

# Molekular- und immundiagnostische Untersuchungen zur bovinen Neosporose in der Schweiz

Autor(en): **Gottstein, B. / Hentrich, B. / Wyss, R.**

Objektyp: **Article**

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

Band (Jahr): **141 (1999)**

Heft 2

PDF erstellt am: **16.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-589148>

## **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

## **Haftungsausschluss**

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Institut für Parasitologie<sup>1</sup> und Institut für Tierpathologie<sup>5</sup> der Universität Bern,  
 Institut für Veterinärpathologie der Universität Zürich<sup>2</sup>, Institut für Viruskrankheiten  
 und Immunoprophylaxe<sup>3</sup>, Bundesamt für Veterinärwesen<sup>4</sup>

# Molekular- und immundiagnostische Untersuchungen zur bovinen Neosporose in der Schweiz

B. Gottstein<sup>1</sup>, B. Hentrich<sup>1</sup>, R. Wyss<sup>1</sup>, B. Thür<sup>2</sup>, L. Bruckner<sup>3</sup>, N. Müller<sup>1</sup>, H. Kaufmann<sup>4</sup>,  
 A. Waldvogel<sup>5</sup>

## Zusammenfassung

Die durch zystenbildende Kokzidien verursachten Schäden beim Wiederkäuer betreffen primär Aborte, Jungtierverluste sowie Muskelschäden. Erst seit kurzem ist bekannt, dass *Neospora caninum* ein wichtiger protozoärer Aborterreger beim Rind ist. Ziel der vorliegenden Studie war die Dokumentation diagnostischer Parameter verschiedener Labormethoden (*in vitro*-Kultivierung; Histologie; Immunhistochemie; Serologie; PCR), die uns für den direkten und indirekten Parasitennachweis zur Verfügung stehen. Bei 24 (29%) von 83 abortierten Föten liess sich mittels PCR *Neospora*-DNA im fötalen Hirn, das häufig gleichzeitig durch geringgradige multifokale nekrotisierende Enzephalitiden charakterisiert war, nachweisen. Die zur Verfügung stehenden diagnostischen Labormethoden wurden zusätzlich bei trächtigen Rindern nach experimenteller Infektion mit *N. caninum* erprobt. Die diaplazentäre Übertragung des Parasiten auf den Föten erfolgte bei zwei von drei Rindern. Bei diesen beiden Föten liess sich Parasiten-DNA sowohl in fötalen Organen als auch in der fötalen Abomasal- und Amnionflüssigkeit nachweisen. Die experimentell infizierten Rinder serokonvertierten zwischen dem 10. und dem 17. Tag nach Infektion, bei den dazugehörigen Föten liessen sich keine anti-*Neospora*-Antikörper nachweisen. Die vorliegenden Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass sich unter Praxisbedingungen die PCR am besten für die Diagnose eines *Neospora*-Abortes eignet. Die PCR, ergänzt durch serologische Ver-

## Molecular and immunodiagnosis of bovine neosporosis in Switzerland

Cyst-forming coccidia may cause significant losses in livestock, primarily due to abortion, loss of young animals and neuromuscular diseases. Rather recently, *Neospora caninum* has been recognized as one of the major protozoal abortion-inducing parasites in cattle. The present study addressed the performance of different diagnostic tools (*in vitro*-cultivation; histology; immunohistochemistry; serology; PCR) suitable for the direct or indirect detection of *N. caninum*. By PCR, *Neospora*-DNA was detected in 24 brains (29%) from 83 bovine abortion, many of these brains were simultaneously characterized by histopathological findings typical for a protozoal, cerebral parasitosis. The diagnostic methods were furthermore assessed using samples of different tissues and body fluids from three experimentally *Neospora*-infected pregnant cows and their foetuses. The diaplacental passage of *N. caninum* to the foetus was successful in two of the three cases. In these two cases, PCR was positive for different foetal organs and, additionally, for the abomasal and amniotic fluid. The successfully infected cows developed anti-*Neospora* serum antibodies between 10 and 17 days post infection, foetuses remained serologically negative in all cases.

The results obtained in the present study demonstrated the usefulness of PCR, complemented by serology, for the specific diagnosis of bovine neosporosis. Such tests may prove suitable to

fahren, kann ebenfalls für epidemiologische Untersuchungen eingesetzt werden. Aufgrund der vorliegenden Daten scheint *Neospora* in der Schweiz ein bedeutender Abortverursacher beim Rind zu sein.

**Schlüsselwörter:** *Neospora caninum* – Neosporose – *Toxoplasma gondii* – Toxoplasmose – Abort – Rind – PCR – ELISA

## Einleitung

*Neospora caninum*, ein apikomplexes Protozoon, kann bei diversen Tierarten u. a. neuromuskuläre Erkrankungen verursachen, wobei das klinische Bild demjenigen der Toxoplasmose sehr ähnlich ist (Dubey et al., 1996). Wegen der morphologischen Ähnlichkeit wurde der Parasit bis 1988 fälschlicherweise auch als *Toxoplasma gondii* diagnostiziert (Dubey et al., 1988). Die Neosporose verursacht beim Rind v. a. Aborte oder die Geburt von toten oder lebensschwachen Kälbern (Dubey und Lindsay, 1993). Gemäss neueren Untersuchungen ist *Neospora* der bedeutendste protozoäre Abortverursacher beim Rind in den USA und einigen anderen Ländern (Anderson et al., 1991; Paré et al., 1996). Beim Menschen wurde *Neospora* bisher nicht nachgewiesen. Sowohl die Neosporose als auch die Toxoplasmose kommen weltweit vor (Dubey und Lindsay, 1993). Für die Schweiz liegen für Neosporose, im Gegensatz zur Toxoplasmose, noch sehr wenige Daten vor (Gottstein, 1995), genauere Zahlen zur relativen Häufigkeit des *Neospora*-Nachweises bei Rinderaborten in der Schweiz wurden erst 1998 publiziert (Gottstein et al., 1998). Zur genauen Ermittlung von parasitologischen und serologischen Prävalenzen der Neosporose fehlten bis vor kurzem auch zuverlässige Methoden. Der konventionelle Nachweis von *Neospora* erfolgte bisher mittels *in vitro*-Kultivierung des Parasiten aus diagnostischem Untersuchungsmaterial (z. B. fötales Hirn; Plazenta) oder indirekt durch Immunhistochemie (Cole et al., 1993). Beide Techniken zeigten relativ geringe methodische und diagnostische Sensitivitäten. Histopathologisch manifestierten sich die durch *Neospora* induzierten Läsionen bei Föten experimentell infizierter Rinder als geringe fokale Gliosen im Zentralnervensystem (Conrad et al., 1993) bis hin zu schweren Veränderungen, wie nicht-eitrig e Enzephalomyelitiden, die sich durch multifokale zelluläre Infiltrationen mit oder ohne multifokale Nekrosen charakterisieren, sowie zusätzlich durch diffuse nicht-eitrig e Leukozyteninfiltrationen der Meningen (Dubey und Lindsay, 1996).

Zur Serodiagnose der Neosporose haben sich bisher der indirekte Immunofluoreszenz-Antikörpertest (IFAT) (Trees et al., 1993; Conrad et al., 1993) und der ELISA (Björkman et al., 1994; Paré et al., 1995; Wouda et al., 1997) bewährt. Diese immundiagnostischen Verfahren ermöglichten in den meisten Fällen eine serologische

perform epidemiological investigations. Taken together, our data indicated that prenatal neosporosis may be an important cause of infectious bovine abortion in Switzerland.

**Key words:** *Neospora caninum* – neosporosis – *Toxoplasma gondii* – toxoplasmosis – abortion – bovines – PCR – ELISA

Diskriminierung zwischen Neosporose und Toxoplasmose (Dubey et al., 1996). Erste sero-epidemiologische Untersuchungen, die eine Assoziation zwischen Seroprävalenz und Inzidenz des *Neospora*-Abortes beim Rind dokumentierten, wiesen auf die Relevanz der pränatalen (vertikalen) Transmission des Parasiten hin (Thurmond et al., 1997).

