

Aus dem
Institut für Lebensmittelhygiene
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

**Serologische und molekularbiologische Untersuchungen zur
Prävalenz von *Toxoplasma gondii* bei Waschbären (*Procyon lotor*)
in Deutschland**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Lydia Engel
aus Leipzig

Leipzig, 2023

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Dr. Thomas Vahlenkamp

Betreuer: Prof. Dr. Ahmad Hamedy

Gutachter: Prof. Dr. Ahmad Hamedy
Institut für Lebensmittelhygiene
Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig

Prof. Dr. Peter Paulsen
Institut für Fleischhygiene, Fleischtechnologie und
Lebensmittelwissenschaft
Veterinärmedizinische Universität Wien

Tag der Verteidigung: 11.04.2023

Inhaltsverzeichnis

Inhalt	Seite
1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht	3
2.1 Lebenszyklus und Parasitenstadien von <i>Toxoplasma gondii</i>	3
2.2 Toxoplasmose beim Menschen	7
2.2.1 Klinische Manifestation	7
2.2.2 Risikofaktoren	8
2.2.3 Seroprävalenz	10
2.3 Toxoplasmose beim Tier	12
2.3.1 Klinische Manifestation	12
2.3.2 Prävalenz in verschiedenen Tierarten	12
2.3.3 Toxoplasmose bei Waschbären	14
2.4 <i>T. gondii</i> in Lebensmitteln.....	16
2.4.1 Vorkommen in Lebensmitteln	16
2.4.2 Prävention und Inaktivierung von <i>T. gondii</i>	17
2.5 Diagnostik.....	20
2.5.1 Serodiagnostik.....	21
2.5.2 Molekulardiagnostik	22
3 Publikationen	25
3.1 Publikation 1	25
3.2 Publikation 2.....	35
4 Diskussion.....	43
5 Zusammenfassung.....	50
6 Summary.....	52
7 Literaturverzeichnis	54
8 Danksagung.....	68

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen

AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
ANON.	Anonym
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
DJV	Deutscher Jagdverband
DNA	Deoxyribonucleic Acid
EFSA	European Food Safety Authority
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
IFAT	Indirekter Immunfluoreszenzantikörpertest
IHAT	Indirekter Hämagglutinationstest
LAT	Latex-Agglutinationstest
MAT	Modifizierter Agglutinationstest
MC	Magnetic Capture
MRI	Max-Rubner-Institut
PCR	Polymerase Chain Reaction
SFT	Sabin-Feldmann-Test
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
ZNS	Zentralnervensystem

1 Einleitung

Toxoplasma gondii stellt einen der häufigsten ubiquitär vorkommenden, alimentär übertragbaren Krankheitserreger dar. Der obligat intrazelluläre Parasit ist weltweit verbreitet, weist ein ungewöhnlich breites Wirtsspektrum auf und hat eine Affinität zu verschiedenen Zellen (DUBEY 2022). Nach der ersten genaueren Beschreibung 1908 durch NICOLLE und MANCEAUX (1908) folgte 1939 erstmals eine humanassoziierte Isolierung (SABIN 1939). Der vollständige Lebenszyklus wurde 1970 dargestellt und damit auch Felidae (Katzenartige) als die einzigen Endwirte identifiziert (FRENKEL et al. 1970; HUTCHISON et al. 1970). Es wird angenommen, dass circa ein Drittel der Weltbevölkerung mit *T. gondii* infiziert ist (MONTROYA und LIESENFELD 2004). In Deutschland beträgt die Seroprävalenz bei Erwachsenen 55 %, wobei die Wahrscheinlichkeit, mit dem Erreger in Kontakt zu treten, mit zunehmendem Alter steigt (WILKING et al. 2016). Weitere Faktoren, wie das Geschlecht und die Ernährungsgewohnheiten, aus denen regionale Häufungen resultieren, werden mit einer Seropositivität assoziiert (TENTER et al. 2000; WILKING et al. 2016). Nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) sind etwa 20 % aller durch Lebensmittel übertragenen Erkrankungen auf eine *T.-gondii*-Infektion zurückzuführen (HAVELAAR et al. 2015). Weiterhin wird *T. gondii* in den USA unter den lebensmittelbedingten Krankheitserregern als die vierthäufigste Ursache für Krankenhausaufenthalte sowie als die zweithäufigste Todesursache angesehen (SCALLAN et al. 2011). Damit gehört *T. gondii* zu den wichtigsten alimentär übertragbaren Krankheitserregern.

In Europa stellt der Verzehr von Fleisch und Fleischprodukten, welche nicht ausreichend erhitzt wurden, die häufigste Quelle für humane *T.-gondii*-Infektion dar (BARIL et al. 1999; COOK et al. 2000). Der Konsum von Wildfleisch konnte dabei wiederholt als Ursache für klinische *T.-gondii*-Infektionen ermittelt werden (CARME et al. 2002; ROSS et al. 2001). Vornehmlich in Deutschland gewinnt Wildfleisch zunehmend an Bedeutung. Zu den beliebtesten Tierarten, die zur Herstellung von Wildbret genutzt werden, gehören Wildschwein (*Sus scrofa*), Reh- (*Capreolus capreolus*) sowie Rot- (*Cervus elaphus*) und Damwild (*Dama dama*) (DJV 2019). Neben den üblichen heimischen Wildarten, die dem Jagdrecht obliegen (ANON. 2020), werden auf EU-Ebene invasive Tierarten gelistet (ANON. 2016). Eine zentrale Maßnahme zur Eindämmung dieser Tierarten umfasst die gezielte Bejagung (ANON. 2014).

Hierzu zählt unter anderem der Waschbär (ANON. 2016); er stammt ursprünglich aus Nordamerika und wurde zu Beginn des 20. Jahrhunderts in Deutschland etabliert (BELTRÁN-BECK et al. 2012). Damit steht der Waschbär in Deutschland auf der Liste der invasiven Arten (ANON. 2016) ohne natürliche Feinde und wird zum Schutz heimischer Arten bejagt (DJV 2020; NEHRING und SKOWRONEK 2020). Dennoch

Einleitung

wuchs die Population in den letzten Jahrzehnten rapide, was sich in den Streckenzahlen des DJV widerspiegelt. Wurden im Jagdjahr 2000/2001 noch ca. 9.000 Waschbären erlegt, so waren es im Jagdjahr 2020/2021 schon über 200.000 erlegte Tiere (DJV 2022). Die steigende Jagdstrecke der Waschbären könnte damit zunehmend das Interesse wecken, die Tierkörper weitergehend zu nutzen. Aktuell werden Waschbären in Deutschland nur zu einem sehr geringen Anteil für Wildbret und zur Pelzproduktion genutzt. In anderen Ländern, wie den USA, ist dies eher üblich, wenn auch Jäger selbst mehr Waschbärenfleisch konsumieren als Nichtjäger (BURGER 2000; DJV 2019; GAINES et al. 2000; GOGUEN und RILEY 2020). Als Voraussetzung dafür, sollten jedoch Informationen über die Belastung der Waschbären mit zoonotischen Krankheitserregern erfasst werden.

Das Ziel dieser Arbeit war es daher, anhand einer großen Probenanzahl zunächst die *Toxoplasma-gondii*-Seroprävalenz bei Waschbären in Deutschland zu ermitteln und damit einhergehende Risikofaktoren zu bestimmen. Zudem sollten konsumrelevante Fleischteile molekularbiologisch untersucht werden, um qualitative und quantitative Ergebnisse zum Vorkommen von *T.-gondii*-Stadien in diesen Geweben zu erhalten. Insgesamt sollten damit Daten als Beitrag für eine Risikoabschätzung einer *T.-gondii*-Infektion des Menschen, durch den Verzehr des Fleisches von wild lebenden Waschbären aus Deutschland, zur Verfügung gestellt werden.

2 Literaturübersicht

2.1 Lebenszyklus und Parasitenstadien von *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii ist ein obligat intrazellulär lebender, einzelliger Parasit. Mit seinem fakultativ zweiwirtigen, komplexen Lebenszyklus ist er in der Lage, annähernd alle warmblütigen Tiere, darunter auch den Menschen, zu infizieren und besitzt vermutlich keine Wirtsspezifität (COOK et al. 2000; FELDMAN 1982; TENTER et al. 2000). Der Begriff *Toxoplasma* leitet sich aus der gebogenen Form der Tachyzoiten ab (griechisch: *toxos* = Bogen, *plasma* = Gebilde) und wurde durch NICOLLE und MANCEAUX (1908) etabliert.

Im Jahr 1970 wurde der vollständige parasitäre Lebenszyklus von *Toxoplasma gondii* erstmals beschrieben. Dabei wurde zwischen einer asexuellen Entwicklungsphase in Zwischen- sowie Endwirten und einer sexuellen Vermehrung in Endwirten unterschieden (FRENKEL et al. 1970; HUTCHISON et al. 1970). Alle warmblütigen Tiere, einschließlich Nutztiere und Menschen, können als Zwischenwirte fungieren. Endwirte stellen ausschließlich die Feliden (Katzenartige) dar, wobei Hauskatzen die relevantesten Vertreter für die Parasitenverbreitung abbilden (DUBEY 1996a).

Toxoplasma gondii kann morphologisch in drei verschiedenen infektiösen Entwicklungsstadien auftreten:

- Tachyzoiten (auch Endo- oder Trophozoiten),
- Bradyzoiten (bzw. Zystozoiten) in Gewebezysten und
- Sporozoiten in Oozysten.

Alle drei Formen von *Toxoplasma gondii* weisen gleiche Primärorganellen und Strukturen auf. Dazu gehört die im Allgemeinen längliche äußere Form, der typische apikale Komplex und Organellen wie Konoid, Mikroneme und Rhoptrien, siehe Abb. 1 (ATTIAS et al. 2020).

Die Stadien weisen eine deutliche Differenzierung der vorderen Region auf; dort ist der Apikalkomplex lokalisiert, welcher der Invasion von Wirtszellen dient (CHIAPPINO et al. 1984; DUBEY et al. 1998; DUBREMETZ 1998; PAREDES-SANTOS et al. 2012). Bradyzoiten und Tachyzoiten zeichnen sich durch eine gebogene sichelartige Form aus, wobei in Abhängigkeit des Entwicklungsstadiums Größe und Form erheblich variieren können (DUBEY et al. 1998).

Literaturübersicht

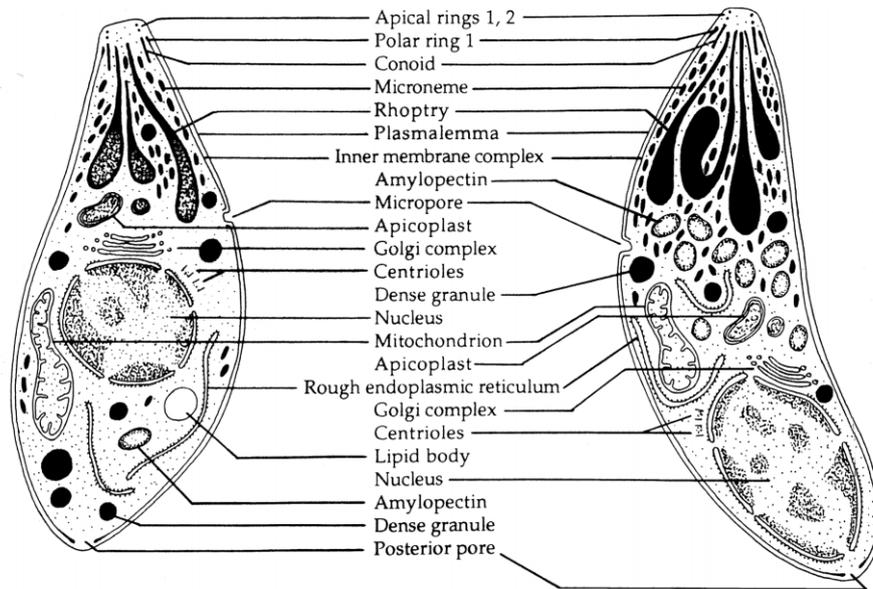


Abb. 1 Schematische Darstellung eines Tachyzoiten (links) und eines Bradyzoiten (rechts) von *T. gondii* (Quelle: DUBEY et al. 1998)

In Zwischen- und Endwirten können sich sowohl infektiöse Tachyzoiten sowie Bradyzoiten als die asexuellen Vermehrungsformen des Einzellers befinden. Ausschließlich im Endwirt können Oozysten produziert werden, welche mit dem Kot ausgeschieden werden (COOK et al. 2000; DUBEY 2022; TENTER et al. 2000), wie Abb. 2 dargestellt.

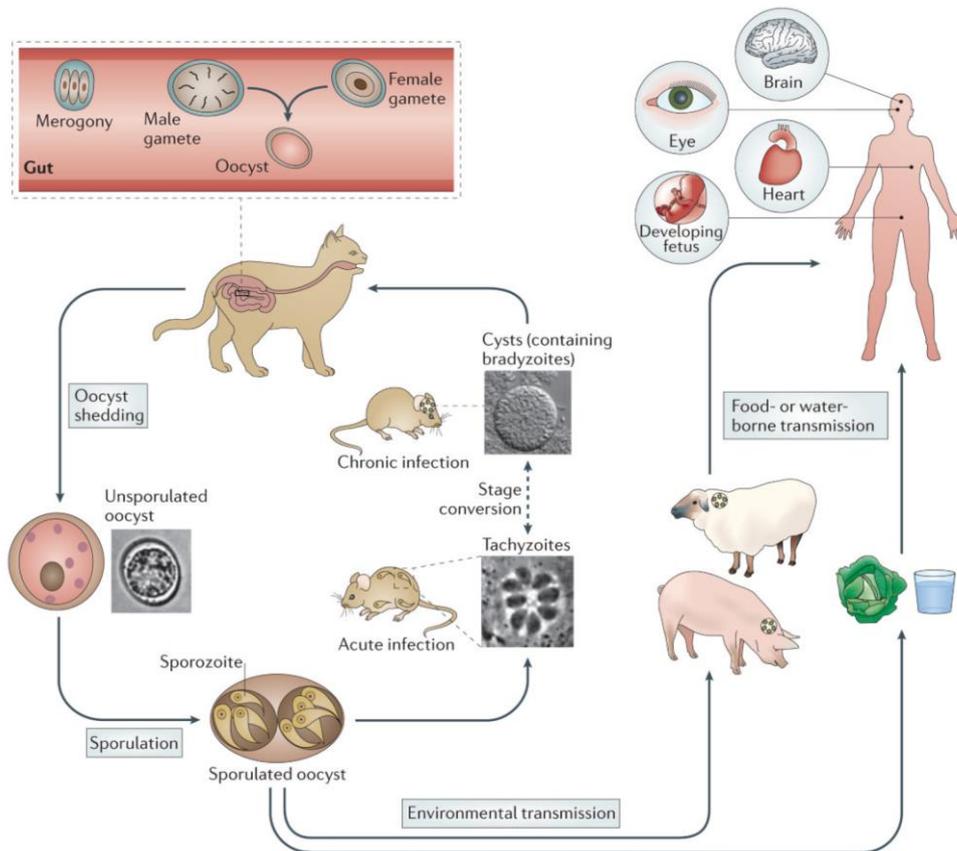


Abb. 2 Lebenszyklus von *T. gondii* (Quelle: HUNTER und SIBLEY 2012)

Werden infektiöse *T. gondii*-Stadien von Zwischen- oder Endwirten oral aufgenommen, durchlaufen sie eine extraintestinale ungeschlechtliche Entwicklung. Wird gewebezystenhaltiges Fleisch konsumiert, lösen proteolytische Enzyme im Magen die Wand der Gewebezysten auf, die Bradyzoiten werden frei und können die Darmepithelzellen des Wirtes invadieren. Bei oraler Aufnahme sporulierter Oozysten rupturiert die Oozystenwand erst im Darm, die Sporozoiten werden frei und penetrieren daraufhin das Darmepithel des Wirtes. In kernhaltigen Zellen des Dünndarmepithels konvertieren die Parasiten zu Tachyzoiten (DUBEY 1986; DUBEY et al. 1998). In der Wirtszelle zeichnen sie sich durch eine schnelle Replikationsphase (griechisch: *tachos* = schnell) aus; aufgrund dessen wurde der Begriff Tachyzoit durch FRENKEL (1973) geprägt. Tachyzoiten sind etwa 6 µm lang und haben einen Durchmesser von ca. 2 µm (DUBEY et al. 1998). Die Vermehrung findet im Zytoplasma kernhaltiger Zellen innerhalb einer membranbegrenzten parasitären Vakuole statt, die sich hauptsächlich aus Bestandteilen der Wirtszellmembran zusammensetzt und den Parasiten vor einer endolysomalen Schädigung schützt (SUSS-TOBY et al. 1996). Dort findet die ungeschlechtliche Endodyogenie (innere Zweiteilung) statt. Dabei entstehen neue Tochterzellen (PERIZ et al. 2019) bis sich die Wirtszelle vollständig mit Tachyzoiten füllt. Sobald die Wirtszelle dem Wachstum der Parasitenzellen nicht mehr standhalten kann, rupturiert sie schlussendlich. Es werden erneut benachbarte Zellen invadiert oder die freien Tachyzoiten werden über Blut und Lymphe, vornehmlich in das ZNS, Augen, Viszeralgewebe (innere Organe) sowie Skelett- und Herzmuskulatur, abgeschwemmt. Mit dem jeweiligen Medium bzw. Gewebe können die Tachyzoiten entsprechend durch orale Aufnahme oder Organtransplantate auf andere Wirte übertragen werden. Von besonderer Bedeutung ist jedoch die diaplazentare (vertikale) Übertragung der Tachyzoiten auf den Fötus, die im Falle einer Erstinfektion einer seronegativen Mutter während der Schwangerschaft auftreten kann und möglicherweise mit schwerwiegenden Folgen für den Fötus einhergeht (DUBEY et al. 1998; MONTOYA und LIESENFELD 2004; TENTER 2009; TENTER et al. 2000). Aufgrund der Labilität in der Umwelt sowie der Anfälligkeit gegenüber Säure und anderen Magensekreten spielen Tachyzoiten eher eine untergeordnete Rolle für Infektionen nach oraler Aufnahme (JACOBS et al. 1960; WEISS und KIM 2000). In seltenen Fällen, vermutlich aufgrund von Läsionen der Mund- bzw. Mulschleimhaut, ist ein Eindringen in den Wirt jedoch möglich. Bei einigen Tierarten, wie Schaf, Ziege und Rind, wurden Tachyzoiten in der Milch nachgewiesen, was zu einer Übertragung mit diesem Medium führen kann (TENTER et al. 2000). Nach der akuten Phase der Infektion und einer Immunabwehr des Wirtes, konvertieren die Tachyzoiten zu Bradyzoiten. Diese vermehren sich innerhalb von Gewebezysten durch ungeschlechtliche Endodyogenie in der nun chronischen Phase der Infektion. Die Replikation verläuft sehr langsam; aufgrund dessen prägte FRENKEL (1973) den Begriff Bradyzoit (griechisch: *brady* = langsam). Intrazelluläre Gewebezysten, die Bradyzoiten enthalten, können lebenslang reaktionslos persistieren, ohne den immunkompetenten Wirt zu schädigen, und stellen damit eine

latente Infektion dar. Gewebezysten wachsen langsam, einhergehend mit der Replikation der Parasiten. Dabei können junge Gewebezysten, die nur zwei Bradyzoiten enthalten, 5 µm klein sein und ältere, die hunderte von Bradyzoiten enthalten, können bis zu 100 µm groß sein. Die Form der Zysten ist je nach Gewebe variabel. Während sie im Gehirn eher kugelförmig und mit maximal 70 µm relativ klein sind, nehmen in der Muskulatur eine eher längliche Gestalt an und erreichen eine Größe von zu 100 µm (DUBEY et al. 1998). Gewebezysten können sich auch in Viszeralorganen wie Lunge, Leber und Nieren bilden. Die Prädilektionsstellen sind jedoch Neuronal- und Muskelgewebe wie das Gehirn, die Skelett- und Herzmuskulatur ferner die Netzhaut (FERGUSON und HUTCHISON 1987). Schon 6-7 Tage nach der Infektion mit Sporozoiten oder Bradyzoiten können sich Gewebezysten bilden (DUBEY 1997; DUBEY et al. 1998).

Anders als Tachyzoiten sind Bradyzoiten und Oozysten annähernd resistent gegenüber Säure und Magensekrete. Sie können ohne Verlust der Infektiosität den Magen passieren (JACOBS et al. 1960; WEISS und KIM 2000), um dann über das Darmepithel in die Wirtszellen einzudringen. Aufgrund dessen sind die meisten Infektionen mit *T. gondii* auf unzureichend gegartes Fleisch, welches Gewebezysten mit infektiösen Bradyzoiten enthält, oder auf die Aufnahmen von sporulierten Oozysten (die Sporozoiten enthalten) durch kontaminiertes Obst, Gemüse oder Wasser zurückzuführen. Eine Aufnahme von Oozysten ist darüber hinaus durch den direkten Umgang mit Katzen bzw. Katzenkot sowie mittels kontaminierter Erde während der Gartenarbeit möglich (WEISS und KIM 2000).

Die sexuelle Vermehrung des Parasiten findet ausschließlich im Dünndarmepithel von Endwirten statt, dazu gehören Katzen und andere Vertreter der Gattung *Felidae*. Nach Invasion der Dünndarmepithelzellen durchläuft der Parasit anfänglich mehrere asexuelle Teilungen bis die Gamogonie (sexuelle Entwicklungsphase) beginnt. Es kommt zur Differenzierung in männliche und weibliche Gametozyten, die sich nach ihrer Verschmelzung zu einer diploiden Oozyste entwickeln. Durch Rupturieren der Epithelzellen gelangen die entstandenen Oozysten in das Darmlumen und werden in großen Mengen mit dem Kot ausgeschieden (FRENKEL et al. 1970; FREYRE et al. 1989). Im Durchschnitt scheiden jedoch nur etwa 1 % der Katzenpopulation weltweit Oozysten aus, da die Ausscheidung nur in einem sehr kurzen Zeitraum, ca. 1-2 Wochen, nach Infektion der Tiere erfolgt. Allerdings ist die ausgeschiedene Parasitenmenge so hoch, dass es zu einer weitreichenden Kontamination der Umwelt kommt. In der Umwelt sporulieren die Oozysten innerhalb von 1-5 Tagen, in Abhängigkeit von Temperatur und Luftfeuchtigkeit. Die sporulierten Oozysten enthalten zwei Sporozysten mit je vier Sporozoiten. Diese können in der Umwelt vor allem unter günstigen feuchten Bedingungen Monate bis Jahre infektiös bleiben (DUBEY 2022; DUBEY et al. 1998; FERGUSON et al. 1979; TENTER et al. 2000). Die Zeit zwischen oraler Aufnahme infektiöser *T. gondii*-Stadien bis zum Ausscheiden von

Oozysten wird als Präpatenzzeit bezeichnet. Sie unterscheidet sich je nach aufgenommenem Parasitenstadium und -stamm. Bei Bradyzoiten beträgt die Präpatenzzeit nur ca. 3-10 Tage und bei Oozysten deutlich mehr, denn erst ab dem 18. Tag werden Oozysten ausgeschieden (DUBEY 1996a). Bei der Inokulation von Tachyzoiten sind es ca. 13 Tage (DUBEY 1998). Weiterhin scheiden nur ca. 30 % der Katzen nach Aufnahme von Oozysten oder Tachyzoiten selbst auch Oozysten aus. Allerdings scheiden nahezu alle Katzen nach der Inokulation von Bradyzoiten Oozysten aus (DUBEY 1998; DUBEY und FRENKEL 1976).

Insekten können sich nicht mit *T. gondii* infizieren, dennoch können sie als Transportwirte fungieren. So können koprophage Arthropoden, Schnecken und Würmer Oozysten aufnehmen und sie unverändert wieder ausscheiden. Werden diese Insekten vor dem Ausscheiden der Parasiten von anderen Tieren mit der Nahrung aufgenommen, sind die Oozysten noch infektiös und können potentiell neue Wirte infizieren (CHINCHILLA und RUIZ 1976; WALLACE 1971; WOKE et al. 1953).

2.2 Toxoplasmose beim Menschen

2.2.1 Klinische Manifestation

Die Erkrankung mit dem Erreger *T. gondii* wird als Toxoplasmose bezeichnet. Bezugnehmend auf klinische Symptome lassen sich drei Formen der Toxoplasmose unterscheiden: die pränatale Toxoplasmose, die postnatale Toxoplasmose bei immunkompetenten sowie bei immunsupprimierten Personen. Die konnatale Infektion mit *T. gondii* ist in Deutschland bei direktem Erregernachweis oder indirekten Nachweis von Antikörpern laut Infektionsschutzgesetz meldepflichtig (ANON. 2000; RKI 2018).

Eine Infektion mit *T. gondii* verläuft in den meisten Fällen bei immunkompetenten Menschen asymptomatisch oder geht mit milden Symptomen, wie einer generalisierten Lymphknotenschwellung bis zu leichten grippeähnlichen Symptomen, einher. Eine überstandene Infektion führt bei diesen Personen zur Ausbildung von Antikörpern und somit zu einer lebenslangen Immunität. Klinische Erkrankungen sind weitestgehend auf Risikogruppen beschränkt (TENTER et al. 2000).

Vor allem für den Fötus einer seronegativen Mutter kann die Infektion schwerwiegende Folgen haben. Das Risiko für klinisch manifeste Erscheinungen des Kindes ist höher bei einer Infektion zu Beginn der Schwangerschaft. So ist die Wahrscheinlichkeit für schwere Folgen des Fötus am höchsten, wenn eine Infektion in der 24.-30. Schwangerschaftswoche auftritt (DUNN et al. 1999). Das Infektionsrisiko des Fötus steigt während der Schwangerschaft, jedoch sinkt im Verlauf der Gravidität das Risiko für schwere klinische Manifestationen des Fötus (GROß et al. 2001). Findet eine Infektion allerdings 4-6 Monate vor der Schwangerschaft oder eher statt,

verhindert die erworbene Immunkompetenz der Mutter in der Regel die vertikale Übertragung von Tachyzoiten auf den Fötus. In seltenen Fällen kann es bei Frauen mit einer Immundefizienz, zum Beispiel aufgrund einer systemischen Lupus erythematodes Erkrankung oder AIDS, zur vertikalen Übertragung von *T. gondii* auf das ungeborene Kind kommen (TENTER et al. 2000). Die klassischen Symptome einer kongenitalen Infektion umfassen die Triade Chorioretinitis, intrakranielle Verkalkungen und Hydrozephalus. Weiterhin häufig beobachtete Symptome sind Strabismus, Amaurosis, Uveitis, Katarakt ferner andere Retinopathien, Mikrozephalie, Enzephalitis und infolgedessen epileptiforme Erscheinungen, aber auch Ikterus, Myokarditis, Pneumonie, Hepatosplenomegalie sowie ossäre Läsionen bis hin zum Abort des Fötus können auftreten. Häufig erscheinen die Neugeborenen dennoch symptomlos und die klinischen Erscheinungen fallen erst nach Monaten oder Jahren auf, was den Rückschluss auf eine ursächliche *T.-gondii*-Infektion in der Schwangerschaft erschwert (REMINGTON 2011).

Für Menschen mit einer zugrundeliegenden Immunschwäche anderer Genese kann eine Infektion mit *T. gondii* schwere Folgen haben. Infektionen sind bei dieser Personengruppe zusätzlich durch Organtransplantate, die Gewebezysten enthalten, aber auch durch eine Reaktivierung latenter Infektionen in Folge einer erworbenen Immunsuppression möglich. Folglich tritt häufig eine Enzephalitis, durch nekrotische Veränderungen bestehender Zysten im Gehirn auf. Weiterhin ist eine pulmonale Manifestation mit Bronchitis oder eine Pneumonie möglich, darüber hinaus unspezifische Wesensveränderungen, Lähmungserscheinungen, Krampfanfälle, Kopfschmerzen, Gleichgewichtsstörungen, Sehstörungen oder Fieber bis hin zum Tod sind möglich. Menschen mit AIDS entwickeln häufig eine Toxoplasmen-Enzephalitis, welche trotz Behandlung bei diesen Patienten tödlich verlaufen kann (TENTER et al. 2000).

2.2.2 Risikofaktoren

Soziodemographische und epidemiologische Daten werden zur Ermittlung von *T.-gondii*-spezifischen Risikofaktoren genutzt. Damit lässt sich die Wahrscheinlichkeit für eine Erkrankung besser einschätzen. In wissenschaftlichen Studien werden neben der Seroprävalenz der Bevölkerung häufig entsprechend assoziierte Risikofaktoren ermittelt, welche mögliche Erklärungen für die stark variierende Seroprävalenz der Bevölkerungsgruppen und der territorialen Gebiete darstellen können (DUBEY 2022).

In Deutschland steigt mit zunehmendem Alter die Wahrscheinlichkeit, sich mit *T. gondii* zu infizieren. Parallel nimmt die Immunsuppression im Alter zu; folglich können für diese Personengruppe schwerwiegende Folgen aus einer *T.-gondii*-Infektion resultieren (WILKING et al. 2016). Ähnliche Beobachtungen machten JONES et al. (2009) in den USA, demnach ist eine positive Korrelation der Bevölkerung zwischen

Seroprävalenz und Alter festzustellen. Generell wurde das Alter in verschiedenen Studien als Risikofaktor ermittelt (BOBIĆ et al. 1998; HOFHUIS et al. 2011; JENUM et al. 1998; JONES et al. 2007; KOLBEKOVA et al. 2007; KORTBEEK et al. 2004; NASH et al. 2005).

