

Aus dem Veterinär-Anatomischen Institut
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

und dem Institut für Parasitologie
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

**Etablierung und Validierung eines Meerschweinchenmodells für die (humane) kongenitale
Toxoplasmose**

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

eingereicht von
Thomas Grochow
aus Naumburg (Saale)

Leipzig, 2023

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Dr. Thomas Vahlenkamp

Betreuer: Prof. Dr. Dr. Simone Fietz
Prof. Dr. Arwid Dauschies

Gutachter: Prof. Dr. Dr. Simone Fietz, Veterinär-Anatomisches Institut der
Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig zusammen mit
Prof. Dr. Arwid Dauschies, Institut für Parasitologie der Universität Leipzig

Prof. Dr. Anja Joachim, Institut für Parasitologie der Vetmeduni Vienna

Tag der Verteidigung: 05.09.2023

**Für meine Eltern, meine Großeltern, meinen Bruder,
Fritzi, Matze, Edda und Rune**

Inhaltsverzeichnis

Inhalt	Seite
1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht	2
2.1 <i>Toxoplasma gondii</i>	2
2.1.1 Einführung und Geschichte.....	2
2.1.2 Struktur und Vorkommen der Entwicklungsstadien.....	3
2.1.2.1 Tachyzoiten.....	3
2.1.2.2 Bradyzoiten und Gewebezysten.....	3
2.1.2.3 Oozysten	4
2.1.3 Lebenszyklus.....	4
2.1.3.1 Entwicklung im Zwischenwirt.....	4
2.1.3.2 Entwicklung im Endwirt.....	4
2.1.4 Genotypisierung.....	5
2.2 Humane Toxoplasmose	5
2.2.1 Epidemiologie	5
2.2.2 Infektionsquellen.....	6
2.2.2.1 Tachyzoiten.....	6
2.2.2.2 Bradyzoiten.....	6
2.2.2.3 Oozysten	6
2.2.3 Formen der humanen Toxoplasmose	8
2.2.3.1 Postnatale Toxoplasmose.....	8
2.2.3.2 Pränatale (kongenitale) Toxoplasmose.....	8
2.2.3.2.1 Diagnostik.....	9
2.2.3.2.2 Behandlung.....	10
2.2.4 Mögliche Tierversuchsmodelle für die kongenitale Toxoplasmose	11
2.3 Neokortex	12
2.3.1 Anatomischer und histologischer Aufbau des Neokortex.....	12
2.3.2 Pränatale Entwicklung und Stammzellen des Neokortex	13
3 Überblick über die eigene wissenschaftliche Arbeit	15
3.1 Publikation 1: Establishment and validation of a guinea pig model for human congenital toxoplasmosis	16

Inhaltsverzeichnis

3.2	Manuskript 2 Evaluation of neurologic testing in guinea pigs	17
3.3	Manuskript 3 Reduced neural progenitor cell count and cortical neurogenesis in guinea pigs congenitally infected with <i>Toxoplasma gondii</i>	34
4	Übergreifende Diskussion	75
4.1	Etablierung eines Tierversuchsmodells für die humane kongenitale Toxoplasmose	75
4.2	Folgen der kongenitalen Toxoplasmose auf das sich entwickelnde Meerschweinchenhirn	79
4.3	Schlussfolgerungen.....	81
5	Zusammenfassung	82
6	Summary.....	84
7	Literaturverzeichnis	86

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
BIV	Basale intermediäre Vorläuferzellen
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
Bzw.	Beziehungsweise
Ca.	Circa
D. h.	Das heißt
EC	European Commission
EFSA	European Food Safety Authority
Et al.	Et alii
Hu C/D	HuC / HuD
I. d. R.	In der Regel
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
I. p.	Intraperitoneal
ÖGHMPH	Österreichische Gesellschaft für Hygiene, Mikrobiologie und Präventivmedizin
Pax6	Paired box gene 6
PV	Parasitophore Vakuole
QPCR	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RKI	Robert Koch-Institut
SVZ	Subventrikulärzone
Tbr2	T-box brain protein 2
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
U. a.	Unter anderem
V. a.	Vor allem
VZ	Ventrikulärzone
Z. B.	Zum Beispiel

1 Einleitung

Die Toxoplasmose ist eine durch *Toxoplasma (T.) gondii* verursachte Zoonose. *T. gondii* ist ein obligat intrazellulär lebender Parasit, der weltweit verbreitet ist (BLADER et al. 2015, OPSTEEGH et al. 2015, TENTER et al. 2000).

Nach postnataler Infektion befällt *T. gondii* während der akuten Phase vorzugsweise Gliazellen und bei chronischem Verlauf Neurone im Kortex von Mensch und Tier (PARLOG et al. 2015). Die *T. gondii*-Infektion führt dabei zu Beeinträchtigungen der Morphologie und Funktion der infizierten Zellen (BRUNET et al. 2008, PARLOG et al. 2015, KIM et al. 2016, WANG und GAO 2016). Zur Pathogenese und zum Infektionsverlauf, insbesondere zum Zelltropismus von *T. gondii*, im pränatalen Gehirn lagen bisher keine Daten vor. Von großer Wichtigkeit war die Tatsache, dass in höheren Säugetieren die Neurogenese zum überwiegenden Teil pränatal stattfindet und neurale Stammzellen in hoher Abundanz nur im pränatalen Kortex vorhanden sind (FIETZ und HUTTNER 2011, FIETZ et al. 2012, SAUERLAND et al. 2018, KALUSA et al. 2021). Ob und in welchem Ausmaß *T. gondii* neurale Stammzellen, Neurone und/oder Gliazellen im sich entwickelnden Gehirn nach kongenitaler Infektion infiziert, war unbekannt.

Für die kongenitale Toxoplasmose, insbesondere für die humane kongenitale Toxoplasmose, stand kein geeignetes Tiermodell zur Verfügung. Für die Untersuchung der kongenitalen Toxoplasmose war die Etablierung eines geeigneten Tiermodells deshalb von großer Bedeutung. Ziel dieses Dissertationsprojekts war es, das Meerschweinchen als Modelltier für die humane kongenitale Toxoplasmose zu etablieren und auf Basis der Erregertransmission, pathomorphologische und immunhistologischen Befunde zu validieren. Das Vorhaben bildet die Grundlage für die Verwendung des Meerschweinchens als Tiermodell, um wissenschaftliche Fragestellungen von hoher Aktualität und klinischer Bedeutung, u. a. zur Pathogenese, Diagnostik, Therapie und Prognose der kongenitalen Toxoplasmose, zu untersuchen.

2 Literaturübersicht

2.1 *Toxoplasma gondii*

2.1.1 Einführung und Geschichte

Der protozoäre Parasit *Toxoplasma (T.) gondii* wurde erstmals 1908 durch NICOLLE und MANCEAUX (1908) im Gundi (*Ctenodactylus gundi*) entdeckt. Anfangs wurde der Parasiten den Leishmanien zugeordnet, jedoch erkannte man bereits ein Jahr später, dass es sich um eine eigene Spezies handelt. Der Parasit wurde nach seiner Morphologie (altgriechisch: toxon = Bogen, plasma = Gebilde, gondii = von *C. gundi*) benannt und führte die Gattung *Toxoplasma* ein (NICOLLE und MANCEAUX 1909).

Die erstmalige Isolation des Parasiten aus dem Tier gelang 1937 SABIN und OLITSKY (1937). Im selben Jahr konnte der Parasit als Verursacher einer tödlichen Infektion eines Erwachsenen und 1939 einer tödlichen kongenitalen Infektion eines Kindes identifiziert werden. Damit rückte er verstärkt in den Fokus der Humanmedizin (WOLF und COWEN 1937, WOLF et al. 1939a, WOLF et al. 1939b, WOLF et al. 1940). Veterinärmedizinische Bedeutung erlangte die Erkrankung, als es in den 1950er Jahren vermehrt zu Aborten in neuseeländischen Schafherden kam (HARTLEY und MARSHALL 1957, DUBEY 2008).

Mit Hilfe des von SABIN und FELDMAN (1948) entwickelten Dye-Tests konnte festgestellt werden, dass der Parasit alle warmblütigen Tiere, einschließlich des Menschen, befällt (DUBEY et al. 1998, TENTER et al. 2000, OPSTEEGH et al. 2015). Die Hypothese von WEINMAN und CHANDER (1954, 1956), dass der Parasit durch den Verzehr von rohem Fleisch übertragen wird, konnte durch DESMONTS et al. (1965) bestätigt werden. Eine 1959 in Mumbai durchgeführte Studie zeigte, dass strenge Vegetarier eine ähnlich hohe Seroprävalenz wie auch Fleischverzehrende haben (RAWAL 1959). Diese Lücke des Ansteckungsweges konnte durch die Entdeckung der Oozysten als infektiöses Stadium der Parasitenentwicklung im Katzenkot durch HUTCHISON (1965) und andere Arbeitsgruppen geschlossen werden (HUTCHISON et al. 1969, DUBEY et al. 1970, FRENKEL et al. 1970, WEILAND und KUHN 1970).

Aktuelle Ergebnisse zeigen, dass eine *T. gondii*-Infektion des Menschen zu psychischen Erkrankungen wie einer bipolare Störung oder einer Schizophrenie, aber auch zu einer erhöhten Suizidinzidenz führen kann (YOLKEN et al. 2001, WEBSTER et al. 2006, TORREY et al. 2007, ARLING et al. 2009, LING et al. 2011, PEARCE et al. 2012, TORREY et al. 2012, FLEGR et al. 2014, FLEGR und HORÁČEK 2019). Des Weiteren steht die Toxoplasmose im Verdacht, neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Parkinson sowie Morbus Alzheimer zu begünstigen und ist auch deshalb weiterhin im Zentrum der Forschung (MIMAN et al. 2010, KUSBECI et al. 2011).

SABIN (1939, 1941) erkannte, dass die Gattung *Toxoplasma* nur die Spezies *Toxoplasma gondii* enthält. Aktuell wird der Parasit nach SCHNIEDER et al. (2006) folgendermaßen eingeordnet:

Stamm: Apicomplexa
Klasse: Coccidea
Unterklasse: Eucoccidea
Ordnung: Eimeriida

Familie: Sarcocystidae
Gattung: *Toxoplasma*
Art: *Toxoplasma gondii*

2.1.2 Struktur und Vorkommen der Entwicklungsstadien

Der Entwicklungszyklus von *T. gondii* gliedert sich in 3 Phasen, die durch verschiedene infektiöse Stadien repräsentiert werden: die Tachyzoiten, die Bradyzoiten in den Gewebezysten und die Sporozoiten, welche während der exogenen Sporulation der Oozysten gebildet werden. Die Tachyzoiten und Bradyzoiten leben obligat intrazellulär (ROBERT-GANGNEUX und DARDÉ 2012). Die 3 genannten infektiösen Stadien haben eine sichelförmige Gestalt mit einer Größe von ca. 4 – 8 x 6 µm (DUBEY et al. 1998, HALONEN und WEISS 2013).

2.1.2.1 Tachyzoiten

Den Begriff Tachyzoit (tachys [griechisch] = schnell) prägte FRENKEL (1973) in Bezug auf die sehr schnelle Replikationsgeschwindigkeit dieses Stadiums. Tachyzoiten können alle kernhaltigen Zellen befallen und sind vor allem während der akuten Infektion im Wirt zu finden (JOINER und DUBREMETZ 1993, HALONEN und WEISS 2013). Sie besitzen am apikalen Ende, wie alle Apicomplexa, den so genannten Apikalkomplex. Dabei handelt es sich um sekretorische Organelle, welche neben dem Zytoskelett eine essentielle Rolle bei der Invasion in die Wirtszelle spielen (DUBEY et al. 1998, BAUM et al. 2008). Durch das Eindringen in die Wirtszelle wird der Parasit von Teilen ihrer Plasmamembran umschlossen, welche nun eine parasitophore Vakuole (PV) bildet. Durch diese sind die Parasiten vor zelleigenen Abwehrmechanismen, wie z. B. dem im Lysosom vorkommenden Lysozym, geschützt (DUBEY et al. 1998, MORDUE et al. 1999, HALONEN und WEISS 2013, BLADER et al. 2015). Die Tachyzoiten transformieren in Trophozoiten und der Parasit vermehrt sich anschließend asexuell in Form der so genannten Endodyogenie in Intervallen von 6 – 8 Stunden rapide in der PV, bis die Wirtszelle letztlich zerstört wird und die nun freiwerdenden Tachyzoiten neue Wirtszellen infizieren können. Nach wenigen Wochen werden die freien Tachyzoiten vom Immunsystem des Wirts eliminiert (HALONEN und WEISS 2013, SCHLÜTER et al. 2014).

2.1.2.2 Bradyzoiten und Gewebezysten

Durch die Immunantwort des Wirts werden die Parasiten in ihrer Replikationsgeschwindigkeit gebremst und differenzieren sich zu Bradyzoiten. Den Begriff Bradyzoit prägte ebenfalls FRENKEL (1973) in Anlehnung an die langsamere Reproduktion des Parasiten (bradys [griechisch] = langsam). Die Parasiten vermehren sich nur noch sehr langsam über Endodyogenie, sodass sie die Wirtszelle nicht zum Platzen bringen. Durch die Bildung einer Zystenwand um die Bradyzoiten entstehen intrazelluläre Gewebezysten (FERGUSON und HUTCHISON 1987, DUBEY et al. 1998). Durch die sie umschließende Wirtszellmembran und die glykoproteinreiche Zystenwand entgehen die Bradyzoiten bzw. Zystozoiten der Immunabwehr des Wirts (ZHANG et al. 2001). Gewebezysten können bereits 3 Tage nach der Infektion entstehen und stellen das chronische Stadium bzw. das Dauerstadium von *T. gondii* im Wirtsgewebe dar (DUBEY und FRENKEL 1976). *Toxoplasma*-Zysten können lebenslang im Wirt persistieren (FERGUSON und HUTCHISON 1987, FRENKEL 1988). Der Durchmesser der Zysten kann bis zu 100 µm betragen. Sie kommen primär in der grauen Substanz des Gehirns, aber auch in der Muskulatur, Leber, Lunge, Niere und anderen viszeralen Organen vor (FERGUSON und HUTCHISON 1987, DUBEY et al. 1998, WEISS und KIM 2000, HALONEN und WEISS 2013, SCHLÜTER et al. 2014, CHIEBAO et al. 2021).