Zur Identifizierung von *Neospora* in Gewebeproben wurden bisher diverse Oligonukleotidpaare beschrieben, die sich als PCR-geeignet erwiesen (Ho et al., 1996; Payne und Ellis, 1996; Kaufmann et al., 1996; Yamage et al., 1996). Durch eigene Entwicklungsarbeiten (Kaufmann et al., 1996; Yamage et al., 1996) sowie die Einführung des sogenannten UDG-Systems und eines einfach durchzuführenden PCR-Amplifikat-Detektionssystems (*DNA-Hybridization Immunoassay*, DIA) (Müller et al., 1996) wurde eine praxisreife PCR entwickelt. Diese *Neospora*-PCR wurde bezüglich ihrer diagnostischen Parameter im Labor evaluiert und hatte eine methodische Sensitivität von einem nachweisbaren Erreger pro 200 µl Untersuchungsvolumen bewiesen. Die Spezifität der PCR, geprüft mit Laborisolaten verschiedenster tierpathogener Protozoen, konnte aufgrund des Ausbleibens jeglicher Kreuzreaktionen mit 100% bezeichnet werden als Entwicklungsarbeiten (Kaufmann et al., 1996; Yamage et al., 1996; Müller et al., 1996). Ziel der vorliegenden Arbeit war es nun, die zur Verfügung stehenden diagnostischen mit klinischem Untersuchungsmaterial zu evaluieren. Strategie dieser Evaluation war einerseits die Untersuchung von Proben aus experimentellen Infektionen und von Proben aus einer an der Universität Zürich durchgeführten Abortstudie beim Rind (Thür et al., 1997; Thür et al., in press). Zu bemerken ist, dass ein Teil der vorliegenden Daten in einer spezialisierten parasitologischen Zeitschrift bereits in Englisch publiziert worden ist (Gottstein et al., 1998), deshalb wurden entsprechende Hinweise in der Arbeit eingefügt.

## Tiere, Material und Methoden

### Versuchsplan

Grundsätzlich wurden zum Nachweis von *Neospora* und/oder *Toxoplasma* in Untersuchungsproben folgende direkten und indirekten Verfahren eingesetzt: (a) *In*

*vitro*-Kultivierung, (b) histologischer Nachweis der durch die Parasiten verursachten Läsionen, (c) immunhistochemische Identifizierung von Parasitenantigenen in denselben Läsionen, (d) DNA-Nachweis mittels PCR, (e) serologischer Antikörpernachweis mittels IFAT, ELISA und Direktagglutination (DA).

(1) In einer ersten Phase wurden die diagnostischen Werkzeuge mittels experimenteller Infektionen beim trächtigen Rind auf ihre Eignung geprüft.

(2) In einer weiteren Phase wurden die diagnostischen Werkzeuge zur Prüfung von Untersuchungsmaterial eingesetzt, das im Rahmen einer separaten Abortstudie beim Rind (B. Thür, Abt. für Immunpathologie, Institut für Veterinärpathologie, Universität Zürich) anfiel und nach entsprechender Berücksichtigung der Aufarbeitungsvorschriften für die Neosporose und die Toxoplasmose nach Bern weitergeleitet worden ist. Detailliertere Angaben zu diesem Teil der Arbeit können in einer bereits erfolgten Publikation eingesehen werden (Gottstein et al., 1998).

## Parasiten

Ein *N. caninum*-Isolat (NC-1-strain) wurde uns von Dr. J.P. Dubey, USDA, Beltsville, Maryland, USA, zur Verfügung gestellt. Für *T. gondii* setzten wir den an unserem Institut gehaltenen RH-Stamm ein. Die Parasiten wurden *in vitro* auf BVDV-freien Vero-Zellen gezüchtet (Yamage et al., 1996; Hemphill et al., 1996). Alle Reagentien stammten von der Firma Gibco-BRL (Life Technology, Basel). Die Reinigung von *Neospora*-Tachyzoiten zur Antigenherstellung erfolgte über eine Sephadex G-25M-Säule gemäss Angaben der Hersteller (PD-10® columns, Pharmacia).

## Experimentelle Infektionen

Simmentaler Rinder wurden im Alter von 16–18 Monaten gekauft. Die Rinder stammten aus Betrieben ohne Fruchtbarkeitsprobleme. Die Tiere wurden am Institut für Viruskrankheiten und Immunprophylaxe (IVI) im Hochsicherheitstrakt (in einer Isolationseinheit) eingestellt und vorgängig serologisch und/oder molekularbiologisch (PCR) bezüglich folgender Infektionskrankheiten überprüft: Neosporose, Toxoplasmose, Leptospirose, Brucellose, Coxiellose, IBR, BVD. Die Rinder wurden künstlich besamt und die Trächtigkeit überprüft. Drei von vier Rindern wurden experimentell durch Verabreichung folgender Inokulate infiziert:  $5 \times 10^7$  *N. caninum*-Tachyzoiten intravenös und  $2 \times 10^7$  Tachyzoiten intramuskulär. Die Trächtigkeitstermine bei der Infektion waren die folgenden: Rind Nr. 2, Tag 121; Rind Nr. 4, Tag 125; Rind Nr. 3, Tag 150. Das Kontrollrind Nr. 1 erhielt am 126. Trächtigkeitstag dasselbe Inokulatsvolumen einer identisch aufgearbeiteten, jedoch nicht infizierten Verozell-Suspension. Nach der experimentellen Infektion wurden die Tiere täglich auf Erkrankungssym-

ptome untersucht und die Rektaltemperatur aufgezeichnet.

Blutentnahmen für serologische Untersuchungen erfolgten am Tag 0 (Präinfektionsserum) und regelmässig alle zwei Tage bis zur Sektion. Fötales Herzblut wurde ebenfalls anlässlich der Sektion entnommen. Die Seren wurden bis zu ihrer Verwendung bei  $-20^\circ\text{C}$  aufbewahrt. Alle vier Tiere wurden am Tag 32 *post infectionem* (Tp) euthanasiert, und eine vollständige Sektion an allen Rindern und Föten durchgeführt. Für die histologischen und immunhistologischen Untersuchungen wurden fötales Hirn, Herz, Plazenta, Leber, Lunge, Thymus, Milz, Niere, Dünn- und Dickdarm, Skelettmuskulatur, Mesenteriallymphknoten, Rückenmark und Augen entnommen sowie maternales Hirn, Herz und Plazenta. Pro Organ wurden jeweils mehrere Proben an verschiedenen relevanten Stellen gewonnen. Alle Proben wurden in neutral gepufferter, 4%-iger Paraformaldehydlösung für die Immunhistochemie fixiert. Für die diagnostische *in vitro*-Kultivierung sowie für die DNA-Gewinnung (PCR) wurden folgende nativen Proben (fötal und maternal) entnommen und sofort weiter verarbeitet: Hirn, Skelettmuskulatur, Herz, Blut, Abomasuminhalt (nur fötal), Amnionflüssigkeit, Plazenta.

## Untersuchungen von 83 Abortföten oder perinatal gestorbener Kälber

Analog zur Probengewinnung bei den experimentell infizierten Rindern wurden im Rahmen einer erweiterten Studie Organproben und Körperhöhlenflüssigkeit bei 83 abortierten Rinderföten oder perinatal verstorbener Kälber entnommen. Diese waren zwischen 1993–1994 im Rahmen einer an der Abteilung für Immunpathologie (Institut für Veterinärpathologie der Universität Zürich) durchgeführten Projektarbeit zur Untersuchung eingesandt worden. Am selben Institut erfolgten die konventionellen makroskopischen und histopathologischen Untersuchungen sowie die Untersuchung auf BVDV mittels Immunhistochemie (LSAB: labelled Streptavidin-Biotin). Das zusätzliche konventionelle mikrobiologische Untersuchungsspektrum schloss die bekannten abortrelevanten Bakterien, Viren und Pilze ein (siehe Thür et al., im Druck). Für die parasitologischen Untersuchungen wurden folgende Proben (jeweils an verschiedenen Organlokalisationen) gewonnen: (i) fötales Herzblut oder Flüssigkeit aus den Körperhöhlen; (ii) Hirn (10 g Material in 20ml steriler PBS-Lösung mit 200U/ml Penicillin, 200µg/ml Streptomycin und 0.5 µg/ml Amphotericin B); (iii) Herz (wie beim Hirn); (iv) Plazenta (nur in 32 Fällen); (v) Mutterseren am Tag des Abortes (nur in 12 Fällen). Die Aufbewahrung von Proben, die nicht sofort weiter untersucht wurden, erfolgte bei  $-80^\circ\text{C}$ .