Weiterhin stellte sich heraus, dass Männer in Deutschland (WILKING et al. 2016) sowie in den USA (JONES et al. 2009; JONES et al. 2007) statistisch signifikant häufiger seropositiv sind als Frauen. Vermutlich besteht ein enger Zusammenhang mit den Essgewohnheiten. In Deutschland nehmen Männer etwa doppelt so viel Fleisch und Fleischprodukte zu sich wie Frauen (MRI 2008).

Eine erhöhte Exposition mit *T. gondii* besteht für Menschen, deren Essgewohnheiten einen hohen Anteil von rohem bzw. nicht ausreichend gegartem Fleisch beinhalten (BOBIĆ et al. 1998; HOFHUIS et al. 2011; KOLBEKOVA et al. 2007; TENTER 2009). In den USA wurde der Verzehr von lokal hergestelltem gepökeltem, getrocknetem oder geräuchertem Fleisch dabei insbesondere Lammfleisch oder rohes Rinderhackfleisch als Risikofaktor ermittelt (JONES et al. 2009). COOK et al. (2000) ermittelten den Konsum von unzureichend gegartem Fleisch der üblichen Nutztiere als erhöhtes Risiko für eine *T.-gondii*-Infektion. Hauptsächlich wurde dabei der Verzehr des Fleisches sonstiger Tierarten, zu denen Wildtiere wie jagdbare Vögel, Pferde, Hasen und Walarten gehören, mit *T.-gondii*-Infektion assoziiert (COOK et al. 2000). Ebenso wurde das Verfüttern von rohem Fleisch an Hunde und damit einhergehend ein häufiger Umgang mit Fleisch in dem UK als Risikofaktor ermittelt (NASH et al. 2005).

Weiterhin wurde der tägliche Umgang mit Tieren bzw. Fleisch, wie es bei einschlägigen Berufen, beispielsweise in der Landwirtschaft oder als Schlachthofmitarbeiter bzw. als Metzger, der Fall ist, wiederholt als Risikofaktor ermittelt (JONES et al. 2009; KORTBEEK et al. 2004). Um das bestehende Risiko, welches von Fleisch bzw. Tierprodukten ausgeht, besser einschätzen zu können, sind Daten der parasitären Belastung bei Nutztieren und die Ermittlung von Risikofaktoren unerlässlich (TENTER 2009).

Der Unterschied zwischen dem Leben in ländlichen Regionen gegenüber städtischen Regionen wird zum Teil mit einem erhöhten Risiko für eine *T.-gondii*-Exposition in Zusammenhang gebracht (KORTBEEK et al. 2004; NASH et al. 2005), andererseits wurde schon gegenteiliges ermittelt (HOFHUIS et al. 2011).

Des Weiteren wurden in den USA Menschen mit einem niedrigen Bildungsstand (HOFHUIS et al. 2011) und diejenigen, die unterhalb der Armutsgrenze leben, vermehrt *T.-gondii*-Antikörper positiv getestet (JONES et al. 2007).

Bezugnehmend auf die Übertragung von Oozysten wurde der Kontakt und das Zusammenleben mit Katzen wiederholt mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für eine Seropositivität in Zusammenhang gebracht. Zudem wurde für die Bevölkerung in

Deutschland eine positive Korrelation festgestellt (WILKING et al. 2016) sowie in den Niederlanden (HOFHUIS et al. 2011) und in den USA ab einer Anzahl von 3 Katzen im Haushalt (JONES et al. 2009). Teilweise wurde die erhöhte Exposition von Katzenhaltern nicht bestätigt (BOBIĆ et al. 1998; NASH et al. 2005). Weiterhin konnte Gartenarbeit in einigen Studien nicht als erhöhtes Risiko für eine Toxoplasmose bestätigt werden (NASH et al. 2005). In den Niederlanden hingegen wurde ab 5 Stunden Gartenarbeit pro Woche eine erhöhte Seroprävalenz ermittelt (KORTBEEK et al. 2004). Gleichermaßen stellte sich bei jungen Frauen in Jugoslawien die Gartenarbeit (BOBIĆ et al. 1998) und der vermehrte Kontakt mit Erde (COOK et al. 2000) als Risikofaktor heraus.

Faktoren, die sich mit einer niedrigen Seroprävalenz assoziiert herausstellten, sind vegetarische Essgewohnheiten (PLEYER et al. 2019) und ein hoher sozioökonomischer Lebensstandard (HOFHUIS et al. 2011; JONES et al. 2007; KORTBEEK et al. 2004; PLEYER et al. 2019).

2.2.3 Seroprävalenz

Toxoplasma gondii ist weltweit verbreitet. Es wird angenommen, dass bis zu ein Drittel der Weltbevölkerung mit dem Parasiten in Kontakt getreten ist und Antikörper gebildet hat (DUBEY 2022; JACKSON und HUTCHISON 1989). Die geschätzten Prävalenzen der Bevölkerung variieren allerdings sehr stark zwischen den Ländern, gleichwohl innerhalb von geografischen Gebieten, vorwiegend geprägt durch verschiedene ethnische Gruppen sowie Lebens- bzw. Essgewohnheiten. So wurden weltweit in den Bevölkerungsgruppen Seroprävalenzen zwischen 0 und 100 % ermittelt (TENTER 2009). Generell sind die Werte der Bevölkerung in tropischen Gebieten höher und nehmen mit steigendem Breitengrad innerhalb Europas ab (PETERSEN et al. 2010).

In lateinamerikanischen Ländern, wie Argentinien, Brasilien, Kuba, Jamaika und Venezuela, wurden hohe Antikörperspiegel von 51-72 % detektiert. Ähnlich hoch ist die Seroprävalenz bei der Bevölkerung Westafrikas, wie im Golf von Guinea (Benin), Kongo, Kamerun, Gabun und Togo mit 54-77 % (TENTER et al. 2000).

Eine allgemein niedrige Seroprävalenz wurde vor allem in den Ländern Südostasiens, China und Korea mit 4-39 % detektiert des Weiteren in Ländern kälterer Klimazonen, wie Skandinavien (11-28 %) (TENTER et al. 2000). Für China lässt sich jedoch tendenziell in den letzten Jahrzehnten eine Steigerung der Bevölkerung mit *T.-gondii*-Antikörpern verzeichnen. Demzufolge wurde in den Jahren 2000-2010 noch eine Seroprävalenz von ca. 8 % detektiert und von 2011-2017 betrug die Seroprävalenz schon knapp 10 % ($p < 0,0001$). Ein Zusammenhang besteht vermutlich mit den veränderten Essgewohnheiten, wie dem vermehrten Konsum von rohem bzw. unzureichend gegartem Fleisch und dem Zelebrieren von Barbecue (DONG et al. 2018).

Gegensätzlich dazu stehen Daten aus den USA, demzufolge ist in den letzten Jahrzehnten eine fallende Seroprävalenz der Bevölkerung zu verzeichnen (JONES et al. 2007). Nach JONES et al. (2007) wurden 1988-1994 noch bei 14 % der Bevölkerung Antikörper gegen *T. gondii* detektiert und in den Jahren 1999-2004 waren es nur noch knapp 5 %. Die generell fallende Seroprävalenz zeigt sich anhand Studien in den Niederlanden. Demzufolge wurde in den Jahren 2000-2010 noch eine Seroprävalenz von ca. 41 % für die Bevölkerung geschätzt (KORTBEEK et al. 2004), wohingegen es 2006/2007 nur noch 26 % waren (HOFHUIS et al. 2011).

Selbst innerhalb Europas variiert die ermittelte Häufigkeit stark. Einer repräsentativen Studie zufolge wurde für Deutschland eine Seroprävalenz von 55 % angenommen, wobei eine Varianz zwischen den verschiedenen Regionen festgestellt wurde. Ursächlich für höhere Antikörperspiegel der Bevölkerung Ostdeutschlands (WILKING et al. 2016) werden die Essgewohnheiten, wie frischer „Hackepeter“ oder Mett diskutiert (WILKING et al. 2016). Denn diese Art von Fleischzubereitung, vornehmlich aus Schwein und Rind hergestellt, wird üblicherweise in Ostdeutschland und seltener in Westdeutschland konsumiert (BREMER et al. 2005; ROSNER et al. 2012). Eine ähnlich starke Varianz zeigt sich in den Niederlanden. Innerhalb der Landesgrenzen wurde festgestellt, dass Menschen, die im Westen der Niederlande leben, deutlich häufiger Kontakt mit *T. gondii* hatten als im restlichen Landesgebiet. Ursächlich dafür werden die verschiedenen Urbanisierungsgrade diskutiert (HOFHUIS et al. 2011). Verglichen zu Deutschland, stellt sich Jugoslawien als stärker belastet dar. Es wurden bei 77 % der schwangeren Frauen Antikörper nachgewiesen (BOBIĆ et al. 1998). Ähnlich hoch sind die Werte bei schwangeren Frauen in Frankreich (71 %) (JEANNEL et al. 1988). Gegensätzlich dazu stellten sich Tschechien mit 23 % (KOLBEKOVA et al. 2007), UK mit 9 % (NASH et al. 2005) und Norwegen mit ca. 11 % (JENUM et al. 1998) serologisch positiven Personen als eher gering belastete Länder innerhalb Europas dar.

Die durchgeführten Studien zur Seroprävalenz wurden allerdings immer mit einer unterschiedlichen Anzahl von Probanden sowie verschiedenen Bevölkerungsgruppen wie Schwangeren (JEANNEL et al. 1988; JENUM et al. 1998; NASH et al. 2005) oder Soldaten (KOLBEKOVA et al. 2007) durchgeführt. Teilweise wurden unterschiedliche Tests zum indirekten Nachweis von *T. gondii* verwendet, welche mit verschiedenen Detektionsgrenzen sowie Sensitivität und Spezifität einhergehen. Diese Parameter machen die Studienergebnisse nur bedingt vergleichbar (DUBEY 2022; TENTER et al. 2000).

2.3 Toxoplasmose beim Tier

2.3.1 Klinische Manifestation

Grundsätzlich können sich alle warmblütigen Tiere mit *T. gondii* infizieren. Je nach Tierart und immunologischem Status kann der Wirt keine bzw. mehr oder weniger stark ausgeprägte Symptome zeigen. Dementsprechend ist die Immunreaktion nach erfolgter Infektion zeitlich und in ihrer Intensität variabel (DUBEY 2022).

Klinische Erkrankungen treten selten bei Tieren auf, vornehmlich jedoch bei Feten, Jungtieren oder Immunsupprimierten. So kommt es in seltenen Fällen bei Hunden, assoziiert mit Staupe-Infektionen, und bei Katzen, multifaktoriell, folglich einer *T.-gondii*-Infektion zu Anorexie, Pneumonie, Hepatitis, Ikterus, Diarrhoe, Enzephalitis, Nephritis, Anämie, Lymphknotenschwellung, Fieber, Myokarditis, Myositis oder dermalen Läsionen. Speziell bei Hunden sind die häufigsten Symptome Pneumonie, Ataxie und Diarrhoe (DUBEY 2022; ELMORE et al. 2010). Andere Canide (Hundeartige), vornehmlich Wölfe (*Canis lupus*) und Kojoten (*Canis latrans*), gelten trotz eines hohen Grades an Durchseuchung als resistent gegen klinische Symptome (DUBEY et al. 2021). Bei Nerzen, die häufig in Pelzfarmen gehalten werden, konnten hohe Verluste durch Aborte, Totgeburten und verringerte Futteraufnahmen auf einen *T.-gondii*-Ausbruch zurückgeführt werden. Es zeigten sich Läsionen in Form einer interstitiellen Pneumonie, Enzephalitis, Enzephalomalazie, Karditis und Myokarditis (FRANK 2001). Ebenso ist *T. gondii* bei kleinen Wiederkäuern ein wichtiger Erreger, bezugnehmend auf die Epidemiologie von Aborten. So kann es regional zu starken Verlusten durch Aborte, Totgeburten ferner Kümmern Neugeborener kommen (DUBEY 2022). Schweine zeigen nur vereinzelt klinische Symptome infolge einer *T.-gondii*-Infektion, zum Teil wurden Fieber, Anorexie, Dyspnoe sowie Todesfälle beobachtet (DUBEY 2009).

2.3.2 Prävalenz in verschiedenen Tierarten

T. gondii wird weltweit indirekt oder direkt im Gewebe von Tieren nachgewiesen. Die Prävalenz der verschiedenen Wirtsspezies unterscheidet sich sehr stark. Ebenso variiert die zeitliche und quantitative Persistenz des Erregers je nach befallener Tierart und befallenem Gewebe sehr stark (DUBEY 2022; OPSTEEGH et al. 2011). Eine hohe Anzahl an Gewebezysten wurden häufig bei Schweinen, Schafen und Ziegen nachgewiesen, gefolgt von Geflügel in Freilandhaltung, Kaninchen, und Wildtieren, weniger häufig hingegen bei Pferden sowie Geflügel in kommerzieller Haltung und nur sporadisch im Fleisch von Rindern (TENTER und FEHLHABER 2002; TENTER et al. 2000). Die Varianz wird vornehmlich entsprechend ihrer Haltungsbedingungen bzw. ihrem natürlichen Habitat, dem Alter der Tiere, der speziesspezifischen Ernährung und der Region, in der sie leben zugeschrieben und zum Teil gibt es entscheidende geschlechtsspezifische Unterschiede (DUBEY 2022). Beispielsweise wurden bei

freilaufenden Katzen deutlich häufiger Infektionen nachgewiesen als bei Wohnungskatzen. Katzen in Thailand haben mit ca. 5 % eine deutlich geringe Seroprävalenz im Vergleich zu Katzen, die frei in Europa leben. So wurden in Frankreich bis zu 79 % der freilebenden Katzen seropositiv getestet. Bei Hunden stellte sich heraus, dass Tiere, die in ländlichen Regionen leben, generell häufiger infiziert sind als Tiere, die in Städten leben (DUBEY 2022).

Essentiell sind die Daten zur Prävalenz von *T. gondii* bei lebensmittelliefernden Tieren. Schafe und Ziegen in Europa sind sehr stark durchseucht. In der Schweiz lebende Ziegen wiesen eine Seroprävalenz von ca. 46 % und Schafe ca. 62 % auf (BERGER-SCHOCH et al. 2011). Eine geringere Seroprävalenz wurde bei Hausschweinen in der Schweiz mit ca. 23 % Seropositiven detektiert (BERGER-SCHOCH et al. 2011). KIJLSTRA et al. (2004) wiesen in einer vergleichenden Studie zur Prävalenz von *T. gondii* bei Hausschweinen aus verschiedenen Haltungssystemen in den Niederlanden nach, dass Tiere die in einer Stallhaltung mit einer geringeren Exposition, weniger häufig Antikörper entwickeln als Tiere, die in einer Freilandhaltung gemästet werden. Entsprechend wurden alle beprobten Tiere aus konventioneller Tierhaltung im Stall negativ, dagegen wurden 2,9 % der Schweine aus tierfreundlichen Haltungssystemen positiv auf Antikörper gegen *T. gondii* getestet. Ähnliche Beobachtungen machte DUBEY (2009). Schweine in Freilandhaltung sind deutlich häufiger mit *T. gondii* infiziert als Schweine in konventionellen Haltungssystemen mit hoher Biosicherheit. In den letzten Jahrzehnten optimierten sich die Hygienebedingungen in konventionellen Stallhaltungen so, dass die Seroprävalenz in Hausschweinebeständen deutlich gesunken ist (DUBEY 2009), denn 1964 wurde zum Teil noch eine Seroprävalenz von ca. 98 % nachgewiesen (BOCH et al. 1964). In China wurde, nach einem Afrikanischen Schweinepest Ausbruch und einer damit verbundenen kompletten Bestandssanierung sowie erhöhten externen und internen Biosicherheitsmaßnahmen, die Seroprävalenz in einem Schweinestall sogar auf ca. 1 % gesenkt (XIE et al. 2021).

Im Vergleich zu Hausschweinen haben Wildschweine eine deutlich höhere Exposition, sich in der Umwelt entweder über Oozysten oder durch Gewebezysten zu infizieren. Häufig wird bei Wildschweinen entsprechend eine höhere Seroprävalenz nachgewiesen. So stellten sich ca. 7 % der in der Schweiz lebenden Wildschweine als seropositiv heraus (BERGER-SCHOCH et al. 2011). Kürzlich wurde bei Wildschweinen in Deutschland eine Seroprävalenz von 14-24 % detektiert (BIER et al. 2020; STOLLBERG et al. 2021). Wildschweine haben als Allesfresser ein breites Ernährungsspektrum und somit eine höhere Exposition als pflanzenfressende Wildtiere. Entsprechend konnte in Deutschland bei anderen jagdbaren Wildtierarten, wie Rot- und Rehwild, eine niedrigere Seroprävalenz von ca. 6-13 % detektiert werden (BIER et al. 2020; STOLLBERG et al. 2021). Im Gegensatz dazu wurde für wildlebende Füchse in Deutschland eine Seroprävalenz von 79 % ermittelt (HERRMANN et al. 2012). Ähnlich wie bei anderen Tieren wurde bei wilden Füchsen, im Vergleich zu

Füchsen die auf Farmen gehaltenen werden, eine deutlich höhere Seroprävalenz detektiert (DUBEY et al. 2021). Weiterhin konnten bei wild lebenden Nagetieren in Deutschland (n = 72) keine Antikörper gegen *T. gondii* nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse, wenn auch limitiert auf eine geringe Probenanzahl, geben Hinweis darauf, dass die Infektion der Wildtiere eher auf die Übertragung mittels Oozysten zurückzuführen ist (HERRMANN et al. 2012).

2.3.3 Toxoplasmose bei Waschbären

Waschbären fressen annähernd alles, sie suchen ihre Nahrung im Müll, konsumieren Erde und Pflanzen, weshalb sie als gute Indikatoren für *T.-gondii*-Infektionen in der Umwelt betrachtet werden (DUBEY et al. 2021). MOLLER und NIELSEN (1964) beschrieben 1964 zum ersten Mal bei zwei weiblichen Waschbären eine *T.-gondii*-Infektion. Die Tiere zeigten neurologische Auffälligkeiten. Es stellte sich eine akute, disseminierte Form der Toxoplasmose heraus mit fokaler Nekrose der Lunge, Leber und Herz sowie glialen Knötchen im ZNS. Diese Tiere waren zusätzlich mit dem Caninen Staupevirus infiziert, was vermuten lässt, dass das Virus ausschlaggebend für eine akute Toxoplasmose-Infektion sein kann bzw. zur Entwicklung von latenten Toxoplasmose-Infektionen beiträgt (MOLLER und NIELSEN 1964). Daraufhin wurden vor allem in den USA verschiedene Studien durchgeführt, bei denen Waschbären serologisch auf das Vorhandensein von *T.-gondii*-Antikörpern getestet wurden. Angewendet wurden der Sabin-Feldmann-Test (SFT), der indirekte Hämagglutinationstest (IHAT), der modifizierte Agglutinationstest (MAT) und Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA). Dabei wurde eine breite Spanne an Seroprävalenz der Waschbären ermittelt, von 18 % Seropositiven mittels IHAT in Florida (BURRIDGE et al. 1979) bis zu 84 % in Virginia mittels MAT (HANCOCK et al. 2005).

Seit den letzten Jahrzehnten steigt die Zahl der Waschbären in Deutschland stark an, was sich in den Streckenzahlen des DJV widerspiegelt (DJV 2022). Somit besteht in Deutschland und den angrenzenden Ländern zunehmend Interesse an Waschbären. Mit steigendem Interesse beschäftigen sich auch mehr Wissenschaftler mit Untersuchungen von Waschbären in Deutschland und ganz Europa (BARTOSZEWICZ et al. 2008; BELTRÁN-BECK et al. 2012; GARCÍA et al. 2012; MAAS et al. 2021; RENTERÍA-SOLÍS et al. 2018; RENTERÍA-SOLÍS 2015). Bezugnehmend auf *T. gondii* wurden in Europa bereits stark variierende Ergebnisse bei Waschbären in Seroprävalenzstudien erzielt. Die Varianz zeigt sich in Abhängigkeit der verwendeten Untersuchungsmethode, der Probengröße, der geografischen Region und dem untersuchten Medium (siehe Tab. 1). So wurde das Blut von Waschbären aus Deutschland serologische mittels MAT untersucht, dabei detektierten HEDDERGOTT et al. 2017 insgesamt eine Seroprävalenz von ca. 38 % (n = 433). Für

Hessen wurden 1998 bei 56 Waschbären mittels IHAT eine Seroprävalenz von 26 % ermittelt (GEY 1998), während HEDDERGOTT und MÜLLER (2020) bei knapp 66 % der untersuchten 93 Waschbären Antikörper detektierten. Circa 36 % der in Brandenburg lebenden Waschbären wurden durch die Untersuchung des Fleischsaftes mittels ELISA als *T. gondii* positiv ermittelt (KORNACKA et al. 2018). In den typischen *T.-gondii*-Prädilektionsstellen wurde mittels PCR (Polymerase Chain Reaction) bei Waschbären aus Deutschland, Polen und Tschechien *T.-gondii*-DNA nachgewiesen (KORNACKA et al. 2018; SROKA et al. 2019). Jedoch wurden bislang keine Untersuchungen von konsumrelevanten-Fleischteilen sowie keine Quantifizierung der DNA-Äquivalente bei Waschbären durchgeführt. Für andere Tierarten liegen diesbezüglich Daten vor, wie für Puten (KOETHE et al. 2015). Diese quantitativen Daten sind unerlässlich für eine potentielle Risikoabschätzung und um effizientere Strategien zur Verringerung der Übertragung von *T. gondii* auf den Verbraucher zu ermitteln (TENTER 2009).

Tab. 1 *T.-gondii*-Seroprävalenz bei Waschbären in Europa

Land	Positive/Untersuchte (Seroprävalenz [%])	Test	Medium	Referenz
Deutschland	30/50 (26,0)	IHAT	Blut	(GEY 1998)
Deutschland	4/12 (33,3)	ELISA	Fleischsaft	(KORNACKA et al. 2018)
Deutschland	166/433 (38,3)	MAT	Blut	(HEDDERGOTT et al. 2017)
Deutschland	61/93 (65,6)	MAT	Blut	(HEDDERGOTT und MÜLLER 2020)
Polen	2/15 (13,3)	ELISA	Fleischsaft	(KORNACKA et al. 2018)
Tschechien	0/17 (0,0)	ELISA	Fleischsaft	(KORNACKA et al. 2018)
Luxemburg	4/21 (19,0)	Blut	MAT	(HEDDERGOTT et al. 2017)

2.4 *T. gondii* in Lebensmitteln

2.4.1 Vorkommen in Lebensmitteln

Die postnatalen Hauptübertragungswege von *Toxoplasma gondii* sind zum einen gewebezystenhaltiges Fleisch und zum anderen Nahrungsmittel, die mit Oozysten kontaminiert sind (TENTER und FEHLHABER 2002). Tachyzoiten sind bei der vertikalen Übertragung entscheidend, werden andererseits nur selten in Verbindung mit Infektionen nach oraler Aufnahme gebracht (COOK et al. 2000). Nach SLIFKO et al. (2000) und SCALLAN et al. (2011) ist davon auszugehen, dass ca. 50 % der Infektionen mit *T. gondii* bei Menschen lebensmittelbedingt sind. Daten von Toxoplasmose Ausbrüchen deuten darauf hin, dass ein Großteil der Infektionen auf den Konsum von unzureichend erhitztem Fleisch zurückzuführen ist (SLIFKO et al. 2000). Speziell in Europa wurde festgestellt, dass die häufigsten Quellen für *T.-gondii*-Infektionen der Verzehr von rohem Fleisch während der Speisezubereitung, rohes bzw. nicht ausreichend gegartes Fleisch generell und gepökelte Fleischerzeugnisse darstellen (BARIL et al. 1999; COOK et al. 2000). Primär spielen Fleisch und Fleischprodukte von Rind, Lamm, Pferd sowie Wildtieren, Wildvögeln und Hasen eine Rolle, hingegen kein Schweinefleisch (COOK et al. 2000). Vorwiegend Wildbret stellte sich wiederkehrend als Ursache für schwere Krankheitsverläufe einer Toxoplasmose heraus (CARME et al. 2002; ROSS et al. 2001), was vermutlich auf die höhere Belastung von Wildtieren mit *T. gondii* zurückzuführen ist (DUBEY 2022). Rohes Fleisch und Rohfleischerzeugnisse gelten als Gefahr, Gewebezysten mit Bradyzoiten zu enthalten. Hauptsächlich zählt dazu unzureichend erhitztes Fleisch. Dabei spielt der zunehmende Trend der Bevölkerung von Barbecue, bzw. primär der Verzehr von „medium“ Steak und allen Variationen im Sinne von „rare“, „medium rare“ etc. eine entscheidende Rolle (BfR 2018; TENTER und FEHLHABER 2002). Weiterhin kann mittels Zubereitungen aus Wildfleisch mit einem rosa Kern, wie Carpaccio, eine Erregerübertragung stattfinden (TENTER und FEHLHABER 2002). Pökel- und Räucherprozesse können Gewebezysten abtöten. Die Inaktivierung ist jedoch stark abhängig von den Bedingungen während des Herstellungsprozesses, wie der Salzkonzentration, der Wasseraktivität sowie der Reifungszeit (BfR 2018). Entsprechend gibt es unterschiedliche Bewertungen für gepökelte Fleischerzeugnisse. Wiederholt wurde der Verzehr von gepökelttem Fleisch als Risikofaktor für eine *T.-gondii*-Infektion ermittelt (BARIL et al. 1999; COOK et al. 2000; JONES et al. 2009). Darüber hinaus konnten WARNEKULASURIYA et al. (1998) bei der Untersuchung von 67 verzehrfertigen Pökelfleischprodukten in einem der Produkte infektiöse *T.-gondii*-Stadien nachweisen und diskutieren ursächlich einen fehlerhaft durchgeführten Pökelprozess. Allgemein gelten Rohwurstprodukte wie Salami, Rohschinken, getrocknetes oder gepökeltes Fleisch laut BfR (2018) als sicher in Bezug auf *T. gondii*. Bei einer ausreichend langen Lagerung, nimmt die Infektiosität ab (TENTER und

FEHLHABER 2002). Jedoch konnten GOMEZ-SAMBLAS et al. (2015) infektiöse *T. gondii*-Stadien in Serrano-Schinken nachweisen. Weiterhin kann potentiell eine Gefahr von nur kurz gereiften Fleischprodukten, wie Mett- und Teewurst ausgehen (BfR 2018; TENTER und FEHLHABER 2002), aber auch Salami oder nur kurze Zeit gelagerte ferner getrocknete Fleisch- und Wurstprodukte können noch infektiöse *T. gondii*-Stadien enthalten (COOK et al. 2000).

Tachyzoiten spielen eine eher untergeordnete Rolle bei der alimentären Erregerübertragung. Dennoch wurden Tachyzoiten unter anderem in Rohmilch lebensmittelliefernder Tiere, wie Schafe, Ziegen und Kühe nachgewiesen (DUBEY 2022; REMINGTON 2011; TENTER et al. 2000). Käseprodukte, hergestellt aus Ziegenrohmilch, wurden positiv auf *T. gondii* getestet und konnten mit erfolgten Infektionen assoziiert werden (DUBEY 2022). Weiterhin wurden *T. gondii*-Tachyzoiten bereits in rohen Hühnereiern nachgewiesen (JACOBS und MELTON 1966).

Zusätzlich ist eine alimentäre Übertragung von *T. gondii* sekundär mittels Oozysten belasteter Lebensmittel wie Obst, Gemüse und Wasser möglich (TENTER et al. 2000).

2.4.2 Prävention und Inaktivierung von *T. gondii*

Durch adäquate präventive Maßnahmen kann das Infektionsrisiko, welches von kontaminierten Lebensmitteln ausgeht, bedeutend gesenkt werden (TENTER und FEHLHABER 2002). Die Abtötung und die Inaktivierung von Zysten in tierischem Gewebe bzw. Oozysten aus der Umwelt spielt eine Schlüsselrolle, um humane und tierische Infektionen mit dem Erreger zu verhindern. Etabliert sind dafür üblicherweise thermische Methoden welche die Tenazität von *T. gondii* limitieren wie Erhitzen und Tiefkühlen (MIRZA ALIZADEH et al. 2018).

In feuchtem Milieu sind Oozysten mehrere Monate bis Jahre resistent. Aufgrund dessen ist eine Infektion mit kontaminiertem Wasser sowie durch Obst oder Gemüse, welches Oozysten auf der Oberfläche enthält, möglich. Die potentiell mit Parasitenstadien belasteten Lebensmittel sollten entsprechend gewaschen werden, um keine Gefahr für eine Infektion mehr darzustellen. Weiterhin ist eine Aufnahme von Oozysten während der Gartenarbeit mit kontaminierter Erde oder durch engen Kontakt zu Katzen, welche Oozysten ausscheiden, möglich. Nach etwaiger Exposition mit Oozysten sollten die Hände gründlich mit Wasser und Seife gereinigt werden, um Infektionen mit *Toxoplasma gondii* vorzubeugen. Tierhalter sollten Katzenkot täglich entfernen, um eine Sporulation von Oozysten in der Umwelt zu verhindern. Darüber hinaus sollten die genutzten Werkzeuge wie Schaufeln sollten täglich gründlich gereinigt werden (DUBEY 1986).