2.1.2.3 Oozysten

Die Oozysten entstehen bei der sexuellen Vermehrung des Parasiten im Darm des Endwirts und werden über den Kot in die Umwelt abgegeben (HUTCHISON et al. 1969, DUBEY et al. 1970, DUBEY 2009a). Dabei können sie in der Umwelt bis zu 1,5 Jahre und bei 4 °C bis zu 4,5 Jahre überleben (FRENKEL et al. 1975, DUBEY et al. 1998). Sie sind oval bis rund und haben einen Durchmesser von 10 x 13 µm. Der Großteil der Oozyste wird vom Sporonten ausgefüllt. Nach 1 – 5 Tagen kommt es in der Umwelt zur Sporulation. Die Oozyste enthält dann 2 ca. 6 x 8 µm große Sporozysten mit je 4 Sporozoiten. Die Sporulation beinhaltet eine meiotische Teilung, so dass der aufgrund der Fertilisation diploide Sporont sich in insgesamt 8 haploide Sporozoiten teilt. Erst nach der Sporulation ist die Oozyste infektiös (FRENKEL et al. 1970, DUBEY et al. 1998).

2.1.3 Lebenszyklus

2.1.3.1 Entwicklung im Zwischenwirt

Als Zwischenwirt von *T. gondii* können alle Vögel und Säugetiere auftreten (TENTER et al. 2000, HALONEN und WEISS 2013, OPSTEEGH et al. 2015, ELSHEIKHA et al. 2021). Diese können sich durch die Aufnahme von sporulierten Oozysten aus der Umwelt oder über Gewebezysten durch den Verzehr anderer infizierter Zwischenwirte infizieren. Dabei wird die Wand der Oozysten bzw. der Gewebezysten im Magen-Darm-Trakt v. a. durch proteolytische Enzyme und eine pH-Wert Senkung aufgelöst. Die dadurch freigesetzten Sporozoiten bzw. Bradyzoiten durchdringen die Membran von Enterozyten, bilden eine PV und differenzieren sich zu Tachyzoiten. Während der akuten Infektionsphase vermehren sich die Tachyzoiten durch Endodyogenie, bis die infizierte Zelle schließlich rupturiert und wiederum Tachyzoiten freisetzt. Über den lympho-hämatogenen Weg verteilen sich die Tachyzoiten im gesamten Körper und können alle kernhaltigen Zellen der verschiedenen Organe und Gewebe infizieren. In den Wirtszellen vermehren sie sich in weiteren Endodyogeniezyklen, solange keine Immunität entwickelt wird (FERGUSON und HUTCHISON 1987, FRENKEL 1988, JOINER und DUBREMETZ 1993, DUBEY et al. 1998, TENTER et al. 2000, WEISS und KIM 2000, MONTOYA und LIESENFELD 2004, SCHLÜTER et al. 2014, SHAPIRO et al. 2019, ATTIAS et al. 2020, ELSHEIKHA et al. 2021).

Während der Endodyogenien wird das adaptive Immunsystem stimuliert, so dass es in der chronischen Phase der Toxoplasmose im Zwischenwirt zur Elimination der freien Tachyzoiten kommt. Gleichzeitig verbleibt im Sinn einer Immunevasion ein Teil der Parasiten in ihren Wirtszellen – vorwiegend in Gehirn und Muskulatur – wo sie der Immunattacke entgehen und sich zu intrazellulären Gewebezysten, in denen durch eine langsame Vielteilung Bradyzoiten entstehen, entwickeln. Die Gewebezysten können lebenslang im Wirt persistieren (FERGUSON und HUTCHISON 1987, FRENKEL 1988, SCHLÜTER et al. 2014). Im Falle einer Immundefizienz des Wirts können sich die Bradyzoiten wieder zu Tachyzoiten differenzieren und es kann ohne erneute Infektion eine akute Toxoplasmose entstehen, die zu schwerwiegenden Krankheiten, wie z.B. einer Enzephalitis, führen kann (MONTOYA und LIESENFELD 2004, KIM und WEISS 2008, BASAVARAJU 2016, ELSHEIKHA et al. 2021).

2.1.3.2 Entwicklung im Endwirt

Die sexuelle Vermehrung von *T. gondii* findet nur im Darm von Feliden, die den Endwirt darstellen, statt. Nach erfolgter oraler Aufnahme von Gewebezysten sowie Exzystierung durch proteolytische Enzyme und pH-Wert-Änderung im Magen-Darm-Trakt infizieren die freigesetzten Bradyzoiten bzw.

Literaturübersicht

Sporozoiten die Enterozyten. Innerhalb ihrer Wirtszelle transformieren die Infektionsstadien zu Tachyzoiten, die zu Meronten auswachsen, die wiederum über Endodyogenie zahlreiche Merozoiten bilden. Es kommt zur Ruptur des Enterozyten und die dadurch freigesetzten Merozoiten können sodann andere Enterozyten befallen und erneut intrazelluläre Endodyogeniezyklen einleiten. Es folgt die Gamogonie, in der sich invasive Merozoiten zu Mikrogamonten und Makrogamonten differenzieren. Mikrogamonten teilen sich zu zahlreichen motilen Mikrogameten, die aktiv die sessilen ausgereiften Makrogameten befruchten und damit eine Zygote, schließlich nach Entstehen der Oozystenwand eine unreife Oozyste bilden, die einen diploiden Sporonten enthält. Die Oozyste wird über den Kot in die Umwelt abgegeben. Dort reift sie nach 1 – 5 Tagen zur vesporten infektiösen Oozyste (Sporulation), die 2 Sporozysten mit jeweils 4 haploiden Sporozoiten enthält (MILLER et al. 1972, DUBEY und FRENKEL 1976, DUBEY et al. 1998, TENTER et al. 2000, WEISS und KIM 2000, MONTOYA und LIESENFELD 2004, DUBEY 2009a, SHAPIRO et al. 2019, ATTIAS et al. 2020, ELSHEIKHA et al. 2021).

Alternativ kann sich *T. gondii* in Feliden nach oraler Aufnahme von sporulierten Oozysten wie in Zwischenwirten entwickeln (2.1.3.1), um dort eine sexuelle Entwicklung mit Bildung meist weniger Oozysten einzuleiten (DUBEY 1995, ZULPO et al. 2018).

Infiziert sich der Endwirt über Bradyzoiten beträgt die Präpatenzzeit 3 – 10 Tage, wohingegen diese bei einer Infektion über Sporozoiten bei 23 Tagen liegt (DUBEY 2006).

2.1.4 Genotypisierung

Auf der Virulenz von Mäusen basierend, wurde *T. gondii* in 3 Hauptgenotypen (Typ I, II und III) unterteilt. Dabei zeigt der Typ I eine sehr hohe Virulenz, wohingegen die Typen II und III eher eine niedrige Virulenz aufweisen. So ist die intraperitoneale (i. p.) Applikation von einem Tachyzoiten vom Typ I für alle Mäuse tödlich ($LD_{100} = 1$), konträr hierzu ist die mittlere letale Dosis der Typen II und III bei über 1000 i. p. applizierten Tachyzoiten ($LD_{50} \geq 10^3$). Zudem unterscheiden sich die Typen stark im Reproduktionsverhalten und in der Fähigkeit Gewebezysten zu bilden (SIBLEY und BOOTHROYD 1992, HOWE und SIBLEY 1995). Diese Stämme sind primär in Europa und Nordamerika zu finden, wohingegen in Afrika, Asien und Südamerika v.a. atypische Strämme vorkommen. In Deutschland kommt am häufigsten der Genotyp II mit 87,2 % vor (MAKSIMOV et al. 2012, AMOUEI et al. 2020).

2.2 Humane Toxoplasmose

2.2.1 Epidemiologie

Weltweit sind ca. 33 % der Menschen mit *T. gondii* infiziert (MONTOYA und LIESENFELD 2004, BIGNA et al. 2020). Dabei kann die Seroprävalenz anhand von *Toxoplasma*-IgG-Antikörpern je nach Land von unter 10 % bis über 90 % schwanken und selbst innerhalb eines Landes stark variieren. Niedrige Prävalenzen von bis zu 30 % findet man v. a. in Nordamerika, im Fernen Osten und in Nordeuropa, mittlere Prävalenzen von 30 – 50 % in Mittel- und Südeuropa und hohe in Südamerika und den tropischen Gebieten Afrikas (TENTER et al. 2000, PAPPAS et al. 2009, FLEGR et al. 2014, WILKING et al. 2016, BIGNA et al. 2020). Dabei haben umwelt- und sozioökonomische Bedingungen, einschließlich Ernährungsgewohnheiten und gesundheitsrelevante Praktiken, einen starken Einfluss. Eine mögliche Ursache für die höheren Prävalenzen in den Gebieten mit tropischem Klima liegt in der Wärme und Feuchte, da die Oozysten ideale Bedingungen zum Sporulieren vorfinden und auch über ein Jahr lang infektiös bleiben können (FRENKEL et al. 1975, SCHLÜTER et al. 2014, SHAPIRO et al.

2019). Die höhere Prävalenz in Ostdeutschland gegenüber Westdeutschland wird durch einen höheren Konsum von rohem Schweinehackfleisch im Osten erklärt (WILKING et al. 2016). Zudem kann festgestellt werden, dass die Prävalenz stark vom Lebensalter abhängt. Sie nimmt beispielsweise in Deutschland um 1 % pro Lebensjahr zu. Die Seroprävalenz in Deutschland liegt bei 55 % (GROSS 2004, WILKING et al. 2016).

2.2.2 Infektionsquellen

2.2.2.1 Tachyzoiten

Bei der horizontalen Übertragung sind Tachyzoiten aufgrund ihrer kurzen Persistenz nur von untergeordneter Bedeutung. Tachyzoiten können galaktogen übertragen werden (COSTA und LANGONI 2010, DUBEY et al. 2014, BOUGHATTAS 2017). Deshalb stellt der Verzehr von nicht pasteurisierter Milch ein potentielles Risiko dar. Beim Menschen ist die besondere Übertragung durch eine Bluttransfusion, bei welcher der Spender akut infiziert ist und so den Empfänger mit Tachyzoiten infizieren kann, beschrieben (YAZAR et al. 2006, ALVARADO-ESQUIVEL et al. 2010, ELHENCE et al. 2010, TONG et al. 2011, KHURANA und BATRA 2016, ALVARADO-ESQUIVEL et al. 2018). Im Gegensatz hierzu sind Tachyzoiten der entscheidende Faktor bei der vertikalen Infektion des Embryos bzw. Fötus (2.2.3.2).

2.2.2.2 Bradyzoiten

In Fleisch und Innereien befindliche Gewebezysten stellen ein hohes potentielles Risiko für eine Infektion mit dem Parasiten dar. Dabei gehen sowohl COOK et al. (2000) als auch SLIFKO et al. (2000) davon aus, dass ca. 50 % der Infektionen mit *T. gondii* auf diesem Weg geschehen. Toxoplasmen können alle warmblütigen Tiere als potentiellen Zwischenwirt befallen (DUBEY et al. 1998, TENTER et al. 2000, OPSTEEGH et al. 2015). Als Folge einer natürlichen Infektion sind viele Nutztiere, insbesondere bei Weide- oder Auslaufhaltung, für *T. gondii* seropositiv. Die Prävalenzen liegen bei Schweinen in der Stallhaltung bei 19 %, in der Freilandhaltung bei bis zu 68 %. Geflügel erreicht Prävalenzen von bis zu 65 %, Rinder, Schafe und Ziegen mit Weidegang von bis zu 92 % (TENTER et al. 2000, EFSA 2007, DUBEY und JONES 2008, KIJLSTRA und JONGERT 2008, DUBEY 2009b, DUBEY 2009c, HERRERO et al. 2016, ALIZADEH et al. 2018). Da vom Fleisch eines Schweines 300 – 400 Personen essen, ist von Zysten befallenes Fleisch durchaus von zoonotischer Relevanz (TENTER und FEHLHABER 2002). So ist es bereits mehrfach zu Ausbrüchen infolge einer Infektion von Menschen über Gewebezysten gekommen (BONAMETTI et al. 1997, MEIRELES et al. 2015, SCHUMACHER et al. 2021).

Im Zuge der Verarbeitung werden Fleisch und Fleischerzeugnisse für den menschlichen Verzehr zubereitet. Dabei sind nicht alle Verfahren geeignet, um die Zysten zu inaktivieren und somit ein sicheres Lebensmittel für den Menschen herzustellen. So werden beispielsweise durch das Faschieren Gewebezysten nicht inaktiviert. Ein sicheres Lebensmittel erhält man z. B. durch Erhitzen auf mindestens 67 °C, Einfrieren des Fleisches bei -20 °C für mindestens 3 Tage und das Pökeln bei mindestens 2 % Salzkonzentration im Fleisch. (ALIZADEH et al. 2018).