Die Techniken und das Vorgehen zur Probengewinnung und Aufarbeitung waren sowohl bei den experimentell infizierten Rindern und deren Föten als auch bei den Aborten der Studie dieselben.

## Diagnostische *in vitro*-Kultivierung

Die diagnostische *in vitro*-Kultivierung von *Neospora* erfolgte aus fötalem Hirn und Herz sowie Plazenta. Methodisch wurde gemäss einem bereits in einer früheren Arbeit beschriebenen Verfahren unter Verwendung empfänglicher Verozellen vorgegangen (Gottstein et al., 1998). Die Kulturzellen wurden mikroskopisch täglich auf eventuelle Parasitenproliferation begutachtet. Erfolgte innerhalb von 21 Tagen kein Parasitenwachstum, wurden die Kulturen gemäss Conrad et al. (1993) als «negativ» bezüglich eines *Neospora*- oder *Toxoplasma*-Nachweises taxiert.

## PCR

Ein Doppel jeder diagnostischen Gewebeprobe (fötales Hirn und Herz sowie Plazenta) wurde zusätzlich für die PCR aufgearbeitet (Müller et al., 1996). Als methodische Modifikation wurde ein High-Pure-PCR-Template-Preparation-Kit (Boehringer, Mannheim) zur Reinigung der DNA eingesetzt. Die *Neospora*- und *Toxoplasma*-spezifische PCR wurde nach Müller et al. (1996) durchgeführt. Zur Erkennung falsch negativer Resultate, die durch inhibitorische Komponenten im PCR-Ansatz verursacht werden können, wurde für jede Probe eine entsprechende Inhibitionskontrolle mitgeführt (Müller et al., 1996). Falsch-positive Ergebnisse, die durch *carry-over* Kontaminationen vorangegangener PCRs entstehen können, wurden minimiert, indem das Prinzip der räumlichen Trennung von Probenaufarbeitung und Analyse der PCR-Produkte strikt eingehalten wurde. «Falsche» Reaktionsbefunde solchen Ursprungs wurden ausserdem durch zwei weitere methodische Schritte praktisch ausgeschlossen: Zur PCR wurde das artifizielle Nukleotid dUTP (2'-Deoxyuridin 5'-triphosphat) zugegeben. Dadurch waren PCR-Produkte biochemisch von natürlicher DNA verschieden. Jeder PCR-Ansatz wurde vor der zyklischen Reaktion mit dem Enzym Uracil-DNA-Glycosylase (UDG; Gibco Life Technology, Basel) inkubiert, wodurch eine eventuell auftretende *carry-over* PCR-Kontamination aufgrund ihres Gehalts an Uracil selektiv zerstört wurde. Da natürlich vorkommende DNA von der Wirkung der UDG verschont blieb und das Enzym bei den hohen Temperaturen des ersten Thermozyklus inaktiviert wurde, konnte die PCR trotz der enzymatischen Vorbehandlung ungestört ablaufen (Müller et al., 1996).

## Histologie und Immunhistochemie

Proben von den oben erwähnten, paraformaldehydfixierten Geweben wurden in Paraffin eingebettet. Paraffinschnitte von 3 bis 4 µm Dicke wurden auf poly-L-Lysin vorbeschichtete Objektträger aufgezogen und HE gefärbt oder für die Immunhistochemie verwendet. Für die Immunhistochemie wurden die Schnitte re-

hydriert und unspezifische Bindungsstellen durch 15-minütige Inkubation mit normalem Ziegen Serum bei Raumtemperatur blockiert. Es erfolgte eine 1-stündige Inkubation der Präparate bei 37 °C mit einem Protein A gereinigten anti-*Neospora* oder anti-*Toxoplasma* Kaninchenhyperimmunserum (Hemphill et al., 1996). Verschiedene Antikörperverdünnungen und Vorbehandlungen der Schnitte wurden getestet. Die besten Resultate wurden ohne Vorbehandlung und mit einer Verdünnung der primären Antikörper von 1:100 erzielt. Die Bindung des primären Antikörpers wurde mittels des LSAB Kits (DAKO Diagnostics AG, 6300 Zug) lokalisiert. Als negative Kontrollen dienten einerseits die Gewebe des nicht-infizierten Rindes und andererseits das Präimmuneserum. Vorgängige Untersuchungen hatten bereits gezeigt, dass die beiden Hyperimmunseren keine Kreuzreaktivität aufwiesen (Hemphill et al., 1996).

## Serologie

Der Nachweis von anti-*Neospora*-Antikörpern erfolgte im IFAT und ELISA, der von anti-*Toxoplasma*-Antikörpern im ELISA und DA. Der *Neospora*-IFAT erfolgte gemäss einem standardisierten Verfahren (Barr et al., 1995) mit *in vitro*-kultivierten *Neospora*-Tachyzoiten als Antigen. Als negatives und positives Kontrollserum wurden das Prä- und das Postinfektionsserum eines experimentell infizierten Rindes (siehe oben) verwendet. Die Visualisierung der primären Antikörperreaktion erfolgte mit FITC-markierten Zweitantikörper (FITC-conjugated monoclonal mouse-anti-bovine IgG antibody, 1:300; Sigma Immunochemicals). Die in Voruntersuchungen ermittelten Grenztiter betragen für fötale Proben 1:80 und für Rinderseren 1:160. Das Antigen für den *Neospora*-ELISA basierte auf einem löslichen Rohextrakt von *in vitro*-kultivierten *Neospora*-Tachyzoiten. Das Antigen wurde bei einer Proteinkonzentration von 5 µg/ml Karbonat-Puffer (pH 9.6) zur Beschichtung von MikroELISA-Platten (Greiner, Cat.-Nr. 750756) verwendet (*Neospora* SA-ELISA). Für den *Toxoplasma*-ELISA setzten wir das kommerziell erhältliche affinitätschromatographisch gereinigte P30-Antigen (SR2B, Arville, France, cat. no. TXP30B) mit 1 µg Protein/ml (*Toxoplasma*-P30-ELISA) ein. Die technischen Basisparameter für beide ELISAs wurden aus einer anderweitigen Publikation (Gottstein et al., 1997) übernommen, wobei die Test- und Kontrollseren 1:100 verdünnt wurden. Als Konjugat verwendeten wir einen mit alkalischer-Phosphatase gekoppelten Kaninchen-anti-Rind-IgG Zweitantikörper (Sigma Immunochemicals, cat. no. A 0705) bei einer Verdünnung von 1:500. Positive und negative Kontrollseren waren sowohl für den *Neospora*-SA-ELISA als auch für den *Neospora*-IFAT identisch. Dasselbe negative Kontrollserum wurde für den *Toxoplasma*-P30-ELISA und den *Toxo-Screen*-DA verwendet. Der *Toxo-Screen*-DA (BioMérieux) wurde nach dem vom United-States-Department-of-Agriculture (USDA) beschriebenen Verfahren durchgeführt (Dubey et al., 1996). Das *Toxoplasma*

-seropositive Kontrollserum wurde uns von Dr. David Buxton (Moredun Research Institute, Edinburgh) zur Verfügung gestellt. Zur Bestimmung des ELISA-Grenzwertes, der zur Unterscheidung zwischen «Seropositivität» und «Seronegativität» diente, wurden 50 Seren von Rindern geprüft, bei denen anamnestisch, d. h. infolge der genauen Dokumentation ihrer Herkunft und ihrer Aufzucht, keine Hinweise für eine Infektion mit den beiden Parasiten bestand und bei denen bisher kein Abort aufgetreten war. Die Seren der Tiere waren ebenfalls im *Neospora*-IFAT und im *Toxo-Screen-DA* seronegativ. Der jeweilige ELISA-Grenzwert wurde durch den Mittelwert plus 3 SD der A404nm-Werte der 50 Seren errechnet. Die Reproduzierbarkeit der ELISA-Resultate bezüglich der verschiedenen Testansätze wurde durch das dreifache Mitführen eines zusätzlichen Infektions-Kontrollserums, das eine geringe Antikörperkonzentration aufwies, geprüft. Es wurde eine Testvariabilität von +/-10% toleriert.