Fokussierend auf die Parasitenübertragung mittels Bradyzoiten durch die Aufnahme von gewebezystenhaltigem Fleisch sollte beim Umgang mit Rohfleisch auf Hygienestandards geachtet werden. Vielmehr gilt es, kritische Kontrollpunkte einzuhalten, um eine Kreuzkontamination zu vermeiden. Entsprechend sollte rohes Fleisch nie in Kontakt mit fertig zubereiteten Speisen oder Materialien, die noch anderweitig für die Nahrungszubereitung genutzt werden, kommen (MCCURDY et al. 2006). Nach COOK et al. (2000) stellt unzureichend erhitztes oder gepökelttes Fleisch bzw. Fleischprodukte die Hauptquelle für humane Infektionen mit *T. gondii* bei den Untersuchten in der Schweiz, Dänemark, Schweden, Belgien und Italien dar. Zu konsumierendes Fleisch sollte entsprechend nur gut durch erhitzt zu sich genommen werden. Schwangere Frauen sollten rohes bzw. unzureichend gegartes Fleisch meiden (DUBEY 1986), dies gilt auch für weitere vulnerable Gruppen, wie ältere Menschen, Kinder und Immunsupprimierte. Darüber hinaus ist die orale Aufnahme von Bradyzoiten während der Häutung von Wildtieren möglich. Dies stellte sich bei einer Studie in Kanada heraus, welche primär das Häuten von Wölfen, Füchsen und Mardern als Risikofaktor einer *T.-gondii*-Infektion bei schwangeren Frauen ermittelte (MCDONALD et al. 1990).

Die Tenazität der *T.-gondii*-Gewebezysten unterscheidet sich je nach Lebensmittel bzw. entsprechend der erfolgten Vorbehandlung mittels thermischer und nicht thermischer Maßnahmen (TENTER und FEHLHABER 2002). Zur Inaktivierung von infektiösen *T.-gondii*-Stadien in Fleisch und anderen Lebensmitteln kann eine Reihe von Maßnahmen ergriffen werden. Generell sind Gewebezysten im Vergleich zu Oozysten weniger stark resistent (DUBEY 1996b).

Thermische Maßnahmen haben einen Einfluss auf *Toxoplasma gondii*. Schon 1965 zeigten erste Versuche zur Tenazität von Gewebezysten in Fleisch einen Zusammenhang zwischen der zur Inaktivierung des Parasiten benötigten Temperatur und der Dicke der Fleischstücke. Diesbezüglich wurde festgestellt, dass eine Kurzzeiterhitzung über 5 Minuten bei 160-170 °C im Ölbad zum Frittieren von Schweinekoteletts mit einer Schichtdicke von 5 cm keine sichere Abtötung von *T. gondii* erreichte. Denn das Innere der entsprechenden Fleischstücke war zu diesem Zeitpunkt noch roh. Wurde das Fleisch jedoch in der Bratpfanne erhitzt, konnte schon nach 3 Minuten eine sichere Abtötung des Erregers erreicht werden (SOMMER et al. 1965). Spätere experimentelle Studien fanden heraus, dass Gewebezysten in Schweinefleisch bei einer Erhitzung auf 52 °C über 9,5 min lebensfähig blieben, allerdings bei 58 °C über 9,5 min inaktiviert wurden. Allgemein kann bei einer Temperaturerhöhung die Garzeit reduziert werden. Bei 61 °C oder höheren Temperaturen für 3,6 min wurden die Erreger sicher unschädlich gemacht. Somit sind *T.-gondii*-Gewebezysten allgemein weniger hitzeresistent als andere zoonotische Erreger im Fleisch, wie *Trichinella spiralis*. Je niedriger die Temperatur ist, bei der das Fleisch zubereitet wird, desto länger dauert es, bis der Erreger abgetötet wird (DUBEY et al. 1990). Bei einer Erhitzung in der Mikrowelle ist die Temperaturkontrolle schwer

möglich, infolgedessen ist das Fleisch häufig nicht ausreichend bzw. nicht gleichmäßig gegart und die *T.-gondii*-Stadien können noch infektiös sein (LUNDÉN und UGGLA 1992). Generell wird empfohlen, Fleisch auf mindestens 70 °C Kerntemperatur zu erhitzen, um *T. gondii* zu inaktivieren (DUBEY 1986; VAN SPRANG 1984). Um die Temperatur zu kontrollieren, ist es sinnvoll Thermometer zu nutzen (MCCURDY et al. 2006).

Die bei der Herstellung von Wurstwaren und Fleischerzeugnissen genutzten Temperaturen sind im Allgemeinen ausreichend, um *T.-gondii*-Gewebezysten abzutöten. Denn im Herstellungsprozess von Brühwürsten sind Temperaturen von 72-75 °C üblich und bei Kochwürsten ca. 80 °C. Kochschinken wird mit einer Kerntemperatur von 68-70 °C gegart, folglich sollte keine Gefahr, bezugnehmend auf *T. gondii*, von diesen Lebensmitteln ausgehen (TENTER und FEHLHABER 2002).

Bei einem Lagerungsprozess von frischer Schweinelende wurde festgestellt, dass *T. gondii* ab Tag 7 bei 0 °C seine Infektiosität verliert (HILL et al. 2006).

Weiterhin können *T.-gondii*-Stadien in Fleisch mittels Kältebehandlung inaktiviert werden. Dabei erwies sich ein Einfrierungsprozess unter -12,4 °C als effektiv. Bei einer Temperatur von -8 °C konnte nach 2,8 Tagen keine Infektiosität mehr festgestellt werden. Jedoch sind die benötigten Temperaturen zur Inaktivierung auch bei der Kältebehandlung stark abhängig von der Größe der Fleischteile, somit ist die Kerntemperatur entscheidend. Dennoch erwies sich *T. gondii* bei Einfrierversuchen labiler als *Trichinella-spiralis*-Larven (KOTULA et al. 1991). Nach nur eineinhalb Stunden bei -21 °C scheinen die meisten Gewebezysten ihre Infektiosität zu verlieren und nach 5 Stunden oder länger wurden keine infektiösen Stadien mehr festgestellt (HELLESNES und MOHN 1977).

Neben der thermischen Behandlung zur Inaktivierung des Erregers, können eine Reihe nichtthermischer Maßnahmen ergriffen werden. Häufig stehen diese Methoden in einem engen Zusammenhang (MIRZA ALIZADEH et al. 2018).

Dementsprechend haben Pökelprozesse einen Einfluss auf die Infektiosität von *T. gondii*. Dabei scheint die Nitritkonzentration im Pökelsalz der entscheidende Faktor zu sein (TENTER und FEHLHABER 2002). Bei einer 10-prozentigen Pökellake wurde *T. gondii* bei 4 °C nach 2 Tagen vollständig abgetötet und bei 15 °C nach nur einem Tag (SOMMER et al. 1965). Gewebezysten können mittels Nitritpökelsalz effektiver vergleichend zur Behandlung mit Kochsalz inaktiviert werden. Entsprechend konnten Gewebezysten nach nur einem Tag Inkubation mit 8-prozentigem Nitritpökelsalz inaktiviert werden, bei 8-prozentiger Kochsalzlösung waren die Gewebezysten nach 4 Tagen noch infektiös (LUNDÉN und UGGLA 1992). Weiterhin konnten HILL et al. (2006) zeigen, dass eine 2-prozentige Natriumchlorid Lösung sowie eine 1,4-prozentige Kalium- oder Natriumlaktat-Lösung nach etwa 8 Stunden *T.-gondii*-Gewebezysten in Schweinelenden abtöten. Bei der Behandlung mit Salz und Zucker ändern sich die osmotischen Druckverhältnisse, dadurch kommt es vermutlich zur Zerstörung der Parasiten (LUNDÉN und UGGLA 1992). Bei einem üblichen

Pökelvorgang mit Natriumchlorid und Saccharose sowie einer Einwirkzeit von 64 Stunden bei 4 °C wurden die *T.-gondii*-Stadien vollständig abgetötet (LUNDÉN und UGGLA 1992).

Beim Räuchern hingegen, werden häufig nicht die nötigen Temperaturen zum Abtöten von *T. gondii* erreicht. Jedoch fanden LUNDÉN und UGGLA (1992) nach dem Räucherprozess keine infektiösen Parasitenstadien mehr. Dies steht wahrscheinlich im Zusammenhang mit dem Pökelvorgang, der üblicherweise vor dem Räucherprozess stattfindet. In diesem Experiment wurde Natriumchloridlösung in das Fleisch injiziert und der Räuchervorgang bei +50 °C für 24-28 Stunden führte zum vollständigen Verlust der Infektiosität von *T. gondii* (LUNDÉN und UGGLA 1992). Experimente zur Rohwurstherstellung zeigten bei einer Kalträucherung (2 Tage bei 12-16 °C, danach 20 °C und 80-90 % Luftfeuchtigkeit), einer Schwitzräucherung (25-27 °C, 90-100 % Luftfeuchtigkeit) oder einer Lufttrocknung (12-15 °C mit minimaler Luftumwälzung) schon nach 2 Tagen eine Inaktivierung der *T.-gondii*-Stadien (SOMMER et al. 1965). Somit besteht bei Rohwürsten mit sehr kurzen Reifungsphasen ein mögliches Risiko, *T. gondii* zu übertragen, was vor allem bei frischen Mettwürsten oder rohen Hackfleischzubereitungen der Fall ist (TENTER und FEHLHABER 2002).

Weiterhin kann eine Bestrahlung von belastetem Fleisch die vorhandenen *T.-gondii*-Stadien inaktivieren. Dabei erwies sich eine γ -Bestrahlung mit einer Dosis von 0,5 kGy als erfolgreich, um Gewebezysten abzutöten (DUBEY 1996b). Jedoch ist die lebensmitteltechnologische Bestrahlung von Fleisch in der EU nicht zulässig (EFSA 2007).

Bei Hochdruckverfahren (High pressure processing, HPP) werden Lebensmittel mit einem Druck von bis zu 1000 MPa bearbeitet, um Mikroorganismen abzutöten. *T. gondii* konnte bei einer einminütigen Hochdruckbehandlung mit 340-400 MPa in Lebensmitteln inaktiviert werden. In diesem Zusammenhang sind weitere Studien nötig, um genaue Zeiten und den entsprechend benötigten Druck zu bestimmen (MIRZA ALIZADEH et al. 2018).

Schlussendlich sind die thermischen Verfahren die gebräuchlichen und haushaltsüblich anzuwendenden Methoden. Eine ausreichende Erhitzung oder Einfrierungsprozesse können leicht durchgeführt werden und führen zu einer sicheren Abtötung von *T.-gondii*-Gewebezysten, wenn die entsprechenden Kerntemperaturen eingehalten werden (BfR 2018; TENTER und FEHLHABER 2002).

2.5 Diagnostik

Abhängig vom Probenmaterial kann *T. gondii* direkt oder indirekt nachgewiesen werden. Die Diagnostik umfasst molekularbiologische, serologische und histologische Verfahren, sowie eine Kombination dieser Untersuchungsmethoden. Während der Nachweis von Tachyzoiten auf eine aktive Infektion hindeutet, bestätigt das

Vorhandensein von Gewebezysten eine latente Infektion und ist nicht mit der Diagnose einer klinischen Erkrankung gleichzusetzen (DUBEY 2022). Neben dem indirekten Nachweis in Form von Antikörpern kann nach erfolgter Extraktion aus dem Gewebe, die DNA des Erregers auch direkt nachgewiesen werden. Weiterhin kann ein direkter Erregernachweis durch Herstellung eines zytologischen Präparates aus einer Gewebsbiopsie und einer herkömmlichen Färbung, wie Giemsa, erfolgen. Einen Hinweis auf bestehende Infektiosität von *T. gondii* erhält man nur durch die Anwendung von Bioassays mit Versuchstieren (üblicherweise Katzen oder Mäuse) oder Zellkulturen (DUBEY 2022).

2.5.1 Serodiagnostik

Der Nachweis von *T. gondii*-Antikörpern gehört zur indirekten Diagnostik. Immunglobuline können im Vollblut, Plasma, Serum, Milch, Körperflüssigkeiten und Fleischsaft nachgewiesen werden (DUBEY 2022). Dabei stehen verschiedene serologische Verfahren zum Nachweis humoraler Antikörper zur Verfügung darunter der Sabin-Feldman-Test (SFT) (SABIN und FELDMAN 1948), der indirekte Hämagglutinationstest (IHAT), der indirekte Immunfluoreszenzantikörpertest (IFAT), der modifizierte Agglutinationstest (MAT), der Latex-Agglutinationstest (LAT), der Enzyme-Linked Immunosorbent-Assay (ELISA) und andere Tests (DUBEY 2022).

Anfangs stellte der SFT den Goldstandard zum Nachweis von *T. gondii*-Antikörpern dar. Das Testprinzip beruht auf der Verhinderung der Färbung lebender Tachyzoiten mit Methylenblau, wenn sich im Testserum *T. gondii*-spezifische Antikörper befinden (SABIN und FELDMAN 1948). Aufgrund der Tatsache, dass für diesen Test lebende Tachyzoiten notwendig sind, wird der SFT derzeit nur selten angewandt (DUBEY 2022). Bei dem IHAT wird eine Testlösung verwendet, welche Erythrozyten enthält, die zuvor mit Tachyzoiten-Antigen beladen wurden. Es kommt zur Agglutination, wenn im Testserum *T. gondii*-Antikörper vorhanden sind (WILDFÜHR und WILDFÜHR 1975). Bei einem IFAT werden *T. gondii*-Tachyzoiten auf einer Oberfläche fixiert und das zu untersuchende Serum hinzugefügt. Durch die Zugabe tierartspezifischer fluoreszierender Anti-Antikörper kommt es zur Bildung von fluoreszierenden Antigen-Antikörperkomplexen, die mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops sichtbar gemacht werden (DUBEY 2022). LAT und MAT beruhen auf der Agglutination von Antikörpern im Testserum mit toten Toxoplasmen die bei dem Test verwendet werden. Sie dienen als qualitative Untersuchungsmethoden und werden in großem Umfang in der *T. gondii*-Diagnostik eingesetzt (DUBEY 2022).

Mittels ELISA können spezifische Antikörper nachgewiesen werden. Diese Art von Untersuchung eignet sich besonders gut auf Bestandesebene bzw. bei einer großen Anzahl von Proben, denn auf einer 96-well-Mikrotiterplatte können entsprechend viele Testseren untersucht werden. Bezugnehmend auf die Serodiagnostik von *T. gondii*

stellte sich der ELISA als sehr sensitives Diagnostikum heraus. Der Test ist einfach und schnell anzuwenden und direkt nach der Durchführung werden Ergebnisse generiert. Bei der Testdurchführung wird eine Oberfläche (Mikrotiterplatte oder Objektträger), welche mit *T.-gondii*-spezifischen Antigenen (meist P30) beschichtet ist, verwendet. Das Testserum wird hinzugegeben und inkubiert. Bei vorhandenen Antikörpern findet eine Bindungsreaktion und damit die Bildung eines Antikörper-Antigen-Komplexes statt. Nach einem Waschvorgang werden Peroxidase-markierte Anti-Antikörper als Konjugat hinzugegeben, sie binden an die *T.-gondii*-Antikörper und es entsteht ein Antigen-Antikörper-Konjugat-Komplex. Nach Beseitigung des überschüssigen Konjugats durch Waschen wird eine Substratlösung hinzugegeben, welche durch eine enzymatische Reaktion die Peroxidase umsetzt und eine Farbreaktion mit sich zieht. Nach erfolgter Inkubation wird die enzymatische Reaktion mittels Schwefelsäure gestoppt und in einem ELISA Reader (Photometer) die optische Dichte mit einer Wellenlänge von zumeist 450 nm gemessen. Mit Hilfe der Werte der optischen Dichte kann eine Quantifizierung durchgeführt werden (DUBEY 2022; TENTER et al. 1992).

In den letzten Jahren erwiesen sich ELISA und MAT als die am ehesten sensitiven sowie praktikabelsten Tests bei Tieren und wurden somit vorwiegend angewandt (BIER et al. 2020; CASTILLO-CUENCA et al. 2021; GAZZONIS et al. 2020; HEDDERGOTT und MÜLLER 2020; KORNACKA et al. 2020; STOLLBERG et al. 2021; ZHANG et al. 2020). Mittels serologischer Tests kann zwischen einer akuten und einer chronischen Infektion unterschieden werden. Immunglobulin M können, je nach infektiöser Dosis, Stamm, Immunkompetenz und Wirtspezies, bei akuten Infektionen bereits nach einer Woche detektiert werden. Immunglobulin G hingegen sind erst 1-2 oder auch erst 4 Wochen nach oraler Aufnahme infektiöser Toxoplasmen-Stadien nachweisbar. Je nach Art des Wirtes sind Immunglobulin G lebenslang detektierbar und geben somit Hinweis auf eine chronische Infektion (DUBEY 2022).

2.5.2 Molekulardiagnostik

Bei dem Nachweis von *T.-gondii*-DNA mittels molekularer Diagnostik ist die PCR das Mittel der Wahl. Das Allgemeine Prinzip einer PCR beruht auf zyklischen Wiederholungen der Denaturierung von DNA, der Anlagerung sequenzspezifischer Oligonukleotide (Primer) und der Synthese einer entsprechenden DNA durch eine thermostabile DNA-Polymerase. Nach mehreren Zyklen kommt es zu einer exponentiellen Vermehrung der DNA-Sequenz (GALVANI et al. 2019; HILL und DUBEY 2002; SAADATNIA und GOLKAR 2012).

Eine PCR ist generell sehr sensitiv, denn schon geringe DNA Mengen von nur einem Tachyzoiten können erfasst werden. Zusätzlich kann eine Quantifizierung durch

Anwendung einer real-time-PCR erfolgen (DUBEY 2022). Die meisten Studien zum Nachweis von *T. gondii* bei lebensmittelliefernden Tieren sind unzureichend, da lediglich eine qualitative Untersuchung durchgeführt wird. Aufgrund dessen lässt sich das Infektionsrisiko im Einzelfall schlecht ableiten. Für eine bessere Aussagekraft, sollten quantitative Daten erhoben werden, um effizientere Strategien zur Verringerung der Übertragung von *T. gondii* durch lebensmittelliefernde Tiere zu ermitteln (TENTER 2009).

Um mithilfe einer PCR die DNA nachweisen zu können, muss zuvor aus dem zu untersuchenden Gewebe die *T.-gondii*-DNA extrahiert werden. Dafür stehen im Handel verschiedene Extraktionskits zur Verfügung, wobei üblicherweise nur einige Milligramm, bis wenige Gramm eines Gewebes untersucht werden können. Dieser Umstand limitiert die Präzision der Ergebnisse bei der *T.-gondii*-Diagnostik stark, aufgrund der eher inhomogenen Verteilung von *T.-gondii*-Gewebezysten im zu untersuchenden Gewebe (OPSTEEGH et al. 2010; STOLLBERG et al. 2021).

Bei einer DNA-Extraktion durch magnetische Separation (englisch: Magnetic Capture, MC) und folgender Quantifizierung mittels real-time-PCR können bis zu 100 g Gewebe untersucht werden und somit, spezifisch für *T. gondii*, präzise Ergebnisse erzielt werden (OPSTEEGH et al. 2010). Diese Methode der DNA-Extraktion wird seit einigen Jahren bei Tieren angewandt (ALGABA et al. 2017; BACHAND et al. 2018; STOLLBERG et al. 2021). Entsprechend des Protokolls nach OPSTEEGH et al. (2010), wie in Abb. 3 schematisch dargestellt, wird das kleingeschnittene Muskelfleisch mittels Proteinase K verdaut und homogenisiert. Daraufhin wird mit Streptavidin-gekoppelter Sepharose das frei gewordene Biotin entfernt. Folgend werden Biotin-gekoppelte *T.-gondii*-spezifische Oligonukleotide hinzugegeben, welche sich an die *T.-gondii*-DNA der Probe binden. Im nächsten Schritt führt die Zugabe Streptavidin-gekoppelter magnetischer Kügelchen (Beads) dazu, dass diese sich an die *T.-gondii*-DNA gebundenen Oligonukleotide anlagern. Daraufhin werden die Beads im magnetischen Feld an der Wand der Reaktionsgefäße immobilisiert und von der restlichen Lösung separiert, siehe Abb. 4. Schlussendlich wird durch Erhitzen die Bindung der *T.-gondii*-DNA zu den noch an die Oligonukleotide gekoppelten Beads gelöst und nach Anlegen des magnetischen Feldes kann die DNA abpipettiert werden. Die so gewonnene DNA kann folglich mittels PCR nachgewiesen werden (OPSTEEGH et al. 2010). Mit dieser Methode können speziell für *T. gondii* eher aussagekräftige Ergebnisse erzielt werden (JURÁNKOVÁ et al. 2014).

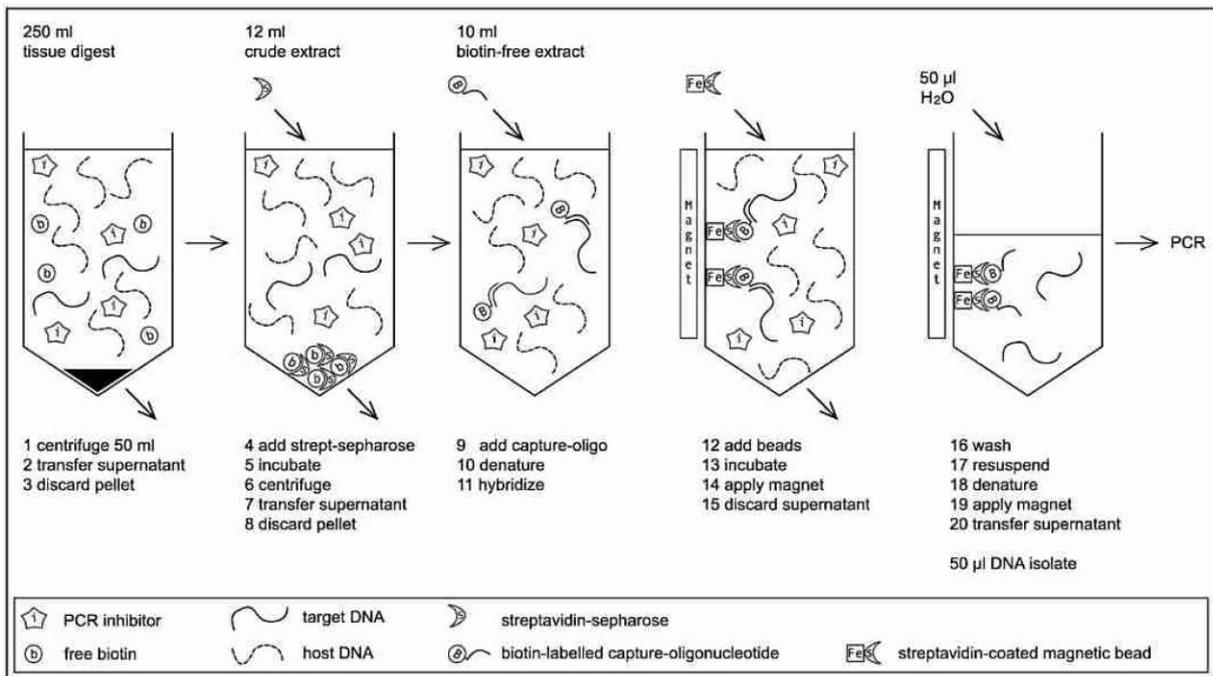


Abb. 3 Schematische Darstellung der MC-DNA-Extraktion (OPSTEEGH et al. 2010)

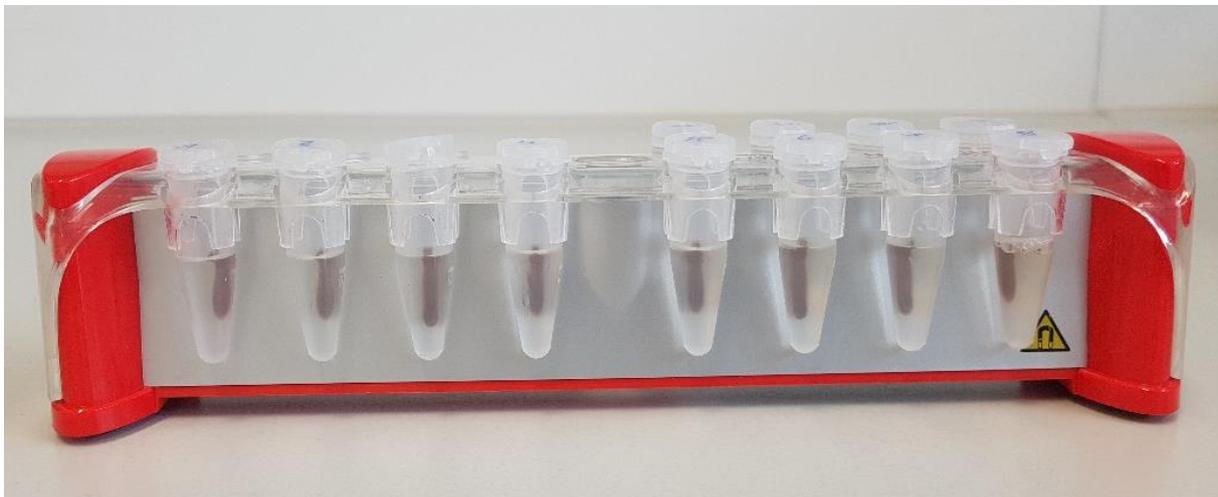


Abb. 4 Magnetische Beads, durch das magnetische Feld am Rand der Reaktionsgefäße immobilisiert

3 Publikationen

3.1 Publikation 1

Stellungnahme zum Eigenanteil der Publikation 1:

Hiermit erkläre ich, dass ich den Entwurf des Manuskriptes eigenständig erstellt habe, sowie die Versuche und deren Interpretation. Unterstützt wurde ich dabei von Dr. Martin Köthe und Prof. Dr. Ahmad Hamedy. Die Literaturrecherche habe ich selbstständig durchgeführt. Weiterhin habe ich eigenständig die Abbildungen und Tabellen erstellt, ferner die statistische Auswertung durchgeführt, dabei erhielt ich zusätzlich Unterstützung von Dr. Martin Köthe. Das Manuskript habe ich mit Hilfe und Rücksprache aller Co-Autoren final verfasst und eingereicht.

***Toxoplasma gondii* in raccoons (*Procyon lotor*) in Germany: a serosurvey based on meat juice**

Lydia Engel¹, Ahmad Hamedy¹, Aleksandra Kornacka-Stackonis², Torsten Langner¹, Stefan Birka¹, Martin Koethe¹

¹Institute of Food Hygiene, Leipzig University, An den Tierkliniken 1, 04103 Leipzig, Germany

²Witold Stefański Institute of Parasitology, Polish Academy of Sciences, 00-818 Warsaw, Twarda 51/55, Poland

Eingereicht: 20. Mai 2022

Akzeptiert: 29. August 2022

Publiziert: 23. September 2022

Parasitology Research 2022, <https://doi.org/10.1007/s00436-022-07646-w>



Toxoplasma gondii in raccoons (*Procyon lotor*) in Germany: a serosurvey based on meat juice

Lydia Engel¹ · Ahmad Hamedy¹ · Aleksandra Kornacka-Stackonis² · Torsten Langner¹ · Stefan Birka¹ · Martin Koethe¹Received: 20 May 2022 / Accepted: 29 August 2022
© The Author(s) 2022

Abstract

Toxoplasma gondii seroprevalence was determined in meat juice samples of 820 free-living raccoons from Germany. The animals were collected between December 2017 and April 2021. Using a commercial enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), the overall seroprevalence was found to be 48.5%. Statistical analysis revealed significant seroprevalence differences between seasons, sex, and weight of analysed raccoons. The prevalence in late winter/spring (57.7%) was significantly higher than in autumn (38.4%) ($p < 0.0003$). Male raccoons (50.5%) were more often seropositive than females (41.0%) ($p = 0.028$). Increasing animal weight had a significant impact on the relative probability of a positive serostatus (odds ratio: 1.783, $p < 0.0001$). Furthermore, we found regional differences in seroprevalence, but there was no statistically significant difference resulting from animal age, degree of habitat urbanization and hunting year. Meat juice is a suitable medium for serological surveys for *T. gondii* in meat producing animals, as sampling is even possible after slaughter or during meat inspection when blood is no longer available. The observed high seroprevalence indicates that *T. gondii* infection is widespread among the German raccoon population providing a potentially relevant source of *T. gondii* transmission to humans upon consumption or handling of animal products.

Keywords Protozoan · Game · ELISA · Tissue fluid · Zoonosis · Seroprevalence

Introduction

Toxoplasma gondii is a ubiquitous intracellular parasite able to infect all warm-blooded animals as well as humans. To date, about one-third of the world population is infected with this protozoan (Dubey 2021). The infection rate may vary on a national basis, e.g. in Germany about 55% of the general population was found to be infected with *T. gondii* (Wilking et al. 2016). While in immunocompetent individuals the infection mostly stays asymptomatic or only causes mild symptoms, in immunocompromised patients it can lead to serious pathological effects (Montoya and Liesenfeld 2004). Additionally, there is a high risk to the

foetus if a seronegative mother becomes infected during pregnancy, primary infection can lead to abortion or a wide range of other manifestations like encephalitis, pneumonia or chorioretinitis (Jones et al. 2014; Lopes et al. 2007).

There are three infectious stages of *T. gondii*: sporozoites (in oocysts), tachyzoites and bradyzoites. Felidae are the only definitive hosts in which sexual development of the protozoan results in the excretion of oocysts with their faeces. After infection, sporozoites develop into tachyzoites that disseminate within the host and transform into bradyzoites accumulating within tissue cysts in muscles and organs. Besides congenital transmission, humans can get infected by either taking up oocysts from the environment or by ingestion of raw or undercooked meat containing tissue cysts (Montoya and Liesenfeld 2004). Approximately 50% of *T. gondii* infections in the USA are assumed to be foodborne, making *T. gondii* one of the most important foodborne pathogens in the USA (Scallan et al. 2011). In Europe, the consumption of raw or undercooked meat and cured meat products, including game, is the most important source of infection (Baril et al. 1999; Cook et al. 2000). Game meat in particular was supposed to be the cause of some severe toxoplasmosis

Section Editor: Daniel Howe

✉ Lydia Engel
lydia.engel@vetmed.uni-leipzig.de¹ Institute of Food Hygiene, Leipzig University, An den Tierkliniken 1, 04103 Leipzig, Germany² Witold Stefański Institute of Parasitology, Polish Academy of Sciences, Twarda 51/55, 00-818 Warsaw, Poland

Published online: 23 September 2022

Springer

cases (Carme et al. 2002; Ross et al. 2001). Furthermore, McDonald et al. (1990) have shown that consumption and handling of game meat as well as frequency of consumption was significantly associated with an infection of Canadian pregnant women. There are also published cases of an acute toxoplasmosis outbreak in hunters due to consumption of game meat in the USA (Sacks et al. 1983). As hunters consume game meat more frequently, they are considered a high-risk group in respect of getting in contact with meat containing *T. gondii* tissue cysts, as revealed in a study in Slovakia, recently (Fecková et al. 2020).