2.2.2.3 Oozysten

Oozysten stellen das umweltresistente Stadium von *T. gondii* dar und spielen folglich eine wichtige Rolle in der Epidemiologie dieses Zoonoseerregers. Obwohl *T. gondii* verschiedene warmblütige Tierarten infiziert, sind Hauskatzen (*Felis catus*) und andere Felidae die einzigen bekannten Endwirte,

Literaturübersicht

die in der Lage sind, Oozysten in ihrem Kot auszuscheiden (DUBEY et al. 1970, JEWELL et al. 1972, MILLER et al. 1972, SHAPIRO et al. 2019). Hauskatzen leben weltweit in enger Verbindung mit dem Menschen (LIBERG et al. 2000) und sowohl Hauskatzen als auch freilaufende, streunende oder verwilderte Hauskatzen tragen zur Oozystenbelastung der Umwelt bei. Die Verbreitung der Oozysten in der Umwelt beginnt mit der Infektion eines Feliden. Diese können mit *T. gondii* durch den Verzehr eines infizierten Zwischenwirts (Bradyzoiten in Zysten), die Aufnahme von Oozysten aus der Umwelt oder kongenital über Tachyzoiten infiziert werden. Man geht davon aus, dass die meisten Infektionen von Katzen durch infizierte Beutetiere erworben werden (DUBEY und JONES 2008, SHAPIRO et al. 2019). Dabei liegt die Präpatenz nach einer Infektion mit Bradyzoiten bei ca. 3 – 10 Tagen, mit Oozysten bei ca. 23 Tagen (DUBEY 2006). Nach postnataler Erstinfektion können Katzen über 1 – 2 Wochen über eine Millionen Oozysten je Gramm Kot ausscheiden (DUBEY et al. 1998, DUBEY 2006, SCHARES et al. 2008). In der Umwelt erfolgt innerhalb von 1 – 5 Tagen die Sporulation und die Oozysten erreichen ihre Infektiosität (DUBEY et al. 1998). Die Seroprävalenz bei Hauskatzen liegt durchschnittlich bei ca. 30 – 40 %, wobei davon ausgegangen werden muss, dass diese Tiere zur immensen Verbreitung des Parasiten beitragen (ELMORE et al. 2010).

Über viele Jahrzehnte war es nicht möglich, eine exakte Aussage zu treffen, ob eine Infektion des Menschen primär über Oozysten oder über Bradyzoiten bzw. Tachyzoiten erfolgt. Lediglich über die Auswertung von Anamnesebögen konnten Vermutungen aufgestellt werden. Mit Hilfe der von HILL et al. (2011) etablierten Sporoziten-spezifischen Antikörper konnte erstmals bestätigt werden, dass sich 43 – 78 % der US-Amerikaner über Oozysten infizieren (BOYER et al. 2011, AGUIRRE et al. 2019).

Bei einer Infektion mit Oozysten spielen verschiedene Risikofaktoren eine Rolle. Dabei variiert das Infektionsrisiko je nach Studie in Bezug auf das Vorhandensein von Katzen im eigenen Haushalt stark. So haben KOLBEKOVA et al. (2007), WILKING et al. (2016) und THEBAULT et al. (2021) eine positive Korrelation zwischen dem Besitz von Katzen und der Seroprävalenz festgestellt, JONES et al. (2009) lediglich beim Besitz von mindestens 3 Katzenwelpen. Sowohl KAPPERUD et al. (1996), COOK et al. (2000) als auch ERTUG et al. (2005) konnten hingegen keinen Zusammenhang feststellen. Auffallend ist, dass auf Spitzbergen eine hohe Seroprävalenz des Parasiten in der Wildtierpopulation vorherrscht, obwohl es dort keinen Endwirt gibt und somit dieser nicht entscheidend für die Verbreitung des Parasiten sein kann (PRESTRUD et al. 2010).

Einen deutlichen Einfluss hingegen hat der Verzehr von nicht ausreichend behandeltem Wasser (BAHIA-OLIVEIRA et al. 2003, ERTUG et al. 2005, JONES et al. 2005, PETERSEN et al. 2010, THEBAULT et al. 2021). So sind die bislang größten Toxoplasmoseausbrüche in Kanada, Brasilien und Indien auf mit Oozysten verunreinigtes Trinkwasser zurückzuführen (BOWIE et al. 1997, MOURA et al. 2006, BALASUNDARAM et al. 2010, MEIRELES et al. 2015).

Nicht ausreichend durchgegartes Muscheln, insbesondere Austern, stellen ebenfalls ein hohes Risiko für eine *Toxoplasma*-Infektion dar. In den Wasser filternden Membranen der Muscheln kumulieren die Oozysten, ohne dabei stark an Infektiosität einzubüßen (JONES et al. 2009, THEBAULT et al. 2021).

Etwa 6 – 17 % der Infektionen in den USA sind auf Kontakt mit kontaminierter Erde zurückzuführen (COOK et al. 2000). Insbesondere Sandkästen sind mit Oozysten belastet. Da Kinder zur Geophagie neigen, besteht die Gefahr, dass sie sich auf diesem Weg mit dem Parasiten infizieren (STAGNO et al. 1980, DOS SANTOS et al. 2010, MOSHFE et al. 2018).

Des Weiteren stellt der Verzehr von unzureichend gewaschenem Obst und Gemüse einen Risikofaktor dar. Über den Kontakt mit kontaminierten organischen Düngemitteln, Wasser oder direkten Bodenkontakt können Oozysten am Obst und Gemüse anhaften (KAPPERUD et al. 1996, ALVARADO-ESQUIVEL et al. 2010, THEBAULT et al. 2021).

2.2.3 Formen der humanen Toxoplasmose

2.2.3.1 Postnatale Toxoplasmose

In den meisten Fällen verläuft die postnatale Toxoplasmose bei immunkompetenten Kindern und Erwachsenen asymptomatisch oder wird von leichten grippeähnlichen Symptomen begleitet. Weniger als 10 % der Infizierten entwickeln Symptome wie Fieber, Kopf- und Gliederschmerzen sowie eine Lymphadenopathie, insbesondere der Hals- und Hinterhauptlymphknoten. Diese Symptome klingen in der Regel nach spätestens 4 – 6 Wochen komplett ab (MONTOYA und LIESENFELD 2004, FLEGR et al. 2014, SCHLÜTER et al. 2014, PLEYER et al. 2019). Sehr seltene Komplikationen kommen in der Regel nur bei immunsupprimierten Menschen vor, z. B. infolge einer AIDS- oder Krebserkrankung oder einer Organtransplantation vor. Diese können sich in Form einer Myokarditis, Polymyositis, Pneumonitis, Hepatitis oder Enzephalitis, die bis zum Tod führen können, äußern. Bei immunsupprimierten Patienten ist dies meist die Folge einer Reaktivierung der Bradyzoiten in den Zysten zu Tachyzoiten (STAGNO et al. 1980, FARKASH et al. 1986, PORTER und SANDE 1992, MONTOYA und LIESENFELD 2004, KIM und WEISS 2008, AKANMU et al. 2010, FLEGR et al. 2014, BASAVARAJU 2016).

Eine weitere Form einer *Toxoplasma*-Infektion ist die okuläre Toxoplasmose. Die okuläre Toxoplasmose stellt beim Menschen die häufigste Ursache für eine posteriore Uveitis dar. Sobald der Parasit die Netzhaut und Aderhaut erreicht hat, vermehrt er sich in den Wirtszellen, lässt diese rupturieren und dringt in die benachbarten Zellen ein, wodurch es zu einer nekrotisierenden Chorioretinitis kommt. Diese aktiven Läsionen granulieren in der Regel innerhalb von 2 – 4 Monaten mit einer hyperpigmentierten Narbe als Folge der Zerstörung des retinalen Pigmentepithels (MONTOYA und LIESENFELD 2004, PARK und NAM 2013, MAENZ et al. 2014, SCHLÜTER et al. 2014). Bei 80 % der Fälle kommt es innerhalb der nächsten 5 Jahre zum Rezidiv. Dabei sind die neuen Läsionen an den alten Narben assoziiert. In der Folge kann eine Erblindung auftreten (BOSCH-DRIESSEN et al. 2002, HOVAKIMYAN und CUNNINGHAMJR 2002).

2.2.3.2 Pränatale (kongenitale) Toxoplasmose

Falls während einer Gravidität eine akute Parasitämie infolge einer Erstinfektion oder einer Reaktivierung durch Immunsuppression auftritt, kann es in 20 – 50% der Fälle zu einer diaplazentaren (kongenitalen) Übertragung auf das Ungeborene kommen (DUNN et al. 1999). Dabei ist das Risiko der Übertragung im ersten Trimester am niedrigsten und steigert sich stetig bis zum dritten Trimester (DUNN et al. 1999, MONTOYA und LIESENFELD 2004). Im Gegensatz hierzu ist die Symptomatik am stärksten, je früher die Infektion stattgefunden hat. So kommt es bei einer Infektion im ersten Trimester vermehrt zu Aborten. Im zweiten Trimester treten die als klassische Triade bezeichneten Symptome Gehirnverkalkungen, Hydrozephalus und Chorioretinitis auf. Dabei bilden 5 % aller Nachkommen diese Triade aus. Zudem kann es zu Hepato- und Splenomegalien, Krampfanfällen und Gelbsucht kommen. Erfolgt eine Infektion im letzten Trimester, bleiben die Nachkommen meist asymptomatisch. Dennoch kann es in bis zu 84 % der Fälle nachträglich zu einer okulären Toxoplasmose, Epilepsie und Entwicklungsstörungen kommen, die oftmals nicht mehr mit einer

kongenitalen Toxoplasmose assoziiert werden (BÉRARD-BADIER et al. 1968, DESMONTS und COUVREUR 1974, FARKASH et al. 1986, WONG und REMINGTON 1994, COUVREUR 1999, DUNN et al. 1999, TENTER et al. 2000, JONES et al. 2001, THULLIEZ 2001, ELSHEIKHA 2008, PHAN et al. 2008, CAPOBIANGO et al. 2014, MCAULEY 2014, MALDONADO und READ 2017, FRENKEL et al. 2018, MAQUERA-AFARAY et al. 2022).

2.2.3.2.1 Diagnostik

Die Toxoplasmose verläuft in der Regel bei gesunden Erwachsenen asymptomatisch und auch am Embryo sind ultrasonographisch nur selten Veränderungen feststellbar (GAY-ANDRIEU et al. 2003). Da somit eine akute Infektion während der Schwangerschaft nicht klinisch auffällig ist, muss sie durch serologische Untersuchungen festgestellt werden. Ein serologisches Screening von Schwangeren ist sinnvoll, da ein frühes Erkennen der Infektion rechtzeitige therapeutische Maßnahmen ermöglicht, die zu einer deutlichen Reduktion der Symptomatik des Kindes führen (THALHAMMER und HELLER-SZÖLLÖSY 1979, FOULON et al. 2000, GRAS et al. 2005, THIÉBAUT et al. 2007, MONTOYA und REMINGTON 2008, CORTINA-BORJA et al. 2010, HOTOP et al. 2012, MCAULEY 2014). Dabei wird das maternale Serum oder Plasma zunächst untersucht und festgestellt, ob sich überhaupt Antikörper gegen *T. gondii* im Blut befinden. Ist dieser Befund negativ, ist davon auszugehen, dass die Mutter noch keinen Kontakt mit dem Parasiten hatte und es werden Wiederholungsuntersuchungen alle 8 Wochen empfohlen, um eine mögliche Serokonversion frühzeitig zu erkennen. Im Falle eines positiven Befundes werden nun die Antikörper genauer spezifiziert. Falls nur IgG-Antikörper detektiert werden, kann von einer latenten und inaktiven Infektion ausgegangen werden. Damit gilt die Mutter als immun gegen *T. gondii* und muss sich nicht weiter untersuchen lassen. Falls zusätzlich IgM-Antikörper nachgewiesen werden, besteht der Verdacht, dass es sich um eine akute Infektion handelt. Daraufhin sollte die IgG-Avidität bestimmt werden. Ist diese hoch, ist von einer latenten oder abklingenden Infektion auszugehen; ist diese niedrig, ist eine akute Infektion und damit eine behandlungswürdige Toxoplasmose sehr wahrscheinlich (DESMONTS und COUVREUR 1974, LEBECH et al. 1996, GROSS et al. 2000, CHRISTOPH et al. 2004, MONTOYA und LIESENFELD 2004, THIÉBAUT et al. 2007, SAADATNIA und GOLKAR 2012, PAQUET et al. 2013, ÖGHMPH 2013, SCHLÜTER et al. 2014, RKI 2018).

Um diesen Verdacht zu bestätigen, kann ein direkter Erregernachweis aus Nabelschnurblut oder mittels Amniozentese gewonnenem Fruchtwasser in Betracht gezogen werden. Die Inokulation dieses Materials in Labornagern führt zu einer Serokonversion dieser Tiere, so dass eine aktive Toxoplasmose auf diesem Weg sicher nachgewiesen werden kann. Aufgrund der mangelnden Praktikabilität dieser Vorgehensweise für die Routinediagnostik sowie tierethischer Aspekte wird inzwischen die qPCR als die besser geeignete Alternative angewendet. Die qPCR hat Sensitivitäten von 65 – 80 % (LEBECH et al. 1996, BESSIÈRES et al. 2001, CHRISTOPH et al. 2004, ÖGHMPH 2013, RKI 2018)

Falls diese Verfahren zu nicht eindeutigen Ergebnissen geführt haben, gibt es Befunde, die am geborenen Kind eine kongenitale Infektion beweisen. Dazu zählen:

- der Nachweis von spezifisch gegen *T. gondii* gerichteten IgM- und IgA-Antikörper im Blut des Kindes (LEBECH et al. 1996, BESSIÈRES et al. 2001, CHRISTOPH et al. 2004),
- der direkte Erregernachweis im Blut oder andere Gewebe des Kindes bzw. der Nachgeburt (BESSIÈRES et al. 2001, RIKI 2018),

Literaturübersicht

- der Nachweis von Neo-Antikörpern im Blut des Kindes, wobei hierfür ein vergleichender IgG-Immunblot von Mutter und Kind durchgeführt werden muss (LEBECH et al. 1996, ROBERT-GANGNEUX et al. 1999, GROSS et al. 2000),
- persistierende oder steigende IgG-Gehalte gegen *T. gondii* im Blut des Kindes in den ersten 6 – 12 Monaten (LEBECH et al. 1996).

Sollten die IgG-Gehalte in den ersten 8 – 12 Monaten hingegen sinken, ist eine *T. gondii* Infektion auszuschließen und es müssen andere Erkrankungen, die eine ähnliche Symptomatik hervorrufen, z. B. Infektionen mit dem Zytomegalievirus, dem Herpes-simplex-Virus, dem Lymphozytäre-Choriomeningitis-Virus oder dem Varizella-Zoster-Virus berücksichtigt werden (CHRISTOPH et al. 2004).

