

# Untersuchung von bovinem Sperma auf *Neospora caninum*-DNA mittels PCR

D. Staubli<sup>1</sup>, C. Iten<sup>2</sup>, J. Kneubühler<sup>2</sup>, H. Sager<sup>1</sup>, N. Müller<sup>1</sup>, B. Gottstein<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut für Parasitologie der Universität Bern, <sup>2</sup>Swissgenetics, Logistikzentrum, Mülligen

## Zusammenfassung

*Neospora caninum* wird weltweit als einer der wichtigsten Abortverursacher beim Rind beschrieben. Der Parasit wird während einer Trächtigkeit von der latent infizierten Mutter transplazentär auf den Feten übertragen. In den meisten Fällen wird ein gesundes, jedoch chronisch und lebenslang infiziertes Kalb geboren. Der *Neospora*-induzierte Abort stellt somit eigentlich eine Ausnahme dar. Man geht davon aus, dass in der Rinderpopulation die vertikale Übertragung endogenen Ursprungs mehr als 90% des Infektionsgeschehens ausmacht. Horizontale Infektionen exogenen Ursprungs betreffen somit weniger als 10% der Fälle. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, welche exogenen Infektionsquellen grundsätzlich in Betracht kommen. Obwohl verschiedene Berichte den Hund als Oozystenausscheider und damit als mögliche Futterkontaminationsquelle beschreiben, wird dieser Übertragungsweg zumindest in der Schweiz als nicht bedeutend eingestuft. In letzter Zeit wurde nun auch über die Möglichkeit einer exogenen Infektion diskutiert, welche sich durch Sperma von latent infizierten Stieren ergeben könnte. Ursprung war eine Arbeit aus Spanien, welche über die Nachweismöglichkeit von *N. caninum*-DNA im Sperma von natürlich infizierten Bullen mittels «nested-PCR» berichtete. Zur Erlangung eigener Erfahrungen untersuchten wir je 5 Spermaproben verschiedener Ejakulate von 20 *N. caninum*-seropositiven KB-Zuchtstieren mittels der publizierten «nested-PCR». Sämtliche Spermaproben ergaben keine spezifischen DNA-Amplifikate, alle Proben waren somit PCR-negativ. Somit drängen sich, aufgrund unserer Ergebnisse, keine weiteren Massnahmen bei Zuchtstieren auf, um die *Neospora*-Problematik beim Rind einzugrenzen.

Schlüsselwörter: *Neospora caninum*, Stier, PCR, Sperma

## Search for *Neospora caninum*-DNA by PCR in bull semen

*Neospora caninum* represents one of the most frequent abortifaciant organisms worldwide. The parasite is diaplacentally transmitted from the pregnant cow to the fetus, where it normally leads to the delivery of a healthy, however persistently infected calf. Abortion thus is a relative rare event. The transmission of bovine neosporosis occurs in more than 90% of the cases vertically due to the endogenous reactivation of a persistently infected mother. Exogenous infections are therefore responsible for less than 10% of the cases. The question arises about which infection sources may be relevant in this context. In Switzerland, the role of dogs as definitive hosts has been shown to be of low significance in that respect. Recently, discussion focused on the potential of infectious bull semen following natural or artificial insemination. Thus, a few years ago a report documented the detectability of *N. caninum*-DNA in the semen of naturally infected bulls by nested-PCR. As a consequence, we decided to gain own experience by investigating 5 separate semen specimens per animal, originating from 20 *N. caninum*-seropositive bulls used for artificial insemination in Switzerland. All probes turned out to be negative by nested PCR. Based upon our laboratory experiences, the potential bull semen-associated *Neospora*-problem seems not to affect the Swiss bull population, thus there is no evidence to include further respective means of control.