The raccoon (*Procyon lotor*) was originally native in North America and has established in Germany since the early twentieth century as an invasive species (Beltrán-Beck et al. 2012). Due to their omnivorous feeding habits, raccoons are a good indicator of zoonoses or environmental contamination and act as sentinel hosts for *T. gondii* (Bigler et al. 1975; Dubey 2021). According to the German Hunting Association (DJV), the consumption of game meat is becoming increasingly popular (German Hunting Association 2019). The annual hunting numbers of raccoons in Germany have risen sharply in recent years, from about 8000 in 1999/2000 to more than 200,000 in 2019/2020 (German Hunting Association 2021). Although consumption of raccoon meat is rare in Germany, the increasing number of hunted animals may raise interest in use of their meat for human consumption. From the USA, it is known that raccoon meat is consumed, although to a lesser extent than other game animals and also that hunters do eat raccoon meat more often than non-hunters (Burger 2000; Gaines et al. 2000; Goguen and Riley 2020).

There is some data on the prevalence of *T. gondii* antibodies in raccoons for several regions of the world. Mostly, they are based on examinations of blood. Based on this sample material, in North America seroprevalence ranges from 13 to 84.4% (BurrIDGE et al. 1979; Gerhold et al. 2017; Hancock et al. 2005; Hill et al. 1998; Hwang et al. 2007; Mitchell et al. 1999; Smith and Frenkel 1995). In Japan, Sato et al. (2011) found a seroprevalence of 9.9% in feral raccoons. In Germany, the seroprevalence was previously reported to be about 37.4% (Heddergott et al. 2017). However, blood is not an optimal sample material to examine game animals after hunting because it is only available directly after killing. Meat juice can be obtained for a long period of time, e.g. by freezing and thawing, and therefore is more suitable for examination of hunted game animals for the presence of antibodies. The benefit is that meat juice can still be taken at meat inspection, after the carcass has been frozen, or even if there are only carcass parts available. But, there is only one study focusing on detection of *T. gondii* antibodies in raccoons based on meat juice. This study only comprised a small sample size ($n=12$) and was limited to one study area in Germany, the federal state Mecklenburg-Western Pomerania. Thus, the reported

antibody prevalence of 33.3% may be of limited precision (Kornacka et al. 2018). The aim of the present study was to gain information on a large sample of the German raccoon population about the presence of *T. gondii* antibodies in meat juice and on respective influencing factors. This data is compared with previous results to estimate the value of meat juice results and to better assess the potential public health risk posed by raccoon meat.

Material and methods

Sample collection and information

A total of 820 raccoons were sampled in a German fur producing company (Fellwechsel Vertriebs GmbH, Löptin, Germany). These animals' carcasses were previously collected by Fellwechsel GmbH after being killed by local hunters or, in few cases, after having been killed in accidents. They originate from the four hunting seasons 2017/2018, 2018/2019, 2019/2020, and 2020/2021. The carcasses were stored constantly frozen until being used for fur production at $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Defrosted carcasses were sampled after skinning. Each carcass was individually labelled and assigned to corresponding accompanying information, which comprised hunting date and origin (German postcode) of the animals. Sex, age, and weight of the animals were determined during sample collection. Age was classified into adult and juvenile based on deciduous or permanent dentition as originally described by Grau et al. (1970) and recently applied by Hwang et al. (2007).

Based on the given postcodes, the animals' origin was further assigned to a specific Federal State and Local Administrative Unit (LAU) using official data from the German Federal Statistical Office (Statistisches Bundesamt 2021). This data also contains the degree of urbanization for every German LAU based on the classification developed in 2011 by DG AGRI and DG REGIO of the European Commission with support of the Joint Research Centre (JRC) and Eurostat (Eurostat 2011). This classification distinguishes densely populated areas (cities and large urban areas; coded as 1) from intermediate density areas (towns and suburbs, and small urban areas; coded as 2), and thinly populated areas (rural areas; coded as 3). In some cases, postcodes comprised several LAUs or even Federal States. In these cases, urbanization classification was manually assigned to a specific code when all respective LAUs belonged to the same code. When LAUs of different urbanization degrees were part of a common postcode, an intermediate code was computed (i.e. 2.5 for comprised LAUs of code 2 and 3).

Missing information: For some animals, not all accompanying information was available. Postcodes were missing for 113 and hunting dates for 123 raccoons. Due

to the carcasses' condition, definite sex determination was impossible for eleven animals, while weight measurement of two animals and age determination for another two animals could not be performed.

From each carcass, the following samples were collected for further examination: head, one forelimb, flexor muscles of the other forelimb, one hind limb, gastrocnemius muscle of the other hind limb, diaphragm and in some cases back musculature. All samples of an individual animal were stored together in a plastic bag. These samples were frozen at $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ onsite and transported frozen to the Leipzig University, Institute of Food Hygiene. They were kept frozen until further examination.

Serology

Serological examination was performed on meat juice. Samples were thawed 2 days in a refrigeration chamber at $1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Meat juice was collected out of every bag with a sterile 10 ml syringe into a sterile sample vessel and stored frozen at $-19\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) until used for testing. The presence of antibodies against *T. gondii* was determined for every meat juice sample using a commercial indirect ELISA (ID Screen Toxoplasmosis Indirect Multi-species, IDvet, France) according to the most recent manufacturer's instructions for meat juice (50 μl sample volume at 1:2 dilution). This ELISA has been successfully applied to raccoon meat juice samples by others, recently (Kornacka et al. 2018). Optical density was measured at 450 nm using a microplate reader (Tecan Infinite F50, Germany). Using internal positive and negative controls, the sample to positive control ratio (S/P ratio) was calculated by using the following formula as indicated in the instructions:

$$S/P\% = \frac{OD_{\text{value of the sample}} - OD_{\text{value of the negative control}}}{OD_{\text{value of the positive control}} - OD_{\text{value of the negative control}}} \times 100$$

For meat juice, samples with $S/P \leq 25\%$ were considered negative for *T. gondii* antibodies. Samples with an S/P ratio between 25 and 30% were considered doubtful. If the S/P ratio was $\geq 30\%$, the sample was considered positive for presence of *T. gondii* antibodies. All samples were analysed in duplicates and the mean value was used for result calculation. Samples with a standard deviation of more than 15% between the two replicates were examined repeatedly in case these deviations could have led to a different evaluation of the result. In addition to the assay's internal positive control, samples of previously positive tested raccoon meat juice were included in each assay. These positive meat juice samples were kindly provided by the Witold Stefański Institute of Parasitology, Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland. To check assay performance

for interassay variation one low (S/P about 40%) and one high (S/P about 150%) positive meat juice samples were included in every assay.

Statistics

All statistical analyses were performed by Prism9 Software (GraphPad Software, LL, USA). Chi-square tests were used for analysis of differences in prevalence of sex, age, urbanization, season, and hunting year. Bonferroni correction was applied for analyses with more than two groups when the global chi-square test revealed statistical significance. Analysis of weight was done using logistic regression for odds ratios and likelihood ratio test. Differences were considered statistically significant when the *p* value was < 0.05 .

Results

The overall seroprevalence of *T. gondii* in examined raccoon meat juice samples was 48.5% (398/820; 95% confidence interval 45.1–52.0). Another 48.5% (398/820; 95% CI: 45.1–52.0) were negative and 2.9% (24/820; 95% CI: 2.0–4.3) of the samples were considered doubtful for the presence of antibodies to *T. gondii*. S/P ratio of positive samples ranged from 30.0 to 292.5%. Further information on S/P ratio distribution is shown in Table 1.

Presence of antibodies seems not to be dependent on age, degree of urbanization, and the hunting year because the performed respective chi-square tests revealed no significant differences. However, antibodies were found in 48.8% of adults and 29.4% of juveniles. Regarding the degree of urbanization, 51.6% of animals originating from densely populated areas (Code 1), 48.5% from intermediate density areas (Code 2), 47.2% from thinly populated areas (Code 3) and 52.6% from areas comprising Code 2 and Code 3 areas (Code 2.5) were positive for the presence of *T. gondii* antibodies. The seroprevalence in different hunting years ranged from 46.4 to 56.3% (see details in Table 2).

Statistically significant differences were found for season, sex and weight. Detailed results are compiled in Table 2. Compared to animals from autumn, raccoons hunted in late winter to spring were statistically significant more often seropositive (57.7% vs. 38.4%, $p < 0.0003$, Bonferroni

Table 1 Sample distribution regarding serostatus based on S/P ratios

< 25%	25–30%	30–60%	60–120%	$\geq 120\%$	Total
Negative	Doubtful	Low positive	Medium positive	High positive	
398	24	103	177	118	820
48.5%	2.9%	12.6%	21.6%	14.4%	100%

Table 2 Seroprevalence of *T. gondii* in sampled raccoons associated with variables

Variable	Category	No. tested	No. positive	Prevalence [%]	95% CI	<i>p</i> -value ^a
Age	Adult	801	391	48.81	45.4–52.3	0.113
	Juvenile	17	5	29.41	13.3–53.1	
	Subtotal	818				
Urbanization ^b	Code 1	62	32	51.61	39.4–63.6	0.836
	Code 2	270	131	48.52	42.6–54.5	
	Code 2.5	57	30	52.63	39.9–65.0	
	Code 3	318	150	47.17	41.7–52.7	
	Subtotal	707				
Hunting year ^c	2017/2018	16	9	56.25	33.2–76.9	0.809
	2018/2019	181	84	46.41	39.3–53.7	
	2019/2020	247	124	50.20	44.0–56.4	
	2020/2021	253	123	48.62	42.5–54.7	
	Subtotal	697				
Season ^d	Autumn	219	84	38.36	32.2–44.9	<0.0003
	Winter	138	63	45.65	37.6–54.0	
	Late winter/spring	331	191	57.70	52.3–62.9	
	Subtotal	688				
Sex	Male	643	325	50.54	46.7–64.4	0.028
	Female	166	68	40.96	33.8–48.6	
	Subtotal	809				
Total		820	398	48.54	45.1–52.0	

^a*p*-value of global chi-square test per variable

^bCode 1 = Cities; Code 2 = Towns and suburbs; Code 2.5 = postal code included local area units of Code 2 and 3; Code 3 = Rural areas

^cHunting year runs from April 1st to March 31st of the next year

^dAutumn = 06 Sep–14 Dec; winter = 15 Dec–14 Jan; late winter/spring = 15 Jan–10 Apr

corrected pairwise chi-square comparisons). Prevalence of animals hunted in winter (45.7%) did not differ significantly from either group. Seroprevalence was significantly higher in male (50.5%) than in female (41.0%) animals ($p=0.028$, chi-square test). The weight of all raccoons included in this study ranged from 1.85 to 7.45 kg. Analysing animal weight and respective serostatus by simple logistic regression, the relative probability of a positive result was shown to increase by 78.3% per kg (odds ratio [OR]: 1.783, 95% CI: 1.516–2.108; $p < 0.0001$, likelihood ratio test). The graphical result of this analysis is shown in Fig. 1.

The prevalence varies greatly among the sampled areas. As shown in Table 3, the comparably highest seroprevalence was determined in the German federal states of Thuringia (55.6%), Hesse (53.1%) and Lower Saxony (52.4%). In contrast, animals from Mecklenburg-Western Pomerania (35.7%) and Brandenburg (38.4%) presented the lowest seroprevalence in

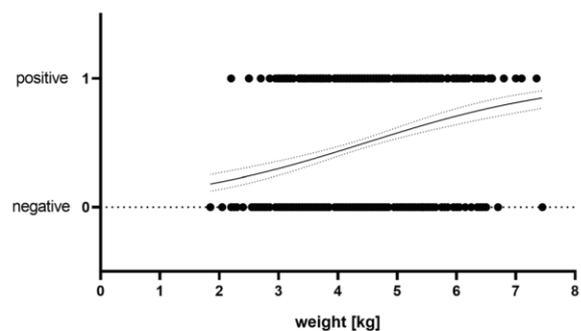


Fig. 1 Simple logistic regression of raccoon serostatus in dependence of animal weight ($n=818$)

Germany (see Fig. 2 for regional distribution). Some deviating prevalence estimates were based on only few samples.

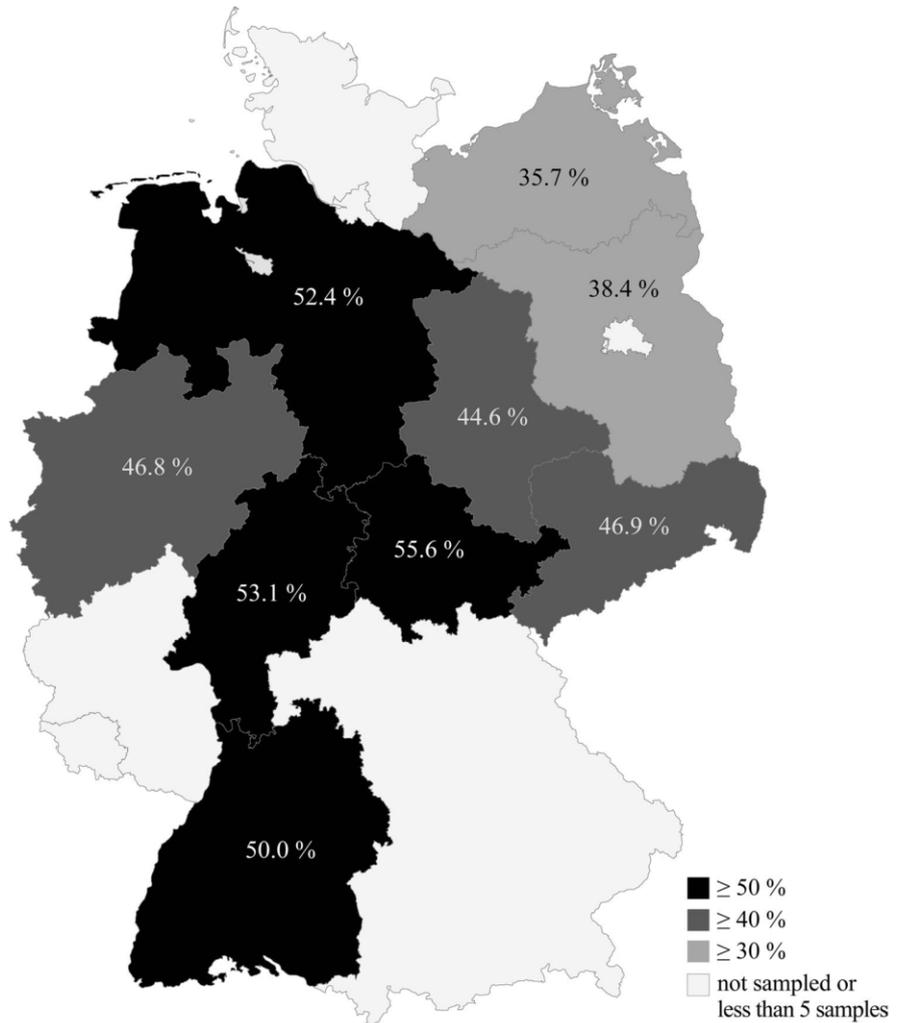
Table 3 Seroprevalence in German federal states

German federal state	No. positive/ no tested	Seroprevalence [%]	95% CI
Baden-Württemberg	9/18	50.0	29.0–71.0
Bavaria	2/4	50.0	8.9–91.1
Brandenburg	5/13	38.4	17.7–64.5
Hesse	93/175	53.1	45.8–60.4
Lower Saxony	55/105	52.4	42.9–61.7
Mecklenburg-Western Pomerania	5/14	35.7	16.3–61.2
North Rhine-Westphalia	80/171	46.8	39.5–54.3
Rhineland-Palatinate	0/1	0.0	0.0–94.9
Saarland	2/2	100.0	17.8–100.0
Saxony	15/32	46.9	30.9–63.6
Saxony-Anhalt	54/121	44.6	36.1–53.5
Thuringia	21/37	55.6	39.6–70.5

Discussion

Studies on seroprevalence often differ in respect to available sample material, applied serological test, and sample size, making results difficult to compare. We decided to use meat juice for detection of *T. gondii* antibodies in raccoons because this material is more easily accessible from raccoon carcasses than blood and, therefore, more suitable in respect of meat inspection as already discussed for other animals (Berger-Schoch et al. 2011). Although it is generally known that antibody concentration in meat juice is lower than in serum, both matrices were shown to correlate well in serological analyses (Wingstrand et al. 1997). Thus, meat juice was successfully used as an adequate matrix for monitoring meat-producing animals for antibodies to various parasites such as *T. gondii* (Berger-Schoch et al. 2011; Gazzonis et al. 2020; Halos et al. 2010; Lundén

Fig. 2 Regional distribution of seroprevalence ranges in Germany; original clean map was created using Microsoft Excel



et al. 2002) or other zoonotic agents such as *Trichinella* sp. (Nöckler et al. 2005). Due to the general lower concentration of antibodies in meat juice, sample dilutions were adjusted accordingly (Halos et al. 2010; Nöckler et al. 2005; Wallander et al. 2015). The manufacturer's instruction of the applied ID Screen ELISA test on the one hand advises to use a fivefold lower dilution of meat juice samples (1:2 rather than 1:10 as for serum) and on the other hand also contains an adjusted evaluation scheme for result interpretation from meat juice. From this scheme, samples were considered positive at a lower S/P ratio compared to serum.

Several recent studies about the serostatus of *T. gondii* in raccoons were performed on blood instead of meat juice and using modified direct agglutination test (MAT) or direct agglutination test (DAT) instead of ELISA (Dubey et al. 2007; Heddergott et al. 2017; Hwang et al. 2007; Sato et al. 2011). A previous study on raccoons showed indirect hemagglutination test (IHAT) and latex agglutination test (LAT) inferior to MAT in respect of reaction speed and sensitivity (Dubey et al. 1993). Indirect ELISA is considered a suitable method for the detection of antibodies to *T. gondii* in porcine serum and yielded similar or even better results than MAT (Gamble et al. 2005). ELISA results from the present study were compared to previous research considering varying factors like sample size, study site, or applied serological test, which were discussed to impact varying results (Dubey et al. 2021). Sample size may considerably impact the precision of presented seroprevalence. Therefore, confidence intervals should be considered when comparing results from different studies, especially when sample size was low.

The results of this study, examining meat juice of 820 feral raccoons in Germany by ELISA, revealed a total *T. gondii* seroprevalence of 48.5% (95% CI: 45.1–52.0). The only previous survey also applying ELISA on meat juice to detect antibodies of *T. gondii* in raccoons in Germany reported lower seroprevalence of 33.3% but was based on only 12 samples resulting in a broad 95% CI of 9.9–65.1 (Kornacka et al. 2018) which means that the true prevalence of both studies could be in the same range. Comparing only results from the same region (the federal state Mecklenburg-Western Pomerania), also, only a small number of samples was examined in our study yielding similar results of 35.7% (5/14; 95% CI: 16.3–61.2). The observed overall seroprevalence of 48.5% is higher than in Mecklenburg-Western Pomerania because some federal states like Thuringia, Hesse, and Lower Saxony had prevalence above 50%.

For Hesse, another German federal state, previous studies on raccoon blood reported seroprevalence of 26.0% by IHAT (13/50, no CI indicated) (Gey 1998), 36.4% (8/22; CI: 95% 16.3–56.5), and 65.6% (61/93; CI: 95% 27.3–81.2) by MAT (Heddergott et al. 2017; Heddergott and Müller 2020). Compared to other federal states, we also found high prevalence of 53.1% (93/175; CI: 95% 45.8–60.4) in Hesse.

This value is not as high as the one reported by Heddergott and Müller (2020) but is based on a larger sample size and, thus, more precise as indicated by the smaller 95% CI. Besides sample size, the differences may be caused by the different examination methods (ELISA versus MAT), the examined sample material (meat juice versus blood), or the different study sites within Hesse. In the present study, seroprevalence of all regions combined was 48.5%, which is higher than 38.3% (166/433) previously reported by Heddergott et al. (2017) for Germany. As shown in Table 3, seroprevalence greatly varies within national borders, an effect which was similarly reported by others (Burridge et al. 1979; Graser 2008; Heddergott et al. 2017; Mitchell et al. 2006; Sato et al. 2011). Within Germany, seroprevalence seems to decrease from west to east (Fig. 2) resulting in low values in the neighbouring countries Poland (13.3%, 2/15; 95% CI: 1.7–40.5) and the Czech Republic (0%, 0/17; 95% CI: 0–19.5) (Kornacka et al. 2018). However, it should be noted that only one limited area was sampled in these countries and only few animals were examined at all.

Notably, the prevalence of 48.5% detected in this study is comparable to reports from specific regions in the USA, where seroprevalence ranges from 46.5 to 59.2% (Dubey et al. 2007; Gerhold et al. 2017; Lindsay et al. 2001; Mitchell et al. 1999), while it was considerably lower in studies from other US regions and Canada (Fredebaugh et al. 2011; Hwang et al. 2007; Smith et al. 1992), further supporting the influence of region on seroprevalence.

Another commonly discussed influencing factor is urbanization. It is assumed that in urban areas, cats are more prevalent than in rural areas and may serve as a source of environmental contamination with oocysts as source of infection for raccoons. For example, a high seroprevalence of 84.4% was found in raccoons in an urban area of Northern Virginia (Hancock et al. 2005). However, there is inconsistent data to either support or reject that hypothesis. In our study, we stratified sampled animals in regard to the degree of urbanization into three groups based on the European classification scheme (Eurostat 2011) rather than dividing into urban and rural. However, there was no correlation between the degree of urbanization and seroprevalence, which is consistent with the results of Heddergott et al. (2017). Moreover, Graser (2008) and Heddergott and Müller (2020) found lower seroprevalence in raccoons in urban than in rural areas.

There is also ongoing discussion on a correlation between high seroprevalence in raccoons and a high cat density, in general. Hancock et al. (2005) discussed the high density of cats in the sampling area and their oocyst excretion in relation to the high prevalence in their study. This hypothesis is supported by low seroprevalence values in Japan where cat populations are low. Sato et al. (2011), Matoba et al. (2002), and Yamaguchi et al. (2015) detected seroprevalence values of only 9.4–13.7% in raccoons. This might be due to

the used LAT method but more likely because of the virtual absence of wild felids in Japan, except for the leopard cat (*Prionailurus bengalensis*), which is found only on the islands Tsushima and Iriomote (Macdonald et al. 2010). Additionally, prevalence of *T. gondii* in domestic cats is similarly low in Japan (9.8%) (Maruyama et al. 2003). Yamaguchi et al. (2015) found a significant higher prevalence in raccoons living near rivers and sharing environment with feral domestic cats. Facilitated by a higher cat density in urban areas, Heddergott and Müller (2020) also discussed that raccoons and cats could get in closer contact in urban areas sharing feeding sites. In other species, such as domestic ruminants in the Mediterranean ecosystem, the presence of cats has been found to be one of the main risk factors for *T. gondii* infection (Almería et al. 2018). Thus, degree of urbanization itself may not be a risk factor to relate *T. gondii* seroprevalence to but rather depends on cat density.

Age was generally reported to be a risk factor for *T. gondii* infection because of the higher chance for contact to the parasite with increasing living time (Jones et al. 2001; Wilking et al. 2016). This was also found in several studies for raccoons (Burrige et al. 1979; Graser 2008; Hill et al. 1998; Hwang et al. 2007; Mitchell et al. 1999; Smith et al. 1992). However, we did not observe a significant difference in seroprevalence between adult and juvenile raccoons, which is in line with Heddergott et al. (2017) as well as Heddergott and Müller (2020), and may be due to the very low number of juveniles (17) compared to adults (801). This imbalance can be explained by these samples originating from a fur producing company, for which juveniles are rarely used and, therefore, hunters almost only provide adult animals. Since we only stratified into two age categories based on dentition status, weight might be a better indicator for already elapsed lifetime of the animals. Although there are limitations like individual food shortage or disease, raccoon weight generally increases with age (Gehrt and Fritzell 1999) and may, therefore, be used as an indicator for age as well as for food intake. Fur impacting disease like canine distemper or prolonged food restriction can be excluded for animals used in the present study since they did not present adverse fur condition or poor general condition. Weight showed a significant influence on serostatus, with heavier animals being more likely seropositive (OR: 1.783). This finding is consistent with other studies analysing raccoon weight as well in Germany (Heddergott et al. 2017; Heddergott and Müller 2020) and Japan (Sato et al. 2011).

For raccoons, sex of the animals also seems to be a potential risk factor. We observed significantly more seropositive males than females. This is comparable with early observations of Burrige et al. (1979). More recently, Hwang et al. (2007) noted that adult males are more often positive than juveniles of both sexes and discussed larger home ranges and a higher mobility as probable reasons.

Furthermore, males have a lower need for safety, they sleep in more risky places, and have a larger range of motion than females (Michler 2016). As a result, they also have a different diet compared to female animals, which Engelmann et al. (2011) confirmed by excrement examinations. Together, this may result in an increased risk of exposure to *T. gondii* for males, explaining the observed result.

The noted significantly lower prevalence in autumn compared to spring was also reported in previous studies (Hill et al. 1998; Mitchell et al. 1999). Moreover, Hill et al. (1998) found a correlation between season and age of the animals, with large number of negative juveniles entering the population during the period between spring and autumn. Therefore, a large amount of young and, thus, less likely infected animals are present in autumn compared to spring. Additionally, the diet of free-ranging raccoons greatly varies depending on season and food supply. During autumn, raccoons are more actively feeding on vegetation and crops, while the primary diet in spring is of animals source comprising vertebrates as well as invertebrates (Engelmann et al. 2011). These raccoons' prey animals are known to transmit *T. gondii* through tissue cysts or oocysts, respectively (Dubey 2021).

The observed high seroprevalence indicates that *T. gondii* is widespread in the German raccoon population and that they might be a relevant source of human *T. gondii* infection during consumption of raccoon meat or fur production handling. Future studies focusing on methods for direct detection of the parasite in meat should be performed to better assess the potential public health risk.

Acknowledgements We acknowledge Heiko Wellner and Lia Kieker from the Institute of Food Hygiene, Leipzig University, Germany for their excellent technical support. The animals from which samples were drawn for this study have been collected from a funded project (German Federal Ministry of Education and Research 01KI2102, supported by the National Research Platform on Zoonoses). We acknowledge the provision of samples from these animals.

Author contribution Lydia Engel, Ahmad Hamedy and Martin Koethe made substantial contribution to the conception and design of the study. All authors contributed to data acquisition, Lydia Engel, Ahmad Hamedy and Martin Koethe analysed and interpreted the data. Lydia Engel has written the first draft of the manuscript and all authors revised it critically. All authors read and approved the final manuscript.

Funding Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL. Publishing was funded by the Open Access Fund of Leipzig University.

Data availability All supplementary and raw data can be provided on request.