2.2.3.2.2 Behandlung

Falls eine kongenitale Toxoplasmose während der Schwangerschaft diagnostiziert wird, ist unverzüglich mit einer medikamentösen Therapie zu beginnen, um die Symptomatik für das Kind zu minimieren (THALHAMMER und HELLER-SZÖLLÖSY 1979, FOULON et al. 2000, GRAS et al. 2005, THIÉBAUT et al. 2007, MONTOYA und REMINGTON 2008, CORTINA-BORJA et al. 2010, HOTOP et al. 2012, MCAULEY 2014). Insbesondere ist eine rechtzeitige Behandlung in den frühen Schwangerschaftsstadien durch einen deutlich besseren Verlauf gekennzeichnet (MCLEOD et al. 2006).

Zur Behandlung der kongenitalen Toxoplasmose wird zwischen der pränatalen und perinatalen Therapie unterschieden. Ziel der pränatalen Therapie ist es die Infektion des Fötus zu verhindern und – im Falle einer nachgewiesenen Infektion – die Behandlung bereits vor der Geburt zu beginnen. Während die postnatale Therapie darauf abzielt, die Infektion zu behandeln und die Folgeerscheinungen zu verhindern (SERRANTI et al. 2011). Dabei richtet sich die Therapie insbesondere auf die Läsionen-auslösenden Tachyzoiten, weniger auf die ruhenden Bradyzoiten (RKI 2018).

Initial startet die Therapie in der Regel mit Spiramycin, einem Makrolidantibiotikum, welches die Proteinbiosynthese des Parasiten hemmt. Ergänzt wird es durch die Folsäure-Synthese-Antagonisten Sulfadiazin und Pyrimethamin. Die Tachyzoiten haben durch ihre schnelle Teilungsaktivität einen enormen Bedarf an Folsäure. Durch die Medikamente steht dem Parasiten weniger Folsäure zur Verfügung und es kommt schließlich zur Parastitostase. Jedoch hat auch das Kind einen erhöhten Bedarf an Folsäure. Dieser muss durch Supplementierung von Folsäure, welche vom Kind, aber nicht vom Parasiten verstoffwechselt werden kann, geschaffen werden. Dabei darf keine weitere Folsäuresupplementierung von Seiten der werdenden Mutter erfolgen, um das Sulfadiazin und Pyrimethamin nicht zu hemmen (CHRISTOPH et al. 2004, MONTOYA und REMINGTON 2008, SERRANTI et al. 2011, ÖGHMPH 2013, PAQUET et al. 2013, SCHLÜTER et al. 2014, RKI 2018).

Nach der Geburt wird die Therapie bei begründetem Verdacht einer Übertragung auf das Kind (z. B. ein positiver Erregernachweis in der Amniozentese oder im Nabelschnurblut) für 0,5 – 2 Jahre fortgesetzt, um mögliche Schäden, wie z. B. eine okuläre Toxoplasmose (2.2.3.1) zu minimieren (MCLEOD et al. 2006, MONTOYA und REMINGTON 2008, SERRANTI et al. 2011, ÖGHMPH 2013, PAQUET et al. 2013, RKI 2018).

2.2.4 Mögliche Tierversuchsmodelle für die kongenitale Toxoplasmose

In einem umfassenden Übersichtsartikel haben VARGAS-VILLAVICENCIO et al. (2016) die meisten etablierten Versuchsmodelle für die kongenitale Toxoplasmose zusammengefasst. Im Folgenden wird auf die wichtigsten Tiermodelle eingegangen.

Die Hausmaus (*Mus musculus*) und die Farbratte (*Rattus norvegicus domestica*) sind die am häufigsten verwendeten Versuchssäugetiere (HICKMAN et al. 2017, BMEL 2021, EC 2021). Dies zeigt sich ebenfalls bei der Anzahl der etablierten Modelle für die kongenitale Toxoplasmose (VARGAS-VILLAVICENCIO et al. 2016). Dabei sind Maus und Ratte die ältesten und am besten untersuchten Tiermodelle für die Toxoplasmose (EICHENWALD 1948, BEVERLEY 1959, REMINGTON et al. 1961). Mäuse können je nach verwendetem *Toxoplasma*-Stamm sehr empfindlich auf eine Infektion mit *T. gondii* reagieren, wohingegen Ratten und der Mensch nur ausnahmsweise erkranken und damit relativ resistent sind (DUBEY und SHEN 1991, ROBERTS und ALEXANDER 1992, ZENNER et al. 1993, PAULINO und VITOR 1999, FREYRE et al. 2001, SU et al. 2002, FREYRE et al. 2008, MAKSIMOV et al. 2012, MÜLLER et al. 2017, MEHDI SHARIF et al. 2018, CHIEBAO et al. 2021). Die Trächtigkeitsdauer beträgt bei Mäusen und Ratten ca. 3 Wochen (DEWAR 1968, NAGASAWA 1982, HICKMAN et al. 2017). Sie bilden eine Plazenta hämotrichorialis aus und die Nachkommen werden als primäre Nesthocker geboren (KRESSIN et al. 2019).

Das Hausschwein (*Sus scrofa domesticus*) ist das am häufigsten verwendete Großsäugermodell in der Versuchstierhaltung. Trotz des vergleichsweise hohen Aufwandes die Tiere zu halten, lässt sich ein steigender Trend in der Anzahl der verwendeten Tiere beobachten (EC 2021). Schweine gelten als eine der wichtigsten Tierarten in der translationalen Forschung, v. a. weil sie dem Menschen ähnliche anatomische und physiologische Merkmale aufweisen, insbesondere in Bezug auf das Herz-Kreislauf-System und das Gehirn (SAULEAU et al. 2009, SWINDLE et al. 2012, SALAMEH et al. 2015). DUBEY und URBAN (1990) sowie JUNGENSEN et al. (2001) konnten im Schweinmodell die transplazentare Übertragung in mit Oozysten oder mit Tachyzoiten infizierten Sauen nachweisen. Dabei wurden in den Nachkommen der humanen kongenitalen Toxoplasmose vergleichbare Schäden beobachtet. Die Trächtigkeitsdauer von Schweinen liegt bei ca. 114 Tagen. Sie bilden, anders als der Mensch, eine Plazenta epitheliochorialis aus und ihre Nachkommen sind Nestflüchter (KRESSIN et al. 2019).

Das Hausschaf (*Ovis gmelini aries*) gewinnt aktuell immer mehr an tierexperimenteller Bedeutung, da es sich vor allem durch seine dem Menschen ähnliche Gehirnanatomie sehr gut für Schlaganfallmodelle eignet (BOLTZE et al. 2008, BOLTZE et al. 2011, TERPOLILLI et al. 2012, WELLS et al. 2012). MUNDAY und DUBEY (1986) und MÉVÉLEC et al. (2010) konnten Aborte durch eine kongenitale *Toxoplasma*-Infektionen in Schafen auslösen. MÉVÉLEC et al. (2010) schlugen das Schaf als Versuchstierspezies für die Impfstoffforschung gegen *T. gondii* vor. Schafe sind ca. 150 Tage trächtig, besitzen wie das Schwein eine Plazenta epitheliochorialis und bringen ihre Nachkommen als Nestflüchter zur Welt (KRESSIN et al. 2019).

Das Meerschweinchen (*Cavia porcellus*) wird bereits seit dem 17. Jahrhundert tierexperimentell eingesetzt und war neben anatomischen Studien auch stets für Infektionsmodelle in Gebrauch (SUCKOW et al. 2012). Entdeckt wurde *T. gondii* im Gundi, eine mit dem Meerschweinchen verwandte Nagerspezies (NICOLLE und MANCEAUX 1908). WRIGHT (1972) nutzte erstmals das Meerschweinchen als Versuchstier für eine kongenitale Toxoplasmose. Dabei konnte, wie auch in

späteren Studien, eine diaplazentare Übertragung erreicht werden und eine der pränatalen Infektion des Menschen vergleichbare Symptomatik ausgelöst werden (HAUMONT et al. 2000, FLORI et al. 2002, FLORI et al. 2003). HAUMONT et al. (2000) stellten fest, dass sich das Meerschweinchen für Studien in der Impfstoffentwicklung gegen *T. gondii* eignet. In den ca. 66 Tagen Tragezeit bilden Meerschweinchen wie der Mensch eine Plazenta hämomonochorialis aus und ihre Nachkommen sind Nestflüchter (MESS 2007, KRESSIN et al. 2019, CARTER 2020).

2.3 Neokortex

2.3.1 Anatomischer und histologischer Aufbau des Neokortex

Das Großhirn (Telencephalon) befindet sich in der rostralen knöchernen Schädelhöhle und ist von den Hirnhäuten (Meningen) umgeben. Bei Säugern stellt das Großhirn den größten Teil des Gehirns dar. Das Telencephalon ist dorsal durch die in die Fissura longitudinalis ragende Großhirnsichel (Falx cerebri) in 2 Hemisphären geteilt. Die Großhirnhemisphären umschließen jeweils einen mit Liquor cerebrospinalis gefüllten Lateralventrikel. Der Großhirnmantel (Pallium cerebri) umgibt das Großhirn und besteht aus der Großhirnrinde (Cortex cerebri), die v. a. Nervenzellkörper und Dendriten enthält und die graue Substanz bildet und dem darunter liegenden Marklager, welches primär die myelinisierten Axone beinhaltet und die weiße Substanz bildet (NICKEL et al. 2004, AURICH 2019, SALOMON et al. 2020).

Die Großhirnrinde lässt sich in den Neokortex (Isokortex), mit einem Anteil von ca. 90 % und den Allokortex unterteilen. Zum Allokortex gehören z. B. der Bulbus olfactorius und der Hippocampus (PURVES 2012, SALADIN 2012). Der Neokortex wird morphologisch anhand der angrenzenden Schädelknochen in Lobus parietalis, Lobus temporalis, Lobus frontalis und Lobus occipitalis unterteilt (AURICH 2019). Die Funktionen des Neokortex sind vielschichtig, dazu zählen beispielsweise die Erzeugung von motorischen Befehlen, räumliches Denken, Sinneswahrnehmung, Kognition und Sprache (LUI et al. 2011, LODATO und ARLOTTA 2015).

Der Neokortex besteht in etwa zu gleichen Anteilen aus Gliazellen und Neuronen (AZEVEDO et al. 2009). Bei den Neuronen lassen sich 2 Haupttypen unterscheiden: einerseits glutamaterge Projektionsneurone (~70 – 85 %), die aufgrund ihrer Morphologie auch Pyramidenzellen genannt werden und im dorsalen Telencephalon entstehen, und andererseits GABAerge Interneurone (~15 – 30 %) und aus dem ventralen Telencephalon stammen (HENDRY et al. 1987, LETINIC et al. 2002, MARÍN und RUBENSTEIN 2003, WONDERS und ANDERSON 2006, HAN und SESTAN 2013, HANSEN et al. 2013). Gliazellen sind spezialisierte Bindegewebszellen, die obligatorische Hilfsfunktionen im zentralen Nervensystem übernehmen. So haben sie eine Stütz- und Ernährungsfunktion, sind maßgeblich an der Bildung der Blut-Hirn-Schranke (Astrozyten) und Myelinscheide (Oligodendrozyten) beteiligt, übernehmen wichtige Abwehrfunktionen (Mikroglia) oder produzieren Liquor cerebrospinalis (Ependymzellen) (LIEBICH 2009, OHATA und ALVAREZ-BUYLLA 2016, VASILE et al. 2017, WELSCH et al. 2022).

Der Neokortex ist histologisch in 6 laminare Schichten gegliedert. Direkt an die Meningen angrenzend liegt die Molekularzellschicht. In dieser Schicht befinden sich v. a. viele Nervenzellfortsätze. Zudem sind hier viele Astrozyten an der Blut-Hirn-Schranke beteiligt. Dann folgt die äußere Körnerzellschicht, in der kleine Pyramidenzellen (10 – 20 µm) und Nicht-Pyramidenzellen zu finden sind. Dem schließt sich die äußere Pyramidenzellschicht mit zahlreichen mittelgroßen (20 – 40 µm) Pyramidenzellen an.

Literaturübersicht

In der folgenden inneren Körnerzellschicht befinden sich wiederum zahlreiche Nicht-Pyramidenzellen. An diese Schicht innen angrenzend ist die innere Pyramidenzellschicht. Hier liegen große (80 – 120 µm) Pyramidenzellen, deren Apikaldendrit durch alle äußeren Schichten zieht. Das Axon der großen Pyramidenzellen führt durch die innen angrenzende multifforme Schicht bis in die weiße Substanz (NOBACK et al. 2007, SEEGER et al. 2010, WELSCH et al. 2022).

2.3.2 Pränatale Entwicklung und Stammzellen des Neokortex

Die Gehirnentwicklung beginnt bereits mit der Differenzierung von neuralen Progenitorzellen während der Gastrulation. Im Bereich der Chorda dorsalis kommt es zu Ektodermwucherungen, die zunächst zur Bildung der Neuralplatte und durch Abfaltung zur Neuralfalte, Neuralfurche und schließlich zum Neuralrohr mit innenliegendem Neuralkanal führen. Am cranialen Ende des Neuralrohres (Neuroporus cranialis) entwickelt sich durch Expansion und Hohlrumbildung die Gehirnanlage. Diese weist zunächst 3 Bläschen auf, welche das Vorderhirn (Prosencephalon), Mittelhirn (Mesencephalon) und Rautenhirn (Rhombencephalon) darstellen. Anschließend teilen sich sowohl das Vorderhirn in Endhirn (Telencephalon) und Zwischenhirn (Diencephalon) als auch das Rautenhirn in Hinterhirn (Metencephalon) und Nachhirn (Myelencephalon) und formen so mit dem bestehen bleibenden Mittelhirn 5 Hirnbläschen (RÜSSE und SINOWATZ 2010, STILES und JERNIGAN 2010, KRESSIN et al. 2019). Aus dem Neuralkanal des cranialen Hirnbläschens, dem Telencephalon, bilden sich die Seitenventrikel. Im weiteren Verlauf wachsen die dorsalen Anteile der beiden Hirnbläschen des Telencephalons stark und überdecken als Hirnmantel (Pallium) das Stammhirn. Aus dem Pallium entwickeln sich u. a. der Neokortex, Hippocampus und Bulbus olfactorius. Der ventrale Anteil des Telencephalons wächst ebenfalls stark, verdrängt dabei das Lumen des Seitenventrikels und bildet unter anderem die Basalganglien (KRESSIN et al. 2019).