Keywords: *Neospora caninum*, bull, PCR, semen

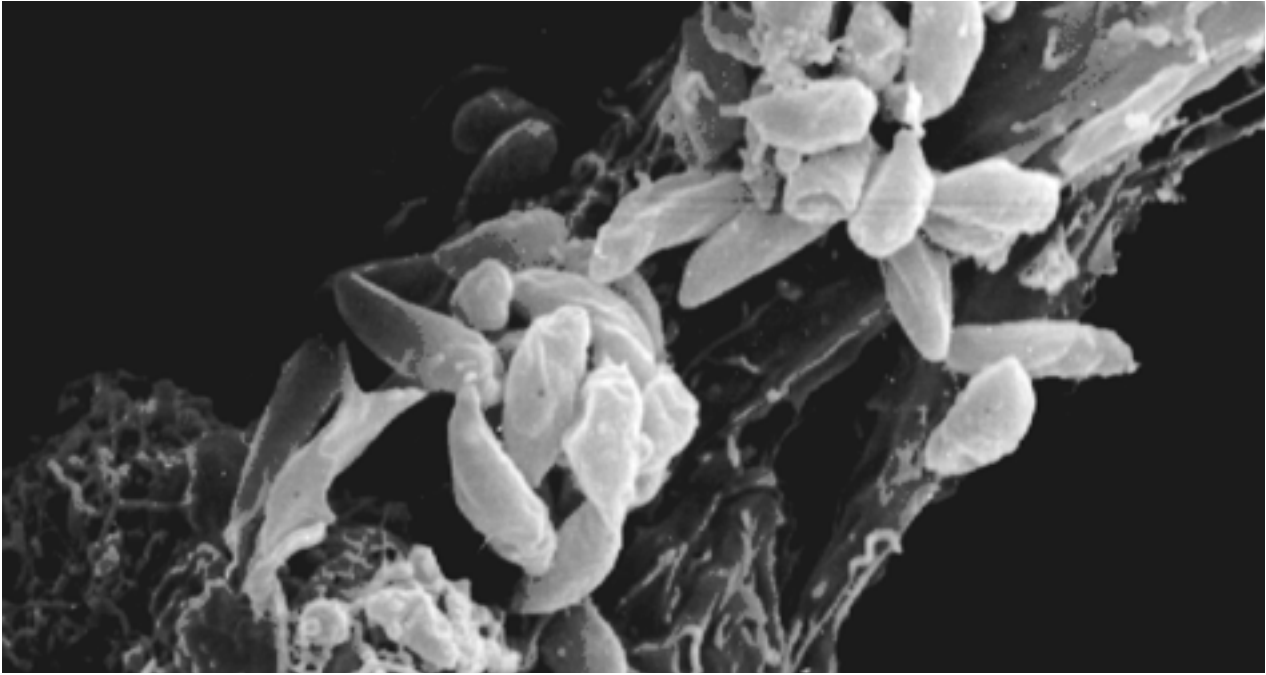


Abbildung 1: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von zahlreichen bananenförmigen *Neospora*-Tachyzoiten, welche sich im Rind primär in Gefäßendothelien vermehren, später aber andere Zellen in verschiedensten Organen befallen können. (Vergrößerung 3000fach).

## Einleitung

*Neospora caninum*, ein apikomplexes Protozoon, gilt als naher Verwandter von *Toxoplasma gondii* und besitzt dementsprechend eine nahezu identische Morphologie (Abb. 1).

*N. caninum* gilt als einer der bedeutendsten infektiösen Abortverursacher beim Rind. Ein chronisch infiziertes, Muttertier zeigt jedoch keinerlei Erkrankungssymptome. Im Gegensatz dazu kann eine Infektion beim Hund zu einer neuromuskulären Erkrankung führen. Zusätzlich fungiert der Hund auch als Endwirt für den Parasiten, was mit der Ausscheidung von Oozysten einhergeht, welche im sporulierten Stadium vorwiegend für Rinder und Hunde infektiös sind. Der häufigste Infektionsmodus beim Rind ist jedoch endogenen Ursprungs. Ausgehend von einem gesunden, latent infizierten Muttertier wird dabei der Parasit während der Trächtigkeit transplazentär auf den Feten vertikal übertragen. Zwischen dem 3. und 7. Trächtigkeitsmonat kann es zum Abort (zu anderen Zeitpunkten auch Umrindern oder Totgeburten und Geburt lebensschwacher Kälber) kommen. Am häufigsten bringt die infizierte Kuh ein gesundes Kalb zur Welt, welches nun selbst zu einem latenten Träger von *N. caninum* wird und – wenn es sich um ein Zuchtier handelt – den Parasiten an die nächste Generation weitergeben kann. Eine *Neospora*-positive Mutterkuh kann, unregelmässig alternierend, sowohl abortieren als auch ein gesundes Kalb gebären. Die horizontale Übertragung aufgrund einer exogenen Infektion mit *Neospora*-Oozysten aus Hundekot

