M. Wastling und B. D. Akanmori (2000). The prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in Ghanaian sheep and goats. *Acta Trop.* 76, 21 – 26
- Pujol-Riqué, M., F. Derouin, A. García-Quintanilla, M. E. Valls, J. M. Miró und M. T. Jiménez de Anta (1999). Design of a one-tube hemi-nested PCR for detection of *Toxoplasma gondii* and comparison of three DNA purification methods. *J. Med. Microbiol.* 48, 857 – 862
- Punda-Polić, V., M. Tonkić und V. Capkun (2000). Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in the female population of the county of Split Dalmatia, Croatia. *Eur. J. Epidemiol.* 16, 875 – 877
- Rah, H., B. B. Chomel, E. H. Follmann, R. W. Kasten, C. H. Hew, T. B. Farver, G. W. Garner und S. C. Amstrup (2005). Serosurvey of selected zoonotic agents in polar bears (*Ursus maritimus*). *Vet. Rec.* 156, 7 – 13
- Raz, R., Z. Nishri, A. Mates, G. Sartani, N. Hadad, N. Reichman, D. Miron und E. Flatau (1993). Seroprevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* among two rural populations in northern Israel. *Isr. J. Med. Sci.* 29, 636 – 639
- Reischl, U., S. Bretagne, D. Krüger, P. Ernault und J-M. Costa (2003a). Comparison of two DNA targets for the diagnosis of toxoplasmosis by Real-Time PCR using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. *BMC Infect. Dis.* 3. <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/3/7>
- Reischl, U., H. Wolf und D. Krüger (2003b). Aktueller Stand des Nachweises von *Toxoplasma gondii*-DNA mittels qualitativer und quantitativer PCR. *J. Lab. Med.* 27, 393 – 397
- Remington, J. S., P. Thulliez und J. G. Montoya (2004). Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. *J. Clin. Microbiol.* 42, 941 – 945
- Riemann, H. P., P. C. Brant, D. E. Behymer und C. E. Franti (1975). *Toxoplasma gondii* and *Coxiella burnetii* antibodies among Brazilian slaughterhouse employees. *Am. J. Epidemiol.* 102, 386 – 392
- Robert-Koch-Institut (RKI)(2002). Infektionsepidemiologisches Jahrbuch für 2001. [www.rki.de/cln\\_091/nn\\_196882/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuch2001.html](http://www.rki.de/cln_091/nn_196882/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuch2001.html)
- Robert-Koch-Institut (RKI) (2003). Infektionsepidemiologisches Jahrbuch für 2002 [www.rki.de/cln\\_091/nn\\_196882/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuch2002.html](http://www.rki.de/cln_091/nn_196882/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuch2002.html)