## Resultate

### Experimentelle Infektionen

Während der ersten 14 Tage p. i. zeigte das experimentell infizierte Rind Nr. 3 eine intermittierende Temperaturerhöhung (maximal 41 °C). Die drei anderen Tiere (2 Infizierte und 1 Kontrolltier) zeigten zu keinem Zeitpunkt p. i. klinische Symptome. Bei der Sektion der Rinder liessen sich bei den Muttertieren keine pathologischen Veränderungen an den Organen, inklusive Plazenta, nachweisen. Bei den Föten zeigte ausschliesslich der Fötus Nr. 4 (siehe Tabelle 1) eine deutlich vergrösserte Milz (15 cm × 4,5 cm; gleichaltriger Kontrollfötus Nr. 1: 9 cm × 3 cm).

### Diagnostische *in vitro*-Kultivierung

(i) *Neospora*-Erreger liessen sich aus keiner der Proben isolieren, die aus den experimentellen Infektionen für die *in vitro*-Kultivierung gewonnen wurden.

(ii) Von den insgesamt 83 Abortfällen konnte bei 27 Föten und 5 dazugehörigen Plazenten eine *in vitro*-Kultivierung durchgeführt werden. Bei den restlichen 56 Fällen konnte die Kultivierung aufgrund eines ungeeigneten biologischen Zustandes der Proben (Kontaminationen mit Bakterien und/oder Pilzen; zu kleine Probenvolumen; fortgeschrittene Autolyse) technisch nicht durchgeführt werden. Aus diesen 27 untersuchten Föten liessen sich in keinem Fall *Neospora* oder *Toxoplasma* kultivieren. Von den 27 dazugehörigen PCR-Proben waren 12 positiv in der *Neospora*-PCR (Fälle Nr. 3–6 und 7–14, siehe Tabelle 2). Beim Plazentamaterial (32 Plazenten) gelang die Parasitenisolierung ebenfalls nicht, obwohl einige der Proben in der *Neospora*-PCR positiv waren (Fälle Nr. 2, 4, 8, 10, 25).

### *Neospora*- und *Toxoplasma*-PCR sowie Histologie und Immunhistochemie

(i) Eine Zusammenfassung der Resultate der *Neospora*-PCR bei experimentellen Infektionen (einschliesslich Kontrolltier Nr. 1) findet sich in Tabelle 1: Beim nicht-infizierten Kontrolltier (Rind und Fötus Nr. 1) waren sämtliche PCRs negativ, ebenso bei allen Proben (ausschliesslich der Plazenten) der Muttertiere Nr. 2, 3 und 4. *Neospora*-DNA liess sich mittels PCR beim Fötus Nr. 3 im Gehirn, in der Abomasumflüssigkeit sowie beim Fötus Nr. 4 in der Abomasum- und der Amnionflüssigkeit nachweisen, ebenso in der Plazenta des Muttertieres Nr. 4. Die histopathologischen und immunhistochemischen Ergebnisse sowie gegebenenfalls diejenigen der dazugehörigen PCR sind ebenfalls in Tabelle 1 zusammengefasst. Mikroskopisch nachweisbare Veränderungen zeigten sich ausschliesslich bei den beiden Föten Nr. 3 und 4. Bei diesen beiden Tieren konnten sowohl in der Plazenta als auch in diversen Organen multiple kleine Nekroseherde ohne oder nur mit geringgradiger entzündlicher Reaktion nachgewiesen werden. Bei Fötus 3 waren die Gehirnveränderungen deutlicher ausgeprägt: Multiple kleine Nekroseherde fanden sich im zerebralen Kortex, in den Basalganglien, dem Hippocampus, dem Mittelhirn und dem Rückenmark. Bei Fötus 4 beschränkten sich die Gehirnveränderungen auf geringgradige perivaskuläre lymphozytäre Infiltrationen in Hirnstamm und Kleinhirn. Gleichartige Veränderungen wurden auch in weiteren Organen gefunden, bei Fötus 3 in der Lunge und bei Fötus 4 in Myokard und Leber. Mittels Immunhistochemie konnten lediglich einige wenige verstreut liegende *Neospora*-Tachyzoiten, teils am Rande der Nekroseherde, teils im anschliessenden erhaltenen Gewebe identifiziert werden.

(ii) Die Untersuchung von 83 Hirnproben aus natürlich abortierten Föten oder perinatal gestorbener Kälber mittels PCR ergab folgende Resultate: *Neospora*-DNA liess sich in 24 (29%) Proben und *Toxoplasma*-DNA in 4 (5%) der Proben nachweisen (Tabelle 2). Eine Probe (Fall Nr. 24) war in der PCR gleichzeitig für *Neospora* und für *Toxoplasma* positiv. Eine histopathologische Untersuchung bei den 24 *Neospora*-PCR-positiven Föten/Kälber ergab bei 18 Proben ein pathologisches Bild, das für eine Neosporose sprechen könnte: Bei sieben Fällen liessen sich im Hirn eine multifokale nekrotisierende Enzephalitis nachweisen, zwei Fälle zeigten eine Hypoplasie des Kleinhirns, ein Fall einen *Hydrocephalus internus* und fünf Fälle eine multifokale nekrotisierende Plazentitis oder multiple Verkalkungen in der Plazenta. In den meisten der 24 *Neospora*-PCR-positiven Fälle liessen sich keine anderen Infektionserreger nachweisen, mit Ausnahme von zwei fötalen BVDV-Fällen und einem Fall mit einem *Streptococcus*-Nachweis in der Plazenta. Bei allen drei *Toxoplasma*-PCR-positiven (jedoch *Neospora*-PCR-negativen) Fällen hatten vorgängige histopathologische Untersuchungen bereits einen Verdacht auf das Vorliegen einer protozoären Infektion geliefert (siehe Tabelle 2). Der einzige Fall mit doppel-positiven Ergebnis

Tabelle 1: Resultate der histopathologischen und immunhistochemischen sowie molekularbiologischen Untersuchungen trächtiger Rinder und ihrer Föten nach 32 Tagen einer experimentellen *Neospora-caninum*-Infektion.

	Hirn		Abomasum-Fl.		Herz		Leber		Lunge		Med. Lymphkn.		Plazenta		Amnionfl.			
	HE	IHC PCR	HE	IHC PCR	HE	IHC PCR	HE	IHC PCR	HE	IHC PCR	HE	IHC PCR	HE	IHC PCR	HE	IHC PCR		
Fötus 1*	-	nd	-	nd	nd	-	-	nd	-	nd	nd	-	nd	nd	-	nd	nd	-
Fötus 2	-	nd	-	nd	nd	-	-	nd	-	nd	nd	-	nd	nd	-	nd	nd	-
Fötus 3	+	+	+	nd	nd	+	-	-	-	nd	nd	+	-	nd	+	+	-	nd
Fötus 4	+	-	-	nd	nd	+	+	+	+	+	nd	-	-	nd	+	+	+	nd

\* Kontrolltier; Inokulation von *Neospora*-freiem Kontrollmedium

HE: Histopathologische Untersuchung, H&amp;E-Färbung; Nachweis vorwiegend von multifokalen Nekroseherden, ohne direkten Erregernachweis.

IHC: Immunohistochemischer Nachweis von vereinzelt *Neospora*-Tachyzoiten mittels *N. caninum*-spezifischem Antiserum.

nd: Untersuchung nicht durchgeführt.