ist selten, kann aber zu einem lokal gehäuften Abortgeschehen führen (sog. «*abortion storms*»). Mittels seroepidemiologischer Untersuchung von Herden, insbesondere durch Verwendung von Antikörper-Aviditätstests, kann diagnostisch zwischen vertikaler und horizontaler Übertragung unterschieden werden. Eigene Studien in der Schweiz zeigten, dass *N. caninum* auf Einzeltierebene bei 25%–29% der abortierten Feten nachgewiesen werden kann (Gottstein et al., 1999; Sager et al., 2001). Auf Betriebsebene zeigt sich der Erreger sogar für 30% aller auftretenden Abortprobleme verantwortlich (Sager et al., 2001). In den meisten Fällen verteilen sich die *Neospora*-Aborte über das ganze Jahr und betreffen Kühe unterschiedlichen Alters und verschiedener Rassen. Gehäufte Aborte in einer kurzen Zeitperiode sowie in ähnlichen Alterssegmenten («*abortion storm*») konnten in der Schweiz bisher nur in einem einzigen Fall im Kanton Genf dokumentiert werden (Sager et al., 2005). Bei Aborten wird in erster Linie der Kopf des Feten mittels PCR und wenn nötig mit histopathologischen Methoden untersucht. Eine gleichzeitige Serologie beim Muttertier wird empfohlen, da sie Auskunft über den Immunstatus liefert und im Aviditätstest Hinweise auf den Infektionsmodus gibt (Sager et al., 2003). Die Serologie kann jedoch nicht zur direkten Diagnose eines *Neospora*-induzierten Abortes verwendet werden, da bei einem Teil der seropositiven Muttertiere auch andere Gründe für einen Abort vorliegen können. Sehr selten kann eine

seronegative Mutterkuh trotzdem den Parasiten beherbergen und aufgrund der *Neospora*-Infektion abortieren (Sager et al., 2001).

In der Schweiz wurde nachgewiesen, dass beim Rind die vertikale Übertragung über eine endogene Infektion, das heisst von der latent infizierten Mutter auf die Feten, mehr als 90% der Fälle betrifft (Sager et al., 2001; 2005). Exogene Infektionen machen somit weniger als 10% der Fälle aus. Da aber in diesem Zusammenhang die *N. caninum*-Oozystenausscheidung bei Hunden in der Schweiz ein äusserst seltenes Ereignis zu sein scheint (Sager et al., 2006), stellt sich die Frage, welche anderen exogenen Infektionsquellen in Betracht gezogen werden müssen, wie zum Beispiel der orale Kontakt mit, beziehungsweise Ingestion von infektiösen Plazenten oder Lochialflüssigkeit, oder infektiöses Sperma von Stieren, sei dies mittels Natursprung oder über künstliche Besamung. Einer spanischen Forschergruppe gelang es vor einigen Jahren erstmalig, *N. caninum*-DNA im Sperma von natürlich infizierten Bullen mittels «nested-PCR» nachzuweisen (Ortega et al., 2003). Da ein DNA-Nachweis noch nicht auf die Infektiosität des Spermas schliessen lässt, infizierten die Autoren hochempfindliche athymische Nacktmäuse mit PCR-positivem Sperma, wobei in keinem Falle eine Infektion zustande kam. Auch aus praktischer Sicht scheint Sperma keine wesentliche Rolle zu spielen, da im Gegenteil die Verwendung von KB in *Neospora*-seropositiven Kühen das Abortrisiko zu senken scheint (Lopez-Gatius et al., 2005).

Da trotzdem die Möglichkeit der *N. caninum*-Übertragung via Sperma zu einem Thema geworden ist und dies auch grosse Auswirkungen auf den Bullen-Spermamarkt haben könnte, initiierten wir eine Studie bei KB-Zuchtstieren aus der Schweiz. Von diesen Tieren standen sowohl Serumproben als auch unverdünnt und verdünnt in flüssigem Stickstoff eingelagerte Spermaproben zur Verfügung.

## Tiere, Material und Methoden

### Zuchtbullen und ihr serologischer Status

Zur Vorselektionierung von serologisch *N. caninum*-positiven Schweizer Stieren wurden 351 Tiere aus der KB-Station Mülligen der Swisshgenetics mittels ELISA und Western Blot untersucht, wobei sich 22 Stiere in beiden Tests als seropositiv erwiesen. Bei diesen Tieren waren folgende Rassen vertreten: Simmentaler, Fleckvieh, Red Holstein, Holstein, Brown Swiss und Original Braunvieh. Von 20 Stieren konnten eine unverdünnt gefrorene und sowie vier verdünnt gefrorene, in flüssigem Stickstoff eingelagerte Spermaproben, jede von einem unterschiedlichen Ejakulat her stammend, verwendet werden, um diese

mittels «nested-PCR» (gemäss Ortega et al., 2003) auf die Nachweisbarkeit von *N. caninum*-DNA zu prüfen.

### Aufarbeitung der Spermaproben

Um PCR-inhibierende Faktoren, die sich im verdünnten, gefrorenen Sperma befinden, herauszufiltern, mussten diese Spermaproben vor der DNA-Extraktion zuerst mittels Säulenfiltration vorgereinigt werden. Dazu wurden die tiefgefrorenen Spermahalme im Wasserbad für während 60 Sekunden bei 37°C aufgetaut und anschliessend über eine 2 ml Sephacryl S-400-Säule (Amersham Bioscience, Uppsala, Schweden) chromatographisch gereinigt.