Die Projektionsneurone werden fast ausschließlich während der embryonalen und fötalen Entwicklung gebildet und stammen von neuralen Stamm- und Progenitorzellen ab. Diese Zellen exprimieren das Intermediärfilament Nestin und lassen sich in apikale (in Richtung Lateralventrikel) und basale (in Richtung Pia mater) Vorläuferzellen grob unterteilen (LEND AHL et al. 1990, FIETZ und HUTTNER 2011, FLORIO und HUTTNER 2014, MOLNÁR et al. 2014, DEHAY et al. 2015, CÁRDENAS und BORRELL 2020, KALEBIC und HUTTNER 2020, KALUSA et al. 2021). Die Zellkörper der apikalen Progenitorzellen befinden sich in der ventrikulären Zone (VZ), der Keimzone, die den lateralen Ventrikel auskleidet. Sie sind die primären neuralen Progenitorzellen. Ihre Zellkörper besitzen eine apikale Zellpolarität und einen radial orientierten Basalfortsatz. Sie exprimieren charakteristischerweise das Markerprotein paired box gene 6 (Pax6). Primär entstehen die apikalen Progenitorzellen aus neuroepithelialen Zellen. Durch symmetrische Teilung differenzieren sich diese in apikale radiale Gliazellen und intermediäre Vorläuferzellen (KRIEGSTEIN und GÖTZ 2003, GAL et al. 2006, KRIEGSTEIN und ALVAREZ-BUYLLA 2009, STANCIK et al. 2010, FIETZ und HUTTNER 2011, FLORIO und HUTTNER 2014, PINSON et al. 2019, CÁRDENAS und BORRELL 2020).

Mit Einsetzen der Neurogenese beginnen sich die apikalen radialen Gliazellen asymmetrisch zu teilen. In der Folge wandern deren Zellkörper basal in die an die VZ angrenzende Subventrikulärzone (SVZ) aus und bilden die basalen Progenitorzellen. Diese lassen sich in die fortsatzlosen basalen intermediären Vorläuferzellen und fortsatzhaltende basale radiale Gliazellen unterteilen (KRIEGSTEIN und GÖTZ 2003, ATTARDO et al. 2008, KRIEGSTEIN und ALVAREZ-BUYLLA 2009, FIETZ et al. 2010, FIETZ und HUTTNER 2011, FLORIO und HUTTNER 2014, CÁRDENAS und BORRELL 2020, KALEBIC und HUTTNER 2020). Die basalen radialen Gliazellen exprimieren primär Pax6 und

Literaturübersicht

astrogliale Marker (FLORIO und HUTTNER 2014). Die basalen intermediären Vorläuferzellen (BIV) unterteilen sich wiederum in die proliferativen BIV, die v. a. die Transkriptionsfaktoren Pax6 und T-box brain protein 2 (Tbr2) exprimieren, und den neurogenen BIV, die nur Tbr2 und nicht Pax6 exprimieren (MIYATA et al. 2004, NOCTOR et al. 2004, FIETZ und HUTTNER 2011, SAUERLAND et al. 2018, KALUSA et al. 2021). Durch die Teilung der neurogenen BIV entstehen schließlich die Neurone, die basal in die entstehende Kortikalplatte migrieren. Diese Zellen zeichnen sich dadurch aus, dass sie mit Hilfe der Markerproteine HuC und HuD (Hu C/D) anfärbbar sind. Zunächst bilden sich hierbei die Cjal-Retzius-Zellen. Diese liegen während der gesamten Neurogenese in der Molekularzellschicht des entstehenden Neokortex. Dabei sezernieren die Cjal-Retzius-Zellen Reelin, welches für die folgende Migration der weiteren Neurone von entscheidender Bedeutung ist. Mit Abschluss der Neurogenese bilden sich die Cjal-Retzius-Zellen zurück (GUPTA et al. 2003, FRANCO et al. 2011, SEKINE et al. 2011, GIL-SANZ et al. 2013). Bei der dadurch entstehenden Schichtung werden die oberflächlichen Schichten von den später entstandenen Neuronen gebildet. Diese müssen hierfür radial an den früher entstandenen apikalen Zellschichten vorbeigleiten („Inside-Out-Methode“). Durch diesen Prozess nimmt der Neokortex erheblich an Dicke zu und erlangt sein für Säuger typisches Erscheinungsbild (ANGEVINE und SIDMAN 1961, RAKIC 1988, NOCTOR et al. 2001, FIETZ und HUTTNER 2011).

3 Überblick über die eigene wissenschaftliche Arbeit

- 3.1 Publikation 1: **Thomas Grochow**, Britta Beck, Zaida Rentería-Solís, Gereon Schares, Pavlo Maksimov, Christina Strube, Johannes Seeger, Lisa Raqué, Reiner Ulrich, Arwid Dauschies, Simone A. Fietz. Establishment and validation of a guinea pig model for human congenital toxoplasmosis. *Parasites Vectors*. 2021; 14:389.

- 3.2 Manuskript 2: Josephine Dietzel, **Thomas Grochow**, Irene Böttcher. Evaluation of neurologic testing in guinea pigs. Eingereicht im *Journal of Exotic Pet Medicine*, 03.2023.

- 3.3 Manuskript 3: **Thomas Grochow**, Britta Beck, Zaida Rentería-Solís, Gereon Schares, Pavlo Maksimov, Christina Strube, Lisa Raqué, Arwid Dauschies, Simone A. Fietz. Reduced neural progenitor cell count and cortical neurogenesis in guinea pigs congenitally infected with *T. gondii*. Eingereicht in *Communications Biology*, 04. 2023, im Druck.

Publikationen

3.1 Publikation 1: Establishment and validation of a guinea pig model for human congenital toxoplasmosis

Thomas Grochow, Britta Beck, Zaida Rentería-Solís, Gereon Schares, Pavlo Maksimov, Christina Strube, Johannes Seeger, Lisa Raqué, Reiner Ulrich, Arwid Dauschies, Simone A. Fietz

Publiziert in *Parasites & Vectors* 2021; 14:389.

DOI: 10.1186/s13071-021-04890-4

18 Seiten, 11 Abbildungen, 3 Tabellen, 53 Literaturangaben, Anhang: electronic supplementary information

Tierversuch: TVV 45/17, Landesdirektion Sachsen, Dienststelle Leipzig, 19.04.2018

Eigenanteil der Arbeit:

- Studiendesign: Die Studienidee und der Tierversuchsantrag stammen von Thomas Grochow, Simone A. Fietz und Arwid Dauschies.
- Durchführung: Thomas Grochow ist eigenverantwortlich für die Durchführung des Tierversuchs und der damit einhergehenden Laborarbeiten, ausgenommen der Durchführung des Immunoblots (Gereon Schares), der histologischen Färbungen (Reiner Ulrich) der Katzenpassage der Toxoplasmen (Christina Strube) und der ultrasonographischen Untersuchung der Meerschweinchen (Lisa Raqué).
- Analyse und Interpretation: Thomas Grochow ist eigenverantwortlich für die Auswertung der Ergebnisse, ausgenommen der Resultate bezüglich *T. gondii*-spezifischer Antikörper (Gereon Schares).
- Schreiben der Publikation: Thomas Grochow ist eigenverantwortlich für das Schreiben der Publikation, ausgenommen der Material- und Methodikbeschreibung bezüglich des Nachweises *T. gondii*-spezifischer Antikörper mittels Immunoblot (Gereon Schares) und einer kritischen Begutachtung zum fachlichen Inhalt (Gereon Schares, Christina Strube, Johannes Seeger, Reiner Ulrich, Arwid Dauschies, Simone A. Fietz).

Publikationen

3.2 Manuskript 2: Evaluation of neurologic testing in guinea pigs

Josephine Dietzel, **Thomas Grochow**, Irene Böttcher

Eingereicht in Journal of Exotic Pet Medicine, 02.2023

Das Manuskript wurde von den anderen Autoren zur Vorveröffentlichung freigegeben.

15 Seiten, 1 Abbildung, 4 Tabellen, 15 Literaturangaben

Tierversuch: TVV 45/17, Landesdirektion Sachsen, Dienststelle Leipzig, 19.04.2018

Eigenanteil der Arbeit:

- Studiendesign: Die Studienidee stammt von Josephine Dietzel. Der Tierversuchsantrag stammt von Thomas Grochow, Simone A. Fietz und Arwid Dausgies.
- Durchführung: Thomas Grochow ist eigenverantwortlich für das Handling der Tiere während des Versuchs. Die neurologischen Untersuchungen wurden von Josephine Dietzel und Irene Böttcher durchgeführt
- Analyse und Interpretation: Josephine Dietzel ist eigenverantwortlich für die Auswertung der Ergebnisse.
- Schreiben der Publikation: Thomas Grochow ist eigenverantwortlich für das Schreiben des Unterpunktes „2.1 Animals“ des Manuskripts und einer kritischen Begutachtung zum fachlichen Inhalt (zusammen mit Josephine Dietzel und Irene Böttcher).

Publikationen

Evaluation of neurologic testing in guinea pigs

Josephine Dietzel^{1*}, Thomas Grochow^{2,3}, Irene C. Böttcher¹

¹ Department of Small Animal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig, Leipzig, Germany

² Institute of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig, Leipzig, Germany

³ Institute of Veterinary Anatomy, Histology and Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig, Leipzig, Germany

*Corresponding author

Abstract

Background

Up-to-date, specialized literature provides very little information on performing and interpreting clinical neurological tests on small mammals, particularly guinea pigs.

Methods

Two clinical neurologists performed separate neurological examinations of 25 guinea pigs. The structure of the examination was similar to those performed in other companion animals and included postural reaction tests, cranial nerve tests, and spinal reflex tests. Each test was evaluated for feasibility, reproducibility, and associated stress level for the animals.

Results

The following tests revealed an excellent ability to elicit the expected response: hopping reaction in the thoracic limbs, wheelbarrowing and hemiwalking, medial and lateral palpebral reflex, auricular sensitivity, maxillary sensitivity, horizontal oculocephalic reflex, tone of the jaw, voluntary movement of the tongue, and direct pupillary light reflex. On the other hand, a poor ability to elicit the expected response was observed in the following tests: visual paw replacement of the thoracic limbs, tactile paw replacement in both thoracic and pelvic limbs, paper test for thoracic and pelvic limbs, mandibular sensitivity, vertical oculocephalic reflex, menace response, patellar reflex, cutaneous trunci reflex, and perineal reflex. The most reliable spinal reflex test with a good ability to elicit the expected response was the withdrawal reflex for both thoracic and pelvic limbs. The guinea pigs experienced the most stress during the spinal reflex tests.

Conclusion

It is possible to apply several clinical neurological tests on guinea pigs and produce meaningful results. However, certain tests elicited high stress responses in the animals and should therefore only be used if necessary. Based on the results, we propose a possible protocol for neurological examination in guinea pigs.

Clinical relevance

This is the first study to evaluate a full range of clinical neurological tests performed on guinea pigs. The results of this study could lead to a better understanding of lesion localization and serve as a basis for further diagnostic and therapies in guinea pigs with neurological diseases.

Keywords: guinea pig, clinical neurological examination, rodent, neurology, central nervous system

Introduction

Small mammals, including guinea pigs, have gained more and more popularity as companion animals over the past decades (KRAFT 2005). While most owners demand proper medical care for these kinds of pets, research and clinical advances still lag behind those of other pets, such as dogs and cats. The same problem arises for clinical neurologists confronted with a potentially neurologically impaired guinea pig. The last few years have seen detailed studies on the clinical neurological examination of rabbits and chinchillas, while other species like rodents (including guinea pigs) and ferrets are only briefly mentioned in one study (VERNAU et al. 2007, MANCINELLI 2015, SNOW et al. 2017, WARNEFORS et al. 2019). The clinical neurological examination itself is an integral part of the correct diagnostic workup of neurological cases in dogs and cats. Neurological or systemic diseases that affect the central or peripheral nervous system have also been described in guinea pigs (LANGENECKER et al. 2009, MEREDITH and RICHARDSON 2015). Unfortunately, only limited data on how to perform the neurological examination of guinea pigs are available, which might lead to misjudgment of symptoms and therefore result in the selection of inappropriate diagnostic tests (MANCINELLI 2015). In addition to the clinical relevance of the correct assessment of a neurological case, guinea pigs are also frequently used as animal models in various research areas of human medicine (PADILLA-CARLIN et al. 2008, BARBERO and FRASCH 2009). A better understanding of feasible clinical neurological tests in guinea pigs could be vital for future research.

This study aimed to evaluate a wide range of clinical neurological tests in guinea pigs regarding the feasibility and cooperation of the animals, reproducibility between different examiners, and associated stress levels for the animals.