- Robert-Koch-Institut (RKI) (2004). Infektionsepidemiologisches Jahrbuch für 2003  
[www.rki.de/cln\\_091/nn\\_196882/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuch2003.html](http://www.rki.de/cln_091/nn_196882/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuch2003.html)
- Robert-Koch-Institut (RKI) (2005). Infektionsepidemiologisches Jahrbuch für 2004  
[www.rki.de/cln\\_091/nn\\_196882/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuch2004.html](http://www.rki.de/cln_091/nn_196882/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuch2004.html)
- Robert-Koch-Institut (RKI) (2006). Infektionsepidemiologisches Jahrbuch für 2005  
[www.rki.de/cln\\_091/nn\\_196882/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuch2005.html](http://www.rki.de/cln_091/nn_196882/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuch2005.html)
- Robert-Koch-Institut (RKI) (2007a). Infektionsepidemiologisches Jahrbuch für 2006  
[www.rki.de/cln\\_091/nn\\_196882/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuch2006.html](http://www.rki.de/cln_091/nn_196882/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuch2006.html)
- Robert-Koch-Institut (RKI) (2008). Infektionsepidemiologisches Jahrbuch für 2007  
[www.rki.de/cln\\_091/nn\\_196882/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuch2007.html](http://www.rki.de/cln_091/nn_196882/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuch2007.html)
- Robert-Koch-Institut (RKI) (2007b). Ratgeber Infektionskrankheiten – Merkblätter für Ärzte  
Toxoplasmose- neue Fassung des RKI-Ratgeber Infektionskrankheiten-Merkblätter für  
Ärzte. Epidem. Bullet. 42, 390 – 394
- Rommel, M., R. Sommer und K. Janitschke (1967). *Toxoplasma*-Infektionen beim  
Schwarzwild. Z. Jagdwiss. 13, 35 – 36
- Roos, T., J. Martius, U. Groß und L. Schrod (1993). Systematic serologic screening for  
toxoplasmosis in pregnancy. Obstet. Gynecol. 81, 243 – 250
- Ruiz-Fons, F., J. Vicente, D. Vidal, U. Höfle, D. Villanúa, C. Gauss, J. Segalés, S. Almería, V.  
Montoro und C. Gortázar (2006). Seroprevalence of six reproductive pathogens in  
European wild boar (*Sus scrofa*) from Spain: The effect on wild boar female  
reproductive performance. Theriolog. 65, 731 – 743
- Sabin, A. B. (1941). Toxoplasmic encephalitis in children. J. Am. Med. Assoc. 116, 801-814
- Sabin, A. B. und H. A. Feldmann (1948). Dyes as microchemical indicators of a new immunity  
phenomenon affecting a protozoon parasite (*Toxoplasma*). Science, 108, 660 – 663.  
Zitiert in: Aspöck, H. (1994). Historische Übersicht, In: Pohle, D und J. S. Remington,  
Toxoplasmose: Erreger und Krankheit Upjohn GmbH, 7 – 23
- Sacks, J. J., R. R. Roberto und N. F. Brooks (1982). Toxoplasmosis infection associated with  
raw goat's milk. JAMA. 248, 1728 – 1732
- Saffer, L., D., O. Mercareau-Puijalon, J.-F. Dubrematz und J. D. Schwarzman (1992).  
Localization of a *Toxoplasma gondii* rhoptry protein by immunoelectron microscopy  
during and after host cell penetration. J. Protozool. 39, 526 – 530
- Salibay, C. C. und F. G. Claveria (2005). Serologic detection of *Toxoplasma gondii* infection in  
*Rattus* spp. collected from three different sites in Dasmariñas, Cavite, Philippines.  
Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health 36, 46 – 49

- Samad, M. A., B. C. Dey, N. S. Chowdhury, S. Akhtar und M. R. Khan (1997). Seroprevalence studies on *Toxoplasma gondii* infection in man and animals in Bangladesh. Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Health 28, 339 – 343
- Schares, G., J. F. Dubremetz, J. P. Dubey, A. Bärwald, A. Loyens und F. J. Conraths (1999). *Neospora caninum*: Identification of 19-, 38-, and 40 kDa surface antigens and a 33-kDa dense granule antigen using monoclonal antibodies. Exp. Parasitol. 92, 109-119
- Schares, G., N. Pantchev, D. Barutzki, A. O. Heydorn, C. Bauer und F. J. Conraths (2005). Oocysts of *Neospora caninum*, *Hammondia heydorni*, *Toxoplasma gondii* and *Hammondia hammondi* in faeces collected from dogs in Germany. Int. J. Parasitol. 35, 1525 – 1537
- Schares, G., M. Peters, R. Wurm, A. Bärwald und F. J. Conraths (1998). The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analysed by serological techniques. Vet. Parasitol. 80, 87-98
- Schares, G., M. Rauser, P. Söndgen, P. Rehberg, A. Bärwald, J. P. Dubey, R. Edelhofer und F. J. Conraths (2000). Use of purified tachyzoite surface antigen p38 in an ELISA to diagnose bovine neosporosis. Int. J. Parasitol. 30, 1123-1130
- Schares, G., M. G. Vrhovec, N. Pantchev, D. C. Herrmann und F. J. Conraths (2008). Occurrence of *Toxoplasma gondii* and *Hammondia hammondi* oocysts in the faeces of cats from Germany and other European countries. Vet. Parasitol. 152, 34 – 45
- Schulzig, H. S. (2004). Untersuchungen zur epidemiologischen Bedeutung des Schweines bei der Verbreitung der humanen Toxoplasmose. Vet. Med. Diss., Universität Leipzig
- Schulzig, H. S. und K. Fehlhaber (2005). Longitudinalstudie zur Seroprävalenz der *Toxoplasma gondii*-Infektion in vier deutschen Schweineaufzucht- und Mastbetrieben. Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 118, 399 – 403
- Schulzig, H. S. und K. Fehlhaber (2006). Seroprävalenz von *Toxoplasma gondii* - Schweinefleisch und Schweinefleisch enthaltende Erzeugnisse aus konventioneller und ökologischer Herstellung. Fleischwirtsch. 12, 106 – 108
- Sedlák, K. und E. Bártová (2006a). Seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in zoo animals Vet. Parasitol. 136, 223 – 231
- Sedlák, K. und E. Bártová (2006b). The prevalence of *Toxoplasma gondii* IgM and IgG antibodies in dogs and cats from the Czech Republic. Vet. Med.-Czech. 51, 555 – 558
- Seinecke, P. (1996). Seroprävalenz von Antikörpern gegen *Toxoplasma gondii* bei Schafen, Ziegen und Schweinen in Niedersachsen. Vet. Med. Diss. Tierärztliche Hochschule Hannover
- Seitz, H. M. (1994). *Toxoplasma gondii*: Mikrobiologische Aspekte, In: Pohle, D und J. S. Remington, Toxoplasmose: Erreger und Krankheit. Upjohn GmbH, 7 – 23