### DNA-Extraktion der Spermaproben

Unverdünnte Spermaproben (400 µl) sowie verdünnte Spermaproben (250 µl) [siehe oben] wurden durch Sedimentation (12000×g, 5 min., 4°C) in zwei Phasen getrennt, einer flüssigen F1 (Seminalflüssigkeit) und einer zellulären F2 (Spermazellen). Die DNA-Extraktion erfolgte mit dem «Genomic-Prep cell and tissue DNA isolation kit» von Amersham Biosciences Limited (UK).

F1 und F2 wurden mit einer Zellyselösung mit Proteinase K (200 µg/ml) und RNaseA (20 µg/ml) während 1 Stunde bei 60°C inkubiert. Dadurch wurden in der zellulären F2-Fraktion nicht-spermatozoäre Zellen sowie die Spermienchwänze lysiert, nicht aber die Spermienköpfe, welche die eigentlichen inhibitorischen Komponenten enthalten (Von Beroldingen et al., 1990; Van der Engelenburg et al., 1993) und welche so mittels Sedimentation (12000×g, 5 min., 4°C) entfernt werden konnten. Die DNA beider F1- und F2-Lysate wurde mit Isopropanol präzipitiert und das Präzipitat in 50 µl DNA-Hydratationlösung aufgenommen. Die F1 und F2, welche aus verdünnten Spermaproben isoliert wurden, erhielten zusätzlich 1 µl Glycogen (20 mg/ml). Die so isolierten DNA-Proben wurden mit einem Volumen von 5 µl (äquivalent zu 40 µl frischen Spermas und 20 µl verdünntem Sperma) in der PCR eingesetzt. Zur Herstellung einer Positivkontrolle (PK1) wurden einer PCR-negativen Spermaprobe 100 aus in vitro-Kultur gewonnene *N. caninum*-Tachyzoiten hinzugefügt.

### PCR mit Sperma-DNA

DNA der F1- und F2-Fractionen wurden einzeln mittels einer «nested-PCR» geprüft, welche auf der Amplifikation einer Sequenz aus der *internal transcribed spacer* (ITS1) Region der rRNA-Gene von *N. caninum* beruht (Payne and Ellis, 1996). Die verwendeten Primerpaare (NN1 und NN2 für den ersten Durchgang, NP1 und NP2 für den zweiten

«nested» Durchgang) entsprachen den von Buxton et al. (1998) publizierten Oligonukleotidsequenzen.

NN1 (forward):

5'-TCAACCTTGAATCCCAA-3'

NN2 (reverse):

5'-CGAGCCAAGACATCCATT-3'

NP1 (forward):

5'-TACTACTCCCTGTGAGTTG-3'

NP2 (reverse):

5'-TCTCTTCCCTCAAACGCT-3'

Die Amplifikation wurde in ihrer ersten Runde in einem Volumen von 25 µl durchgeführt. Für die zweite Runde wurden aus dem ersten Amplifikat 2 µl direkt in das zweite Reaktionsgefäß übergeführt. Das zweite Amplifikat wurde in einem 2.0% Agarosegel mit Ethidiumbromid ausgewertet. Zur Verhinderung von Kontaminationen wurden die einzelnen Schritte der PCR (DNA-Isolation; Pipettieren der PCR-Reaktionslösung; Gelanalyse) in getrennten Räumen durchgeführt. Bei jedem PCR-Ansatz wurden bekannte negative Spermaproben, Sperma-DNA-freie Proben sowie eine Positivkontrolle (PK1) mitgeführt. Zudem wurde bei jeder Probe eine Inhibitionskontrolle durchgeführt, indem ein zweiter Ansatz mit DNA der Positivkontrolle, entsprechend ca. 10 Erregeräquivalenten, versehen wurde.

## Ergebnisse

### Serologie

Von den 351 mittels ELISA und Western Blot serologisch geprüften Stieren waren 22 Tiere *N. caninum*-seropositiv. Die Seroprävalenz bei den untersuchten Schweizer Bullen lag folglich bei 6.27%.

### Nested-PCR

In Vorversuchen ermittelten wir die methodische Sensitivität der «nested PCR» durch Austitration von Spermaproben, die vorgängig mit einer definierten Anzahl von *N. caninum*-Tachyzoiten aus in vitro-Kultur versehen worden waren. Bei der F2-Fraktion lag die Nachweisgrenze bei 0.1 Tachyzoiten pro PCR-Ansatz, bei der F1-Fraktion gelang es, 1 bis 10 Tachyzoiten pro PCR-Ansatz nachzuweisen. Extrapoliert lag unsere Nachweisgrenze somit bei ca. 1 bis 10 Erregern pro ml unverdünnter Spermaflüssigkeit.