Tabelle 2: (übernommen aus der englischen Version von Gottstein et al., 1998): Mittels PCR wurde genomische DNA, isoliert aus dem Hirn von 83 aborbierten Rinderföten, auf die Nachweisbarkeit von *Neospora*- und *Toxoplasma*-DNA geprüft. Parallel dazu erfolgte der serologische Nachweis von anti-*Neospora* (akkumulierte IFAT und/oder SA-ELISA-Seropositivität) oder anti-*Toxoplasma* (akkumulierte P30-ELISA- und/oder DA-Seropositivität) Antikörpern in fötalen Körperflüssigkeiten. Die (histo-) pathologischen Untersuchungen erfolgten mittels den an tierpathologischen Instituten üblichen Routineverfahren.

Nr. der Föten	<i>Neospora</i> -Serologie	<i>Neospora</i> -PCR	<i>Toxoplasma</i> -Serologie	<i>Toxoplasma</i> -PCR	Alter (Monate)	(Histo-)Pathologie (Makro- und mikroskopische Kriterien in Stichworten)
1	POS	POS	neg	neg	8	Nekroseherde im Hirn; <i>eldO</i>
2	POS	POS	neg	neg	8	plazentäre Hyperämie; Konjunktivitis; <i>afL</i>
3	POS	POS	neg	neg	9	Konjunktivitis, Pneumonie
4	POS	POS	neg	neg	7	Verkalkte, nekrotische Läsionen in der Plazenta; <i>afL</i> ; <i>eldO</i>
5	POS	POS	neg	neg	6	Hyperplasie des Zerebellums; [BVDV+]
6	POS	POS	neg	neg	+1*	<i>Hydrocephalus internus</i> ; Hämorrhagien in der Niere
7	neg	POS	neg	neg	5	Nekrotische Hirnläsionen; Enzephalitis; Pneumonie
8	neg	POS	neg	neg	7	<i>ksP</i>
9	neg	POS	neg	neg	7	<i>ksP</i>
10	neg	POS	neg	neg	6	<i>ksP</i>
11	neg	POS	neg	neg	8	Granulozytostase im Hirn; Pneumonie
12	neg	POS	neg	neg	+1*	Enteritis mit nekr. Läsionen in den Peyer'schen Platten; [BVDV+]
13	neg	POS	neg	neg	5	<i>ksP</i>
14	neg	POS	neg	neg	5	<i>eldO</i> ; nekrotische Läsionen im Zerebellum; Meningitis
15	neg	POS	neg	neg	6	Nekrotische Läsionen im Hirn; Konjunktivitis [Streptococcus]
16	neg	POS	neg	neg	5	Verkalkungen in der Plazenta
17	neg	POS	neg	neg	5	Nekrotische Läsionen in Hirn und Plazenta, Epikarditis; <i>eldO</i>
18	neg	POS	neg	neg	6	Nekrotische Läsionen und Verkalkungen im Hirn
19	neg	POS	neg	neg	6	Hyperplasie des Zerebellums, Konjunktivitis
20	neg	POS	neg	neg	6	Hämorrhagien im Zerebellum
21	neg	POS	neg	neg	7	<i>ksP</i>
22	neg	POS	neg	neg	6	Hämorrhagien im Zerebellum
23	neg	POS	neg	neg	7	<i>ksP</i>
24	neg	POS	neg	POS	7	Hämorrhagien im Herz; Verkalkungen in der Plazenta [Pilze]
25	neg	neg	neg	POS	7	<i>afL</i> ; <i>eldO</i> ; Nekrotische Läsionen in Hirn, Leber; Plazentitis
26	neg	neg	neg	POS	9	<i>eldO</i> ; Konjunktivitis, Verkalkungen in der Plazenta
27	neg	neg	neg	POS	7	Konjunktivitis, [Aeromonas hydrophila]
28	POS	neg	POS	neg	+3*	Hämorrhagien in der Niere, Enteritis, Abomasitis [Rotavirus]
29	neg	neg	POS	neg	11	<i>Atresia ani</i> und Missbildungen im Urogenitaltrakt
30-83	neg	neg	neg	neg	[8]**	siehe entsprechenden Text unter «Resultate»

\* Bei +1 und +3 handelte es sich um lebensschwache Kälber, die 1 oder 3 Tage nach der Geburt verstarben;

\*\* Für die 54 Fälle, die in sämtlichen *Neospora*- und *Toxoplasma*-Tests negativ waren, betrug das mittlere Alter 8,1 Monate.*eldO*: entzündliche Infiltrate in diversen Organen; *afL*: aktiviertes foetales Lymphsystem; *ksP*: keine spezifische Pathologie;

[: zusätzlich identifizierte pathogene Erreger

sen in der *Neospora*- und *Toxoplasma*-PCR zeigte ebenfalls massive multifokale Verkalkungen in der Plazenta, jedoch keine weiteren typischen Veränderungen bei den anderen Organen.

Bei den 56 Fällen, welche sowohl in der *Neospora*- als auch in der *Toxoplasma*-PCR negativ waren, liessen sich histopathologische Veränderungen, welche auf eine Neosporose hätten hinweisen können, seltener nachweisen: Zerebrale Veränderungen liessen sich bei 12 von 56 (21%) dieser Fälle (gegenüber 29 = 52% bei *Neospo-*

*ra*-positiven Föten) nachweisen. Der Nachweis anderer Infektionserreger war häufiger bei den 56 Kontrollfällen: Sieben virale Infekte (4 BVD- und 3 Rota/Corona-Virus-positive Fälle); 9 bakterielle Infekte (Gattungen *Mycoplasma*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* und *Pasteurella*); des weiteren 16 Fälle mit anderen, für eine potentielle Neosporose irrelevanten Veränderungen.

Das mittlere Alter der *Neospora*-PCR-positiven Föten betrug 6.8 Monate (95% Konfidenzintervall: 6.1-7.5), wobei 18 von 24 Fällen (75%) zwischen 4 und 7 Monate alt

waren. Bei den *Neospora*- und *Toxoplasma*-PCR negativen Föten betrug das mittlere Alter 8.1 Monate (95% Konfidenzintervall: 7.5–8.8), 20 von 56 Föten (36%) waren zwischen 4 und 7 Monate alt.

Bei acht *Neospora*-PCR-positiven Föten (zugleich negativ in der *Toxoplasma*-PCR) konnte gleichzeitig auch die dazugehörige Plazenta mittels PCR untersucht werden: 7 Plazenten waren *Neospora*-PCR-negativ, eine Plazenta war *Neospora*-PCR-positiv.

Da wir bereits in Voruntersuchungen (Gottstein et al., 1998) festgestellt hatten, dass mit der Immunhistochemie ein zuverlässiger Parasitennachweis in Organmaterial abotierter Föten nicht gewährleistet ist, wurde diese sehr zeitaufwendige Untersuchungsmethode in diesem Teil der Studie nicht mehr zu Ende geführt.

### **Neospora- und Toxoplasma-Serologie**

(i) Im Rahmen der experimentellen *Neospora*-Infektionen serokonvertierten 2 von 3 infizierten Rindern (Nr. 3 und 4) im IFAT 10, resp. 17 Tage nach Infektion. Der maximale Titer der Kuh Nr. 3 betrug 1:640 am 29., derjenige der Kuh Nr. 4 1:320 am 19. Tag nach Infektion. Die im ELISA gemessenen Antikörperkonzentrationen blieben bei beiden Kühen (Nr. 3 und Nr. 4) sehr niedrig, ein positives Resultat wurde nur bei der Kuh Nr. 3 und erst ab dem 25. Tag nach Infektion ersichtlich. Dieselben Tiere blieben in allen *Toxoplasma*-Serologien negativ. Fötale Antikörper liessen sich weder gegen *Neospora*-Antigene noch gegen *Toxoplasma*-Antigene nachweisen.

(ii) Fötale Herzblut oder Körperhöhlenflüssigkeit konnte bei allen 83 abortierten Föten bzw. perinatal gestorbener Kälber (präkolossal) serologisch untersucht werden, die Ergebnisse sind in Tabelle 2 dargestellt. Bei der *Neospora*-Serologie von PCR-positiven Föten waren von 7 IFAT-positiven Föten deren 4 positiv im SA-ELISA (Fälle Nr. 4, 5, 6, 28). Ein Fall (Nr. 28) war doppel-positiv sowohl in der *Neospora*- als auch in der *Toxoplasma*-Serologie, jedoch negativ in beiden dazugehörenden PCR. Die *Toxoplasma*-Serologie ergab zwei positive Tiere im *Toxo-Screen-DA*-Test. Einer dieser beiden Tiere war ebenfalls positiv im P30-ELISA. Beide *Toxoplasma*-seropositive Tiere waren in beiden PCR negativ.