Declarations

Conflict of interest The authors declare no competing interests.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

- Almeria S, Cabezon O, Paniagua J, Cano-Terriza D, Jiménez-Ruiz S, Arenas-Montes A, Dubey JP, García-Bocanegra I (2018) *Toxoplasma gondii* in sympatric domestic and wild ungulates in the Mediterranean ecosystem. *Parasitol Res* 117:665–671. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5705-6>
- Baril L, Ancelle T, Goulet V, Thulliez P, Tirard-Fleury V, Carme B (1999) Risk factors for *Toxoplasma* infection in pregnancy: a case-control study in France. *Scand J Infect Dis* 31:305–309. <https://doi.org/10.1080/00365549950163626>
- Beltrán-Beck B, García FJ, Gortázar C (2012) Raccoons in Europe: disease hazards due to the establishment of an invasive species. *Eur J Wildl Res* 58:5–15. <https://doi.org/10.1007/s10344-011-0600-4>
- Berger-Schoch AE, Bernet D, Doherr MG, Gottstein B, Frey CF (2011) *Toxoplasma gondii* in Switzerland: a serosurvey based on meat juice analysis of slaughtered pigs, wild boar, sheep and cattle. *Zoonoses Public Health* 58:472–478. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2011.01395.x>
- Bigler WJ, Jenkins JH, Cumbie PM, Hoff GL, Prather EC (1975) Wildlife and environmental health: raccoons as indicators of zoonoses and pollutants in southeastern United States. *J Am Vet Med Assoc* 167:592–597
- Burger J (2000) Gender differences in meal patterns: role of self-caught fish and wild game in meat and fish diets. *Environ Res* 83:140–149. <https://doi.org/10.1006/enrs.2000.4060>
- Burridge MJ, Bigler WJ, Forrester DJ, Hennemann JM (1979) Serologic survey for *Toxoplasma gondii* in wild animals in Florida. *J Am Vet Med Assoc* 175:964–967
- Carme B, Bissuel F, Ajzenberg D, Bouyne R, Aznar C, Demar M, Bichat S, Louvel D, Bourbigot AM, Peneau C, Neron P, Dardé ML (2002) Severe acquired toxoplasmosis in immunocompetent adult patients in French Guiana. *J Clin Microbiol* 40:4037–4044. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.11.4037-4044.2002>
- Cook AJ, Gilbert RE, Buffalano W, Zufferey J, Petersen E, Jenum PA, Foulon W, Semprini AE, Dunn DT (2000) Sources of *toxoplasma* infection in pregnant women: European multicentre case-control study. *BMJ* 321:142–147. <https://doi.org/10.1136/bmj.321.7254.142>
- Dubey JP, Hamir AN, Shen SK, Thulliez P, Rupprecht CE (1993) Experimental *Toxoplasma gondii* infection in Raccoons (*Procyon lotor*). *J Parasitol* 79:548–552
- Dubey JP, Murata FHA, Cerqueira-Cézar CK, Kwok OCH (2021) Recent epidemiologic and clinical *Toxoplasma gondii* infections in wild canids and other carnivores: 2009–2020. *Vet Parasitol* 290:109337. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109337>
- Dubey JP (2021) *Toxoplasmosis of animals and humans*. CRC Press, Boca Raton, London, New York
- Dubey JP, Sundar N, Nolden CA, Samuel MD, Velmurugan GV, Bandini LA, Kwok OCH, Bodenstein B, Su C (2007) Characterization of *Toxoplasma gondii* from raccoons (*Procyon lotor*), coyotes (*Canis latrans*), and striped skunks (*Mephitis mephitis*) in Wisconsin identified several atypical genotypes. *J Parasitol* 93:1524–1527. <https://doi.org/10.1645/GE-1245.1>
- Engelmann A, Köhnemann BA, Michler F-UF (2011) Nahrungsökologische Analyse von Exkrementen gefangener Waschbären (*Procyon lotor* L., 1758) aus dem Müritz-Nationalpark (Mecklenburg-Vorpommern) unter Berücksichtigung individueller Parameter. *Beiträge zur Jagd- und Wildforschung* 36:587–604
- Eurostat (2011) Statistics Explained: Degree of urbanisation classification - 2011 revision. https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Degree_of_urbanisation_classification_-_2011_revision. Accessed 20 Jan 2022
- Fecková M, Antolová D, Janičko M, Monika H, Štrkolcová G, Goldová M, Weissová T, Lukáč B, Nováková M (2020) The cross-sectional study of *Toxoplasma gondii* seroprevalence in selected groups of population in Slovakia. *Folia Microbiol* 65:871–877. <https://doi.org/10.1007/s12223-020-00797-2>
- Fredebaugh SL, Mateus-Pinilla NE, McAllister M, Warner RE, Weng H-Y (2011) Prevalence of antibody to *Toxoplasma gondii* in terrestrial wildlife in a natural area. *J Wildl Dis* 47:381–392. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-47.2.381>
- Gaines KF, Lord CG, Boring CS, Brislin IL, Gochfeld M, Burger J (2000) Raccoons as potential vectors of radionuclide contamination to human food chains from a nuclear industrial site. *J Wildl Manag* 64:199. <https://doi.org/10.2307/3802991>
- Gamble HR, Dubey JP, Lambillotte DN (2005) Comparison of a commercial ELISA with the modified agglutination test for detection of *Toxoplasma* infection in the domestic pig. *Vet Parasitol* 128:177–181. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.11.019>
- Gazzonis AL, Zanzani SA, Villa L, Manfredi MT (2020) *Toxoplasma gondii* infection in meat-producing small ruminants: meat juice serology and genotyping. *Parasitol Int* 76:102060. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2020.102060>
- Gehrt SD, Fritzell EK (1999) Growth rates and intraspecific variation in body weights of raccoons (*Procyon lotor*) in Southern Texas. *Am Midl Nat* 141:19–27. [https://doi.org/10.1674/0003-0031\(1999\)141\[0019:GRAIVJ\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1674/0003-0031(1999)141[0019:GRAIVJ]2.0.CO;2)
- Gerhold RW, Saraf P, Chapman A, Zou X, Hickling G, Stiver WH, Houston A, Souza M, Su C (2017) *Toxoplasma gondii* seroprevalence and genotype diversity in select wildlife species from the southeastern United States. *Parasit Vectors* 10:508. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2456-2>
- German Hunting Association (2019) Deutschland liebt Wildbret vom Wildschwein. <https://www.jagdverband.de/deutschland-liebt-wildbret-vom-wildschwein>. Accessed 20 Jan 2022
- German Hunting Association (2021) DJV-Handbuch Jagd 2021. DJV-Service GmbH, Bonn
- Gey AB (1998) Synopsis der Parasitenfauna des Waschbären (*Procyon lotor*) unter Berücksichtigung von Befunden aus Hessen. Justus-Liebig-Universität Gießen, Thesis
- Goguen AD, Riley SJ (2020) Consumption of wild-harvested meat in society. *Wildl Soc Bull* 44:553–563. <https://doi.org/10.1002/wsb.1108>
- Graser WH (2008) Density, demographic patterns, population structure, and pathogen exposure of raccoons in the Chicago metropolitan area. The Ohio State University, Master Thesis
- Grau GA, Sanderson GC, Rogers JP (1970) Age Determination of Raccoons. *J Wildl Manag* 34:364–373
- Halos L, Thébault A, Aubert D, Thomas M, Perret C, Geers R, Alliot A, Escotte-Binet S, Ajzenberg D, Dardé M-L, Durand B, Boireau P, Villena I (2010) An innovative survey underlining the significant level of contamination by *Toxoplasma gondii* of ovine meat consumed in France. *Int J Parasitol* 40:193–200. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.06.009>
- Hancock K, Thiele LA, Zajac AM, Elvingert F, Lindsay DS (2005) Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in raccoons

- (*Procyon lotor*) from an urban area of Northern Virginia. *J Parasitol* 91:694–695. <https://doi.org/10.1645/GE-443R>
- Heddergott M, Frantz AC, Stubbe M, Stubbe A, Ansorge H, Osten-Sacken N (2017) Seroprevalence and risk factors of *Toxoplasma gondii* infection in invasive raccoons (*Procyon lotor*) in Central Europe. *Parasitol Res* 116:2335–2340. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5518-7>
- Heddergott M, Müller F (2020) Hohe Prävalenz von Antikörpern gegen *Toxoplasma gondii* im Blutserum von Waschbären (*Procyon lotor*) aus der nordwestlichen hessischen Rhön, Deutschland. *Beiträge zur Jagd- und Wildforschung* 45:125–132
- Hill RE, Zimmerman JJ, Wills RW, Patton S, Clark WR (1998) Seroprevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* in free-ranging mammals in Iowa. *J Wildl Dis* 34:811–815. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-34.4.811>
- Hwang YT, Pitt JA, Quirk TW, Dubey JP (2007) Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in mesocarnivores of the Canadian prairies. *J Parasitol* 93:1370–1373. <https://doi.org/10.1645/GE-1319.1>
- Jones JL, Kruszon-Moran D, Wilson M, McQuillan G, Navin T, McAuley JB (2001) *Toxoplasma gondii* infection in the United States: seroprevalence and risk factors. *Am J Epidemiol* 154:357–365. <https://doi.org/10.1093/aje/154.4.357>
- Jones JL, Parise ME, Fiore AE (2014) Neglected parasitic infections in the United States: Toxoplasmosis. *Am J Trop Med Hyg* 90:794–799. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0722>
- Kornacka A, Cybulska A, Popiołek M, Kuśmierk N, Moskwa B (2018) Survey of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in raccoons (*Procyon lotor*) from the Czech Republic, Germany and Poland. *Vet Parasitol* 262:47–50. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.09.006>
- Lindsay DS, Spencer J, Rupprecht C, Blagburn BL (2001) Prevalence of agglutinating antibodies to *Neospora caninum* in raccoons, *Procyon lotor*. *J Parasitol* 87:1197–1198. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2001\)087\[1197:POAATN\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2001)087[1197:POAATN]2.0.CO;2)
- Lopes FMR, Gonçalves DD, Mitsuka-Breganó R, Freire RL, Navarro IT (2007) *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy. *Braz J Infect Dis* 11:496–506. <https://doi.org/10.1590/s1413-86702007000500011>
- Lundén A, Lind P, Engvall EO, Gustavsson K, Uggla A, Vågsholm I (2002) Serological survey of *Toxoplasma gondii* infection in pigs slaughtered in Sweden. *Scand J Infect Dis* 34:362–365. <https://doi.org/10.1080/00365540110080205>
- Macdonald DW, Loveridge AJ, Nowell K (2010) *Dramatis personae: an introduction to the wild felids*. In: Macdonald DW, Loveridge AJ (eds) *The Biology and Conservation of Wild Felids*. Oxford University Press, Oxford, pp 3–58
- Maruyama S, Kabeya H, Nakao R, Tanaka S, Sakai T, Xuan X, Katsube Y, Mikami T (2003) Seroprevalence of *Bartonella henselae*, *Toxoplasma gondii*, FIV and FeLV infections in domestic cats in Japan. *Microbiol Immunol* 47:147–153. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2003.tb02798.x>
- Matoba Y, Asano M, Masubuchi H, Askawa M (2002) First records of the genera *Eimeria* and *Isoospora* (Protozoa: Eimeriidae) obtained from feral raccoons (*Procyon lotor*) alien species in Japan and prevalence of serum antibodies to *Toxoplasma gondii* among the raccoons. *JPN J Zoo Wildl Med* 7:87–90. <https://doi.org/10.5686/jjzwm.7.87>
- McDonald JC, Gyorkos TW, Alberton B, MacLean JD, Richer G, Juraneck D (1990) An outbreak of toxoplasmosis in pregnant women in northern Québec. *J Infect Dis* 161:769–774. <https://doi.org/10.1093/infdis/161.4.769>
- Michler F-UF (2016) Säugetierkundliche Freilandforschung zur Populationsbiologie de Waschbären (*Procyon lotor*) in einem naturnahen Tierlandbuchewald im Müritzz-Nationalpark (Mecklenburg-Vorpommern). Technische Universität Dresden, Thesis
- Mitchell MA, Hungeford LL, Nixon C, Esker T, Sullivan J, Koerkenmeier R, Dubey JP (1999) Serologic survey for selected infectious disease agents in raccoons from Illinois. *J Wildl Dis* 35:347–355. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-35.2.347>
- Mitchell SM, Richardson DJ, Lindsay DS (2006) Prevalence of agglutinating antibodies to *Toxoplasma gondii* in striped skunks (*Mephitis mephitis*), opossums (*Didelphis virginiana*), and raccoons (*Procyon lotor*) from Connecticut. *J Parasitol* 92:664–665. <https://doi.org/10.1645/GE-800R.1>
- Montoya JG, Liesenfeld O (2004) Toxoplasmosis. *The Lancet* 363:1965–1976. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16412-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16412-X)
- Nöckler K, Serrano FJ, Boireau P, Kapel CMO, Pozio E (2005) Experimental studies in pigs on *Trichinella* detection in different diagnostic matrices. *Vet Parasitol* 132:85–90. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.05.033>
- Ross RD, Stec LA, Werner JC, Blumenkranz MS, Glazer L, Williams GA (2001) Presumed acquired ocular Toxoplasmosis in deer hunters. *Retina* 21:226–229. <https://doi.org/10.1097/00006982-200106000-00005>
- Sacks JJ, Delgado DG, Lobel HO, Parker RL (1983) Toxoplasmosis infection associated with eating undercooked venison. *Am J Epidemiol* 118:832–838. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a113701>
- Sato S, Kabeya H, Makino T, Suzuki K, Asano M, Inoue S, Sentsui H, Nogami S, Maruyama S (2011) Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in feral raccoons (*Procyon lotor*) in Japan. *J Parasitol* 97:956–957. <https://doi.org/10.1645/GE-2813.1>
- Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson M-A, Roy SL, Jones JL, Griffin PM (2011) Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. *Emerg Infect Dis* 17:7–15. <https://doi.org/10.3201/eid1701.p11101>
- Smith DD, Frenkel JK (1995) Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in wild mammals of Missouri and east central Kansas: biologic and ecologic considerations of transmission. *J Wildl Dis* 31:15–21. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-31.1.15>
- Smith KE, Zimmerman JJ, Patton S, Beran GW, Hill HT (1992) The epidemiology of toxoplasmosis in Iowa swine farms with an emphasis on the roles of free-living mammals. *Vet Parasitol* 42:199–211. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(92\)90062-E](https://doi.org/10.1016/0304-4017(92)90062-E)
- Statistisches Bundesamt (2021) Gemeindeverzeichnis. https://www.destatis.de/DE/Themen/Laender-Regionen/Regionales/Gemeindeverzeichnis/Administrativ/Archiv/GVAuszug/31122020_Auszug_GV.xlsx?__blob=publicationFile. Accessed 29 Apr 2022
- Wallander C, Frössling J, Vågsholm I, Uggla A, Lundén A (2015) *Toxoplasma gondii* seroprevalence in wild boars (*Sus scrofa*) in Sweden and evaluation of ELISA test performance. *Epidemiol Infect* 143:1913–1921. <https://doi.org/10.1017/S0950268814002891>
- Wilking H, Thamm M, Stark K, Aebischer T, Seeber F (2016) Prevalence, incidence estimations, and risk factors of *Toxoplasma gondii* infection in Germany: a representative, cross-sectional, serological study. *Sci Rep* 6:22551. <https://doi.org/10.1038/srep22551>
- Wingstrand A, Lind P, Haugegaard J, Henriksen S, Bille-Hansen V, Sørensen V (1997) Clinical observations, pathology, bioassay in mice and serological response at slaughter in pigs experimentally infected with *Toxoplasma gondii*. *Vet Parasitol* 72:129–140. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(97\)00034-4](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(97)00034-4)
- Yamaguchi E, Takada MB, Fujii K, Kobayashi K, Imai K, Kadohira M (2015) Association between seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in raccoons and environmental factors of their habitats in Tokachi District, Hokkaido, Japan. *J Vet Epidemiol* 19:108–113. <https://doi.org/10.2743/jve.19.108>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

3.2 Publikation 2

Stellungnahme zum Eigenanteil der Publikation 2:

Hiermit erkläre ich, dass ich die Versuchsplanung selbstständig mit der Unterstützung von Dr. Martin Köthe und Prof. Dr. Ahmad Hamedy durchgeführt habe. Die Versuchsdurchführung und -auswertung darüber hinaus die Erstellung des Manuskriptes habe ich eigenständig durchgeführt. Unterstützt wurde ich dabei von Dr. Martin Köthe und Prof. Dr. Ahmad Hamedy. Die Literaturrecherche habe ich selbstständig durchgeführt, sowie Abbildungen und Tabellen erstellt. Die statistische Auswertung habe ich mit der Unterstützung von Dr. Martin Köthe durchgeführt. Mit Hilfe und Rücksprache durch Dr. Martin Köthe und Prof. Dr. Ahmad Hamedy wurde das Manuskript final verfasst und eingereicht.

Direct detection and quantification of *Toxoplasma gondii* in meat samples from feral raccoons (*Procyon lotor*) in Germany by magnetic-capture real-time PCR

Lydia Engel, Ahmad Hamedy, Martin Koethe

Institute of Food Hygiene, Leipzig University, An den Tierkliniken 1, 04103 Leipzig, Germany

Eingereicht: 17. Oktober 2022

Akzeptiert: 11. November 2022

Publiziert: 19. November 2022

Parasitology Research 2022, <https://doi.org/10.1007/s00436-022-07730-1>



Direct detection and quantification of *Toxoplasma gondii* in meat samples from feral raccoons (*Procyon lotor*) in Germany by magnetic-capture real-time PCR

Lydia Engel¹ · Ahmad Hamedy¹ · Martin Koethe¹Received: 17 October 2022 / Accepted: 11 November 2022
© The Author(s) 2022

Abstract

Because the number of wild raccoons in Germany is increasing constantly, it appears to be economic reasonable to use their meat as food. For this purpose, it is essential to generate data regarding the pathogen load of the meat to be consumed and handled. It is known that raccoons, particularly in Germany, show a high seroprevalence of *Toxoplasma gondii*. Because serological data only indicates contact of a host to a parasite additional direct detection is needed to prove presence of parasitic stages in particular tissues. Therefore, a total of 150 samples from raccoons with known serostatus were tested and quantified using magnetic-capture real-time PCR for *Toxoplasma gondii*. As it represents potentially consumption-relevant parts of raccoons, meat from forelimb and hindlimb was examined. Samples were stratified into three groups based on the animals' serostatus (each 50 negative, low positive, and high positive). All samples from seronegative animals were found negative by MC-PCR as well. In a total of 56 meat samples from 100 seropositive animals, *T. gondii* DNA was detected. Statistically significant more samples were positive by MC-PCR in the high positive than in the low positive serostatus group (38/50 vs. 18/50, $p < 0.0001$). Furthermore, samples from the former group were also found to have statistically significant higher DNA equivalent values compared to samples from the low positive serostatus group ($p < 0.0001$). These results suggest that meat from seropositive raccoons may contain considerable numbers of *T. gondii* presenting a potential public health risk for humans whilst handling and consumption.

Keywords Wildlife · Game · Zoonosis · DNA · MC-PCR

Introduction

Toxoplasma gondii is a coccidian parasite, which can probably infect all warm-blooded animals as intermediate hosts and cats as definitive hosts (Tenter et al. 2000). Whilst only Felidae excrete oocysts, all warm-blooded animals can accommodate tissue cysts in brain or muscles (Dubey 2022). Humans can become infected by a wide range of exposures. Tissue cysts containing infectious bradyzoites can be taken up through contaminated raw or undercooked meat of food-producing animals or wildlife (Jones and Dubey

2012). Additionally, the infectious oocysts can be transmitted through ingestion of contaminated food, soil, or water by cat faeces (Jones et al. 2014). Toxoplasmosis usually stays subclinical or is accompanied by mild symptoms of illness like fever, malaise, and lymphadenopathy. However, in people with pre-existing disease or immunosuppression, severe disease processes with neurologic involvement, most commonly due to encephalitis, and up to mortality may occur (Jones et al. 2014). Primary maternal infection can lead to transmission of the parasite to the foetus and a wide range of clinical manifestations like ocular disease, hydrocephalus, and intracerebral calcifications, or even abortion may arise (Dubey 2022). Due to its medical and veterinary importance, *T. gondii* is considered one of the most well-studied parasites (Dubey 2022). However, many studies on food-producing animals and game are mainly focusing on the presence of antibodies (Berger-Schoch et al. 2011; Bier et al. 2020; Lundén et al. 2002; Račka et al. 2015). Furthermore, economic and public health aspects regarding wild canids

Section Editor: Nawal Hijjawi

✉ Lydia Engel
lydia.engel@vetmed.uni-leipzig.de¹ Institute of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Leipzig University, An den Tierkliniken 1, 04103 Leipzig, Germany

and other carnivores like raccoons, which are mainly raised for fur or meat production, have also been discussed recently (Dubey et al. 2021).

The raccoon (*Procyon lotor*) originated in North America and became established in Europe at the beginning of the past century (Kauhala 1996; Lutz 1995). As the spread increased strongly from the 1970s onwards (Lutz 1995), population management measures have become more and more important since this uncontrolled distribution (Beltrán-Beck et al. 2012; Salgado 2018). Along to this, the German Hunting Association (DJV) has recorded a strong increase in the annual hunting bag data, from about 8000 in the year 1999/2000 to more than 200,000 in 2019/2020 (German Hunting Association 2021). With the increasing popularity of eating game (German Hunting Association 2019), the use of raccoon meat may also be increasingly conceivable, as well as in other countries such as the USA, even though raccoon is still consumed less than the usual game species there (Burger 2000; Gaines et al. 2000; German Hunting Association 2020; Goguen and Riley 2020). However, raccoon meat consumption is rather rare in Germany, but is considered to be a delicacy amongst hunters (German Hunting Association 2020).

Using serological analyses, a large number of individuals can be examined at low cost, so these are preferred for screening (Opsteegh et al. 2011). A positive serological result only indicates exposure to the parasite, but does not confirm presence of the parasite in host tissues (Dubey 2022). However, the presence of antibodies may indicate an infection risk by consuming meat, if there is a strong correlation between the presence of antibodies against *T. gondii* and tissue cysts (Opsteegh et al. 2011). This correlation can be different in the various host species. Whilst strong correlations were found for pigs and sheep (Dubey et al. 2008; Gamble et al. 2005; Opsteegh et al. 2010), this was not the case for cattle (Opsteegh et al. 2011). Therefore, it is needed to examine such correlation for a specific species, i.e. the raccoon. Additionally, different parts of the organism may be affected to varying degrees by tissue cysts (Dubey 2022; Koethe et al. 2015; Tenter et al. 2000). Thus, to assess the human health risk, *T. gondii* infestation of consumption-relevant meat parts from raccoons needs to be evaluated.

Recent studies demonstrated a high seroprevalence of *T. gondii* in German raccoons (Engel et al. 2022; Heddergott et al. 2017; Heddergott and Müller 2020). However, seropositive animals do not immediately pose a risk to humans, as they do not always harbour tissue cysts with infectious parasites (Halos et al. 2010). Nevertheless, when performed conventionally, essential direct detection is laborious, costly, and insufficiently sensitive (Algaba et al. 2017). Due to this, there is not much published information on PCR for *T. gondii* in rarely consumed species like raccoons. For naturally infected feral raccoons, one

study was conducted in Poland using a conventional PCR to analyse brain, lung, and heart of the animals for *T. gondii* DNA (Kornacka et al. 2018). However, conventional DNA extraction methods are not very sensitive as only small amounts of tissue with a maximum of 50 mg can typically be examined and the distribution of *T. gondii* tissue cysts is non-homogeneous in hosts (Opsteegh et al. 2010). Due to a lack of sensitivity, Opsteegh et al. (2010) developed a method in which up to 100 g of tissue can be analysed for the presence of *T. gondii* DNA, by sequence-specific DNA extraction using magnetic capture followed by real-time PCR. Since then, this magnetic-capture PCR (MC-PCR) has been successfully applied to various animal species or animal products with several minor modifications and different experimental setups (Gomez-Samblas et al. 2015; Hosein et al. 2016; Juránková et al. 2013; Koethe et al. 2015; Nicholas et al. 2018; Stollberg et al. 2021). Additionally, real-time quantitative PCR (qPCR) offers the advantage for quantification of parasite DNA. In general, PCR methods itself are sensitive, as they can detect DNA from as few as one tachyzoite, specific, and enable quick diagnosis (Dubey 2022). Since there are different types of PCR, quantitative MC-PCR was found to be the most sensitive method for detecting *T. gondii* DNA (Stollberg et al. 2021). Because of the high seroprevalence of German raccoons (Engel et al. 2022; Heddergott et al. 2017; Heddergott and Müller 2020), this study focuses on direct detection of *T. gondii* DNA in consumption-relevant raccoon meat by MC-PCR to provide more relevant information for future human health risk evaluation. To the authors' knowledge, this is the first time MC-PCR was performed on raccoon meat.

Material and methods

Meat samples

Raccoons were gathered for sampling as previously detailed by Engel et al. (2022). Based on serological investigations performed previously by Engel et al. (2022), according to enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) results, animals were stratified into three groups. One group comprised seronegative animals with a sample to positive control (*S/P*) ratio < 8%. The other groups comprised either low positive animals with an *S/P* ratio between 30 and 60% or high positive ones with an *S/P* ratio > 120%. From each group, 50 raccoons were randomly chosen and sampled for molecular diagnostics. For sampling, each one previously frozen forelimb and hindlimb of every animal were defrosted for 2 days in a refrigeration chamber at 1 °C.

Magnetic-capture DNA extraction and real-time PCR

Samples were prepared and DNA was extracted by magnetic capture as described by Opsteegh et al. (2010) using minor modifications (Koethe et al. 2015) as well as some additional slight deviations. Approximately 100 g (67.1–116.2 g) meat sample (free of fat and connective tissue), which was composed of approximately 75% of the hindlimb and 25% of the forelimb due to meat availability, was used for further examination.

T. gondii tachyzoites (ME 49) were kindly provided from Institute of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Leipzig University, in Dulbecco Modified Eagle Medium (including 10% foetal bovine serum, 1% penicillin/streptomycin). To generate quantification standards and control samples for each magnetic-capture (MC) DNA extraction, meat from nine seronegative raccoons (*S/P* ratio < 4%) was demonstrated *T. gondii* DNA-free by MC-PCR, pooled, and split into 10-g aliquots. Tachyzoites were serially diluted in phosphate buffered saline (PBS) and added at a final concentration of 10^6 to 10^2 per 10 g of negative raccoon meat aliquot for quantification standards. For these standards, DNA was extracted by magnetic capture and thereupon included in every PCR run to calculate the amount of *T. gondii* in the examined sample. Additionally, for every MC-DNA extraction approach a 10-g meat aliquot was spiked with 10^3 tachyzoites to serve as positive extraction control. Another 10-g meat aliquot without tachyzoites was included as negative extraction control. By comparing the resulting sample cycle threshold value (C_t value) with the standards the quantity of *T. gondii* genome equivalents of each sample was calculated (StepOnePlus software, Life Technologies, Germany) and adjusted to determine the number of genome equivalents per 100 g of meat, expressed as \log_{10} values. Qualitatively, MC-PCR results with C_t values < 35 were considered positive, and samples with C_t values > 40 were regarded as negative. From samples with C_t values between 35 and 40, the respective amplification curves were visually inspected and considered negative when no typical amplification course was observed.

Statistics

The statistical analyses were performed by Prism9 Software (GraphPad Software, LLC, USA). Low and high positive serostatus groups were compared by chi-square test regarding qualitative PCR results. To analyse for differences between these two groups in respect to genome equivalents per 100 g meat, quantitative PCR results were compared by *t*-test after confirmation of Gaussian data distribution. The Spearman correlation coefficient (r_s) was determined to describe the relationship between *S/P* ratio and DNA

equivalents present in 100 g meat. In general, $p < 0.05$ was regarded statistically significant.

Results

In 56 of 150 examined raccoon meat samples *T. gondii* DNA was detected by MC-PCR. All of the 50 serologically negative animals were also found to be negative for *T. gondii* DNA. Out of the serologically low positives (30–60% *S/P* ratio), 18 samples (36%) were MC-PCR positive, whilst 38 out of the 50 analysed samples from the high positive serostatus group (76%) were found to contain *T. gondii* DNA. Statistically, significantly more positive samples were detected in the high positive serostatus group (chi-square test, $p < 0.0001$). Detailed results are shown in Table 1.

In samples with high *S/P* ratios statistically significant higher DNA equivalent values were detected compared to MC-PCR positive samples with lower *S/P* ratio (4.688 vs. 3.610 \log_{10} ; $p < 0.0001$). In general, the amount of *T. gondii* DNA equivalents amongst the MC-PCR positive samples ranged from 2.622 \log_{10} (*S/P* ratio of this sample: 30.02%) to 6.352 \log_{10} (*S/P* ratio: 177%) per 100 g meat. Details on quantitative results are shown in Fig. 1.

Based on the quantitative MC-PCR results of the herein analysed samples, there was a positive correlation between *S/P* ratio and DNA equivalents ($r_s = 0.5439$, $p < 0.0001$), which is illustrated in Fig. 2.

Discussion

Generally, in many studies *T. gondii* DNA was detected in samples from seropositive animals, including wildlife (Dubey 2022). Particularly for Germany, foxes (*Vulpes vulpes*) (Herrmann et al. 2012), wild boars (*Sus scrofa*), roe deer (*Capreolus capreolus*), and red deer (*Cervus elaphus*) were shown to contain *T. gondii* DNA (Stollberg et al. 2021). For raccoons, Kornacka et al. (2018) recently detected *T. gondii* DNA in typical predilection sites of seropositive animals by conventional PCR, especially in the brain but also in lungs and hearts. Based on only a few samples, they reported

Table 1 Qualitative MC-PCR results of raccoon meat samples grouped by serostatus of the originating animals

MC-PCR result	Serological result (<i>S/P</i> ratio)			Total
	Negative (< 8%)	Low positive (30–60%)	High positive (> 120%)	
Positive	0	18	38	56
Negative	50	32	12	94
Total	50	50	50	150

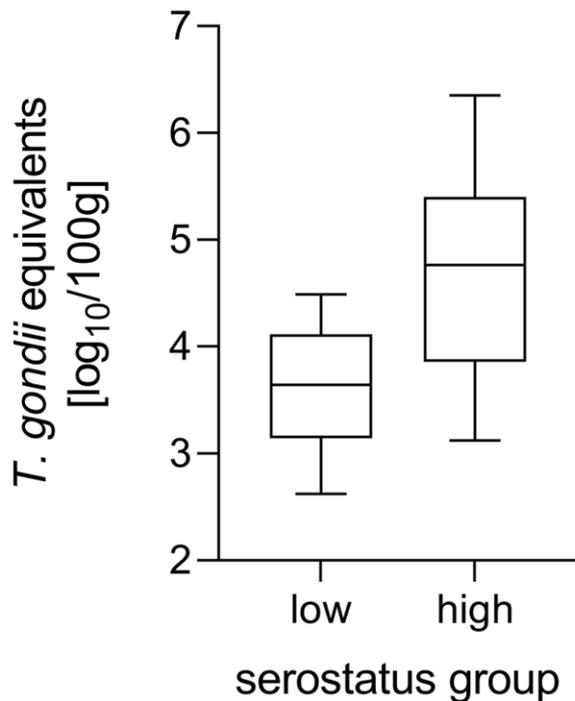


Fig. 1 Box-and-whisker diagram of quantitative MC-PCR result distribution in the low and high positive serostatus groups. Minimum, 25% percentile, median, 75% percentile, and maximum are displayed from 18 (low positive serostatus) or 38 (high positive serostatus) MC-PCR positive samples

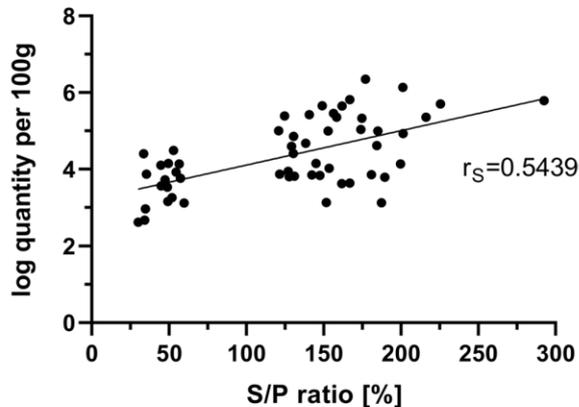


Fig. 2 Scatter diagram of quantitative MC-PCR results (\log_{10} values) depending on serological results (S/P ratio). Best-fit line from linear regression and Spearman correlation coefficient (r_s) are displayed

detection of *T. gondii* DNA in 50% (3/6) of serologically positive animals originating from Poland and Germany. Using the more sensitive MC-PCR method, we detected *T. gondii* DNA in meat samples of 56% (56/100) of serological

positive raccoons. Further investigations in German wildlife made comparable findings, where approximately 52% (24/46) of wild boar and 41% (7/17) of roe deer samples were serological positive as well as DNA positive by PCR (Stollberg et al. 2021).