Animals, Material and Methods

Animals

Twenty-five guinea pigs were examined. Female Dunkin Hartley guinea pigs (n=16) were obtained from Charles River Laboratories (Écully, France). Additionally, five female (n=5) and four male (n=4) animals of the short-haired breed originated from the Institute of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Leipzig University, Leipzig, Germany. All animals were housed in the animal-care facility of the Institute of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Leipzig University, Leipzig, Germany. The guinea pigs were kept in groups of two in 50 x 70 x 50 cm wire mesh cages. Water supplemented with 400 mg/l ascorbic acid, standard diet pellets (Altromin Spezialfutter, Lage, Germany), and fresh vegetables were provided ad libitum. Room temperature was kept at 19–25°C and relative humidity was kept at an average of 55% ($\pm 10\%$). The light/dark cycle was set to 12 h:12 h. Each cage offered a shelter (cardboard boxes or plastic houses) for hiding. The health status of all guinea pigs, including weight, was checked at least once a week by a veterinarian (TG). The animals belonged to a research cohort regarding a study on establishing an animal model for research on congenital toxoplasmosis (GROCHOW et al. 2021). All neurological examinations were performed before the animals came into

contact with oocytes of *Toxoplasma gondii*. The competent authority (Landesdirektion Sachsen, Germany) approved both studies.

Clinical neurological examination

The neurological examination was performed in the animal-care facility of the Institute of Parasitology, Leipzig University, Leipzig, Germany, which ensured familiar surroundings for the guinea pigs. Each animal was examined separately by two observers, the first being a board-certified neurologist with several years of clinical experience (IB) and the second a neurologist in training with three years of clinical experience and additional clinical experience in small mammal medicine (JD). The two examinations on the same animal were performed at least seven days apart. Clinical neurological examinations were carried out in accordance with those performed on dogs and cats. They included a variety of proprioceptive testing, cranial nerve tests, and spinal reflex tests (GAROSI and LOWRIE 2013). In cases when an animal showed signs of severe stress, the examination was paused for a short break of several minutes until the animal was calm again. If there was no improvement in the stress symptomatology, the examination was aborted.

The examination started with the hands-off evaluation of mentation, behavior, posture, face symmetry, and gait. After that, a hands-on examination began with postural reaction tests, including paw replacement and hopping reaction of thoracic and pelvic limbs, wheelbarrowing, extensor postural thrust, hemiwalking, tactile placing of thoracic and pelvic limbs, and visual placing of the thoracic limbs. These tests were executed in a similar way to those for dogs and cats. Additionally, the animals were evaluated for righting reflex after being placed on one side. Paw replacement was evaluated by positioning one paw on a sheet of paper that was pulled away laterally (later referred to as the “paper test”). A tactile test on which the animals were allowed to see the edge of the table was performed. This was done similarly to the visual placing test of the thoracic limbs, but if the animal did not reach for the table, the table was contacted with the dorsal paw side without covering the animal’s eyes. Cranial nerve tests included medial and lateral palpebral reflex; sensitivity of the ear, mandibula, and maxilla; corneal reflex; menace response; sensitivity of the nasal septum; and direct and consensual pupillary light reflex for each eye. Furthermore, oculocephalic reactions were observed by horizontal and vertical movement of the head as well as evaluation of positional reactions (strabismus when the head was lifted or occurrence of nystagmus in dorsal recumbency). Tonus of the jaw, tongue movement, and gag reflex were examined as well. Spinal reflex tests included the withdrawal reflex in thoracic and pelvic limbs, patellar reflex, perineal reflex, and cutaneous trunci reflex. Except for the patellar tendon reflex, all reflexes were tested with the animal in an upright position. Additionally, skin sensitivity was examined by gently touching the ventral aspects of the thorax and abdomen with forceps. The actual execution of the tests and the handling of the animals are shown in Fig. 1.



Fig. 1 Handling of guinea pigs for each part of the neurological examination. a paw replacement reaction. **b** hopping reaction. **c** tactile paw replacement. **d** wheelbarrowing. **e** extensor postural thrust. **f** straightening up. **g** paper test. **h** cranial nerves are tested with the animal sitting upright on the table. **i** spinal reflexes are tested with the animal standing in front of the examiner with exception of the patellar tendon reflex. **j** the patellar tendon reflex is tested with the animal being lifted by the examiner

All tests excluding the hands-off examination were evaluated in terms of ability to elicit the expected responses of the animals. If a guinea pig did not show the expected response at all during a test, this was considered unwillingness and not a disease. The feasibility of a test was assessed as “excellent” if 100% of the animals showed the expected response and as “good” if more than 90% of the animals showed the expected response. “Moderate” feasibility was defined as the ability to elicit the expected response in between 60% and 90% of the animals. Tests with a response rate below 60% were assessed as “poor.”

In addition to being evaluated regarding feasibility and type of response, the animals were also observed for signs of stress, namely vocalization, defensive movements, or biting. If an animal showed any of these signs during a test, a positive stress response was noted. This was also the case if only one of the observers noted positive signs of stress.

For the examination, a reflex hammer, a fine clamp, a small flashlight, cotton swabs, and an examination table with a non-slip surface were used.

Results

The examination results, the relative agreement between the two operators and the calculated kappa value for each test can be found in the tables referring to each section of the clinical neurological examination (Tables 1, 2, 3, 4).

Table 1 Summary of results of the hands-off examination in 25 adult guinea pigs. Left and right body side are not differentiated in the table. When one body side was rated differently to the other body side in the same animal, the lower rate was counted. Results were summarized for both examiners (n = 50). In the case of gait analysis, some guinea pigs refused to walk (n < 50). Percentage of positive responses is given in brackets. Agreement between the two raters is given. The relative observed agreement among raters was calculated by the number of tests, on which the raters agreed, divided by the number of animals. Kappa could not be calculated for each test (inc. = incalculable).

	Normal response	Relative observed agreement between the two operators	Kappa K	Observed signs of stress in % of animals
Mentation	50/50 (100%)	100%	inc.	0%
Behavior	50/50 (100%)	100%	inc.	0%
Body stance	50/50 (100%)	100%	inc.	0%
Face symmetry	50/50 (100%)	100%	inc.	0%
Gait	42/42 (100%)	76%	0,15	0%

Table 2 Summary of results of the postural reaction tests in 25 adult guinea pigs. Left and right body side are not differentiated in the table. When one body side was rated differently to the other body side in the same animal, the lower rate was counted. Results were summarized for both examiners (n = 50). In some cases, the examination could not be performed due to stress for the guinea pig (n < 50). Percentage of positive responses is given in brackets. Agreement between the two raters is given. The relative observed agreement among raters was calculated by the number of tests, on which the raters agreed, divided by the number of animals. Kappa could not be calculated for each test (inc. = incalculable).

Publikationen

Test	Positive response	Relative observed agreement between the two operators	Kappa K	Observed signs of stress in % of animals
Paw replacement thoracic limbs	47/49 (96%)	88%	-0,06	24%
Paw replacement pelvic limbs	36/49 (73%)	60%	0,02	36%
Hopping reaction thoracic limbs	50/50 (100%)	100%	inc.	24%
Hopping reaction pelvic limbs	41/50 (82%)	72%	0,07	20%
Wheel-barrowing	50/50 (100%)	100%	inc.	16%
Extensor postural thrust	39/50 (78%)	64%	0,06	40%
Visual paw replacement (only thoracic limbs)	11/50 (22%)	64%	-0,05	20%
Tactile paw replacement thoracic limbs	0/50 (0%)	100%	inc.	20%
Tactile paw replacement pelvic limbs	1/50 (2%)	96%	0,00	20%
Hemiwalking	49/49 (100%)	96%	0,00	36%
Paper test thoracic limbs	16/49 (33%)	76%	0,45	8%
Paper test pelvic limbs	6/49 (12%)	76%	-0,12	8%
Righting reflex	48/50 (96%)	92%	0,00	48%

Publikationen

Test	Positive response	Relative observed agreement between the two operators	Kappa K	Observed signs of stress in % of animals
Tactile and visual paw replacement	38/48 (79%)	76%	0,34	12%

Table 3 Summary of results of the cranial nerve tests in 25 adult guinea pigs. Left and right body side are not differentiated in the table. When one body side was rated differently to the other body side in the same animal, the lower rate was counted. Results were summarized for both examiners (n = 50). In some cases, the examination could not be performed due to stress for the guinea pig (n < 50). Percentage of positive responses is given in brackets. Agreement between the two raters is given. The relative observed agreement among raters was calculated by the number of tests, on which the raters agreed, divided by the number of animals. Kappa could not be calculated for each test (inc. = incalculable).

Test	Positive response	Agreement between the two operators	Kappa K	Observed signs of stress in % of animals
Palpebral reflex medial	50/50 (100%)	100%	inc.	8%
Palpebral reflex lateral	50/50 (100%)	100%	inc.	8%
Auricular sensitivity	50/50 (100%)	100%	inc.	0%
Maxillary sensitivity	50/50 (100%)	100%	inc.	0%
Mandibular sensitivity	2/50 (4%)	92%	0,00	0%
Corneal reflex	48/49 (98%)	92%	0,00	8%
Oculocephalic reflex (horizontally)	49/49 (100%)	96%	0,00	13%
Oculocephalic reflex (vertically)	0/49 (0%)	100%	inc.	52%

Publikationen

Test	Positive response	Agreement between the two operators	Kappa K	Observed signs of stress in % of animals
Tone of the jaw (total)	48/48 (100%)	92%	-0,04	12%
Gag reflex	not performed in all animals due to strenuous defense	not performed in all animals due to strenuous defense	inc.	-
Motoric of the tongue	49/49 (100%)	96%	0,00	0%
Menace response	1/50 (2%)	96%	0,00	0%
Sensitivity of nasal septum	49/50 (98%)	96%	0,00	0%
Pupillary light response (direct)	50/50 (100%)	100%	inc.	0%
Pupillary light response (indirect)	30/50 (60%)	52%	0,19	0%
Pathological nystagmus	0/50 (0%)	100%	inc.	4%
Positional nystagmus	0/50 (0%)	100%	inc.	32%
Permanent strabismus	0/50 (0%)	100%	inc.	4%
Positional strabismus	2/50 (4%)	92%	0,32	24%

Table 4 Summary of results of spinal reflex tests in 25 adult guinea pigs. Left and right body side are not differentiated in the table. When one body side was rated differently to the other body side in the same animal, the lower rate was counted. Results were summarized for both examiners (n = 50). In some cases, the examination could not be performed due to stress for the guinea pig (n < 50). Percentage of positive responses is given in brackets. Agreement between the two raters is given. The relative observed

Publikationen

agreement among raters was calculated by the number of tests, on which the raters agreed, divided by the number of animals. Kappa could not be calculated for each test (inc. = in calculable).

Test	Positive response	Agreement between the two operators	Kap pa K	Observed signs of stress in % of animals
Withdrawal reflex thoracic limbs	48/49 (98%)	92%	0,00	84%
Withdrawal reflex pelvic limbs	48/49 (98%)	92%	0,00	84%
Patellar reflex	0/50 (0%)	100%	inc.	60%
Cutaneous trunci reflex	4/49 (8%)	84%	0,00	100%
Perineal reflex	1/49 (2%)	96%	0,00	100%
Sensitivity of skin	33/50 (66%)	56%	0,19	52%

Mentation, behavior, posture, face symmetry, and gait

A complete overview of all tests and responses is provided in Table 1. Data on mentation, behavior, posture, and face symmetry was collected for all animals (ability to elicit the expected response: 100%). None of the guinea pigs showed any abnormalities regarding these examinations. Twenty-three (JD) and 19 (IB) animals, respectively, could be observed roaming free outside the cage. The remaining animals could not be motivated to walk during the examination. A few animals occasionally showed a bunny-hopping gait. None of these examination points elicited stress in the observed guinea pigs.

Postural reactions

A complete overview of all tests and responses is provided in Table 2. An excellent ability to elicit the expected response was documented by both examiners for hopping reaction in the thoracic limbs (with only one guinea pig lacking response in the right thoracic limb, presumably due to long nails), wheelbarrowing, and hemiwalking. Paw replacement in thoracic limbs and righting reflex had a good ability to elicit the expected response (96%). A moderate ability to elicit the expected response was observed in paw replacement in pelvic limbs, hopping reaction in pelvic limbs, extensor postural thrust and in the tactile test where the animals could both feel and see the table surface. A poor ability to elicit the expected response was observed by both examiners in the following tests: visual paw replacement of the thoracic limbs, tactile paw replacement in both thoracic and pelvic limbs, and paper test for both thoracic and pelvic limbs.

Publikationen

None of these tests could be carried out without any stress response. Regarding the excellent tests, wheelbarrowing (16%) and hopping reaction in thoracic limbs (24%) were associated with a minor stress level, while hemiwalking (36%) was more stressful in comparison. Overall, the most stressful tests were the righting reflex (48%) and extensor postural thrust (40%). The least stressful test was the paper test in thoracic limbs (8%) and pelvic limbs (8%).

Cranial nerve tests

A complete overview of all tests and responses is provided in Table 3. The gag reflex was unfeasible in all animals due to anatomic features and defensive behavior when reaching for the throat. Excellent ability to elicit the expected responses could be observed for medial and lateral palpebral reflex, auricular sensitivity, maxillary sensitivity, horizontal oculocephalic reflex, tone of the jaw, voluntary movement of the tongue and direct pupillary light response. Sensitivity of nasal septum (with one animal giving an asymmetric response during one examination) and corneal reflex were rated as good with an ability to elicit the expected response in 98 % of cases. Indirect pupillary light reflex was rated as moderate. A poor ability to elicit the expected response was observed in the following tests: mandibular sensitivity, vertical oculocephalic reflex, and menace response. None of the animals showed pathological or positional nystagmus or permanent strabismus. Unilateral positional strabismus was elicited in two animals. Most of the cranial nerve tests elicited responses that would be classified as reduced in dogs and cats.

No signs of stress were observed for auricular, maxillary and mandibular sensitivity, sensitivity of the nasal septum, and direct and indirect pupillary light reflex, menace response and evaluation of voluntary movement of the tongue. A minor percentage of animals showed signs of stress while being tested for medial (8%) and lateral (8%) palpebral reflex, corneal reflex (8%), horizontal oculocephalic reflex (13%), and tone of the jaw (12%). The highest stress rate was found when testing the vertical oculocephalic reflex (52%); testing for positional nystagmus and strabismus caused stress in 24–32% of the animals.