Von den 22 seropositiven Stieren konnten bei 20 Tieren jeweils sowohl unverdünnte als auch verdünnte Spermaproben (unterschiedliche Ejakulate) mittels «nested-PCR» untersucht werden. Von jedem Stier beziehungsweise Ejakulat wurden vier verdünnt tief-

gefrorene Spermaproben je einzeln in einem einfachen PCR-Ansatz geprüft, während die dazugehörige unverdünnte Spermaprobe in einem dreifachen PCR-Ansatz untersucht wurde. Sämtliche verdünnten und unverdünnten Spermaproben ergaben in der «nested-PCR» keine spezifischen DNA-Amplifikate, alle Proben waren somit PCR-negativ. Die mitgeführten Kontrollen zeigten, dass die negativen Ergebnisse nicht auf einer Inhibition der Reaktion beruhten.

## Diskussion

Die bei den Stieren ermittelte Seroprävalenz von 6.3% für *N. caninum* liegt deutlich unter dem in der Schweizerischen Rinderpopulation registrierten Wert, welcher zwischen 11 und 15% liegt (Gottstein et al., 1998). Es stellt sich die Frage, ob der umfangreiche Leistungsanforderungskatalog für Zuchtstiere bereits zu einer Vorselektion und damit zum Ausscheiden von *N. caninum*-Trägertieren führt. Dies ist insofern interessant, da einige Hinweise auf eine Leistungsreduktion bei Rindern mit *N. caninum*-Infektionen vorliegen (abgesehen vom erhöhten Risiko für Aborte und verminderter Fertilität). So beschrieben Hernandez und Kollegen (Hernandez et al., 2001) eine Reduktion der Milchleistung bei Milchkühen um 4%. Bei Masttieren werden ebenfalls verminderte Tageszuwachsrate oder schlechtere Futtermittelverwertung beschrieben, allerdings sind die Unterschiede zwischen *N. caninum* seropositiven und negativen Tieren nicht immer signifikant (Barling et al., 2001; Haddad et al., 2005). Bedingt durch die relativ geringe Seroprävalenz erscheint die Wahrscheinlichkeit eines Zuchteinsatzes von seropositiven Stieren nicht sehr hoch. Dennoch stellt sich die Frage einer möglichen exogenen Infektion von Kühen durch Sperma von *N. caninum*-positiven Stieren. Einer spanischen Forschergruppe gelang es vor einigen Jahren, im Sperma von natürlich infizierten, *N. caninum*-seropositiven Bullen mittels «nested-PCR» *N. caninum*-DNA insbesondere in der zellulären Spermafraktion nachzuweisen (Ortega et al., 2003; Caetano-da-Silva et al., 2004; Ferre et al., 2005). Wir haben deshalb in unserem Labor diese Technologie etabliert und validiert. Dazu gehörte auch der Nachweis der methodischen Sensitivität der «nested-PCR», welche in demselben Bereich lag, wie er von den spanischen Autoren publiziert worden ist, nämlich bei 1–10 *N. caninum* Tachyzoiten pro ml Spermaflüssigkeit.

Bei der Untersuchung von natürlich infizierten, *N. caninum*-seropositiven Stieren aus einer schweizerischen KB-Station gelang es uns jedoch bisher nie, die spanischen Ergebnisse zu reproduzieren. Kritisch bei den spanischen wie auch bei den unsrigen Untersu-

chungen scheint grundsätzlich die methodische Sensitivität zu sein. So berichteten die spanischen Autoren in Folgepublikationen, dass die vorgefundenen DNA-Mengen sich an der Grenze der methodischen Nachweisbarkeit befinden. Die Autoren mussten schliesslich jeweils vier Spermaproben eines einzelnen Ejakulates prüfen, um wenigstens ein PCR-positives Resultat zu erhalten (Caetano-da-Silva et al., 2004; Ferre et al., 2005). Eine rationale Erklärung für diese Vierfachuntersuchung konnten sie nicht liefern. So verzichteten wir in unserer Studie auf diese Mehrfachuntersuchungen, einerseits wegen des nicht vertretbaren Aufwandes bei Routineuntersuchungen, andererseits weil die Anzahl «4» nicht erklärbar ist und weil so im negativen Ergebnisfalle logischerweise noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden müssten. Zusätzlich wiesen die spanischen Autoren nach, dass seropositive Stiere nur transient PCR-Positives Sperma produzieren. So wurden jeweils 10 verschiedene Pailletten (verschiedener Ejakulate) untersucht, wovon in der Regel eine, höchstens aber 3 PCR-positiv waren (Ortega-Mora et al., 2003; Caetano-da-Silva et al., 2004). Wir trugen dem in unserer eigenen Untersuchung Rechnung, indem wir pro Stier 5 unabhängige Ejakuate prüften.