A higher agreement was detected in Canadian foxes with approximately 69% (11/16) of serological positives which were positive by MC-PCR as well (Nicholas et al. 2018). A much lower proportion of DNA positives in serological positive red foxes from Italy (approximately 8%, 8/102) was reported by Verin et al. (2013). Similar low agreements were found for German foxes by Herrmann et al. (2012), who observed DNA in 48 out of 301 (16%) serological positive animals by conventional PCR. Analysing German red deer, Stollberg et al. (2021) also found a comparable low proportion of PCR positive results on seropositive animals (25%). However, only single animals of red deer have been tested ($n=4$) in that study. A high detection rate of DNA in serologically positive samples, e.g. as detected by Nicholas et al. (2018) with 69%, might be caused by different factors. They also used the sensitive MC-PCR method for DNA detection but examined tissues like brain and heart that are known to be predilection sites in many species (Juránková et al. 2014a, 2015; Koethe et al. 2015; Santoro et al. 2019), which might account for the higher detection rate compared to our results in skeletal muscle samples. MC-PCR is still not commonly used in animals or meat products, as it is a very laborious and expensive investigation. However, this type of DNA extraction was repeatedly found to be considerably more sensitive than conventional ones (Juránková et al. 2014b; Opsteegh et al. 2010). Using conventional PCR can, therefore, be a reason for lower DNA detection rates in seropositive animals.

To detect *T. gondii* DNA in meat products, especially for products that are usually uncooked, it is possible to apply MC-PCR as well. For example, it was successfully deployed for the examination of serrano ham, which was found to contain *T. gondii* DNA with a prevalence of approximately 9% (Gomez-Samblas et al. 2015). However, MC-PCR is performed mostly on predilection sites of *T. gondii*, which are expected to have a higher prevalence than examining skeletal muscle. Whilst this is reasonable for general parasitic investigations the aim of this study was to contribute knowledge on prevalence and quantity of *T. gondii* in raccoon meat parts that are relevant for potential consumption. Different sample material may also account for differences in DNA detection rates.

Additionally, differences on the level of agreement between serostatus and DNA prevalence may be due to the corresponding antibody level and the applied method of serological examination. In this study, animals were stratified according to serological status into serological low positive and high positive based on previous ELISA

results (Engel et al. 2022). Different serological methods may include distinct discrimination levels, which could lead to a different categorization of serological results and, thus, to a different level of agreement. To date, the dynamics of antibody response following contact with the parasite in raccoons are not well known. Thus, the extent to which a current serostatus information is reliable for the infection status of a raccoon is uncertain.

All serologically negative raccoons examined in this study also proved negative in MC-PCR. For raccoons, Kornacka et al. (2018) identified 44% (15/34) serologically negative animals to contain *T. gondii* DNA in animal predilection sites, which is contrary to our observations, but is similar to previous investigations for other animals. Nicholas et al. (2018) found 30% (7/23) of serological negative foxes in Canada to be positive by MC-PCR for *T. gondii* DNA. This might be because they examined the predilection sites of animals, where tissue cysts are usually most common. Furthermore, we only investigated animals with a very low *S/P* ratio (<8%) for the seronegative group, whilst all animals with an *S/P* ratio <25% are regarded negative according to the manufacturers' instructions. Kornacka et al. (2018) used the same test and it must be assumed that seronegative animals from their study have a broader *S/P* range compared to the seronegative animals in our study. Similar findings were made previously for other animals, using serological examinations and bioassay. Seronegative pigs rarely also harboured infectious *T. gondii* stages (Dubey et al. 1995) which was later discussed to be because of a very recent infection or of a decrease of antibodies to an undetectable level (Dubey 2022).

In this study, we detected a positive correlation between antibody level and presence of *T. gondii* DNA. For 36% of the serologically low positive animals and for 76% of the serologically high positive animals, *T. gondii* DNA could be detected. Similar observations were made for other species as well. In chickens, a correlation was observed between serological status and pathogen isolation. The frequency of *T. gondii* isolation increased sharply with rising MAT titres; whilst only 61% were isolated at low titres, it was already up to 75% at high titres using a bioassay (Dubey et al. 2016). This leads to the conclusion that higher seroprevalence titres are related to higher parasite loads (Dubey 2022).

However, results strongly depend on the examined tissue, DNA extraction method, PCR method (Dubey 2022), and the amount examined, as it is known that *T. gondii* is not homogeneously distributed in organisms (Opsteegh et al. 2010). For detection of infectious parasites, a bioassay, e.g. together with a cell culture, is necessary which is very time-consuming, associated with high costs, and requires the use of laboratory animals (Algaba et al. 2017; Dubey 2022). Using PCR, only DNA detections are obtained. The material costs of MC-PCR are higher than for conventional DNA

extraction, which is usually performed with a special kit but they are not as high as for a bioassay (Opsteegh et al. 2010). Thus, MC-PCR can be used as an alternative to bioassay in respect to detection and genotyping of *T. gondii*, and to quantify the organism in meat samples of various source (Opsteegh et al. 2010).

For wild animals in Germany, the examination of tissue by MC-PCR showed the best agreement for DNA detection in relation to serological examinations (Stollberg et al. 2021). For sheep and lambs, there was a statistically significant increase in the probability of isolating *T. gondii* in skeletal muscle with increasing sample size per animal (Rani et al. 2020). Since in conventional PCR only a few milligrams or up to a few grams of meat can be examined, an MC-PCR has a significantly higher probability for detecting parasite DNA when using up to 100 g meat.

Finally, we observed skeletal muscle tissue as meat for potential human consumption. Since for different animal species brain and heart were found to be the main predilection sites for *T. gondii* tissue cysts (Juránková et al. 2014a, 2015; Koethe et al. 2015; Santoro et al. 2019) we may underestimate the general prevalence of *T. gondii* DNA in raccoons. However, the focus of this study rather was the detection of parasite burden in consumption relevant parts of raccoons to provide knowledge for further public health evaluations on this kind of meat. We found that meat from seropositive raccoons may contain up to about 6 log₁₀ of *T. gondii* equivalents. Based on the modelling of Guo et al. (2016) this number would be sufficient for a high probability of infection in humans.

Conclusion

Previous seroepidemiological research proved a high presence of *T. gondii* in German raccoons. In addition, we showed a high detection rate of *T. gondii* DNA in meat from seropositive raccoons. Seropositive animals could harbour considerable numbers of *T. gondii*, where antibody titre is positively correlated with DNA amount. If the parasites in meat are also likely to be infective, appropriate care must be taken to avoid infection and the meat has to be sufficiently heated before consumption. To better assess the public health risk posed by raccoon meat, further investigations, such as bioassay for evaluation of parasite infectivity, need to be performed.

Acknowledgements We are grateful to Zaida Melina Renteria Solis from the Institute of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Leipzig University for providing the *T. gondii* tachyzoites.

Author contribution All authors made substantial contribution to the conception and design of the study. L. E. collected the data. M. K. and L. E. analysed and interpreted the data. L. E. has written the first draft of the manuscript and all authors revised it critically. All authors read and approved the final manuscript.

Funding Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

Data availability The data related to the manuscript will be available upon request to the corresponding author.

Declarations

Ethics approval Not applicable.

Consent to participate Not applicable.

Consent for publication Not applicable.

Conflict of interest The authors declare no competing interests.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

- Algaba IG, Geerts M, Jennes M, Coucke W, Opsteegh M, Cox E, Dorny P, Dierick K, de Craeye S (2017) A more sensitive, efficient and ISO 17025 validated magnetic capture real time PCR method for the detection of archetypal *Toxoplasma gondii* strains in meat. *Int J Parasitol* 47:875–884. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2017.05.005>
- Beltrán-Beck B, García FJ, Gortázar C (2012) Raccoons in Europe: disease hazards due to the establishment of an invasive species. *Eur J Wildl Res* 58:5–15. <https://doi.org/10.1007/s10344-011-0600-4>
- Berger-Schoch AE, Bernet D, Doherr MG, Gottstein B, Frey CF (2011) *Toxoplasma gondii* in Switzerland: a serosurvey based on meat juice analysis of slaughtered pigs, wild boar, sheep and cattle. *Zoonoses Publ Health* 58:472–478. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2011.01395.x>
- Bier NS, Stollberg K, Mayer-Scholl A, John A, Nöckler K, Richter M (2020) Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in wild boar and deer in Brandenburg, Germany. *Zoonoses Publ Health* 67:601–606. <https://doi.org/10.1111/zph.12702>
- Burger J (2000) Gender differences in meal patterns: role of self-caught fish and wild game in meat and fish diets. *Environ Res* 83:140–149. <https://doi.org/10.1006/enrs.2000.4060>
- Dubey JP, Thulliez P, Weigel RM, Andrews CD, Lind P, Powell EC (1995) Sensitivity and specificity of various serologic tests for detection of *Toxoplasma gondii* infection in naturally infected sows. *Am J Vet Res* 56:1030–1036
- Dubey JP, Sundar N, Hill D, Velmurugan GV, Bandini LA, Kwok OCH, Majumdar D, Su C (2008) High prevalence and abundant atypical genotypes of *Toxoplasma gondii* isolated from lambs destined for human consumption in the USA. *Int J Parasitol* 38:999–1006. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.11.012>
- Dubey JP, Laurin E, Kwok OCH (2016) Validation of the modified agglutination test for the detection of *Toxoplasma gondii* in free-range chickens by using cat and mouse bioassay. *Parasitology* 143:314–319. <https://doi.org/10.1017/S0031182015001316>
- Dubey JP, Murata FHA, Cerqueira-Cézar CK, Kwok OCH (2021) Recent epidemiologic and clinical *Toxoplasma gondii* infections in wild canids and other carnivores: 2009–2020. *Vet Parasitol* 290:109337. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109337>
- Dubey JP (2022) *Toxoplasmosis of animals and humans*. CRC Press, Boca Raton, London, New York
- Engel L, Hamedy A, Kornacka-Stackonis A, Langner T, Birka S, Koethe M (2022) *Toxoplasma gondii* in raccoons (*Procyon lotor*) in Germany: a serosurvey based on meat juice. *Parasitol Res* 121:3417–3425. <https://doi.org/10.1007/s00436-022-07646-w>
- Gaines KF, Lord CG, Boring CS, Brisbin IL, Gochfeld M, Burger J (2000) Raccoons as potential vectors of radionuclide contamination to human food chains from a nuclear industrial site. *J Wildl Manag* 64:199. <https://doi.org/10.2307/3802991>
- Gamble HR, Dubey JP, Lambillotte DN (2005) Comparison of a commercial ELISA with the modified agglutination test for detection of *Toxoplasma* infection in the domestic pig. *Vet Parasitol* 128:177–181. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.11.019>
- German Hunting Association (2019) Deutschland liebt Wildbret vom Wildschwein. <https://www.jagdverband.de/deutschland-liebt-wildbret-vom-wildschwein>. Accessed 20 January 2022
- German Hunting Association (2020) Ein bärig guter Braten? <https://www.jagdverband.de/ein-baerig-guter-braten>. Accessed 20 January 2022
- German Hunting Association (2021) DJV-Handbuch Jagd 2021. DJV-Service GmbH, Bonn
- Goguen AD, Riley SJ (2020) Consumption of wild-harvested meat in society. *Wildl Soc Bull* 44:553–563. <https://doi.org/10.1002/wsb.1108>
- Gomez-Samblas M, Vílchez S, Racero JC, Fuentes MV, Osuna A (2015) Quantification and viability assays of *Toxoplasma gondii* in commercial “Serrano” ham samples using magnetic capture real-time qPCR and bioassay techniques. *Food Microbiol* 46:107–113. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.07.003>
- Guo M, Mishra A, Buchanan RL, Dubey JP, Hill DE, Gamble HR, Jones JL, Du X, Pradhan AK (2016) Development of dose-response models to predict the relationship for human *Toxoplasma gondii* infection associated with meat consumption. *Risk Anal* 36:926–938. <https://doi.org/10.1111/risa.12500>
- Halos L, Thébault A, Aubert D, Thomas M, Perret C, Geers R, Alliot A, Escotte-Binet S, Ajzenberg D, Dardé M-L, Durand B, Boireau P, Villena I (2010) An innovative survey underlining the significant level of contamination by *Toxoplasma gondii* of ovine meat consumed in France. *Int J Parasitol* 40:193–200. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.06.009>
- Heddergott M, Frantz AC, Stubbe M, Stubbe A, Ansoerge H, Osten-Sacken N (2017) Seroprevalence and risk factors of *Toxoplasma gondii* infection in invasive raccoons (*Procyon lotor*) in Central Europe. *Parasitol Res* 116:2335–2340. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5518-7>
- Heddergott M, Müller F (2020) Hohe Prävalenz von Antikörpern gegen *Toxoplasma gondii* im Blutserum von Waschbären (*Procyon lotor*) aus der nordwestlichen hessischen Rhön, Deutschland. *Beiträge Zur Jagd- Und Wildforschung* 45:125–132
- Herrmann DC, Maksimov P, Maksimov A, Sutor A, Schwarz S, Jaschke W, Schliephake A, Denzin N, Conraths FJ, Schares G (2012) *Toxoplasma gondii* in foxes and rodents from the German Federal States of Brandenburg and Saxony-Anhalt: seroprevalence and genotypes. *Vet Parasitol* 185:78–85. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.10.030>

- Hosein S, Limon G, Dadios N, Guitian J, Blake DP (2016) *Toxoplasma gondii* detection in cattle: a slaughterhouse survey. *Vet Parasitol* 228:126–129. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.09.001>
- Jones JL, Dubey JP (2012) Foodborne toxoplasmosis. *Clin Infect Dis* 55:845–851. <https://doi.org/10.1093/cid/cis508>
- Jones JL, Parise ME, Fiore AE (2014) Neglected parasitic infections in the United States: toxoplasmosis. *Am J Trop Med Hyg* 90:794–799. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0722>
- Juránková J, Opsteegh M, Neumayerová H, Kovařík K, Frencová A, Baláz V, Volf J, Koudela B (2013) Quantification of *Toxoplasma gondii* in tissue samples of experimentally infected goats by magnetic capture and real-time PCR. *Vet Parasitol* 193:95–99. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.11.016>
- Juránková J, Basso W, Neumayerová H, Baláz V, Jánová E, Sidler X, Deplazes P, Koudela B (2014) Brain is the predilection site of *Toxoplasma gondii* in experimentally inoculated pigs as revealed by magnetic capture and real-time PCR. *Food Microbiol* 38:167–170. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.08.011>
- Juránková J, Hůrková-Hofmannová L, Volf J, Baláz V, Piálek J (2014) Efficacy of magnetic capture in comparison with conventional DNA isolation in a survey of *Toxoplasma gondii* in wild house mice. *Eur J Protistol* 50:11–15. <https://doi.org/10.1016/j.ejop.2013.08.002>
- Juránková J, Basso W, Neumayerová H, Frencová A, Baláz V, Deplazes P, Koudela B (2015) Predilection sites for *Toxoplasma gondii* in sheep tissues revealed by magnetic capture and real-time PCR detection. *Food Microbiol* 52:150–153. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.07.005>
- Kauhala K (1996) Introduced carnivores in Europe with special reference to central and northern Europe. *Wildl Biol* 2:197–204. <https://doi.org/10.2981/wlb.1996.019>
- Koethe M, Straubinger RK, Pott S, Bangoura B, Geuthner A-C, Daugschies A, Ludewig M (2015) Quantitative detection of *Toxoplasma gondii* in tissues of experimentally infected turkeys and in retail turkey products by magnetic-capture PCR. *Food Microbiol* 52:11–17. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.06.005>
- Kornacka A, Cybulska A, Popiołek M, Kuśmierk N, Moskwa B (2018) Survey of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in raccoons (*Procyon lotor*) from the Czech Republic, Germany and Poland. *Vet Parasitol* 262:47–50. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.09.006>
- Lundén A, Lind P, Engvall EO, Gustavsson K, Uggla A, Vågsholm I (2002) Serological survey of *Toxoplasma gondii* infection in pigs slaughtered in Sweden. *Scand J Infect Dis* 34:362–365. <https://doi.org/10.1080/00365540110080205>
- Lutz W (1995) Occurrence and morphometrics of the raccoon *Procyon lotor* L. in Germany. *Ann Zool Fennici* 32:15–20
- Nicholas B, Ravel A, Leighton P, Stephen C, Iqbal A, Ndao M, Konecni K, Fernando C, Jenkins E (2018) Foxes (*Vulpes vulpes*) as sentinels for parasitic zoonoses, *Toxoplasma gondii* and *Trichinella nativa*, in the northeastern Canadian Arctic. *Int J Parasitol Parasites Wildl* 7:391–397. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2018.10.003>
- Opsteegh M, Langelaar M, Sprong H, den Hartog L, de Craeye S, Bokken G, Ajzenberg D, Kijlstra A, van der Giessen J (2010) Direct detection and genotyping of *Toxoplasma gondii* in meat samples using magnetic capture and PCR. *Int J Food Microbiol* 139:193–201. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.02.027>
- Opsteegh M, Teunis P, Züchner L, Koets A, Langelaar M, van der Giessen J (2011) Low predictive value of seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in cattle for detection of parasite DNA. *Int J Parasitol* 41:343–354. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2010.10.006>
- Račka K, Bártošová E, Budíková M, Vodrážka P (2015) Survey of *Toxoplasma gondii* antibodies in meat juice of wild boar (*Sus scrofa*) in several districts of the Czech Republic. *Ann Agric Environ Med* 22:231–235. <https://doi.org/10.5604/12321966.1152071>
- Rani S, Cerqueira-Cézar CK, Murata FHA, Kwok OCH, Dubey JP, Pradhan AK (2020) Distribution of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in shoulder muscles of naturally infected goats and lambs. *J Food Prot* 83:1396–1401. <https://doi.org/10.4315/JFP-20-024>
- Salgado I (2018) Is the raccoon (*Procyon lotor*) out of control in Europe? *Biodivers Conserv* 27:2243–2256. <https://doi.org/10.1007/s10531-018-1535-9>
- Santoro M, Viscardi M, Sgroi G, D'Alessio N, Veneziano V, Pellicano R, Brunetti R, Fusco G (2019) Real-time PCR detection of *Toxoplasma gondii* in tissue samples of wild boars (*Sus scrofa*) from southern Italy reveals high prevalence and parasite load. *Parasit Vectors* 12:335. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3586-5>
- Stollberg KC, Schares G, Mayer-Scholl A, Hrushetska I, Diescher S, Johne A, Richter MH, Bier NS (2021) Comparison of direct and indirect *Toxoplasma gondii* detection and genotyping in game: relationship and challenges. *Microorganisms* 9:1663. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081663>
- Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM (2000) *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol* 30:1217–1258. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(00\)00124-7](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00124-7)
- Verin R, Mugnaini L, Nardoni S, Papini RA, Ariti G, Poli A, Mancianti F (2013) Serologic, molecular, and pathologic survey of *Toxoplasma gondii* infection in free-ranging red foxes (*Vulpes vulpes*) in central Italy. *J Wildl Dis* 49:545–551. <https://doi.org/10.7589/2011-07-204>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

4 Diskussion

Die Infektion mit *T. gondii* stellt insbesondere für Immunsupprimierte und Schwangere, vorrangig den Fötus einer seronegativen Mutter, ein erhebliches Gesundheitsrisiko dar. Die Folgen der Erkrankung können bis hin zum Tod führen. Aufgrund dessen sind Daten zur Ermittlung des humanen Risikos für eine Erkrankung unerlässlich. Die horizontale Erregerübertragung durch Lebensmittel, vornehmlich der Verzehr von Fleisch oder Fleischprodukten infizierter Tiere, welche nicht ausreichend erhitzt wurden und Gewebezysten enthalten, gehört zu den wichtigsten Infektionsquellen (BARIL et al. 1999; COOK et al. 2000; SCALLAN et al. 2011). Unzureichend erhitztes Fleisch, vor allem von Wildtieren, erwies sich dabei wiederholt als Ursache klinischer Symptome (CARME et al. 2002; ROSS et al. 2001). Die Exposition der lebensmittelliefernden Tiere mit *T. gondii* unterscheidet sich je nach Haltungsbedingungen und der Ernährungsgrundlage. Darüber hinaus variiert die Anzahl und die Verteilung der Gewebezysten in den verschiedenen Tierarten nach erfolgter natürlicher Infektion (TENTER 2009; TENTER et al. 2000). Entsprechend ist das Gefährdungspotential, welches von dem Fleisch der Tiere ausgeht, unterschiedlich hoch einzustufen (COOK et al. 2000; PETERSEN et al. 2010). Somit ist die Ermittlung von Daten zur Prävalenz und damit assoziiert Informationen über die Infektiosität des Erregers unerlässlich, um zielorientiert Maßnahmen zur Vermeidung einer humanen Infektion ergreifen zu können.

In Deutschland zählen Waschbären zu den invasiven Arten (NEHRING und SKOWRONEK 2020). Aufgrund fehlender natürlicher Feinde wächst die Population in den letzten Jahrzehnten stark an. Von Waschbären geht eine Gefahr aufgrund ihrer Vorliebe für Vogeleier, sowie Jungvögel, Fledermäuse, Fische, Reptilien und Amphibien aus. Die Prävention und das Management mit gebietsfremden Tierarten, wie Waschbären, ist in Deutschland gesetzlich geregelt. Beseitigungs- und Kontrollmaßnahmen umfassen vornehmlich den Lebendfang mit Fallen und den Abschuss durch zertifizierte Jäger (ANON. 2014; NEHRING und SKOWRONEK 2020). Zum Teil werden die aktuellen Regulationsmaßnahmen der Waschbärenpopulation mittels Jagd jedoch kritisiert und es wird ein umfangreiches Prädatorenmanagement zum Schutz heimischer Arten gefordert. Das Zusammenleben mit Waschbären sollte laut MICHLER und MICHLER (2012) besser unterstützt werden. Es wird diskutiert, dass die Waschbären sich anpassen und bei zunehmender Jagd ihre Fortpflanzungsrate erhöhen, darüber hinaus mehr weibliche Nachkommen produzieren, welche wiederum schnell gebärfähig sind und eigene Nachkommen zeugen. Demzufolge stehen Einzelbeobachtungen von Raubzügen der Waschbären auf Vogelnesten im Kontrast zu Beobachtungen einer friedlichen Koexistenz zwischen Vögeln und Waschbären (MICHLER und MICHLER 2012). Aktuell wird in Deutschland

dennoch die Eindämmung der Population mittels jagdlicher Maßnahmen präferiert und ist gesetzlich geregelt (ANON. 2014; ANON. 2016; NEHRING und SKOWRONEK 2020). Die Bejagung der Waschbären wird zum Teil als Maßnahme zur Eindämmung von Krankheitserregern angesehen (BURGER 2000). Dadurch fällt speziell in Deutschland eine große Anzahl erlegter Tiere an, was sich in den Streckendaten des DJV widerspiegelt (DJV 2022). Im Rahmen der Nachhaltigkeit stellt sich die Frage nach der weiteren Nutzung der Tierkörper nach dem Erlegen. Derzeit wird der Balg der legal durch lokale Jäger erlegten Waschbären zum Teil für die Pelzproduktion von den Jägern privat weiterverwertet, oder in die Produktion bei verschiedenen kommerziellen Kürschner Betrieben, wie „Fellwechsel.org“ gegeben. Das Fleisch der Tiere wird aktuell nur von wenigen Jägern als Wildbret genutzt, gilt aber gleichwohl als sehr delikats (DJV 2020; FELLWECHSEL 2022; FISSER 2020). In den USA ist es, vor allem unter Jägern, eher üblich Waschbärenfleisch zu konsumieren, wenn auch die Menge geringer ist als bei anderen Wildtierarten (BURGER 2000; GAINES et al. 2000; GOGUEN und RILEY 2020). Vorwiegend im Südosten der USA ist Waschbärenfleisch und die Pelzproduktion aus den erlegten, wild lebenden Waschbären sehr beliebt (AKÇAKAYA et al. 2008; GAINES et al. 2000). Wenn der Konsum von Waschbärenfleisch demnach aktuell auch in Deutschland eine zunehmende Option darstellt, sollten Daten generiert werden, die die Belastung der deutschen Waschbärenpopulation mit zoonotischen Krankheitserregern darstellen. Damit können entsprechend präventive Maßnahmen ergriffen werden, die dabei nicht zwingend gegen die Nutzung als Wildbret sprechen müssen.

Waschbären haben als Allesfresser ein hohes Risiko, sich mit verschiedenen Krankheitserregern zu infizieren. Sie fungieren als Indikatoren für Zoonosen sowie Umweltkontaminationen (BIGLER et al. 1975) und wurden überdies als Sentineltiere für *T.-gondii*-Infektionen beschrieben (DUBEY et al. 2021). Unter anderem wurden bei Waschbären in Europa Endoparasiten wie der Waschbärspulwurm (*Baylisascaris procyonis*), Trematoden wie *Metorchis* spp., Viren wie das Parvovirus und das Hundestaupavirus, der Dunkersche Muskelegel (*Alaria alata*) (MAAS et al. 2021; RENTERÍA-SOLÍS et al. 2018; RENTERÍA-SOLÍS 2015; RENTERÍA-SOLÍS et al. 2013) und in seltenen Fällen *Trichinella* spp. detektiert (CYBULSKA et al. 2020; CYBULSKA et al. 2018). Aufgrund der starken Durchseuchung mit Krankheitserregern können Waschbären Erkrankungen, die zuvor in bestimmten Gebieten nicht prävalent waren, verbreiten und damit eine potentielle Gesundheitsgefährdung für den Menschen darstellen. So verhält es sich exemplarisch in den Niederlanden mit der Einschleppung des Waschbärspulwurmes (*Baylisascaris procyonis*) (MAAS et al. 2021).

In dieser Arbeit erwiesen sich mittels serologischer Untersuchung (ELISA) des Fleischsaftes 48,5 % (398) der analysierten 820 Waschbären als seropositiv für

Toxoplasma gondii. Als Risikofaktoren bezugnehmend auf das Vorhandensein *T.-gondii*-spezifischer Antikörper wurde das männliche Geschlecht, die saisonale Erlegung der Tiere im Spätwinter bzw. Frühling sowie ein hohes Gewicht der Tiere ermittelt. Aufgrund des großen Anteils der seropositiven Waschbären, ist das Risiko entsprechend hoch, ein Tier, welches zuvor Kontakt mit *T. gondii* hatte, zu erlegen. Die Wahrscheinlichkeit, dass das Tier seropositiv ist, ist entsprechend höher, wenn es männlich ist, ein hohes Gewicht hat oder im Spätwinter bzw. Frühling geschossen wurde.

Die in dieser Studie detektierte Seroprävalenz der untersuchten Waschbären ist vergleichbar zu einer kürzlich durchgeführten Studie in Deutschland mit einer deutlich geringeren Probenanzahl (HEDDERGOTT et al. 2017) und Teilen der USA, wo eine *T.-gondii*-Seroprävalenz von 46,5-59,2 % in Waschbären nachgewiesen wurde (DUBEY et al. 2007; GERHOLD et al. 2017; LINDSAY et al. 2001; MITCHELL et al. 1999). In anderen Gebieten der USA und Kanada wurden weitaus höhere Werte ermittelt (FREDEBAUGH et al. 2011; HWANG et al. 2007; SMITH et al. 1992). Jedoch beeinflusst die Anzahl der Proben die Präzision der Ergebnisse erheblich. Aufgrund dessen sollte immer das Konfidenzintervall mit in Betracht gezogen werden. Wenn in einer Studie lediglich 12 Tiere untersucht werden, wie bei MITCHELL et al. (1999), wird das Konfidenzintervall eine sehr große Spanne haben, dieser Aspekt sollte entsprechend in die Ergebnisbewertung mit einfließen. Darüber hinaus beeinflussen die Risikofaktoren eine Studie. Werden vornehmlich Tiere untersucht die üblicherweise häufiger Erregerkontakt haben, wie männliche Tiere, könnte die Gesamteroprävalenz überschätzt werden.

Bei derzeitig für den Konsum beliebten Wildtierarten in Deutschland wurde eine deutlich geringere Prävalenz vergleichend zu den in dieser Studie untersuchten Waschbären ermittelt. HEDDERGOTT et al. (2018a) detektierten 22,5 % der untersuchten Mufflons (*Ovis orientalis musimon*) als seropositiv für *T. gondii*. Bei Rehwild (*Capreolus capreolus*) wurde eine Seroprävalenz von 6,8-29,1 % ermittelt, bei Rotwild (*Cervus elaphus*) 5,6 % und bei Wildschweinen (*Sus scrofa*) 14,3-24,4 % (BIER et al. 2020; HEDDERGOTT et al. 2018b; STOLLBERG et al. 2021). Bei einer Untersuchung von Wildschweinen in Polen wurde eine Seroprävalenz von 37,7 % festgestellt (KORNACKA et al. 2020). Diese serologischen Untersuchungen belegen die weite Verbreitung von *T. gondii* bei jagdbarem Wild in Deutschland und den angrenzenden Ländern. Der Verzehr von unzureichend erhitztem Wildbret stellt ein potentiell Gesundheitsrisiko dar (KORNACKA et al. 2020; STOLLBERG et al. 2021). Da Wildschweine ähnlich wie Waschbären Allesfresser sind, ist es naheliegend, dass sie eine höhere Exposition haben, mit dem Erreger in Kontakt zu treten, als reine pflanzenfressende Wildtiere (BIER et al. 2020). Darüber hinaus sind Füchse, die eine hohe Stufe in der Nahrungskette einnehmen, einer erhöhten Exposition ausgesetzt.