Spinal reflexes

A complete overview of all tests and responses can be found in Table 4. None of the performed tests elicited an excellent response. The withdrawal reflex in both, thoracic and pelvic limbs, were rated as good (98%) with an agreement between the two operators of 92%. A moderate ability to elicit the expected response was observed for testing the sensitivity of the skin and a poor ability to elicit the expected response in the following tests: patellar reflex, cutaneous trunci reflex and perineal reflex.

Spinal reflex tests were the most stressful part of the examination for the guinea pigs, with a stress response ranging from 52-100% depending on the performed test. The only test showing a good ability to elicit the expected response, the withdrawal reflex, led to stress in 84% of the animals.

Discussion

All 25 guinea pigs could be fully examined, and only one animal required a short break due to signs of severe stress. The hands-off examination was easy to perform and did not cause any stress to the animals. All animals showed the same test responses in hands-off examinations as would be expected in dogs and cats. Therefore, any signs of reduced mentation or asymmetry in body posture should be considered abnormal. Head tilt, in particular, is commonly seen in guinea pigs with otitis media (et interna) and

Publikationen

may be part of complete (head tilt, vestibular ataxia, and pathological or positional nystagmus) or incomplete vestibular syndrome (MEREDITH and RICHARDSON 2015). In dogs, distinguishing between peripheral and central vestibular disease is often possible only by examination and guides the selection of appropriate diagnostic tests (BONGARTZ et al. 2020). This might also be an application for neurological examination in guinea pigs. Gait analysis revealed occasional bunny hopping in some animals, which has been discussed as a possible sign of degenerative or metabolic disease of the skeletal system (WITKOWSKA et al. 2016). Animals were not followed up long-term in this study, so a degenerative, slowly progressive disease cannot be completely ruled out. A metabolic disease seems unlikely as the animals repeatedly showed normal behavior during routine clinical and laboratory examinations. Observation of ataxia or signs of paresis in one, two, or all limbs is vital for lesion localization, especially in spinal cord disease.

Postural reaction tests are good options for detecting minor deficits or differences between thoracic and pelvic limbs or left and right sides in dogs and cats. In this study, some tests, like the hopping reaction in thoracic limbs, wheelbarrowing, hemiwalking, and righting reflex from a lying position, were quite feasible as most guinea pigs cooperated well. In contrast, the corresponding tests for the pelvic limbs (hopping and extensor postural thrust) showed a less reliable ability to elicit the expected response. A similar observation has been described for neurological examinations of rabbits and chinchillas (SNOW et al. 2017, WARNEFORS et al. 2019). The reason behind this tendency in small mammals remains unknown and should always be considered when examining a guinea pig. Overinterpretation of decreased or absent response for hopping reaction in pelvic limbs or extensor postural thrust alone should not lead to localization of a lesion in the caudal spinal cord segments. Unfortunately, no postural test assessing the pelvic limbs alone showed a good or excellent outcome. Therefore, we recommend evaluation of the pelvic limbs during hemiwalking and righting reflex. Especially, the righting reflex is a complex reaction that enables an individual to regain a physiological body posture after changing the position of its body. Since it involves the vestibular and proprioceptive system and requires unaltered coordination of all four limbs, it can be used to assess proprioception in thoracic and pelvic limbs.

As previously described in other small mammals, the guinea pigs lacked a menace response (SNOW et al. 2017, WARNEFORS et al. 2019). Only one animal showed a minor response in one examination. Possible reasons for this could be too vigorous movement of the examiner creating air movement that caused a tactile response. Therefore, vision cannot be successfully tested via menace response but should be evaluated via history given by the owner or an obstacle course. Lateral and medial palpebral reflexes were very consistently performed in all animals, but a great percentage of guinea pigs showed a minor response in comparison to dogs and cats (especially for the lateral aspect of the test). The same applies to the other tests with an excellent ability to elicit the expected response (auricular and maxillary sensitivity, horizontal oculocephalic reflex, tonus of the jaw, voluntary movement of the tongue and direct pupillary light response). The only test that was not feasible was the gag reflex, which has been reported unworkable in chinchillas as well (SNOW et al. 2017). To our surprise, all guinea pigs showed a horizontal oculocephalic reflex when the head was moved from side to side but no positive response when a vertical movement was performed. The direct pupillary light response was elicited in all animals, but the observers rated the extent of pupil constriction very differently. Indirect pupillary light reflex was observed significantly less frequently. Positional cranial nerve tests as evaluation for positional strabismus and nystagmus led to severe signs of stress in one-quarter to one-third of the animals. Accordingly, we propose that these tests should be performed only when they are deemed necessary.

Publikationen

This would be the case when examining for subtle vestibular signs is necessary and unavoidable to differentiate between central or peripheral vestibular disease.

Withdrawal reflexes showed a good response regarding feasibility. The composition of the brachial and lumbar plexus of guinea pigs has been described in one study and is nearly identical to the anatomy in dogs and cats, with the brachial plexus originating from segments C6-Th1 and the lumbar plexus originating from the segments L4-S3 (POTTER and W. L. BRUECK 1958). This knowledge about the neuroanatomy of the guinea pig makes it possible to extrapolate the localization to functional spinal cord segments, as is done in dogs and cats. Spinal reflex testing was the most difficult part of neurological examination in guinea pigs in terms of feasibility and stress level. When this examination was performed for the second time, especially, signs of severe stress were observed even before the animal was touched. Each animal's two examinations were performed at least seven days apart. Nevertheless, most guinea pigs seemed to remember that the upcoming portion would be discomforting. Unfortunately, the very consistently performed withdrawal reflex tests were associated with a high percentage of stress. Patellar reflex, cutaneous trunci reflex, and perineal reflex could be elicited reliably in none or only a small percentage of animals and were therefore considered unreliable. A previous study reported that the cutaneous trunci reflex can be elicited in guinea pigs by tactile and electrical stimulation (BLIGHT et al. 1990). Our results did not support these findings. Even if the cutaneous trunci reflex was associated with a reliable response, we would strongly advise against a routine performance of this test because of the high stress response in all animals tested. Interestingly, the perineal reflex also caused severe stress in all tested animals and is therefore not recommended.

All tests were evaluated to determine whether the animals showed a normal or reduced response compared to dogs and cats. Most of the time, to a greater or lesser extent, the reactions were diminished in guinea pigs. In addition to the high percentage of animals performing no hopping responses in pelvic limbs and extensor postural thrust, the remaining animals showed only a reduced response in these two tests. However, the paper test, tactile and visual placing, palpebral reflex, and sensitivity of the nasal septum and the skin also elicited only minor reactions. This could mean that the standard assumption of what is normal in dogs and cats may not be extrapolated to guinea pigs. A possible explanation for this is that, unlike dogs and cats, guinea pigs are prey animals and therefore tend to behave differently in stressful situations. A study examining the antipredator behavior of guinea pigs documented that, regarding vigilance and body tension, there is no significant difference between the reaction toward a dog or an unknown human (BALKOVA et al. 2016). Since the stress factor of an examining person cannot be eliminated, supposedly reduced reactions should not be overrated. This applies, in particular, to animals that appear vigilant or frightened during the examination. In addition, the animals in our study and in the study by BALKOVA et al. (2016) were all raised and living in a laboratory facility and not handled by a human on a daily basis (e.g., picking up the guinea pig, being petted) as would be likely in a pet. We therefore cannot rule out that guinea pigs used to human handling show stronger responses in the neurological tests due to less pronounced antipredator behavior. On the other hand, test responses in guinea pigs might be physiologically less pronounced than in dogs and cats.

It is known that kappa can lead to paradoxical results, e.g. low kappa even in the presence of strong observer agreement. We think this is the case in our study. When there is a high prevalence for each operator to categorize the factor as present, this results in an imbalance of the 2x2 table that is used to calculate kappa. This has the effect of lowering kappa and producing a paradoxical effect. In the case of total agreement and zero disagreement, kappa might be incalculable as it is not possible to divide by

Publikationen

zero. As all healthy animals should show the expected response to a neurological test, this imbalance is unavoidable. We suggest therefore, only to use the relative observed agreement between the two operators and not to use kappa for interpretation. Interestingly, the two examiners sometimes diverged in their interpretation of whether the animals' reactions were diminished. This included testing of skin sensitivity, cutaneous trunci reflex, extensor postural thrust, and direct and indirect pupillary light reflex. Examiner 1 (JD), who is routinely involved in small mammal cases of all kinds, tended to be less strict than examiner 2 (IB), who has several years of experience in clinical neurology for dogs and cats and is a board-certified neurologist. These differences between the examiners regarding neurological experience in general but also experience in handling small mammals and especially interpretation of guinea pig behavior might explain the divergent ratings on some of the tests. Accordingly, we would appreciate further validation of our proposed modified neurological examination in client-owned guinea pigs by examiners with different levels of experience in small mammal medicine.

Conclusion

Several of the established neurological tests elicited a response in all or nearly all examined animals and thus can be used routinely for the neurological examination of guinea pigs. Nevertheless, clinicians should be aware that some tests, especially proprioceptive testing in the pelvic limbs and menace response, vertical oculocephalic reflex, and mandibular sensitivity, do not create a consistent response in guinea pigs and do not necessarily allow the conclusion of a neurological deficit. All hands-off examinations are very feasible and should be given special attention.

Caution should be exercised as some tests cause stress in a high percentage of animals. We propose that these kinds of tests be used only when deemed necessary (e.g., withdrawal reflex only for suspected spinal cord disease or multifocal lesions). For animals in a critical state of disease, an abbreviated neurological examination with only non-stressful examinations, such as auricular, maxillar, and nasal septum sensitivity, pupillary light reflex, wheelbarrowing, and hopping reaction in thoracic limbs, might be preferred. A template for a generally applicable examination sheet is provided in the appendix.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Ethics approval

All animal experiments were performed in accordance with German animal welfare legislation and were approved by the Landesdirektion Sachsen (TVV 45/17, DD24.1-5131./390/47) on 15 February 2018.

Acknowledgements

The authors wish to thank Prof. Dr. Arwid Dauschies and Prof. Dr. Dr. Simone Fietz for their kind collaboration and giving us the opportunity to do research on their guinea pig colony.

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

References

- Baklová, A., E. Baranyiová, and H. Šimánková, Antipredator behaviour of domestic guinea pigs (*Cavia porcellus*). *Acta Veterinaria Brno*, 2016. 85(3): p. 293-301.
- Barbero AM, Frasch HF. Pig and guinea pig skin as surrogates for human in vitro penetration studies: a quantitative review. *Toxicol In Vitro*. 2009; 23:1–13. doi: 10.1016/j.tiv.2008.10.008.
- Blight AR, McGinnis ME, Borgens RB. Cutaneous trunci muscle reflex of the guinea pig. *J Comp Neurol*. 1990; 296:614–33. doi: 10.1002/cne.902960408.
- Bongartz U, Nessler J, Maiolini A, Stein VM, Tipold A, Bathen-Nöthen A. Vestibular disease in dogs: association between neurological examination, MRI lesion localisation and outcome. *J Small Anim Pract*. 2020; 61:57–63. doi: 10.1111/jsap.13070.
- Garosi L, Lowrie M. The neurological examination. In: Platt SR, Olby NJ, Hrsg. *BSAVA manual of canine and feline neurology*. 4. Aufl. Quedgeley, Gloucester: British Small Animal Veterinary Association. 2013. p. 1–24.
- Grochow T, Beck B, Rentería-Solís Z, Schares G, Maksimov P, Strube C et al. Establishment and validation of a guinea pig model for human congenital toxoplasmosis. *Parasit Vectors*. 2021; 14:389. doi: 10.1186/s13071-021-04890-4.
- Kraft W. Heimtiere als Patienten in der tierärztlichen Praxis – Entwicklung seit 1967. *Tierarztl Prax Ausg K*. 2005; 33:221–6. doi: 10.1055/s-0037-1622468.
- Langenecker M, Clauss M, Hässig M, Hatt J-M. Vergleichende Untersuchung zur Krankheitsverteilung bei Kaninchen, Meerschweinchen, Ratten und Frettchen. *Tierarztl Prax Ausg K*. 2009; 37:326–33. doi: 10.5167/UZH-23399.
- Mancinelli E. Neurologic examination and diagnostic testing in rabbits, ferrets, and rodents. *J Exot Pet Med*. 2015; 24:52–64. doi: 10.1053/j.jepm.2014.12.006.
- Meredith AL, Richardson J. Neurological diseases of rabbits and rodents. *J Exot Pet Med*. 2015; 24:21–33. doi: 10.1053/j.jepm.2014.12.007.
- Padilla-Carlin DJ, McMurray DN, Hickey AJ. The guinea pig as a model of infectious diseases. *Comp Med*. 2008; 58:324–40.
- Potter GE, W. L. Brueck. Nervous system of guinea pig (*Cavia porcellus*). *Bios* 1958; 29:185–96.
- Snow R, Mans C, Rylander H. Neurological examination in healthy chinchillas (*Chinchilla lanigera*). *Lab Anim*. 2017; 51:629–35. doi: 10.1177/0023677217698000.

Publikationen

- Vernau KM, Osofsky A, LeCouteur RA. The neurological examination and lesion localization in the companion rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Vet Clin North Am Exot Anim Pract.* 2007; 10:731-58. doi: 10.1016/j.cvex.2007.05.003.
- Warnefors E, Rueløkke ML, Gredal H. Results of a modified neurological examination in 26 healthy rabbits. *J Exot Pet Med.* 2019; 30:54–9. doi: 10.1053/j.jepm.2018.01.010.
- Witkowska A, Price J, Hughes C, Smith D, White K, Alibhai A et al. The effects of diet on anatomy, physiology and health in the guinea pig. *J Anim Health Behav Sci.* 2016; 1.

Publikationen

3.3 Manuskript 3: Reduced neural progenitor cell count and cortical neurogenesis in guinea pigs congenitally infected with *Toxoplasma gondii*

Thomas Grochow, Britta Beck, Zaida Rentería-Solís, Gereon Schares, Pavlo Maksimov, Christina Strube, Lisa Raqué, Johannes Kacza, Arwid Dauschies, Simone A. Fietz

Eingereicht in Communications Biology, 04 2023

Das Manuskript wurde von den anderen Autoren zur Vorveröffentlichung freigegeben.