Aus der Sicht der Schweizerischen KB-Branche scheint somit aufgrund unserer Ergebnisse die potenzielle *Neospora*-Problematik beim Zuchtstier kein Thema zu sein. Andererseits können aus praktischer Sicht, diverse Bekämpfungsmassnahmen empfohlen werden. Beim weiblichen Tier sind eine ganze Reihe von Massnahmen möglich, welche einen Beitrag zur Lösung der *Neospora*-Problematik leisten können:

(a) Zur Verhinderung des Zukaufs eines *Neospora*-Trägartieres in einen freien Bestand ist die vorgängige serologische Untersuchung des betreffenden Tieres sinnvoll. Ein seropositives Tier ist als *Neospora*-Träger zu betrachten.

(b) Zur Verhinderung des Aufbaus von *Neospora*-positiven Zuchtlinien mit bereits vorhanden *Neospora*-seropositiven Tieren sollte auf die Weiterverwendung dieser Tiere für die Zucht verzichtet werden. Die Verwendung der Nachkommen *Neospora*-positiver Muttertiere für die Mast ist unbedenklich.

(c) Für wertvolle *Neospora*-positive Muttertiere kann als Alternative der Embryotransfer auf ein seronegatives Empfängertier in Betracht gezogen werden, da damit der Übertragungszyklus unterbrochen wird. Umgekehrt ist der Embryotransfer von einem seronegativen Spendertier auf ein seropositives Empfängertier nicht zu empfehlen. Zwar treten in solchen Fällen keine Aborte auf und das neue Kalb kommt mit grosser Wahrscheinlichkeit gesund auf die Welt, jedoch als *Neospora*-positiver Nachkomme. Somit kann das Tier zum Aufbau einer neuen *Neospora*-positiven Zuchtlinie beitragen.

(d) Zur Verhinderung einer horizontalen (exogenen) Einschleppung von *N. caninum* in den Bestand können folgende Massnahmen empfohlen werden: Grundsätzlich ist auf eine gute Hygiene im Betrieb zu achten. Kraftfutter, Gras, Heu und Silage sollte so gelagert werden, dass es nicht durch (Hunde)-Kot verschmutzt werden kann. Hofhunden sollte kein Abortmaterial und keine Nachgeburten verfüttert werden. Ebenfalls ist darauf zu achten, dass sie kein rohes Wiederkäuerfleisch oder entsprechende Organe zum Verzehr erhalten (Tiefgefrieren und genügendes Erhitzen tötet Gewebeformen des Parasiten ab).

Als Einblick in die gegenwärtige Neosporoseforschung über potenzielle Bekämpfungsstrategien, welche zu einem späteren Zeitpunkt einmal Praxisreife erlangen könnten, seien hier kurz die Folgenden erwähnt. Zurzeit wird in Holland eine Totvakzine erprobt, welche angeblich die Abortrate beim Rind reduzieren soll. Da zum jetzigen Zeitpunkt weder die Indikation zur Vakzinierung wissenschaftlich ausgearbeitet worden ist, noch genügend Erfahrung hinsichtlich der Wirksamkeit der Vakzine vorhanden ist, wird von deren Verwendung derzeit abgeraten. Aus wissenschaftlicher Sicht wäre zur Etablierung einer zellulären Immunantwort eine attenuierte Lebendvakzine, an der zur Zeit in mehreren Labors geforscht wird, vorteilhafter. Alternativ zur Vakzinierungsstrategie laufen gegenwärtig Studien zum planmässigen metaphylaktischen Einsatz von anti-Kokzidiemitteln wie zum Beispiel das Toltrazuril. Damit wird chemotherapeutisch versucht, negative Zuchtlinien aus *Neospora*-seropositiven Muttertieren zu generieren. Diese Strategie beruht auf der Behandlung von neugeborenen Kälbern, welche von seropositiven Muttertieren abstammen. Auch hier muss man auf die Auswertung von genügend Studienmaterial warten, um allenfalls die Ausarbeitung eines praxisreifen Bekämpfungsschemas rechtfertigen zu können.

Zur Validierung von zukünftigen Bekämpfungsstrategien werden insbesondere auch Kosten-Nutzen-Analysen beigezogen werden müssen, um deren Effizienz und Effektivität beurteilen zu können. Im Rahmen einer Dissertationsarbeit (Haesler et al., submitted a, b) wurden in mathematischen und ökonomischen Modellen der Prävalenzverlauf von *N. caninum* in der schweizerischen Milchviehpopulation mit und ohne potenzielle Kontrollmassnahmen simuliert und die anfallenden Kosten für verschiedene Möglichkeiten von Kontrollstrategien berechnet. Die Ergebnisse zeigen, dass verschiedene Kontrollstrategien zu einer deutlichen Verminderung der Prävalenz in der Population führen können. Die ökonomischen Berechnungen lassen jedoch darauf schliessen, dass nur einzelne Strategien wirtschaftlich interessant sind. Zur Zeit ist der Verzicht auf Nachzucht von Kälbern