Für Füchse in Deutschland konnte eine entsprechend hohe Seroprävalenz von 79,2 % ermittelt werden (HERRMANN et al. 2012).

Bezugnehmend auf die Serologie ist die Antikörperkonzentration im Fleischsaft deutlich geringer als im Serum bzw. Plasma. Folglich muss die Verdünnung im Verlauf der serologischen Untersuchung angepasst werden (HALOS et al. 2010; NÖCKLER et al. 2005; WALLANDER et al. 2015). Darüber hinaus unterscheidet sich im Fleischsaft die Antikörperkonzentration je nach verwendetem Gewebe bzw. Muskulatur, woraus der Fleischsaft gewonnen wurde. So waren die serologischen Ergebnisse bei Puten mittels Fleischsaft, der aus Brustmuskulatur, Hinterbein und Herz generiert wurde, adäquat der Ergebnisse des Maus-Bioassays (SCHARES et al. 2018). Wenn dies beachtet wird, kann Fleischsaft vor allem bei lebensmittelliefernden Tieren adäquat zum Monitoring angewendet werden (WINGSTRAND et al. 1997).

Ein Nachweis von Antikörpern ist nicht immer mit einem Verbraucherrisiko assoziiert. Dementsprechend wird damit der Erregerkontakt bestätigt, lässt aber keinen Rückschluss auf eine Gewebezystenpräsenz zu. Der Zusammenhang zwischen dem Erregerkontakt und dem Vorhandensein von Gewebezysten variiert in den verschiedenen Tierarten, wie bei Rindern, deren Seroprävalenz üblicherweise hoch war, jedoch nur sehr selten *T.-gondii*-DNA nachgewiesen wurde (TENTER und FEHLHABER 2002; TENTER et al. 2000). Bei Schweinen und Schafen korrelierte die Seropositivität im Gegensatz dazu sehr stark mit der Präsenz von Gewebezysten (OPSTEEGH et al. 2011; TENTER 2009). Weiterhin ist die Korrelation zwischen serologischem und molekularbiologischem Ergebnis stark abhängig von der untersuchten Tierart, der angewandten Untersuchungsmethode, dem generiertem Probenmaterial und der Ausgangsmenge bzw. Konzentration (OPSTEEGH et al. 2010). Es wurde bestätigt, dass bei der Verwendung größerer Gewebemengen für eine DNA-Extraktion deutlich häufiger positive Ergebnisse erzielt werden können (OPSTEEGH et al. 2010; STOLLBERG et al. 2021). Dies ist auf die inhomogene Verteilung der *T.-gondii*-Gewebezysten zurückzuführen (OPSTEEGH et al. 2010). Es besteht eine höhere Wahrscheinlichkeit, eine Gewebezyste in dem zu untersuchenden Material inkludiert zu haben, je größer die untersuchte Ausgangsmenge ist.

Folglich wurde im Rahmen dieser Studie, neben dem serologischen Nachweis von Antikörpern, die konsumrelevanten Fleischteile der Waschbären auf das Vorhandensein von *T.-gondii*-DNA untersucht und so mittels real-time-PCR parasitäre DNA in den konsumrelevanten Fleischteilen nachgewiesen. Dafür wurden insgesamt 150 der Proben mit bekanntem Antikörpertiter untersucht. Die Einteilung der Proben erfolgte entsprechend des serologischen Status in drei verschiedene Gruppen. Dabei wurden jeweils 50 serologisch negative Proben, 50 serologisch niedrigpositive Proben und 50 serologisch hochpositive Proben ausgewählt. Die DNA-Extraktion erfolgte mittels für *T. gondii* hoch sensitiver magnetischer Separation (englisch: Magnetic

Capture, MC). Bei dieser Methode können bis zu 100 g Muskelfleisch untersucht werden, was entsprechend die Präzision der Ergebnisse steigert. Nach erfolgter DNA-Extraktion wurde eine quantitative real-time-PCR durchgeführt. Folglich wurde in den Gliedmaßen serologisch negativer Tiere keine *T.-gondii*-DNA nachgewiesen. In Tieren mit einem hochpositiven Serostatus wurde statistisch signifikant häufiger *T.-gondii*-DNA nachgewiesen als bei Tieren mit einem serologisch niedrigpositiven Ergebnis. Mittels Quantifizierung ließ sich eine positive Korrelation des Serostatus der Waschbären mit den vorhandenen parasitären DNA-Äquivalenten in den Gliedmaßen ermitteln. Bei Tieren mit einem serologisch hochpositiven Ergebnis wurden statistisch signifikant mehr DNA-Äquivalente nachgewiesen als bei Tieren mit einem serologisch niedrigpositiven Status.

Schlussendlich wurde in einer nicht unerheblich großen Anzahl der untersuchten Waschbärengliedmaßen *T.-gondii*-DNA nachgewiesen. Insgesamt 56 der 100 untersuchten serologisch positiven Proben enthielten Toxoplasmen-DNA. Dabei enthielten die Gliedmaßen serologisch hochpositiver Tiere öfter und mehr *T.-gondii*-DNA im Vergleich zu den serologisch niedrigpositiven Tieren. Im Allgemeinen lag die Anzahl der nachgewiesenen *T.-gondii*-DNA-Äquivalente der MC-PCR-positiven Proben zwischen $2,622 \log_{10}$ und $6,352 \log_{10}$ pro 100 g Fleisch. Die minimal infektiöse Dosis für den Mensch ist nicht genau bekannt. Experimentellen Studien zufolge reicht bei Katzen ein Bradyzoit und bei Mäusen 10-1000 Bradyzoiten bei oraler Aufnahme für eine Infektion aus (DUBEY 2006). Mausexperimente deuten darauf hin, dass die Infektionsrate in den Risikogruppen höher sein könnte als bei Gesunden (DUBEY et al. 2011). Von den Daten der verschiedenen Tierarten ausgehend, wird versucht, mit Hilfe von Dosis-Wirkungs-Modellen, die minimal infektiöse Dosis für den Mensch abzuleiten. Jedoch sollte nicht vernachlässigt werden, dass die verschiedenen *T.-gondii*-Stämme schon bei den verschiedenen Tierarten über eine unterschiedliche Virulenz verfügen (GUO et al. 2016). Wir konnten in 100 g Muskelfleisch von seropositiven Waschbären bis zu etwa $6,4 \log_{10}$ *T.-gondii*-DNA-Äquivalente detektieren. Basierend auf der Modellierung von GUO et al. (2016) würde diese Anzahl mit einer hohen Wahrscheinlichkeit für eine Infektion beim Menschen ausreichen. Bei dem Verzehr des Waschbärenfleisches wird die Menge von 100 g vermutlich sogar bei einer Mahlzeit überschritten, wenn man den pro Kopf Verzehr gemessen an anderem Wildbret heranzieht. Denn laut BfR (2018) werden üblicherweise pro Mahlzeit ca. 200-400 g Wildfleisch verzehrt. Somit steigt die Anzahl der Gewebezysten, die möglicherweise aufgenommen wird. Entsprechend würde vermutlich selbst das Fleisch der Proben, in denen nur geringe Mengen an DNA-Äquivalenten detektiert wurde, zu einer humanen Infektion führen können.

Ein molekularbiologischer DNA-Nachweis bestätigt das Vorhandensein parasitärer DNA, gibt allerdings keine Auskunft über die bestehende Infektiosität des Erregers

(OPSTEEGH et al. 2010). Durch den Nachweis lebensfähiger *T.-gondii*-Stadien wird die Infektiosität von *T.-gondii*-Stadien bestätigt. Dabei gelten Maus- und Katzenbioassay als Goldstandard (DUBEY et al. 2016). Jedoch ist der Bioassay aufwändig und teuer, angesichts der Labortiere und der Maßnahmen, die zu ihrer Haltung und Pflege notwendig sind (GOMEZ-SAMBLAS et al. 2015). Darüber hinaus nicht zuletzt aufgrund des ethischen Aspektes der Nutzung von Labortieren werden alternative Untersuchungsmethoden mit vergleichbaren Ergebnissen benötigt.

Die Korrelation zwischen serologischen Ergebnissen und Bioassay variiert. Entsprechend konnten DUBEY et al. (1995) nicht bei allen serologisch positiven Schweinen mittels Bioassay infektiöse Stadien nachweisen. Dafür wurde später eine erst kürzlich stattgefundenene Infektion diskutiert (DUBEY 2022).

Zwischen Ergebnissen einer PCR und denen von Bioassays können sehr gute Korrelationen ermittelt werden. MC-PCR positiv getestete Hühner erwiesen sich im Maus-Bioassay bezüglich *T. gondii* als positiv. Bei beiden Untersuchungen, MC-PCR sowie Maus-Bioassay, werden große Gewebemengen verdaut und analysiert, was die Chance, eine *T.-gondii*-Infektion zu erkennen bzw. *T.-gondii*-Stadien nachzuweisen, erhöht (SCHARES et al. 2018). Weiterhin konnten STOLLBERG et al. (2021) anhand von Bioassay mittels Mausfütterungsversuch die zuvor PCR positiv getesteten Proben von Wildschweinen und Rehwild als infektiös identifizieren. Folglich ist mittels PCR positiv getestetes Wildfleisch vermutlich auch infektiös. Somit ist davon auszugehen, dass die im Rahmen dieser Studie mittels MC-PCR positiv getesteten Fleischteile infektiöse *T.-gondii*-Stadien enthalten.

Laut Infektionsschutzgesetz ist in Deutschland der direkte sowie der indirekte humanassoziierte konnatale Nachweis von *T. gondii* meldepflichtig (ANON. 2000). Für Sachsen regelt eine zusätzliche Verordnung darüber hinaus, dass der direkte oder indirekte Nachweis, folglich einer akuten oder konnatalen Infektion mit *T. gondii*, dem zuständigen Gesundheitsamt namentlich zu erfolgen hat (ANON. 2002). Diese gesonderte Stellung gibt Hinweis auf die Bedeutung der Infektion bzw. die hohe Prävalenz in den neuen Bundesländern im bundesweiten Vergleich (WILKING et al. 2016). Dies ist vermutlich auf die Beliebtheit des Konsums von rohen Fleischprodukten, wie „Hackepeter“, in dieser Region zurückzuführen (WILKING et al. 2016).

Entsprechend dem BfR (2018) wird das Fleisch von freilebendem Wild nachhaltig gewonnen, ist nährstoffreich und fettarm. Es gewinnt zunehmend in Deutschland an Bedeutung. Vornehmlich besteht der Trend halbrohes bzw. noch rosafarbenes Wildfleisch zu verzehren. Der jährliche Konsum einer Person beträgt im Durchschnitt zwei Wildmahlzeiten im Jahr, allerdings konsumieren Jäger und deren Familien deutlich mehr, zum Teil werden um die 60 Mahlzeiten geschätzt. Wildfleisch kann, im

Diskussion

Vergleich zu konventionell gehaltenen lebensmittelliefernden Tieren, vermehrt Parasiten mit zoonotischem Potential enthalten. Als einfache und effektive Präventionsmethode bezugnehmend auf die Übertragung von *T. gondii* durch Fleisch gilt eine ausreichend lange thermische Behandlung. Dabei sollte Temperatur und Garzeit an die Größe des Fleisches angepasst werden (BfR 2018). Eine Erhitzung auf eine Kerntemperatur von 70 °C ist anzustreben. Weiterhin ist eine ausreichend lange Kältebehandlung bei einer Kerntemperatur von mindestens -12 °C eine einfach durchzuführende Maßnahme, um den Erreger zu inaktivieren. Die üblichen Hygienemaßnahmen im Umgang mit rohem Fleisch sollten jederzeit eingehalten werden. Rohes Fleisch sollte nicht mit verzehrfertiger Nahrung in Kontakt kommen, Hände und Arbeitsmaterialien sollten ausreichend mit Wasser, erhöhter Temperatur und Seife gereinigt werden, um eine Erregerübertragung zu minimieren (DUBEY 1986).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der durchgeführten Studie, dass Waschbären in Deutschland stark mit *T. gondii* befallen sind. Bei Handling und Verzehr von Waschbärenfleisch besteht daher grundsätzlich ein potenzielles humanes Gesundheitsrisiko einer *T.-gondii*-Infektion. Das Fleisch sollte entsprechend vor dem Verzehr ausreichend durcherhitzt werden. Jedoch sind weitere Untersuchungen wie Bioassays oder Zellkulturen nötig, um eine bessere Aussage über die Infektiosität der *T.-gondii*-Stadien in ebendiesem konsumrelevanten Gewebe treffen zu können.

5 Zusammenfassung

Lydia Engel

Serologische und molekularbiologische Untersuchungen zur Prävalenz von *Toxoplasma gondii* in Waschbären (*Procyon lotor*) aus Deutschland

Institut für Lebensmittelhygiene, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig

Eingereicht im Dezember 2022

53 Seiten, 4 Abbildungen, 1 Tabelle, 156 Literaturangaben, 2 Publikationen

Schlüsselwörter: Wildtiere, ELISA, Fleischsaft, Zoonose, Seroprävalenz, DNA, magnetic-capture-PCR

Einleitung: *Toxoplasma gondii* stellt einen der weltweit häufigsten, ubiquitär vorkommenden, alimentär übertragbaren Krankheitserreger dar. Der Verzehr von nicht ausreichend erhitztem Fleisch und Fleischerzeugnissen, welche infektiöse Stadien des Protozoen enthalten, erwies sich als eine der bedeutendsten Infektionsquellen für den Menschen. Waschbären (*Procyon lotor*) gelten in Deutschland als invasive Art. Aufgrund der steigenden Jagdstrecke in den letzten Jahrzehnten wird neben der Pelzproduktion auch die Verwendung des Fleisches als Wildbret zunehmend attraktiv. Gegenwärtig gibt es nur wenige Daten zur Erregerlast von *T. gondii* in für den humanen Konsum relevanten Gewebeteilen bei Waschbären, ferner zur Durchseuchungsrate der Waschbären in Deutschland und assoziierten Risikofaktoren.

Ziele der Studie: In dieser Arbeit sollten die Seroprävalenz von *T. gondii* bei Waschbären in Deutschland sowie damit assoziierte Risikofaktoren ermittelt werden. Die für den menschlichen Verzehr relevanten Fleischteile sollten ergänzend dazu direkt molekularbiologisch untersucht werden, um qualitative und quantitative Ergebnisse zum Vorkommen von *T.-gondii*-Stadien in ebendiesem Gewebe zu erhalten. Schlussendlich sollten diese Daten als Beitrag zur Risikoabschätzung einer *Toxoplasma-gondii*-Infektion des Menschen durch den Verzehr des Fleisches von wildlebenden Waschbären aus Deutschland zur Verfügung gestellt werden.

Material und Methoden: Im Rahmen dieser Studie wurden Proben von 820 wildlebenden Waschbären, die von Dezember 2017 bis April 2021 erlegt wurden, untersucht. Das Erlegungsdatum, die Herkunftspostleitzahl, Alter, Geschlecht und Gewicht der Tiere wurden jeweils erfasst. Von den Tieren wurden Kopf, Zwerchfell, Vorder- und Hintergliedmaße entnommen, um Fleischsaft durch Auftauen zu generieren. Mittels kommerziellen ELISAs (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) wurden *T.-gondii*-spezifische Antikörper im Fleischsaft nachgewiesen und Risikofaktoren, basierend auf den zugrundeliegenden tierassoziierten Daten, ermittelt.

Zusammenfassung

Auf Grundlage der serologischen Ergebnisse wurde das Fleisch der Gliedmaßen von 50 negativen, 50 niedrigpositiven und 50 hochpositiven Proben mittels magnetic-capture Polymerase Chain Reaction (PCR) quantitativ untersucht. Zur Untersuchung der Prävalenz-Unterschiede für die einzelnen Risikofaktoren, wurden Chi-Quadrat-Tests durchgeführt. Für das Gewicht wurde eine einfache logistische Regression angewandt.

Ergebnisse: Bei 48,5 % (398/820; 95 % Konfidenzintervall KI: 45,1-52,0) der untersuchten Waschbären wurden *T.-gondii*-spezifische Antikörper nachgewiesen. Weitere 48,5 % der Proben waren negativ und 2,9 % (47/820; 95 % KI: 2,0-4,3) fraglich. Statistisch signifikante Unterschiede wurden für die Faktoren Geschlecht ($p = 0,028$), Saison ($p < 0,0003$) und Gewicht (odds ratio: 1,783; 95 % KI: 1,513-2,108; $p < 0,0001$) festgestellt. Rüden waren häufiger seropositiv als Fähen, im Spätwinter/Frühling erlegte Tiere waren häufiger seropositiv als im Herbst erlegte Tiere und je schwerer die Tiere waren, umso höher war die Chance eines positiven Antikörper-Nachweises. Bei 56 der untersuchten 150 Waschbärenfleischproben wurde *T.-gondii*-DNA (Deoxyribonucleic Acid) nachgewiesen. Davon gehörten 18 Tiere der serologisch niedrigpositiven Gruppe und 38 Tiere der serologisch hochpositiven Gruppe an. In den Proben der seronegativen Tiere wurde keine *T.-gondii*-DNA detektiert. In der serologisch hochpositiven Gruppe gab es statistisch signifikant mehr positive Proben ($p < 0,0001$) und es wurden statistisch signifikant höhere Werte der DNA-Äquivalente ($p < 0,0001$) pro 100 g Waschbärenfleisch nachgewiesen als bei den serologisch Niedrigpositiven.

Schlussfolgerung: Waschbären in Deutschland sind stark mit *T. gondii* befallen. Bei Handling und Verzehr von Waschbärenfleisch besteht daher grundsätzlich ein potenzielles humanes Gesundheitsrisiko. Das Fleisch sollte vor dem Verzehr ausreichend durcherhitzt werden. Jedoch sind weitere Studien im Rahmen von Bioassay oder Zellkulturen nötig, um eine bessere Aussage über die Infektiosität treffen zu können.

6 Summary

Lydia Engel

Serological and molecular biological examinations on the prevalence of *Toxoplasma gondii* in raccoons (*Procyon lotor*) from Germany

Institute of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Leipzig University

Submitted in December 2022

53 Pages, 4 figures, 1 table, 156 references, 2 publications

Keywords: Game, ELISA, meat juice, zoonosis, seroprevalence, DNA, magnetic-capture PCR

Introduction: *Toxoplasma gondii* is one of the most common, ubiquitous, foodborne pathogens worldwide. The consumption of insufficiently heated meat and meat products containing infectious stages of the protozoan is one of the most important sources of infection in humans. Raccoons (*Procyon lotor*) are considered as an invasive species in Germany. Due to the increasing hunting bag data in recent decades, the use of their meat as game is becoming increasingly interesting, besides production of fur. Currently, there is only few data on pathogen load of *T. gondii* in tissues relevant for human consumption in raccoons as well as on the rate of infestation of German raccoons with *T. gondii* and associated risk factors.

Objective: In this work, the seroprevalence of *T. gondii* in German raccoons and associated risk factors should be determined. In addition, meat parts relevant for human consumption should be directly analysed by molecular biological methods to obtain qualitative and quantitative results on the occurrence of *T. gondii* stages in these tissues. Finally, these data should provide a contribution to the risk assessment of *Toxoplasma gondii* infection of humans through the consumption of meat from wild raccoons from Germany.

Material and Methods: Samples of 820 wild raccoons hunted from December 2017 to April 2021 were analysed. Animals hunting date, postcode of origin, age, sex and weight were recorded. The head, diaphragm, forelimb and hindlimb were collected to generate meat juice by thawing. Using commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), *T. gondii* specific antibodies were detected in the meat juice based on the associated animal data, risk factors were determined. Based on the serological results, meat of the limbs of 50 negative, 50 low positive and 50 high positive samples was analysed quantitatively by magnetic-capture polymerase chain reaction (PCR).

Summary

Chi-square tests were performed to investigate the prevalence differences of each risk factor. Simple logistic regression was used for the weight.

Results: *T. gondii* specific antibodies were detected in 48.5% (398/820; 95% confidence interval CI: 45.1-52.0) of the raccoons examined. Another, 48.5% of the samples were negative and 2.9% (47/820; 95% CI: 2.0-4.3) of the samples were considered doubtful. Statistically significant differences were found for sex ($p = 0.028$), season ($p < 0.0003$) and weight (odds ratio: 1.783; 95% CI: 1.513-2.108; $p < 0.0001$). Males were more likely to be seropositive than females, animals hunted in late winter/spring were more often seropositive than animals hunted in autumn, and the heavier animals had a higher chance of a positive result. *T. gondii* DNA (deoxyribonucleic acid) was detected in 56 of 150 raccoon meat samples analysed. Among these, 18 animals belonged to the serologically low positive group and 38 animals to the high positive group. In samples from the seronegative animals, no *T. gondii* DNA was detected. The high positive serological group had statistically significant more positive samples ($p < 0.0001$) and statistically significant higher levels of DNA equivalents ($p < 0.0001$) per 100g of raccoon meat than the serological low positive group.

Conclusion: Raccoons in Germany are highly infested with *T. gondii*. Therefore, handling and consumption of raccoon meat poses a potential health risk. The meat should be heated through sufficiently before consumption. However, to be able to make a better statement about the infectivity, further studies using bioassay or cell cultures are necessary.

7 Literaturverzeichnis

Akçakaya HR, Stark JD, Bridges TS, Hrsg. Demographic toxicity. Oxford, New York: Oxford University Press; 2008.

Algaba IG, Geerts M, Jennes M, Coucke W, Opsteegh M, Cox E, Dorny P, Dierick K, Craeye S de. A more sensitive, efficient and ISO 17025 validated Magnetic Capture real time PCR method for the detection of archetypal *Toxoplasma gondii* strains in meat. Int J Parasitol. 2017;47:875–84.

Anon. Bundesjagdgesetz (BJagd) vom 29. Sep. 1976. BGBl. I S. 2849 (01. Okt. 1976), zuletzt geändert durch Artikel 291 der Verordnung vom 19. Juni 2020 BGBl. I S. 1328 (26. Jun. 2020).

Anon. Gesetz zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim Menschen - Infektionsschutzgesetz (IfSG) vom 20. Jul. 2000. BGBl. I S. 1045 (25. Jul. 2000), zuletzt geändert durch Artikel 2 des Gesetzes vom 13. Okt. 2022. BGBl. II S. 539 (18. Okt. 2022).

Anon. Verordnung des Sächsischen Staatsministeriums für Soziales und Verbraucherschutz über die Erweiterung der Meldepflicht für übertragbare Krankheiten und Krankheitserreger nach dem Infektionsschutzgesetz (IfSGMeldeVO) vom 03. Jun. 2002. SächsGVBl. Nr. 9 S. 187 (03. Jun. 2002), zuletzt geändert durch die Verordnung vom 09. Nov. 2012. SächsGVBl. Nr. 16 S. 698 (09. Nov. 2012).

Anon. Verordnung (EU) Nr. 1143/2014 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. Oktober 2014 über die Prävention und das Management der Einbringung und Ausbreitung invasiver gebietsfremder Arten vom 22. Okt. 2014. ABI. L 317 S. 35 (04. Nov. 2014), zuletzt geändert durch die Delegierte Verordnung (EU) 2018/968 der Kommission vom 30. Apr. 2018 ABI. L 174 S. 5 (10. Jul. 2018).

Anon. Durchführungsverordnung (EU) 2016/1141 der Kommission vom 13. Juli 2016 zur Annahme einer Liste invasiver gebietsfremder Arten von unionsweiter Bedeutung gemäß der Verordnung (EU) Nr. 1143/2014 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 13. Jul. 2016. ABI. L 189 S. 4 (14. Jul. 2016), zuletzt geändert durch die Durchführungsverordnung (EU) 2022/1203 der Kommission vom 12. Jul. 2022. ABI. L 186 S. 10 (13. Jul. 2022).

Attias M, Teixeira DE, Benchimol M, Vommaro RC, Crepaldi PH, de Souza W. The life-cycle of *Toxoplasma gondii* reviewed using animations. Parasit Vectors. 2020;13:588.

- Bachand N, Ravel A, Leighton P, Stephen C, Iqbal A, Ndao M, Konecni K, Fernando C, Jenkins E. Foxes (*Vulpes vulpes*) as sentinels for parasitic zoonoses, *Toxoplasma gondii* and *Trichinella nativa*, in the northeastern Canadian Arctic. *Int J Parasitol Parasites Wildl.* 2018;7:391–7.
- Baril L, Ancelle T, Goulet V, Thulliez P, Tirard-Fleury V, Carne B. Risk factors for *Toxoplasma* infection in pregnancy: a case-control study in France. *Scand J Infect Dis.* 1999;31:305–9.
- Bartoszewicz M, Okarma H, Zalewski A, Szczęśna J. Ecology of the Raccoon (*Procyon lotor*) from western Poland. *Ann Zool Fennici.* 2008;45:291–8.
- Beltrán-Beck B, García FJ, Gortázar C. Raccoons in Europe: disease hazards due to the establishment of an invasive species. *Eur J Wildl Res.* 2012;58:5–15.
- Berger-Schoch AE, Bernet D, Doherr MG, Gottstein B, Frey CF. *Toxoplasma gondii* in Switzerland: a serosurvey based on meat juice analysis of slaughtered pigs, wild boar, sheep and cattle. *Zoonoses Public Health.* 2011;58:472–8.
- Bier NS, Stollberg K, Mayer-Scholl A, Johne A, Nöckler K, Richter M. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in wild boar and deer in Brandenburg, Germany. *Zoonoses Public Health.* 2020;67:601–6.
- Bigler WJ, Jenkins JH, Cumbie PM, Hoff GL, Prather EC. Wildlife and environmental health: raccoons as indicators of zoonoses and pollutants in southeastern United States. *J Am Vet Med Assoc.* 1975;167:592–7.
- Bobić B, Jevremović I, Marinković J, Šibalić D, Djurković-Djaković O. Risk factors for *Toxoplasma* infection in a reproductive age female population in the area of Belgrade, Yugoslavia. *Eur J Epidemiol.* 1998;14:605–10.
- Boch J, Rommel M, Janitzschke K. Beiträge zur Toxoplasmose des Schweines: 2. Untersuchungen von Schlachtschweinen auf *Toxoplasma*-Infektionen. *Berl Münch Tierärztl Wschr.* 1964;77:244–7.
- Bremer V, Bocter N, Rehmet S, Klein G, Breuer T, Ammon A. Consumption, knowledge, and handling of raw meat: a representative cross-sectional survey in Germany, March 2001. *J Food Prot.* 2005;68:785–9.
- Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) 2018. Wildfleisch: Gesundheitliche Bewertung von humanpathogenen Parasiten: Stellungnahme Nr. 045/2018 des BfR vom 21. Dezember 2018 (zitiert vom 01.12.2022) <<https://mobil.bfr.bund.de/cm/343/wildfleisch-gesundheitliche-bewertung-von-humanpathogenen-parasiten.pdf>>.

Burger J. Gender differences in meal patterns: role of self-caught fish and wild game in meat and fish diets. *Environ Res.* 2000;83:140–9.

Burrige MJ, Bigler WJ, Forrester DJ, Hennemann JM. Serologic survey for *Toxoplasma gondii* in wild animals in Florida. *J Am Vet Med Assoc.* 1979;175:964–7.

Carme B, Bissuel F, Ajzenberg D, Bouyne R, Aznar C, Demar M, Bichat S, Louvel D, Bourbigot AM, Peneau C, Neron P, Dardé ML. Severe acquired toxoplasmosis in immunocompetent adult patients in French Guiana. *J Clin Microbiol.* 2002;40:4037–44.

Castillo-Cuenca JC, Martínez-Moreno Á, Diaz-Cao JM, Entrena-García A, Fraga J, Arias PC, Almería S, García-Bocanegra I. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and associated risk factors in domestic pigs raised from Cuba. *Parasitol Res.* 2021;120:2897–903.

Chiappino ML, Nichols BA, O'Connor GR. Scanning electron microscopy of *Toxoplasma gondii*: parasite torsion and host-cell responses during invasion. *J Protozool.* 1984;31:288–92.

Chinchilla M, Ruiz A. Cockroaches as Possible Transport Hosts of *Toxoplasma gondii* in Costa Rica. *J Parasitol.* 1976;62:140–2.

Cook AJ, Gilbert RE, Buffolano W, Zufferey J, Petersen E, Jenum PA, Foulon W, Semprini AE, Dunn DT. Sources of toxoplasma infection in pregnant women: European multicentre case-control study. *BMJ.* 2000;321:142–7.

Cybulska A, Kornacka A, Popiołek M, Bień-Kalinowska J, Moskwa B. Use of meat juice from racoons (*Procyon lotor*) collected from Central Europe for immunological detection of *Trichinella* spp. *Vet Parasitol.* 2020:109066.

Cybulska A, Skopek R, Kornacka A, Popiołek M, Piróg A, Laskowski Z, Moskwa B. First detection of *Trichinella pseudospiralis* infection in raccoon (*Procyon lotor*) in Central Europe. *Vet Parasitol.* 2018;254:114–9.