Die serologische Untersuchung der 56 PCR-negativen Fälle ergab zwei positive *Toxoplasma*-Serologien. In beiden Fällen konnten jedoch keine histopathologischen Hinweise auf protozoäre Erkrankungen nachgewiesen werden.

In fünf Fällen war es möglich, Seren von Muttertieren zu erhalten, deren Föten ein positives *Neospora*-PCR-Resultat aufwiesen. In einem Fall waren sowohl das Mutterserum als auch die Körperhöhlenflüssigkeit seropositiv (SA-ELISA und IFAT). Bei den restlichen vier Fällen waren alle Mutterseren *Neospora*-seropositiv (SA-ELISA und IFAT), die Föten hingegen negativ.

## **Diskussion**

Die vorliegende Studie hatte zum Ziel, diagnostische Techniken zum Nachweis von *N. caninum* beim Rind zu evaluieren und einige Grunddaten zur Bedeutung der Neosporose im Rahmen von bovinem Abortgeschehen zu erfassen. Zur Evaluation der diagnostischen Techniken setzten wir diagnostische Proben ein, die aus zwei verschiedenen Zielgruppen zu untersuchender Tiere stammten: Einerseits trächtige Rinder mit einer experimentellen und somit ätiologisch abgesicherten *Neospora*-Infektion, andererseits Abortfälle beim Rind aus einer separaten Abortstudie, wobei zu bemerken ist, dass einige der hier präsentierten Daten bereits in zwei früheren Arbeiten publiziert worden sind (Thür et al., in press; Gottstein et al., 1998). Um in der vorliegenden Arbeit eine abgerundete Übersicht über die Problematik der Neosporose und deren Labordiagnose präsentieren zu können, wurden einige dieser früheren Daten wieder mitaufgeführt.

Die Auswertung unserer Daten zeigte, dass die *Neospora*-spezifische PCR den genomischen Parasitennachweis im geschädigten Hirn abortierter Föten zuverlässig ermöglicht, und dass bei PCR-positiven Tieren i.d.R. auch entsprechende Veränderungen bei der histopathologischen Untersuchung nachgewiesen werden können. Der Kausalzusammenhang zwischen Neosporose und Abortgeschehen konnte durch die Tatsache erhärtet werden, dass andere Infektionserreger seltener auftraten (17%), im Gegensatz zu *Neospora*-negativen Aborten, bei denen in 27% der Fälle andere bakterielle oder virale Erreger nachgewiesen werden konnten. Die Häufigkeit des *Neospora*-DNA-Nachweises bei abortierten Föten betrug 29%, was gegenüber der Nachweishäufigkeit anderer Infektionskeime eine unerwartet hohe Rate darstellt. Daten aus früheren schweizerischen Abortstudien hatten bisher noch nie derart hohe Häufigkeiten für einen bestimmten Erreger gezeigt, diese Studien hatten *Neospora* nicht mitberücksichtigt (Hässig et al., 1995; Thür et al., 1997; Thür et al., in press).

Die *Toxoplasma*-PCR wurde primär zur Abklärung potentieller Kreuzreaktionen mit lokalen *Neospora*-Isolaten durchgeführt. Nicht erwartet haben wir den alleinigen Nachweis von *T. gondii* im Hirn abortierter Föten, mit histopathologische Befunden, die mit einer protozoären zerebralen Infektion kompatibel waren. Häufig wurde bisher in Lehrbüchern und in der Spezialliteratur darauf hingewiesen, dass *T. gondii* beim Rind infektiologisch keine grosse Rolle zu spielen scheint (Literatur in Soulsby, 1982; Gottstein, 1995), obwohl an wenigen Stellen bereits einige Hinweise über gegensätzliche Meinungen zu finden sind (s. Rommel, Bürger und Kutzer (1992): Parasitosen der Wiederkäuer. In: Eckert et al., 1992; Dubey und Beattie, 1988). Demzufolge wird eine zukünftige genauere Untersuchung der potentiellen Toxoplasmose-Problematik beim Rind notwendig sein. Der Erregernachweis durch *in vitro*-Kultivierung aus Abortmaterial erwies sich als methodisch ungeeignet, da das Abortmaterial zu häufig mikrobiell kontaminiert war.



Immunhistologische Untersuchungen wiesen ebenfalls eine ungenügende diagnostische Sensitivität auf. Über ähnliche Erfahrungen haben bereits andere Autoren berichtet (Dubey und Lindsay, 1996; Conrad et al., 1993). Über den Stellenwert der Serologie (IFAT, ELISA) ist aufgrund der vorliegenden Studie grundsätzlich noch keine klare Aussage möglich. Nur bei 25% der *Neospora*-PCR positiven Föten liessen sich anti-*Neospora*-Antikörper nachweisen. In früheren Studien wurde bereits gezeigt, dass die Seroprävalenz bei Föten mit zunehmendem Alter der Föten zunimmt (Barr et al., 1995). In den fünf Fällen, bei denen wir Mütter von *Neospora*-PCR-positiven Föten serologisch untersuchen konnten, fanden wir bei allen Mütterseren eine positive *Neospora*-Serologie, wohingegen nur einer von fünf Föten seropositiv war. Diese allerdings noch sehr präliminären Daten weisen darauf hin, dass eine serologische Untersuchung auf Neosporose bei Föten nicht sinnvoll erscheint, dass hingegen eine serologische Untersuchung bei Muttertieren Hinweise auf ein potentielles, eventuell erst zukünftiges *Neospora*-Abortgeschehen liefern könnte. Wir werden im Rahmen einer neuen Neosporose-Studie dieser Frage nachgehen.

Das mittlere Alter der *Neospora*-PCR-positiven Föten (6.8 Monate) war signifikant niedriger als bei PCR-negativen Föten (8.1 Monate). Bei 75% der *Neospora*-PCR-positiven Fälle erfolgte der Abort zwischen dem 4. und dem 7. Trächtigkeitstmonat. In dieselbe Trächtigkeitsperiode fielen nur 37% der PCR-negativen Abortfälle. Andere Autoren haben bereits darüber berichtet, dass der *Neospora*-induzierte Abort am häufigsten im mittleren Trimester nachgewiesen werden kann (Dubey und Lindsay, 1996; Thurmond et al., 1997). Man kann davon ausgehen, dass fötale Infektionen, die zu einem späten Zeitpunkt der Trächtigkeit erfolgen, nicht zum Abort, sondern zur Geburt lebensschwacher Kälber oder, noch häufiger, zur Geburt klinisch gesunder, jedoch «latent» mit *Neospora* infizierter Kälber führt. Letztere gelten höchstwahrscheinlich als Hauptursache für die weitere Verbreitung des Parasiten, indem sie selber später zu denjenigen Mutterkühen werden, bei denen eine diaplastäre Passage des Parasiten auf den nächsten Föten stattfinden kann.

Die parallele Untersuchung von Plazenta und Fötus ergab keine Fälle, bei denen eine Plazenta *Neospora*-PCR-positiv, der Nachweis im Fötus jedoch PCR-negativ ausfiel. Umgekehrt waren sieben Föten *Neospora*-PCR-positiv und die entsprechende Plazenta PCR-negativ, und nur in einem Fall war *Neospora*-DNA sowohl in der Plazenta als auch im Fötus nachweisbar. Wir folgern daraus, dass die alleinige Untersuchung von Föten für die Diagnose einer kongenitalen Neosporose ausreicht.