von seropositiven Kühen die zu empfehlende Strategie. Eine vielversprechende Strategie, die nur auf hypothetischen Annahmen beruht, ist die weiter oben erwähnte chemotherapeutische Behandlung mit einem parasitiziden Wirkstoff. Dasselbe gilt für den Einsatz einer Vakzine mit hoher Schutzwirkung. Sobald ein solcher Impfstoff zur Verfügung stehen

würdet, sollte er in den ökonomischen Modellrechnungen mit eingeschlossen werden. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass in Zukunft weitere Bekämpfungsstrategien zur Kontrolle der *Neospora*-Problematik mit einem guten Kosten-Nutzen-Verhältnis zur Verfügung stehen werden.

### Recherche d'ADN de *Neospora caninum* dans le sperme bovin par PCR

*Neospora caninum* est décrit dans le monde entier comme l'une des causes d'avortements les plus importantes chez les bovins. Le parasite est transmis par voie transplacentaire au fœtus durant la gestation par une mère infectée de façon latente. Dans la plupart des cas un veau sain, mais cependant infecté pour toute sa vie de façon chronique, vient au monde. Les avortements causés par *Neospora* représentent donc en fait une exception. On part de l'idée que dans la population bovine la transmission verticale représente plus de 90% des infections. La transmission horizontale d'origine externe constitue donc moins de 10% des cas. Dans ce contexte, la question se pose de savoir quelles sont les sources d'infections exogènes à prendre en considération. Bien que diverses études décrivent le chien comme excréteur d'oocystes et ainsi comme contaminateur des fourrages, ce mode de transmission est considéré en Suisse pour le moins comme très peu significatif. Ces derniers temps on a discuté de la possibilité d'une infection exogène via le sperme de taureaux infectés de façon latente. Le point de départ de cette discussion était un travail espagnol qui décrivait la possibilité de mettre en évidence l'ADN de *N. caninum* dans le sperme de taureaux infectés naturellement par le biais d'une «nested-PCR». Afin d'acquérir une expérience personnelle, nous avons examiné 5 échantillons de sperme provenant de différents éjaculats de 20 taureaux séropositifs à *N. caninum* au moyen de la «nested-PCR» publiée. Aucun échantillon de sperme n'a donné d'amplification spécifique, ils étaient donc négatifs à la PCR. Sur la base de nos observations, il n'y a donc pas de mesures à proposer face aux taureaux d'élevage pour réduire la problématique de *Neospora*.

### Analisi dello sperma bovino tramite PCR per la ricerca di ADN di *Neospora caninum*

La *Neospora caninum* è conosciuta mondialmente quale causa di aborti nei bovini. Il parassita latente nella madre infetta viene trasmesso durante la gravidanza in modo transplacentare ai feti. Nella maggioranza dei casi si giunge alla nascita di un vitello sano ma portatore cronico a vita. La *Neospora* che provoca aborti è però un'eccezione. Si deduce che nella popolazione bovina la trasmissione verticale endogena originaria provoca più del 90% dei casi di infezione. Infezioni orizzontali di origine esogena concernono meno del 10% dei casi. In questo contesto ci si pone la domanda sulle cause esogene di infezione. Anche se diversi rapporti descrivono il cane quale escretore di oociti e quindi quale possibile contaminatore di mangime, in Svizzera questa via di trasmissione non viene considerata rilevante. Negli ultimi tempi si discute anche della possibile infezione esogena provocata dallo sperma di tori con infezione latente. All'origine vi è una ricerca spagnola che citava la possibilità di dimostrare tramite «nested-PCR» la presenza di ADN di *N. caninum* nello sperma di maschi infettati per via naturale. Per acquisire esperienze proprie abbiamo analizzato 5 campioni di sperma di vari eiaculati di 20 tori di allevamento per inseminazione artificiale sieropositi all'*N. caninum* tramite il test pubblicato «nested-PCR». In nessun campione di sperma è risultato un amplificato specifico di ADN, quindi tutti i campioni erano negativi al PCR. Sulla base dei nostri risultati possiamo concludere che non è necessaria l'introduzione di altre misure, negli allevamenti, per delimitare la problematica della *Neospora* nei bovini.