- Sharif, M., A. Daryani, M. Nasrolahei und S. P. Ziapour (2008). Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in stray cats in Sari, northern Iran. Trop. Anim. Health Prod. (im Druck)
- Shuhaiber, S., G. Koren, R. Boskovic, T. R. Einarson, O. P. Soldin und A. Einarson (2003). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection among veterinary staff in Ontario, Canada (2002): Implications for teratogenic risk. BMC Infect. Dis. 3 <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/3/8>
- Sibley, L. D., A. J. LeBlanc, E. R. Pfefferkorn und J. C. Boothroyd (1992). Generation of a Restriction Fragment Length Polymorphism Linkage Map for *Toxoplasma gondii*. Genetics 132, 1003 – 1015
- Silva, da, A. V., S. Bergamaschi Pezerico, V. Y. de Lima, L. D'Arc Moretti, J. Plombom Pinheiro, E. M. Tanaka, M. G. Ribeiro und H. Langoni (2005). Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains isolated from dogs with neurological signs. Vet. Parasitol. 127, 23 -27
- Silva, J. C., S. M. Gennari, A. M. Ragozo, V. R. Amajones, C. Magnabosco, L. E. Yai, J. S. Ferreira-Neto, J. P. Dubey (2002). Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in sera of domestic cats from Guarulhos and São Paulo, Brazil. J. Parasitol. 88, 419 – 420
- Sobrino, R., O. Cabezón, J. Millán, M. Pabón, M. C. Arnal, D. F. Luca, C. Gortázar, J. P. Dubey und S. Almeria (2007). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in wild carnivores in Spain. Vet. Parasitol. 148, 187 – 192
- Sommer, R., M. Rommel und R. Levetzow (1965). Überlebensdauer von Toxoplasmazysten in Fleisch und Fleischzubereitungen. Fleischwirtsch. 45, 454 – 456
- Splendore, A. (1908). Uno nuovo protozoa parasite dei conigli: incontrato nelle lesioni anatomiche d'una malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell'uomo. Rev. Soc. Sci. São Paolo 3, 109 – 112
- Sroka, J. (2001). Seroepidemiology of toxoplasmosis in the Lublin Region. Ann. Agric. Environ. Med. 8, 25 – 31
- Stoll, L. und B. Kraft (1976). Fluoreszenzhistologischer Nachweis von *Toxoplasma gondii* in Lymphknoten des Schweines. Dtsch. Tierärztl. Wschr. 83, 137 – 140
- Studenicová, C., G. Bencaiová und R. Holková (2006). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in a healthy population from Slovakia. Eur. J. Int. Med. 17, 470 – 473
- Sukthana, Y., T. Chintana, W. Supathanapong, C. Siripanth, A. Lekkla und R. Chiabchalard (2000). Prevalence of toxoplasmosis in selected populations in Thailand. J. Trop. Med. Parasitol. 23, 53 – 58
- Sumyuen, M. H., Y. J. F. Garin und F. Derouin (1995). Early kinetics of *Toxoplasma gondii* infection in mice infected orally with cysts of an avirulent strain. J. Parasitol. 81, 327 - 329