Zur Untermauerung der Testparameter unserer diagnostischen Werkzeuge wurden diese anhand von Material überprüft, das aus experimentellen Infektionen von trächtigen Rindern stammte. Bei 2 von 3 infizierten Rindern konnte der parasitologische Nachweis einer diaplastären Passage des Parasiten sowie seine anschließende Vermehrung im Föten nachgewiesen werden, einschliesslich der dadurch induzierten Schädigung di-

verser fötaler Gewebe. Ein Abort trat bei keinem dieser beiden Fälle auf, was jedoch wegen der relativ kurzen Zeitspanne zwischen Infektionsdatum und Euthanasie nicht zu erwarten war. Bei einem Rind liess sich nach Infektion keine mütterliche Serokonversion feststellen und der Parasit im Föten nicht nachweisen, ebensowenig wie etwelche pathologischen Veränderungen. Schlussfolgernd können wir davon ausgehen, dass bei zwei experimentell infizierten Rindern sich eine Infektion, im Anschluss an die Inokulation der Parasiten, erfolgreich etablierte, bei einem Rind schien die Infektion gar nicht angegangen zu sein.

Die diagnostischen Leistungen der verschiedenen Untersuchungstechniken fielen auch bei den experimentellen Infektionen ähnlich aus, wie bei der Untersuchung von natürlich erfolgten Aborten. Eine *in vitro*-Kultivierung des Parasiten gelang aus keinem der maternalen oder fötalen Gewebe. Infolge der zwischen dem 120. und dem 150. Trächtigkeitstag durchgeführten experimentellen Infektionen erfolgte keine *Neospora*-spezifische Serokonversion bei den Föten, hingegen serokonvertierten beide Muttertiere, bei denen später auch Parasiten im Föten nachgewiesen werden konnten. Bei diesen beiden Föten konnte *Neospora*-DNA mittels PCR nicht nur in verschiedenen Geweben, sondern zusätzlich auch in der Abomasalflüssigkeit sowie in der Amnionflüssigkeit nachgewiesen werden. Die Untersuchung von Amnionflüssigkeit hat sich insbesondere auch im Rahmen von diagnostischen Abklärungen bei der pränatalen Toxoplasmose des Menschen bewährt und ist in diesem Problemkreis zu einem wichtigen diagnostischen Prozess geworden.

Bei natürlich infizierten Föten wurden parasiten-induzierte Läsionen vorwiegend im ZNS, in der Skelettmuskulatur sowie in der Leber nachgewiesen (Barr et al., 1995; Anderson et al., 1991; Wouda et al., 1997). Histopathologische Veränderungen bei unseren experimentell infizierten Föten betrafen primär Hirn, Herz, Lungen und Lymphknoten. Typisch waren die kleinen multifokalen Nekrosen im fötalen Herz und in der Plazenta, die bereits erste Hinweise auf eine protozoäre Infektion zu liefern vermögen, die jedoch gleichzeitig auch nach einer weiterführenden ätiologischen Abklärung z. B. mittels Immunhistochemie oder PCR verlangen.

Beide Techniken haben bezüglich der experimentellen Infektionen ungefähr dieselbe diagnostische Effizienz bewiesen. Allerdings schnitt die Immunhistochemie bei den an die Pathologie eingesandten *Neospora*-Aborten wesentlich schlechter ab. Gründe dafür liegen hauptsächlich beim schlechten Zustand dieser Abortproben, die z. T. wegen des Zerfalls der Gewebe kaum mehr den immunhistochemischen Antigennachweis erlaubten, jedoch noch Parasiten-DNA mittels PCR amplifizieren liessen. Auch bei den experimentell infizierten Föten waren immunhistochemisch ausschliesslich einzelne *Neospora*-Tachyzoiten sichtbar. Das Fehlen von typischeren Strukturen wie Gewebezysten oder endotheliale Pseudozysten erschwerte die eindeutige ätiologische Identifikation der Parasiten erheblich. Bei den

nachgewiesenen Infektionsstadien (Tachyzoiten) sind grundsätzlich noch keine Gewebezysten mit Bradyzoiten gebildet worden, was auch die Schwierigkeit erklärt, Parasiten diagnostisch *in vitro* anzuzüchten. Frühestens nach Geburt der infizierten Jungtiere bilden sich im ZNS die dickwandigen Gewebezysten, welche sich über eine künstliche Verdauung relativ leicht und unversehrt isolieren lassen. Erst nach diesem Prozess können freigesetzte Bradyzoiten *in vitro* zur Infektion von Wirtszellen erfolgreich eingesetzt werden.

Zusammengefasst kann aufgrund der Resultate dieser Studie gefolgert werden, dass uns mit der *Neospora*-PCR eine zuverlässige Methode zur Diagnose einer Neosporose beim abortierten Rinderföten resp. perinatal gestorbener Kälber zur Verfügung steht. Die *Neospora*-PCR erlaubt auch eine eindeutige Abgrenzung zur Toxoplasmose. Für weiterführende wissenschaftliche Untersuchungen erlauben immunhistochemische Verfahren ebenfalls art-spezifische Aussagen. Wünschenswert wären effiziente Methoden zur *in-vitro*- (eventuell *in vivo*-) Isolierung von *Neospora* aus infizierten Föten, dies im Hinblick auf eine zukünftige biologische Charakterisierung der gewonnenen Isolate. Die *Neospora*-Serologie ist bei der Untersuchung von Föten nicht angebracht, könnte jedoch eine Rolle bei der postnatalen Abklärung spielen, ob gesund geborene Kälber seropositiver Mütter potentielle *Neospora*-Träger geworden sind (und somit der Gefahr ausgesetzt sind, selber *Neospora*-Aborte zu erleiden), oder ob aufgrund einer hohen Seroprävalenz in Problembeständen Aborte mittels PCR spezifischer auf *Neospora* untersucht werden sollten. Zu erarbeiten bleiben noch detailliertere epidemiologische Grundlagen, die die Entwicklung einer eventuellen Bekämpfungsstrategie erlauben würden.

### Examens diagnostiques moléculaires et immunologiques de la néosporose bovine en Suisse

Les dommages causés par des coccidies formant des kystes chez les ruminants sont en premier lieu des avortements, des pertes de jeunes animaux ainsi que des lésions musculaires. Seulement depuis peu de temps, il est reconnu que *Neospora caninum* est un agent d'origine protozoaire provocateur de l'avortement chez les bovins. Le but de l'étude présente était de documenter les paramètres diagnostiques de plusieurs méthodes de laboratoire (culture *in vitro*; histologie; immunohistochemie; sérologie, PCR) qui sont à disposition pour la détection directe ou indirecte du parasite. Chez 24 (29%) des 83 fœtus avortés, la détection de DNA de *Neospora* a été effectuée par PCR dans le cerveau fœtal, qui était en même temps fréquemment caractérisé par des encéphalites multifocales mineures. Les méthodes diagnostiques ont

été testées chez des génisses portantes après une infection avec *Neospora caninum*. Le passage à travers le placenta et dans le fœtus des parasites a eu lieu chez deux parmi trois génisses. Chez ces deux fœtus, le DNA des parasites a été détecté dans les organes ainsi que dans la caillette et le liquide amniotique. Les génisses infectées expérimentalement ont fait une conversion sérologique entre 10 et 17 jours après l'infection, alors que dans le fœtus correspondant aucun anticorps contre *Neospora* n'a pu être détecté. Sur la base des résultats présents, il est permis de conclure que, dans les conditions de la pratique, le PCR est le moyen le plus indiqué pour le diagnostic d'un avortement par *Neospora*. Le PCR, complété par un examen sérologique, peut aussi être employé pour des études épidémiologiques. Sur la base de ces données, il semble que *Neospora* soit une cause importante d'avortement chez les bovins en Suisse.