Deutscher Jagdverband e.V. (DJV) 2019. Deutschland liebt Wildbret vom Wildschwein (zitiert vom 01.12.2022) <<https://www.jagdverband.de/deutschland-liebt-wildbret-vom-wildschwein>>.

Deutscher Jagdverband e.V. (DJV) 2020. Ein bärig guter Braten? (zitiert vom 01.12.2021) <<https://www.jagdverband.de/ein-baerig-guter-braten>>.

Deutscher Jagdverband e.V. (DJV). DJV-Handbuch Jagd 2022. Bonn: DJV-Service GmbH; 2022.

- Dong H, Su R, Lu Y, Wang M, Liu J, Jian F, Yang Y. Prevalence, Risk Factors, and Genotypes of *Toxoplasma gondii* in Food Animals and Humans (2000-2017) From China. *Front Microbiol.* 2018;9:1–10.
- Dubey J. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol.* 1998;28:1019–24.
- Dubey JP. Toxoplasmosis. *J Am Vet Med Assoc.* 1986:166–70.
- Dubey JP. Infectivity and Pathogenicity of *Toxoplasma gondii* Oocysts for Cats. *J Parasitol.* 1996a;82:957.
- Dubey JP. Strategies to reduce transmission of *Toxoplasma gondii* to animals and humans. *Vet Parasitol.* 1996b;64:65–70.
- Dubey JP. Bradyzoite-induced murine toxoplasmosis: stage conversion, pathogenesis, and tissue cyst formation in mice fed bradyzoites of different strains of *Toxoplasma gondii*. *J Eukaryot Microbiol.* 1997;44:592–602.
- Dubey JP. Comparative infectivity of oocysts and bradyzoites of *Toxoplasma gondii* for intermediate (mice) and definitive (cats) hosts. *Vet Parasitol.* 2006;140:69–75.
- Dubey JP. Toxoplasmosis in pigs-the last 20 years. *Vet Parasitol.* 2009;164:89–103.
- Dubey JP. Toxoplasmosis of animals and humans. Third edition. Boca Raton, London, New York: CRC Press; 2022.
- Dubey JP, Frenkel JK. Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of *Toxoplasma* cysts. *J Protozool.* 1976;23:537–46.
- Dubey JP, Kotula AW, Sharar A, Andrews CD, Lindsay DS. Effect of high temperature on infectivity of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork. *J Parasitol.* 1990;76:201–4.
- Dubey JP, Laurin E, Kwok OCH. Validation of the modified agglutination test for the detection of *Toxoplasma gondii* in free-range chickens by using cat and mouse bioassay. *Parasitology.* 2016;143:314–9.
- Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11:267–99.
- Dubey JP, Murata FHA, Cerqueira-Cézar CK, Kwok OCH. Recent epidemiologic and clinical *Toxoplasma gondii* infections in wild canids and other carnivores: 2009-2020. *Vet Parasitol.* 2021;290:109337.
- Dubey JP, Rajendran C, Ferreira LR, Martins J, Kwok OCH, Hill DE, Villena I, Zhou H, Su C, Jones JL. High prevalence and genotypes of *Toxoplasma gondii* isolated from

goats, from a retail meat store, destined for human consumption in the USA. *Int J Parasitol.* 2011;41:827–33.

Dubey JP, Sundar N, Nolden CA, Samuel MD, Velmurugan GV, Bandini LA, Kwok OCH, Bodenstein B, Su C. Characterization of *Toxoplasma gondii* from raccoons (*Procyon lotor*), coyotes (*Canis latrans*), and striped skunks (*Mephitis mephitis*) in Wisconsin identified several atypical genotypes. *J Parasitol.* 2007;93:1524–7.

Dubey JP, Thulliez P, Weigel RM, Andrews CD, Lind P, Powell EC. Sensitivity and specificity of various serologic tests for detection of *Toxoplasma gondii* infection in naturally infected sows. *Am J Vet Res.* 1995;56:1030–6.

Dubremetz JF. Host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. *Trends Microbiol.* 1998;6:27–30.

Dunn D, Wallon M, Peyron F, Petersen E, Peckham C, Gilbert R. Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling. *Lancet.* 1999;353:1829–33.

Elmore SA, Jones JL, Conrad PA, Patton S, Lindsay DS, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. *Trends Parasitol.* 2010;26:190–6.

European Food Safety Authority (EFSA). Surveillance and monitoring of *Toxoplasma* in humans, food and animals - Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards. *EFSA J.* 2007;5:1–64.

Feldman HA. Epidemiology of *Toxoplasma* infections. *Epidemiol Rev.* 1982;4:204–13.

Fellwechsel 2022. Nachhaltige Nutzung von Bälgen- ein Pilotprojekt (zitiert vom 01.12.2022) <<https://fellwechsel.shop/ueber-uns>>.

Ferguson DJ, Birch-Andersen A, Siim JC, Hutchison WM. An ultrastructural study on the excystation of the sporozoites of *Toxoplasma gondii*. *Acta Pathol Microbiol Scand Sec B.* 1979;87:277–83.

Ferguson DJ, Hutchison WM. An ultrastructural study of the early development and tissue cyst formation of *Toxoplasma gondii* in the brains of mice. *Parasitol Res.* 1987;73:483–91.

Fisser D 2020. Von der invasiven Art zum Gulasch: Was tun gegen die Waschbärplage? Esst sie! (zitiert vom 01.12.2022) <<https://www.noz.de/deutschland-welt/xl-magazin/artikel/was-tun-gegen-die-waschbaerplage-esst-sie-auf-20368836>>.

Frank RK. An outbreak of toxoplasmosis in farmed mink (*Mustela vison* S.). *J Vet Diagn Invest.* 2001;13:245–9.

- Fredebaugh SL, Mateus-Pinilla NE, McAllister M, Warner RE, Weng H-Y. Prevalence of antibody to *Toxoplasma gondii* in terrestrial wildlife in a natural area. *J Wildl Dis.* 2011;47:381–92.
- Frenkel JK. *Toxoplasma* In and Around Us. *BioScience.* 1973;23:343–52.
- Frenkel JK, Dubey JP, Miller NL. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science.* 1970;167:893–6.
- Freyre A, Dubey JP, Smith DD, Frenkel JK. Oocyst-Induced *Toxoplasma gondii* Infections in Cats. *J Parasitol.* 1989;75:750.
- Gaines KF, Lord CG, Boring CS, Brisbin IL, Gochfeld M, Burger J. Raccoons as Potential Vectors of Radionuclide Contamination to Human Food Chains from a Nuclear Industrial Site. *J Wildl Manag.* 2000;64:199.
- Galvani AT, Christ APG, Padula JA, Barbosa MRF, Araújo RS de, Sato MIZ, Razzolini MTP. Real-time PCR detection of *Toxoplasma gondii* in surface water samples in São Paulo, Brazil. *Parasitol Res.* 2019;118:631–40.
- García JT, García FJ, Alda F, González JL, Aramburu MJ, Cortés Y, Prieto B, Pliego B, Pérez M, Herrera J, García-Román L. Recent invasion and status of the raccoon (*Procyon lotor*) in Spain. *Biol Invasions.* 2012;14:1305–10.
- Gazzonis AL, Zanzani SA, Villa L, Manfredi MT. *Toxoplasma gondii* infection in meat-producing small ruminants: Meat juice serology and genotyping. *Parasitol Int.* 2020;76:102060.
- Gerhold RW, Saraf P, Chapman A, Zou X, Hickling G, Stiver WH, Houston A, Souza M, Su C. *Toxoplasma gondii* seroprevalence and genotype diversity in select wildlife species from the southeastern United States. *Parasit Vectors.* 2017;10:508.
- Gey AB. Synopsis der Parasitenfauna des Waschbären (*Procyon lotor*) unter Berücksichtigung von Befunden aus Hessen [Dissertation med. vet.]. Gießen: Justus-Liebig-Univ. Gießen; 1998.
- Goguen AD, Riley SJ. Consumption of Wild-Harvested Meat in Society. *Wildl Soc Bull.* 2020;44:553–63.
- Gomez-Samblas M, Vílchez S, Racero JC, Fuentes MV, Osuna A. Quantification and viability assays of *Toxoplasma gondii* in commercial “Serrano” ham samples using magnetic capture real-time qPCR and bioassay techniques. *Food Microbiol.* 2015;46:107–13.
- Groß U, Roos T, Friese K. Toxoplasmose in der Schwangerschaft. *Dtsch Ärztebl.* 2001;98:A3293-A3300.

- Guo M, Mishra A, Buchanan RL, Dubey JP, Hill DE, Gamble HR, Jones JL, Du X, Pradhan AK. Development of Dose-Response Models to Predict the Relationship for Human *Toxoplasma gondii* Infection Associated with Meat Consumption. *Risk Anal.* 2016;36:926–38.
- Halos L, Thébault A, Aubert D, Thomas M, Perret C, Geers R, Alliot A, Escotte-Binet S, Ajzenberg D, Dardé M-L, Durand B, Boireau P, Villena I. An innovative survey underlining the significant level of contamination by *Toxoplasma gondii* of ovine meat consumed in France. *Int J Parasitol.* 2010;40:193–200.
- Hancock K, Thiele LA, Zajac AM, Elvingert F, Lindsay DS. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in raccoons (*Procyon lotor*) from an urban area of Northern Virginia. *J Parasitol.* 2005;91:694–5.
- Havelaar AH, Kirk MD, Torgerson PR, Gibb HJ, Hald T, Lake RJ, Praet N, Bellinger DC, Silva NR de, Gargouri N, Speybroeck N, Cawthorne A, Mathers C, Stein C, Angulo FJ, Devleeschauwer B. World Health Organization Global Estimates and Regional Comparisons of the Burden of Foodborne Disease in 2010. *PLoS Med.* 2015;12:e1001923.
- Heddergott M, Frantz AC, Stubbe M, Stubbe A, Ansorge H, Osten-Sacken N. Seroprevalence and risk factors of *Toxoplasma gondii* infection in invasive raccoons (*Procyon lotor*) in Central Europe. *Parasitol Res.* 2017;116:2335–40.
- Heddergott M, Müller F. Hohe Prävalenz von Antikörpern gegen *Toxoplasma gondii* im Blutserum von Waschbären (*Procyon lotor*) aus der nordwestlichen hessischen Rhön, Deutschland. *Beitr Jagd- u Wildforsch.* 2020;45:125–32.
- Heddergott M, Osten-Sacken N, Steinbach P, Frantz AC. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in free-living European mouflon (*Ovis orientalis musimon*) hunted in central Germany. *Parasite.* 2018a;25:21.
- Heddergott M, Steinbach P, Pohl D, Frantz AC. First report on the sero-epidemiology of *Toxoplasma gondii* infection in German roe deer (*Capreolus capreolus*). *Parasite.* 2018b;25:52.
- Hellesnes I, Mohn S. Effects of freezing on the infectivity of *Toxoplasma gondii* cysts for white mice. *Zentralbl Bakteriolog Orig A.* 1977;238:143–8.
- Herrmann DC, Maksimov P, Maksimov A, Sutor A, Schwarz S, Jaschke W, Schliephake A, Denzin N, Conraths FJ, Schares G. *Toxoplasma gondii* in foxes and rodents from the German Federal States of Brandenburg and Saxony-Anhalt: seroprevalence and genotypes. *Vet Parasitol.* 2012;185:78–85.

- Hill D, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. Clin Microbiol Infect. 2002;8:634–40.
- Hill DE, Benedetto SMC, Coss C, McCrary JL, Fournet VM, Dubey JP. Effects of time and temperature on the viability of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in enhanced pork loin. J Food Prot. 2006;69:1961–5.
- Hofhuis A, van Pelt W, van Duynhoven YTHP, Nijhuis CDM, Mollema L, van der Klis FRM, Havelaar AH, Kortbeek LM. Decreased prevalence and age-specific risk factors for *Toxoplasma gondii* IgG antibodies in The Netherlands between 1995/1996 and 2006/2007. Epidemiol Infect. 2011;139:530–8.
- Hunter CA, Sibley LD. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. Nat Rev Microbiol. 2012;10:766–78.
- Hutchison WM, Dunachie JF, Siim JC, Work K. Coccidian-like nature of *Toxoplasma gondii*. Br Med J. 1970;1:142–4.
- Hwang YT, Pitt JA, Quirk TW, Dubey JP. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in mesocarnivores of the Canadian prairies. J Parasitol. 2007;93:1370–3.
- Jackson MH, Hutchison WM. The Prevalence and Source of *Toxoplasma* Infection in the Environment. Adv Parasitol. 1989;28:55–105.
- Jacobs L, Melton ML. Toxoplasmosis in chickens. J Parasitol. 1966;52:1158–62.
- Jacobs L, Remington JS, Melton ML. The resistance of the encysted form of *Toxoplasma gondii*. J Parasitol. 1960;46:11–21.
- Jeannel D, Niel G, Costagliola D, Danis M, Traore BM, Gentilini M. Epidemiology of Toxoplasmosis among Pregnant Women in the Paris Area. Int J Epidemiol. 1988;17:595–602.
- Jenum PA, Kapperud G, Stray-Pedersen B, Melby KK, Eskild A, Eng J. Prevalence of *Toxoplasma gondii* specific immunoglobulin G antibodies among pregnant women in Norway. Epidemiol Infect. 1998;120:87–92.
- Jones JL, Dargelas V, Roberts J, Press C, Remington JS, Montoya JG. Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in the United States. Clin Infect Dis. 2009;49:878–84.
- Jones JL, Kruszon-Moran D, Sanders-Lewis K, Wilson M. *Toxoplasma gondii* infection in the United States, 1999–2004, decline from the prior decade. Am J Trop Med Hyg. 2007;77:405–10.

- Juránková J, Hůrková-Hofmannová L, Volf J, Baláž V, Piálek J. Efficacy of magnetic capture in comparison with conventional DNA isolation in a survey of *Toxoplasma gondii* in wild house mice. *Eur J Protistol.* 2014;50:11–5.
- Kijlstra A, Eissen OA, Cornelissen J, Munniksma K, Eijck I, Kortbeek T. *Toxoplasma gondii* infection in animal-friendly pig production systems. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004;45:3165–9.
- Koethe M, Straubinger RK, Pott S, Bangoura B, Geuthner A-C, Dauschies A, Ludewig M. Quantitative detection of *Toxoplasma gondii* in tissues of experimentally infected turkeys and in retail turkey products by magnetic-capture PCR. *Food Microbiol.* 2015;52:11–7.
- Kolbekova P, Kourbatova E, Novotna M, Kodym P, Flegr J. New and old risk-factors for *Toxoplasma gondii* infection: prospective cross-sectional study among military personnel in the Czech Republic. *Clin Microbiol Infect.* 2007;13:1012–7.
- Kornacka A, Cybulska A, Popiołek M, Kuśmierk N, Moskwa B. Survey of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in raccoons (*Procyon lotor*) from the Czech Republic, Germany and Poland. *Vet Parasitol.* 2018;262:47–50.
- Kornacka A, Moskwa B, Werner A, Nowosad P, Jankowska W, Cybulska A, Majewska AC. The Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in Wild Boars from Three Voivodeships in Poland, MAT Analyses. *Acta Parasit.* 2020;65:490–5.
- Kortbeek LM, Melker HE de, Veldhuijzen IK, Conyn-Van Spaendonck MAE. Population-based *Toxoplasma* seroprevalence study in The Netherlands. *Epidemiol Infect.* 2004;132:839–45.
- Kotula AW, Dubey JP, SHARAR AK, Andrews CD, Shen SK, Lindsay DS. Effect of Freezing on Infectivity of *Toxoplasma Gondii* Tissue Cysts in Pork. *J Food Prot.* 1991;54:687–90.
- Lindsay DS, Spencer J, Rupprecht C, Blagburn BL. Prevalence of Agglutinating Antibodies to *Neospora caninum* in Raccoons, *Procyon lotor*. *J Parasitol.* 2001;87:1197–8.
- Lundén A, Uggla A. Infectivity of *Toxoplasma gondii* in mutton following curing, smoking, freezing or microwave cooking. *Int J Food Microbiol.* 1992;15:357–63.
- Maas M, Tatem-Dokter R, Rijks JM, Dam-Deisz C, Franssen F, van Bolhuis H, Heddergott M, Schleimer A, Schockert V, Lambinet C, Hubert P, Redelijk T, Janssen R, Cruz APL, Martinez IC, Caron Y, Linden A, Lesenfants C, Paternostre J, van der Giessen J, Frantz AC. Population genetics, invasion pathways and public health risks

of the raccoon and its roundworm *Baylisascaris procyonis* in northwestern Europe. *Transbound Emerg Dis.* 2021;69:2190–200.

Max-Rubner-Institut (MRI) 2008. Ergebnisbericht Teil 2 Nationale Verzehrsstudie II (zitiert vom 01.12.2022) <https://www.mri.bund.de/fileadmin/MRI/Institute/EV/NVSII_Abschlussbericht_Teil_2.pdf>.

McCurdy SM, Takeuchi MT, Edwards ZM, Edlefsen M, Kang D-H, Elaine Mayes V, Hillers VN. Food safety education initiative to increase consumer use of food thermometers in the United States. *BFJ.* 2006;108:775–94.

McDonald JC, Gyorkos TW, Alberton B, MacLean JD, Richer G, Juraneck D. An outbreak of toxoplasmosis in pregnant women in northern Québec. *J Infect Dis.* 1990;161:769–74.

Michler F-UF, Michler BA. A latest survey about the ecological, economic and epidemiologic impact of raccoons (*Procyon lotor*) in Germany. *Beitr Jagd- u Wildforsch.* 2012;Bd. 37:389–97.

Mirza Alizadeh A, Jazaeri S, Shemshadi B, Hashempour-Baltork F, Sarlak Z, Pilevar Z, Hosseini H. A review on inactivation methods of *Toxoplasma gondii* in foods. *Pathog Glob Health.* 2018;112:306–19.

Mitchell MA, Hungeford LL, Nixon C, Esker T, Sullivan J, Koerkenmeier R, Dubey JP. Serologic survey for selected infectious disease agents in raccoons from Illinois. *J Wildl Dis.* 1999;35:347–55.

Moller T, Nielsen SW. Toxoplasmosis in Distemper-Susceptible Carnivora. *Path vet.* 1964;1:189–203.

Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. *Lancet.* 2004;363:1965–76.

Nash JQ, Chissel S, Jones J, Warburton F, Verlander NQ. Risk factors for toxoplasmosis in pregnant women in Kent, United Kingdom. *Epidemiol Infect.* 2005;133:475–83.

Nehring S, Skowronek S 2020. Die invasiven gebietsfremden Arten der ersten Unionsliste der EU-Verordnung Nr. 1143/2014 - Zweite Fortschreibung 2019 - BfN-Skripten 574. Bonn-Bad Godesberg.

Nicolle C, Manceaux L. Sur une infection a corps de Leishman du gondi. *Compt Rend de l'Acad Sci.* 1908;147:763–6.

- Nöckler K, Serrano FJ, Boireau P, Kapel CMO, Pozio E. Experimental studies in pigs on *Trichinella* detection in different diagnostic matrices. *Vet Parasitol.* 2005;132:85–90.
- Opsteegh M, Langelaar M, Sprong H, Hartog L den, Craeye S de, Bokken G, Ajzenberg D, Kijlstra A, van der Giessen J. Direct detection and genotyping of *Toxoplasma gondii* in meat samples using magnetic capture and PCR. *Int J Food Microbiol.* 2010;139:193–201.
- Opsteegh M, Teunis P, Züchner L, Koets A, Langelaar M, van der Giessen J. Low predictive value of seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in cattle for detection of parasite DNA. *Int J Parasitol.* 2011;41:343–54.
- Paredes-Santos TC, de Souza W, Attias M. Dynamics and 3D organization of secretory organelles of *Toxoplasma gondii*. *J Struct Biol.* 2012;177:420–30.
- Periz J, Del Rosario M, McStea A, Gras S, Loney C, Wang L, Martin-Fernandez ML, Meissner M. A highly dynamic F-actin network regulates transport and recycling of micronemes in *Toxoplasma gondii* vacuoles. *Nat Commun.* 2019;10:4183.
- Petersen E, Vesco G, Villari S, Buffolano W. What do we know about risk factors for infection in humans with *Toxoplasma gondii* and how can we prevent infections? *Zoonoses Public Health.* 2010;57:8–17.
- Pleyer U, Gross U, Schlüter D, Wilking H, Seeber F. Toxoplasmosis in Germany. *Dtsch Arztebl Int.* 2019;116:435–44.
- Remington JS. Infectious diseases of the fetus and newborn infant. 7th ed. Philadelphia PA: Saunders/Elsevier; 2011.
- Rentería-Solís Z, Birka S, Schmäschke R, Król N, Obiegala A. First detection of *Baylisascaris procyonis* in wild raccoons (*Procyon lotor*) from Leipzig, Saxony, Eastern Germany. *Parasitol Res.* 2018;117:3289–92.
- Rentería-Solís ZM. Disease occurrence in free-ranging raccoons (*Procyon lotor*) from rural and urban populations in North-Eastern Germany [Dissertation med. vet.]. Berlin: Freie Univ.; 2015.
- Rentería-Solís ZM, Hamedy A, Michler F-U, Michler BA, Lücker E, Stier N, Wibbelt G, Riehn K. *Alaria alata* mesocercariae in raccoons (*Procyon lotor*) in Germany. *Parasitol Res.* 2013;112:3595–600.
- Robert Koch-Institut (RKI). RKI-Ratgeber Toxoplasmose. *Epid Bull.* 2018:451-457.
- Rosner BM, Stark K, Höhle M, Werber D. Risk factors for sporadic *Yersinia enterocolitica* infections, Germany 2009-2010. *Epidemiol Infect.* 2012;140:1738–47.

Ross RD, Stec LA, Werner JC, Blumenkranz MS, Glazer L, Williams GA. Presumed acquired ocular Toxoplasmosis in deer hunters. *Retina*. 2001;21:226–9.

Saadatnia G, Golkar M. A review on human toxoplasmosis. *Scand J Infect Dis*. 2012;44:805–14.

Sabin AB. Biological and Immunological Identity of *Toxoplasma* of Animal and Human Origin. *Proc Soc Exp Biol*. 1939;41:75–80.

Sabin AB, Feldman HA. Dyes as Microchemical Indicators of a New Immunity Phenomenon Affecting a Protozoon Parasite (*Toxoplasma*). *Science*. 1948;108:660–3.

Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson M-A, Roy SL, Jones JL, Griffin PM. Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. *Emerg Infect Dis*. 2011;17:7–15.

Schares G, Koethe M, Bangoura B, Geuthner A-C, Randau F, Ludewig M, Maksimov P, Sens M, Bärwald A, Conraths FJ, Villena I, Aubert D, Opsteegh M, van der Giessen J. *Toxoplasma gondii* infections in chickens - performance of various antibody detection techniques in serum and meat juice relative to bioassay and DNA detection methods. *Int J Parasitol*. 2018;48:751–62.

Slifko TR, Smith HV, Rose JB. Emerging parasite zoonoses associated with water and food. *Int J Parasitol*. 2000;30:1379–93.

Smith KE, Zimmerman JJ, Patton S, Beran GW, Hill HT. The epidemiology of toxoplasmosis in Iowa swine farms with an emphasis on the roles of free-living mammals. *Vet Parasitol*. 1992;42:199–211.

Sommer R, Rommel M, Lavetzow R. Die Überlebensdauer von Toxoplasmazysten in Fleisch und Fleischzubereitungen. *Fleischwirtsch*. 1965:454–6.

Sroka J, Karamon J, Wójcik-Fatla A, Dutkiewicz J, Bilska-Zajac E, Zajac V, Piotrowska W, Cencek T. *Toxoplasma gondii* infection in selected species of free-living animals in Poland. *Ann Agric Environ Med*. 2019;26:656–60.

Stollberg KC, Schares G, Mayer-Scholl A, Hrushetska I, Diescher S, Johne A, Richter MH, Bier NS. Comparison of Direct and Indirect *Toxoplasma gondii* Detection and Genotyping in Game: Relationship and Challenges. *Microorganisms*. 2021;9:1663.

Suss-Toby E, Zimmerberg J, Ward GE. Toxoplasma invasion: the parasitophorous vacuole is formed from host cell plasma membrane and pinches off via a fission pore. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:8413–8.

- Tenter AM. *Toxoplasma gondii* in animals used for human consumption. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009;104:364–9.
- Tenter AM, Fehlhauer K. Toxoplasmose: Eine lebensmittelübertragene Parasitose. Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz. 2002;45:549–55.
- Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. Int J Parasitol. 2000;30:1217–58.
- Tenter AM, Vietmeyer C, Johnson AM. Development of ELISAs based on recombinant antigens for the detection of *Toxoplasma gondii*-specific antibodies in sheep and cats. Vet Parasitol. 1992;43:189–201.
- van Sprang AP. Possibilities of survival of various parasites in meat and meat products. Tijdschr Diergeneeskd. 1984;109:344–8.
- Wallace GD. Experimental transmission of *Toxoplasma gondii* by filth-flies. Am J Trop Med Hyg. 1971;20:411–3.
- Wallander C, Frössling J, Vågsholm I, Uggla A, Lundén A. *Toxoplasma gondii* seroprevalence in wild boars (*Sus scrofa*) in Sweden and evaluation of ELISA test performance. Epidemiol Infect. 2015;143:1913–21.
- Warnekulasuriya MR, Johnson JD, Holliman RE. Detection of *Toxoplasma gondii* in cured meats. Int J Food Microbiol. 1998;45:211–5.
- Weiss LM, Kim K. The development and biology of bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. Front Biosci. 2000;5:391-405.
- Wildführ G, Wildführ W, Hrsg. Toxoplasmose - Ratgeber für Ärzte und Tierärzte. Jena: VEB Gustav Fischer Verlag; 1975.
- Wiling H, Thamm M, Stark K, Aebischer T, Seeber F. Prevalence, incidence estimations, and risk factors of *Toxoplasma gondii* infection in Germany: a representative, cross-sectional, serological study. Sci Rep. 2016;6:22551.
- Wingstrand A, Lind P, Haugegaard J, Henriksen S, Bille-Hansen V, Sørensen V. Clinical observations, pathology, bioassay in mice and serological response at slaughter in pigs experimentally infected with *Toxoplasma gondii*. Vet Parasitol. 1997;72:129–40.
- Woke PA, Jacobs L, Jones FE, Melton ML. Experimental Results on Possible Arthropod Transmission of Toxoplasmosis. J Parasitol. 1953;39:523.

Literaturverzeichnis

Xie W, Xin S, Jiang N, Zhang G, Zhang L, Li X, Yang Y. Lower seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in swine from central China after an outbreak of African swine fever. *Parasite*. 2021;28:55.

Zhang Y, Gong H, Mi R, Huang Y, Han X, Xia L, Li S, Jia H, Zhang X, Sun T, Wang X, Chen Z. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in slaughter pigs in Shanghai, China. *Parasitol Int*. 2020;76:102094.

8 Danksagung

Mein herzlicher Dank geht an alle, die mich bei der Anfertigung meiner Doktorarbeit unterstützt haben. An erster Stelle danke ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Ahmad Hamedy für die Überlassung des aktuellen und überaus interessanten Themas sowie das in mich gesetzte Vertrauen und den Freiraum. Weiterhin danke ich meinem wissenschaftlichen Betreuer Dr. Martin Koethe. Vielen Dank für eure Unterstützung bei der Projektplanung und -durchführung sowie bei der Bewältigung von allen spontan aufgetretenen kleineren bis mittelgroßen Herausforderungen. Danke vor allem Martin, dass du mir in dieser Zeit mit Rat und Tat beiseite gestanden hast sowie für deine Geduld, von der Laborarbeit bis zur Erstellung der Manuskripte.

Ein besonderer Dank geht an die Koautoren meiner Publikationen, vor allem für den wissenschaftlichen Austausch mit Dr. Aleksandra Kornacka-Stackonis. Weiterhin einen herzlichen Dank an Dr. Zaida Renteria Solis und ihr Team der Parasitologie, der Universität Leipzig für die Anzucht und Bereitstellung der *T.-gondii*-Tachyzoiten.

Die Laborarbeit wurde durch euch nie eintönig, vielen Dank dafür an Heiko Wellner, Lia Kieker und Steffi Berft sowie nicht zuletzt allen, die an der Bereitstellung der 820 Waschbärenproben beteiligt waren. Des Weiteren vielen Dank an alle Kollegen vom Institut der Lebensmittelhygiene besonders Dr. Claudia Wiacek für den wissenschaftlichen Input und Dr. Phillip Rolzhäuser für die vielen Ratschläge. Vielen Dank an Nadja Hillig und Stefanie Wolter, die mich täglich während des Schreibprozesses unterstützten, mir bei Wortfindungsstörungen aushalfen und geduldig Korrektur gelesen haben. Danke liebe Nadja für den frischen Groove und die Unterstützung für alle Vorträge und Poster.

Danke an meine Freunde, vor allem Jessi, Elisa, Manja, Konrad und Elena für die Abwechslung, euer Verständnis während der Anfertigung meiner Dissertation und euer Interesse an meiner Arbeit. Euch, Joanna und Maria danke ich besonders für das Korrekturlesen!

Zu guter Letzt vielen Dank an meine Familie. Ich danke meinen Eltern, meinem Bruder, seiner Frau und meinen Großeltern Christa und Klaus für den Rückhalt während meines Studiums. Vor allem meiner lieben Omi Liesel für das Daumendrücken, die Unterstützung, den Mut und die Kraft, die du mir immer gegeben hast! Mein besonderer Dank geht an meinen Mann Christoph und meinen Vater Lutz für die Unterstützung in allen privaten Angelegenheiten und dass ihr mir den Rücken freigehalten habt. Ich danke meinem Mann von ganzen Herzen für das geduldige Korrekturlesen, deinen Ansporn und die produktive Hilfe bei den wiederholten Vorträgen, die du immer wieder über dich ergehen lassen musstest.