- Suter, B. J., S. Blatter, M. Bittar und E. H. Viollier (1999). Toxoplasmose-IgG-Avidität: Welchen Stellenwert hat sie in der Schwangerschaft? Schweiz. Med. Wochenschr. 129, 1938 – 1941
- Switaj, K., A. Master, P. K. Borkowski, M. Skrzypczak, J. Wojciechowicz und P. Zaborowski (2006). Association of ocular toxoplasmosis with Type I *Toxoplasma gondii* strains: direct genotyping from peripheral blood samples. J. Clin. Microbiol. 44, 4262 – 4264
- Switaj, K., A. Master, M. Skrzypczak und P. Zaborowski (2005). Recent trends in molecular diagnostics for *Toxoplasma gondii* infections. Clin. Microbiol. Infect. 11, 170 – 176
- Tenter, A. M. und K. Fehlhäber (2002). Toxoplasmose: eine lebensmittelübertragene Parasitose. Bundesgesundheitsbl. Gesundheitsforsch. Gesundheitsschutz 45, 549 – 555
- Tenter, A. M., A.R. Heckerroth und L.M. Weiss (2000). *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. Int. J. Parasitol. 30, 1217 – 1258
- Tenter, A. M., P. Seineke, K. Simon, A. R. Heckerroth, I. M. Damriyasa, C. Bauer und H. Zahner (1999). Aktuelle Studien zur Epidemiologie von *Toxoplasma*-Infektionen, Tagung der Fachgruppe „Parasitologie und parasitäre Krankheiten“. Tierärztliche Hochschule Hannover 247 – 272
- Tenter, A. M., C. Vietmeyer, A. M. Johnson, K. Janitschke, M. Rommel und W. Lehmacher (1994). ELISAs based on recombinant antigens for seroepidemiological studies on *Toxoplasma gondii* infections in cats. Parasitol. 109, 29 – 36
- Terazawa, A., R. Muljono, L. Susanto, S. S. Margono und E. Konishi (2003). High *Toxoplasma* antibody prevalence among inhabitants in Jakarta, Indonesia. Jpn. J. Infect. Dis. 56, 107 – 109
- Tonkić, M., V. Punda-Polić, S. Sardelić und V. Capkun (2002). Occurrence of *Toxoplasma gondii* antibodies in the population of Split-Dalmatia County. Lijec. Vjesn. 124, 19 – 22
- Tuntasuvan, D., K. Mohkaew und J. P. Dubey (2001). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in elephants (*Elephas indicus*) in Thailand. J. Parasitol., 87, 229 – 230
- Uggla, A., S. Mattson und N. Juntti (1990). Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in cats, dogs and horses in Sweden. Acta. Vet. Scand. 31, 219 – 222
- Valcavi, P. P., A. Natali, L. Soliani, S. Montali, G. Dettori und C. Cheezi (1995). Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in the population of the area of Parma (Italy). Eur. J. Epidemiol. 11, 333 – 337
- Vanek, J. A., J. P. Dubey, P. Thulliez, M. R. Riggs und B. E. Stromberg (1996). Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in hunter-killed white tailed deer (*Odocoileus virginianus*) in four regions of Minnesota. J. Parasitol. 82, 41 – 44