### Analisi molecolare ed immunodiagnostica per la neosporosi bovina in Svizzera

In danni provocati da coccidi formati delle spore nei ruminanti, concernono primariamente gli aborti, le perdite di animali giovani e danni muscolari. È risaputo solo da poco tempo, che il protozoo *Neospora caninum* può fungere da agente abortivo nella mucca. Lo scopo dello studio era di documentare i parametri diagnostici di diversi metodi di laboratorio (coltivazione *in vitro*; istologia; immunoistochimica; serologia; PCR) usati per l'accertamento diretto ed indiretto del parassita. In 24 (29%) su 83 feti abortiti si poteva diagnosticare, tramite PCR, DNA di *Neospora* in cervello fetale, che mostrava contemporaneamente segni di leggere encefaliti multifocali e necrotizzanti. I mezzi diagnostici di laboratorio a disposizione vennero inoltre provati in manze gravide, sperimentalmente infettate con *N. caninum*. La trasmissione placentare del parassita sul feto si verificò in due su tre casi. In questi feti si poteva riscontrare DNA del parassita in diversi organi e nel liquido abomasale e amniotico. Negli animali infettati sperimentalmente venne accertata una seroconversione fra il 10. ed il 17. giorno dopo l'infezione, mentre che nei relativi feti non era possibile riscontrare anticorpi contro *Neospora*. I risultati di quest'indagine lasciano concludere, che a livello pratico, il metodo PCR è il migliore per la diagnosi di aborto da *Neospora*. Il metodo PCR, supportato da analisi serologiche, può essere utilizzato per indagini epidemiologiche. In base ai dati presentati, l'infezione da *Neospora* pare essere una causa rilevante di aborti nella mucca in Svizzera.

## Dank

Die Arbeiten wurden finanziell durch das «Bundesamt für Veterinärwesen» (Projekt Nr. 012.4.93.4) und durch das «Bundesamt für Bildung und Wissenschaft» (COST-820 Projekt Nr. BBW C96.0068) unterstützt.

## Literatur

Anderson M.L., Blanchard P.C., Barr B.C., Dubey J.P., Hoffman R.L., Conrad P.A. (1991): Neospora-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. *JAVMA* 198, 241–244.

Barr B.C., Anderson M.L., Sverlow K.W., Conrad P.A. (1995): Diagnosis of bovine fetal Neospora infection with an indirect fluorescent antibody test. *Vet. Rec.* 137, 611–613.

Björkman C., Liunden A., Holmdahl J., Barber J., Trees A.J., Uggla A. (1994): Neospora caninum in dogs: detection of antibodies by ELISA using an iscom antigen. *Parasite Immunol.* 16, 643–648.

Cole R.A., Lindsay D.S., Dubey J.P., Blagburn B.L. (1993): Detection of Neospora caninum in tissue sections using a murine monoclonal antibody. *J. Vet. Diagn. Invest.* 5, 579–584.

Conrad P.A., Barr B.C., Sverlow K.W., Anderson M., Daft B., Kinde H., Dubey J.P., Munson L., Ardans A. (1993): In vitro isolation and characterization of a Neospora sp. from aborted bovine fetuses. *Parasitol.* 106, 239–249.

Conrad P.A., Sverlow K., Anderson M., Rowe J., BonDurant R., Tuter G., Breitmeyer R., Palmer C., Thurmond M., Ardans A., Dubey J.P., Dubamel G., Barr B. (1993): Detection of serum antibody responses in cattle with natural or experimental Neospora infections. *J. Vet. Diagn. Invest.* 5, 572–578.

Dubey J.P., Beattie C.P. (1988): Toxoplasmosis of animal and man. 1988; CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, p. 220.

Dubey J.P., Lindsay D.S. (1993): Neosporosis. *Parasitol. Today* 9, 452–458.

Dubey J.P., Lindsay D.S. (1996): A review of Neospora caninum and neosporosis. *Vet. Parasitol.* 9, 452–458.

Dubey J.P., Carpenter J.L., Speer C.A., Topper M.J., Uggla A. (1988): Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 192, 1269–1285.

Dubey J.P., Lindsay D.S., Adams D.S., Gay J.M., Baszler T.V., Blagburn B.L., Thulliez P. (1996): Serologic responses of cattle and other animals infected with Neospora caninum. *Am. J. Vet. Res.* 57, 329–336.

Gottstein B. (1995): Zystenbildende Kokzidien: Toxoplasma, Neospora, Sarcocystis. *Schweiz. Med. Wschr.* 125, 890–898.

Gottstein B., Pozio E., Connolly B., Gamble H.R., Eckert J., Jakob H.P. (1997): Epidemiological investigation of trichinellosis in Switzerland. *Vet. Parasitol.* 72, 201–207.

Gottstein B., Hentrich B., Wyss R., Thür B., Busato A., Stärk K.D.C., Müller N. (1998): Molecular and immunodiagnostic investigations on bovine neosporosis in Switzerland. *Int. J. Parasitol.* 28, 679–691.

Hässig M., Waldvogel A., Corboz L., Strickler L., Zanoni R., Weiss M., Regi G., Peterhans E., Zerobin K., Rüschi P. (1995): Untersuchungen in Betrieben mit gehäuftem Verwerfen beim Rind. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 137, 445–453.

Hemphill A., Gottstein B., Kaufmann H. (1996): Adhesion and invasion of bovine endothelial cells by Neospora caninum. *Parasitol.* 112, 183–197.

Ho M.S., Barr B.C., Marsb A.E., Anderson M.L., Rowe J.D., Tarantal A.F., Hendrickx A.G., Sverlow K., Dubey J.P., Conrad P.A. (1996): Identification of bovine Neospora parasites by PCR amplification and specific small-subunit rRNA sequence probe hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 34, 1203–1208.

Kaufmann H., Yamage M., Roditi I., Dobbelaere D., Dubey J.P., Holmdahl O.J.M., Trees A., Gottstein B. (1996): Discrimination of Neospora caninum from Toxoplasma gondii and other apicomplexan parasites by hybridisation and PCR. *Mol. Nucl. Prob.* 10, 289–297.

Müller N., Zimmermann V., Hentrich B., Gottstein B. (1996): Diagnosis of Neospora sp. and Toxoplasma gondii by PCR and DNA-Hybridization Immuno-Assay (DIA). *J. Clin. Microbiol.* 34, 2850–2852

Paré J., Hietala S.K., Thurmond M.C. (1995): An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for serological diagnosis of Neospora sp. infection in cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.* 7, 352–359.

Paré J., Thurmond M.C., Hietala S.K. (1996): Congenital Neospora caninum infection in dairy cattle and associated calfhoo mortality. *Can. J. Vet. Res.* 60, 133–139.

Payne S., Ellis J. (1996): Detection of Neospora caninum DNA by the polymerase chain reaction. *Int. J. Parasitol.* 26, 347–351.

Soulsby E.J.L. (1982): Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals. Seventh Edition. London: Baillière Tindall.

Thür B., Hilbe M., Strasser M., Ehbrenspurger F. (1997): Immunohistochemical diagnosis of pestivirus infection associated with bovine and ovine abortion and perinatal death. *Am. J. Vet. Res.* 12, 1371–1375

Thür B., Caplazi P., Hilbe M., Zlinszky K., Strasser M., Corboz L., Ehbrenspurger F.: Ursächliche Beteiligung von Pestiviren an Aborten und perinatalen Todesfällen bei Rindern und Schafen in der Schweiz. *Dtsch. tierärztl. Wschr.* (in press).

Thurmond M.C., Hietala S.K., Blanchard P.C. (1997): Herd-based diagnosis of Neospora caninum-induced endemic and epidemic abortion in cows and evidence for congenital and postnatal transmission. *J. Vet. Diagn. Invest.* 9, 44–49.

Trees A.J., Guy F., Balfour A.H., Dubey J.P. (1993): Prevalence of antibodies to Neospora caninum in a population of urban dogs in England. *Vet. Rec.* 132, 125–126.

Wouda W., Dubey J.P., Jenkins M.C. (1997): Serological diagnosis of bovine fetal neosporosis. *J. Parasitol.* 83, 545–547.

Yamage M., Flechtner O., Gottstein B. (1996): Neospora caninum: Specific oligonucleotide primers for the detection of brain «cyst» DNA of experimentally-infected nude mice by the polymerase chain reaction (PCR). *J. Parasitol.* 82, 272–279.

Korrespondenzadresse: Prof. Dr. B. Gottstein, Institut für Parasitologie der Universität Bern, Länggass-Strasse 122, CH-3001 Bern

Manuskripteingang: 17. Mai 1998  
in vorliegender Form angenommen: 12. August 1998