## Literatur

- Barling K.S., Lunt D.K., Snowden K.F., Thompson J.A.: Association of serologic status for *Neospora caninum* and post-weaning feed efficiency in beef steers. J. Am. Vet. Med. Assoc. 2001, 219: 1259–1262.
- Caetano-da-Silva A., Ferre I., Collantes-Fernandez E., Navarro V., Aduriz G., Ugarte-Garagalza C., Ortega-Mora L.M.: Occasional detection of *Neospora caninum* DNA in frozen extended semen from naturally infected bulls. Theriogenology 2004; 62: 1329–1336.
- Ferre I., Aduriz G., del-Pozo I., Regidor-Cerrillo J., Atxaerandio R., Collantes-Fernandez E., Hurtado A., Ugarte-Garagalza C., Ortega-Mora L.M.: Detection of *Neospora caninum* in the semen and blood of naturally infected bulls. Theriogenology 2005, 63: 1504–1518.
- Gottstein B., Hentrich B., Wyss R., Thür B., Bruckner L., Müller N., Kaufmann H., Waldvogel A.: Molekular- und immundiagnostische Untersuchungen zur bovinen Neosporose in der Schweiz. Schweiz. Arch. Tierheilk. 1999, 141: 59–68.
- Gottstein B., Hentrich B., Wyss R., Thür B., Busato A., Stärk K.D., Müller N.: Molecular and immunodiagnostic investigations on bovine neosporosis in Switzerland. Int. J. Parasitol. 1998, 28: 679–691.
- Haddad J.P., Dohoo I.R., VanLeewen J.A.: A review of *Neospora caninum* in dairy and beef cattle – a Canadian perspective. Can. Vet. J. 2005, 46: 230–243.
- Haesler B., Hermamdez Hernandez JA, Reist M, Sager H, Steiner-Moret C., Staubli D., Staerk K.D.C., Gottstein B.: *Neospora caninum*: serological follow-up in dairy cows during pregnancy. Vet. Parasitol. (in press).
- Haesler B., Regula G., Stärk K.D.C., Sager H., Gottstein B., Reist M.: Economic assessment of putative control strategies against *Neospora caninum* in Switzerland. Prev. Vet. Med. (submitted, a).
- Haesler B., Stärk K.D.C., Sager H., Gottstein B., Reist M.: Simulating the impact of different control strategies on the population dynamics of *Neospora caninum* in Swiss dairy cattle. Prev. Vet. Med. (submitted, b).
- Hernandez J., Risco C., Donovan A.: Association between exposure to *Neospora caninum* and milk production in dairy cows. J. Am. Vet. Med. Assoc. 2001, 219: 632–635.
- Lopez-Gatius F., Santolaria P., Yaniz J. L., Garbayo M., Almeria S.: The use of beef bull semen reduced the risk of abortion in *Neospora*-seropositive dairy cows. J. Vet. Med. 2005, 52, 88–92.
- Ortega-Mora L.M., Ferre I., del-Pozo I., Caetano-da-Silva A., Collantes-Fernández E., Regidor-Cerrillo J., Ugarte-Garagalza C., Aduriz G.: Detection of *Neospora caninum* in semen of bulls. Vet. Parasitol. 2003, 117: 301–308.
- Payne S., and Ellis J.: Detection of *Neospora caninum* DNA by the polymerase chain reaction. Int. J. Parasitol., 1996, 26: 347–351.
- Sager H., Fischer I., Furrer K., Strasser M., Waldvogel A., Boerlin P., Audigé L., Gottstein B.: A Swiss case-control-study to assess *Neospora caninum*-associated bovine abortions by PCR, histopathology and serology. Vet. Parasitology Parasitol. 2001, 102: 1–15.
- Sager H., Gloor M., Björkman C., Kritznner S., Gottstein B.: Assessment of antibody avidity in aborting cattle by a somatic *Neospora caninum*-tachyzoite antigen IgG avidity ELISA. Vet. Parasitol. 2003, 112: 1–10.
- Sager H., Hüsey D., Kuffer A., Schreve F., Gottstein B.: First documentation of a *Neospora*-induced abortion storm (exogenous transplacental transmission of *Neospora caninum*) in a Swiss dairy farm. Schweiz. Arch. Tierheilk. 2005, 147: 113–120.
- Sager H., Steiner-Moret C., Müller N., Staubli D., Esposito M., Schares G., Haessig M., Stärk K., Gottstein B.: Incidence of *Neospora caninum* and other intestinal protozoan parasites in populations of Swiss dogs. Vet. Parasitol. 2006, 139: 84–92.
- Van der Engelenburg F.A.C., Maes R.K., Van der Oirschot J.T., Van Rijsewijk F.A.M.: Development of a rapid and sensitive polymerase chain reaction assay for detection of bovine herpesvirus type I in bovine semen. J. Clin. Microbiol. 1993, 31: 3129–3135.
- Von Beroldingen C.H., Blake E.T., Higuchi R., Sensabaugh G.F., Erlich H.A.: Applications of PCR to the analysis of biological evidence. In: Erlich H.A. (Ed.), PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplifications, vol. 1. Stockton Press, New York, 1990, pp. 209–223.

## Korrespondenzadresse

E-mail: bruno.gottstein@ipa.unibe.ch

Eingang: 24. Mai 2006

Angenommen: 5. Juni 2006