- Vela-Amieva, M., I. Cañedo-Solares, P. Gutiérrez- Castellón, M. Pérez-Andrade, C. González-Contreras, J. Ortiz-Cortés, V. Ortega-Velázquez, M. De La Luz Galván-Ramírez, M. Ruiz-García, R. Saltigeral-Simentel, J. C. Ordaz-Favila, C. Sánchez und D. Correa (2005). Short report: Neonatal screening pilot study of *Toxoplasma gondii* congenital infection in Mexico. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 72, 142-144
- Vikøren, T., J. Tharaldsen, B. Fredriksen und K. Handeland (2004). Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in wild red deer, roe deer, moose, and reindeer from Norway. *Vet. Parasitol.* 120, 159 – 169
- Viney, M. (2002). A paradoxical protozoan and its virulence. *TRENDS Parasitol.* 18. 6
- Vitaliano, S. N., D. A. Silva, T. W. Mineo, R. A. Ferreira, E. Bevilacqua und J. R. Mineo (2004). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in captive maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) from Southeastern and Midwestern regions of Brazil. *Vet. Parasitol* 122, 253 – 260
- Wainwright, K. E., M. Lagunas-Solar, M. A. Miller, B. C. Barr, I. A. Gardner, C. Pina, A. C. Melli, A. E. Packham, N. Zeng, T. Truong und P. A. Conrad (2007). Physical inactivation of *Toxoplasma gondii* oocysts in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 5663 - 5666
- Wang Y. K. (1989). A sero-epidemiological survey on toxoplasmosis in Yunan province. *Zhonghua. Liu. Xing. Bing. Xue. Za. Zhi.* 10, 321-323
- Wanha, K., R. Edelhofer, C. Gabler-Eduardo und H. Prosl (2005). Prevalence of antibodies against *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs and foxes in Austria. *Vet. Parasitol.* 128, 189 – 193
- Warnekulasuriya, M. R., J. D. Johnson und R. E. Holliman (1998). Detection of *Toxoplasma gondii* in cured meats. *Int. J. Food Microbiol.* 45, 211 – 215
- Wastling, J. M., S. Nicoll und D. Buxton (1993). Comparison oft two gene amplification methods for the detection of *Toxoplasma gondii* in experimentally infected sheep. *J. Med. Microbiol.* 38, 360 – 365
- Weigel, R. M., J. P. Dubey, A. M. Siegel, D. Hoefling, D. Reynolds, L. Herr, U. D. Kitron, S. K. Shen, P. Thulliez, R. Fayer et al. (1995a). Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in swine in Illinois in 1992. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 206, 1747 – 1751
- Weigel, R. M., J. P. Dubey, A. M. Siegel, U. D. Kitron, A. Manneli, M. A. Mitchell, N. E. Mateus-Pinilla, P. Thulliez, S. K. Shen, O. C. H. Kwok und K. S. Todd (1995b). Risk factors for transmission of *Toxoplasma gondii* on swine farms in Illinois. *J. Parasitol.* 81, 736 – 741
- Weinmann, D. und A. H. Chandler (1954). Zitiert in: J.P. Kreier (Hrsg.): *Parasitic Protozoa* (1993). *Toxoplasma, Neospora, Sarcocystis*, and other tissue cyst-forming coccidian of humans and animals. Bd. 6, 2. Aufl. Academic Press, 1 – 158

- Wilfingseder, D. und H. Stoiber (2002). Quantifizierung von PCR-Produktmengen durch Real-Time PCR-Verfahren. [http://www.antibiotikamonitor.at/12\\_02/12\\_02\\_06.htm](http://www.antibiotikamonitor.at/12_02/12_02_06.htm)
- Wolf, A., D. Cowen und B. H. Paige (1939a). Toxoplasmic encephalomyelitis III. A new case of granulomatous encephalomyelitis due to a protozoon. *Am. J. Pathol.*, 15, 657 – 694. Zitiert in: Aspöck, H. (1994). Historische Übersicht, In: Pohle, D und J. S. Remington, Toxoplasrose: Erreger und Krankheit, Upjohn GmbH, 7 – 23
- Wolf, A., D. Cowen und B. H. Paige (1939b). Human toxoplasmosis. Occurrence in infants as an encephalomyelitis. Verification by transmission to animals. *Science*, 89, 226-229. Zitiert in: Aspöck, H. (1994). Historische Übersicht, In: Pohle, D und J. S. Remington, Toxoplasrose: Erreger und Krankheit Upjohn GmbH, 7 – 23
- Wolf, D., G. Schares, O. Cardenas, W. Huanca, A. Cordero, A. Bärwald, F. J. Conraths, M. Gauly, H. Zahner und C. Bauer (2005). Detection of specific antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in naturally infected alpacas (*Lama pacos*), llamas (*Lama glama*) and vicuñas (*Lama vicugna*) from Peru and Germany. *Vet. Parasitol.* 130, 81 -87
- Yai, L. E., W. A. Cañon-Franco, V. C. Geraldi, M. E. Summa, M. C. Camargo, J. P. Dubey und S. M. Gennari (2003). Seroprevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in the South American opossum (*Didelphis marsupialis*) from the city of São Paulo, Brazil. *J. Parasitol.* 89, 870 – 871
- Yoshitaka, O., M. Kouichi, I. Kunio, und I. Naotaka (2005). Antibodies to *Toxoplasma gondii* in free-ranging wild boar (*Sus scrofa leucomystax*) in Shikoku, Japan. *Japan. J. Zoo Wildl. Med.* 10, 99 – 102
- Yu, J., Z. Xia, Q. Liu, J. Ding und W. Zhang (2007). Seroepidemiology of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in cattle and water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in the People`s Republic of China. *Vet. Parasitol.* 143, 79 – 85
- Zadeh, M., H. Keshavarz, M. Mohebal, K. Holakouie Naieni und S. H. Arshi (2003). Seroepidemiologic study of human *Toxoplasma* infection in residents of Meshkin-Shar. *J. School Public Health Inst. Public Health Res.* 1, 57 – 72.
- Zarnke, R. L., J. P. Dubey, O. C. Kwok und J. M. Ver Hoef (1997). Serologic survey for *Toxoplasma gondii* in grizzly bears from Alaska. *J. Wildl. Dis.* 33, 267 – 270
- Zarnke, R. L., J. P. Dubey, O. C. Kwok und J. M. Ver Hoef (2000). Serologic survey for *Toxoplasma gondii* in selected wildlife species from Alaska. *J. Wildl. Dis.* 36, 19 – 24
- Zarnke, R. L., J. P. Dubey, J. M. Ver Hoef, M. E. McNay und O. C. Kwok (2001). Serologic survey for *Toxoplasma gondii* in lynx from interior Alaska. *J. Wildl. Dis.* 37, 36 – 38



## **Selbständigkeitserklärung**

### **Ich erkläre:**

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Stefanie Ulrike Rosa

## Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn *Prof. Dr. Bülte*. Einerseits für die Überlassung des interessanten Dissertationsthemas und andererseits für die über den gesamten Zeitraum des Promotionsstudiums in jeglicher Hinsicht gewährte Unterstützung und Anleitung.

Ich bin sehr dankbar, dass ich die Gelegenheit bekommen habe, im *Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde* mein Fachwissen vor allem im molekularbiologischen, als auch im mikrobiologischen Bereich zu erweitern und möchte mich an dieser Stelle inständig bei *Dr. Abdulmawjood* für seine Geduld und Hilfsbereitschaft und vor allem für seine fachliche Beratung und Betreuung bedanken.

Ein besonderer Dank gilt allen Mitarbeitern des Institutes für die freundliche und hilfsbereite Atmosphäre, vor allem aber *Herrn Schmitt* für die äußerst sorgsame und zeitaufwändige Herstellung der Rohwurst-Erzeugnisse, sowie *Frau Walter, Frau Simon, Frau Dürrschmidt* und *Frau Marx* für die wochenlange Unterstützung bei der Aufbereitung der DNA-Proben und ganz besonders *Frau Walter* für die geduldige Einweisung in die wichtigen praktischen Fertigkeiten und Geheimnisse der Molekularbiologie.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn *Prof. Dr. Zahner*, Herrn *Dr. Bauer* und Frau *Dr. Taubert* für die gute Zusammenarbeit und die bereitwillige Hilfestellung bei jeglichen Fragen und Problemen aus dem parasitologischen Fachgebiet; darüberhinaus selbstverständlich auch bei Herrn *Dr. Failing* und *Frau Sparenberg* für die freundliche und geduldige Unterstützung bei der statistischen Auswertung und Darstellung der Ergebnisse.

Ebenfalls zu Dank verpflichtet bin ich Herrn *Prof. Dr. Liesenfeld* für das Überlassen der infizierten Mäusegehirne, sowie Herrn *Dr. Schares* für die Durchführung der serologischen Untersuchungen.

Mein größter Dank gilt meinen *Eltern, Gudrun und Oskar Rosa*, ohne deren Unterstützung diese Arbeit niemals entstanden wäre. Ich möchte ihnen ebenso für ihr unerschütterliches Vertrauen wie für ihre Geduld und nicht zuletzt für die finanziellen Mittel danken, die es mir in meiner gesamten Studienzzeit ermöglicht haben, mich voll und ganz auf die vor mir liegenden Aufgaben zu konzentrieren.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meiner *Schwester Christine Dillmann* für die liebevoll entgegengebrachte psychische aber auch physische Unterstützung in Form von unzähligen motivierenden Gesprächen und noch viel mehr Arbeitsstunden bedanken, in denen sie diese Arbeit mehrfach mühevoll und äußerst sorgsam Korrektur gelesen hat.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei allen Freunden bedanken, die mir durch aufmunternde Gespräche und ein offenes Ohr stets selbstlos unterstützend zur Seite gestanden haben – ganz besonders aber bei *Nadine Aßmus* für die jahrelange, wunderbare Freundschaft, die mir den zur Verfassung dieser Arbeit notwendigen Rückhalt und noch viel mehr gegeben hat und gibt.

Das dieser Arbeit zugrundeliegende Projekt wurde durch das Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) über die Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) gefördert [Förderkennzeichen 05HS046].

*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5410-5



© Astroid - Fotolia.com

© Eric Isselée - Fotolia.com