40 Seiten, 12 Abbildungen, 4 Tabellen, 111 Literaturangaben

Tierversuch: TVV 45/17, Landesdirektion Sachsen, Dienststelle Leipzig, 19.04.2018

Eigenanteil der Arbeit:

- Studiendesign: Die Studienidee und der Tierversuchsantrag stammen von Thomas Grochow, Simone A. Fietz und Arwid Dauschies.
- Durchführung: Thomas Grochow ist eigenverantwortlich für die Durchführung des Tierversuchs und der damit einhergehenden Laborarbeiten, ausgenommen, der Durchführung der Katzenpassage der Toxoplasmen (Christina Strube) und der ultrasonographischen Untersuchung der Meerschweinchen (Lisa Raqué).
- Analyse und Interpretation: Thomas Grochow ist eigenverantwortlich für die Auswertung der Ergebnisse.
- Schreiben der Publikation: Thomas Grochow ist eigenverantwortlich für das Schreiben der Publikation, ausgenommen Punkt „Confocal Laser Scanning Microscopy and Deconvolution“ und „Data Analysis“ (in Zusammenarbeit mit Johannes Kacza) und einer kritischen Begutachtung zum fachlichen Inhalt (Gereon Schares, Christina Strube, Johannes Kacza, Arwid Dauschies, Simone A. Fietz).

Reduced neural progenitor cell count and cortical neurogenesis in guinea pigs congenitally infected with *Toxoplasma gondii*

Thomas Grochow^{1,2}, Britta Beck^{1,2}, Zaida Rentería-Solís,² Gereon Schares³, Pavlo Maksimov³, Christina Strube⁴, Lisa Raqué⁵, Johannes Kacza⁷, Arwid Dauschies² and Simone A. Fietz^{1*}

¹ Institute of Veterinary Anatomy, Histology and Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig, Leipzig, Germany

² Institute of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig, Leipzig, Germany

³ National Reference Laboratory for Toxoplasmosis, Institute of Epidemiology, Friedrich-Loeffler-Institut, Federal Research Institute for Animal Health, Greifswald-Insel Riems, Germany

⁴ Institute for Parasitology, Centre for infection Medicine, University of Veterinary Medicine Hannover, Hannover, Germany

⁵ Veterinary practice Raqué, Leipzig, Germany

⁶ BioImaging Core Facility, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig, Leipzig, Germany

*Correspondence: simone.fietz@vetmed.uni-leipzig.de

Abstract

Toxoplasma (T.) gondii is an obligate intracellular parasite with a worldwide distribution. Congenital infection can lead to severe pathological alterations in the brain. To examine the in vivo cell tropism and effects of toxoplasmosis in the fetal brain, pregnant guinea pigs are infected with *T. gondii* oocysts on gestation day 23 and dissected 10, 17 and 25 days afterwards. We show the neocortex to represent a target region of *T. gondii* and the parasite to infect neural progenitor cells (NPCs), neurons and astrocytes in the fetal brain. Importantly, we observe a significant reduction in neuron number at end-neurogenesis and find a marked reduction in NPC count, indicating that impaired neurogenesis underlies the neuronal decrease in infected fetuses. Moreover, we observe focal microglioses to be associated with *T. gondii* in the fetal brain. Our findings expand the understanding of the pathophysiology of congenital toxoplasmosis, especially contributing to the development of cortical malformations

Keywords: congenital toxoplasmosis, *Toxoplasma gondii*, microgliosis, guinea pig, cell tropism, neural progenitor cells, microcephaly

Introduction

The obligate intracellular parasite *Toxoplasma (T.) gondii* causes the zoonosis toxoplasmosis (BLADER et al. 2015, OPSTEEGH et al. 2015, TENTER et al. 2000). In humans, the worldwide seroprevalence of *T. gondii* is approximately 33% (MONTROYA and LIESENFELD 2004, BIGNA et al. 2020). Around 1.9% of women of childbearing age become infected for the first time during pregnancy (BIGNA et al. 2020). All warm-blooded animals can serve as intermediate hosts and members of the cat family (Felidae) are the definitive hosts of *T. gondii*. The life cycle of *T. gondii* consists of different developmental stages (MCAULEY 2014, DUBEY et al. 1998). This parasite reproduces sexually in the intestinal epithelium of the definitive host, which results in the excretion of oocysts in the feces. (DUBEY et al. 1970). In the external environment, during a process called sporulation, infective sporozoites develop within the oocysts. Oral infection of the intermediate host leads to rapid asexual proliferation of the acute (tachyzoite) stage (DUBEY et al. 1998, HALONEN and WEISS 2013). After infection, *T. gondii* tachyzoites disseminate through the infected host via blood, lymph or other body fluids, able to reach all host tissues. About 10-14 days after infection, the immune response of the host against *T. gondii* has developed and causes chronic infection, which is characterized by intracellular tissue cysts, harboring bradyzoites, which may remain in the host for life, especially in the brain, retina, skeletal and cardiac muscle cells (FERGUSON and HUTCHISON 1987, DUBEY et al. 1998, WEISS and KIM 2000, SCHLÜTER et al. 2014, CHIEBAO et al. 2021). Primary routes of infection of the intermediate host are insufficiently heated or raw meat containing tissue cysts and ingestion of water or food contaminated with sporulated oocysts (COOK et al. 2000, MEIRELES et al. 2015, AGUIRRE et al. 2019).

Importantly, the parasite is able to cross the placental barrier during maternal parasitemia and subsequently infect the embryo/fetus after primary infection of the mother (TENTER et al. 2000, ELSHEIKHA 2008, BLADER et al. 2015). In healthy and immunocompetent adults, the infection is usually asymptomatic. However, congenital infection may lead to severe symptoms in the offspring, especially in the brain (GILBERT et al. 2006, MCAULEY 2014). The clinical picture of human

Publikationen

congenital toxoplasmosis depends on the time of infection during pregnancy. An infection in early gestation, especially in the first trimester may lead to abortion. Infection in mid gestation is often characterized by microcephaly, intellectual disability and retinochorioiditis, while congenital infection in the third trimester of pregnancy may result in cerebral calcifications and hepatosplenomegaly (JONES et al. 2001, CAPOBIANGO et al. 2014).

Data from *in vitro* experiments and adult mouse models have shown that *T. gondii* is able to infect neurons and astrocytes, leading to impairments in the number, morphology and function of the infected cells (FISCHER et al. 1997, BRUNET et al. 2008, PARLOG et al. 2015, CABRAL et al. 2016, KIM et al. 2016, WANG and GAO 2016, VELÁSQUEZ et al. 2019, MOUVEAUX et al. 2021). In eutherian mammals, neurogenesis occurs predominantly before birth and therefore neural stem and progenitor cells (NPCs) are exclusively present in high abundance in the prenatal cortex. Based on location of their nucleus at mitosis, NPCs can be divided into two major classes: apical progenitors (APs) and basal progenitors (BPs) (FIETZ and HUTTNER 2011, DEHAY et al. 2015, MOLNÁR et al. 2019, VILLALBA et al. 2021, ANDREWS et al. 2022, VAID and HUTTNER 2022). APs are the primary NPCs, whose cell body resides in the ventricular zone (VZ), the germinal zone adjacent to the lateral ventricle and characteristically express the nuclear marker protein Pax6 (RAKIC 1972, GÖTZ et al. 1998). They first expand by proliferative divisions (RAKIC 1995). With the onset of neurogenesis, APs start dividing asymmetrically, thereby generating BPs that accumulate in the subventricular zone (SVZ). The SVZ is the germinal zone basal to the VZ and constitutes the major site of neuron production in the developing dorsal telencephalon (HAUBENSAK et al. 2004, MIYATA et al. 2004, NOCTOR et al. 2004, HANSEN et al. 2010, BETIZEAU et al. 2013). BPs consist of two major subtypes: basal intermediate progenitors and basal radial glia, with the latter sharing key features with APs including the expression of Pax6 (FIETZ et al. 2010, HANSEN et al. 2010, REILLO et al. 2011, KELAVA et al. 2012) and basal intermediate progenitors characteristically expressing the nuclear marker protein Tbr2 (ENGLUND et al. 2005, MOLYNEAUX et al. 2007). Newborn neurons migrate radially into the cortical plate (CP) in a birth date-dependent *inside-out manner*, in which later-born neurons migrate and settle past earlier-born neurons (ANGEVINE and SIDMAN 1961, RAKIC 1974, RAKIC 1988).

Up to date, the host cells and alterations of *T. gondii* infection in the brain of human fetuses congenitally infected with *T. gondii* are still poorly understood, due to the difficulties in performing clinical studies in pregnant women. As such, whether *T. gondii* infects NPCs in the fetal brain and what the potential consequences on brain development are, remains currently unknown. The aim of this study is to determine the *in vivo* host cells of *T. gondii* and the developmental alterations associated with a congenital *T. gondii* infection in the fetal brain, specifically focusing on the neocortex. The study was conducted in the guinea pig, which represents a highly suitable animal model for human congenital toxoplasmosis, due to the similarities in brain maturity status at birth, in relative timing of cortical neurogenesis and in placentation to humans (FLORI et al. 2002, FLORI et al. 2003, GROCHOW et al. 2021). Here, we demonstrate that *T. gondii* infects NPCs, neurons and astrocytes in the fetal guinea pig brain following vertical transmission of the parasite. Our data show that *T. gondii* infection of the dam during first trimester of gestation results in massive changes in neocortex development of the fetus. Specifically, we observed a significant reduction in the number of neurons at end-neurogenesis and found a marked reduction in the number of BPs, specifically Pax6 and Tbr2-expressing BPs, in the fetal neocortex during mid-neurogenesis, indicating that impaired neurogenesis underlies the neuronal decrease in *T. gondii* infected fetuses. Moreover, we found *T. gondii* tachyzoites to be associated with microglia nodes in the fetal brain as early as second trimester of gestation.

Results

Fetuses were successfully infected with *T. gondii* 17 and 25 days after inoculation of dams

All guinea pig dams became pregnant upon first mating. No clinical abnormalities, i.e. in activity, movement, hair coat, water and food intake, breathing, mucosal color, urine, feces were detected in any of the dams during the daily assessment (Supplementary Table 1). Moreover, no abnormalities were found in the pregnant animals during the ultrasonographic and gynecological examination and no resorptions, abortions or stillbirth of fetuses were observed during the entire experiment. Litter size (mean \pm SEM) of dams was 2.33 ± 0.29 for the control and 3.44 ± 0.34 for the infection groups.

Supplementary Table 1. Scoring system used to evaluate the clinical condition of guinea pigs. If the additive score is greater than 3, the veterinarian and project manager will be informed, as well as the animals will be clinically examined in detail daily and additionally clinically observed at least once. In addition, appropriate measures are taken if necessary. If the additive score is greater than 5, painful conditions are assumed and 1.33 mg/ml metamizole sodium is added to the drinking water. If a score of 2 is achieved in the dehydration category, 60 ml/kg bw and a score of 3, 100 ml/kg bw of a 0.9% sodium chloride solution is applied subcutaneously. If an additive score of at least 2 is reached in the following categories: activity, hair coat, nutritional status, water and feed intake, then social stress conditions are assumed, and the animal is separated into an additional cage. Humane endpoint: an additive score of 10, assessment of two criteria with a score of 3, weight loss of 15% or more, ascites, abortion, inability to move, blindness, central nervous deficits or the presence of even individual clinical manifestations of corresponding severity (with or without connection to the scoring system presented or to the exposure of the animals to the actual animal experiment) the affected animals are euthanized. This is done according to the assessment of the responsible veterinarian.

Criteria	0	1	2	3
Activity	normal	isolated, abnormal posture	inactive or hyperactive	or moribund
Movement, gait	normal	slightly uncoordinated or abnormal gait	uncoordinated or no longer fully applies limb or aversion to movement	swaying or does not sit up limb or paralysis
Hair coat	normal (smooth, shiny, close-fitting)	brittle	unkempt, wounds, loss of hair	bleeding or infected wounds, massive hair loss, automutilation
Nutritional status	normal (ribs palpable, abdomen barrel-shaped, no gluteal and axillary fat pads)	thin	loss of body fat	loss of muscle mass
Water intake	normal (50-100 ml/kg bw)	decreased or increased over 24 h	decreased or increased over 48 h	or permanent drinking or no water intake over 24 h
Food intake	normal (30-50 g pellets/kg bw)	decreased or increased over 24 h	decreased or increased over 48 h	or obese or inappetence over 48 h
Urine	normal (straw-yellow)		abnormal color / quantity	no urine output over 24 h or wet perineum

Publikationen

Criteria	0	1	2	3
Feces	normal (clumped)	(dry, mushy, moist)	diarrhea or decreased fecal output	diarrhea over 24 h, bloody admixtures, no defecation over 24 h
Breathing	normal, breaths/min	100-150	elevated, flat	elevated, abdominal
Vocalization	normal, minor manipulation	with none in case of manipulation	high in case of manipulation	dyspnea, irregular, cyanotic colored mucous membranes
Dehydration	none	reduced skin elasticity	skin fold persists	skin fold remains, sunken eyes
Eyes	normal	dry, dull	eye discharge	lids stuck together, hemophthalmos, exophthalmos
Nose	normal	dried out	minor nasal discharge	high-grade discharge, stuck
Mucosal color	pale pink		reddened or pale	icteric, high-grade redness or cyanotic
Vagina	dry, no discharge	swollen	clear discharge	cloudy, purulent or bloody discharge

Prior to infection, all blood samples of the control and infection groups were seronegative using immunoblotting against a *T. gondii* p30 surface antigen. In order to verify a *T. gondii* infection of the dam and fetus, tissue samples were obtained from distinct organs, i.e. maternal heart, liver, and spleen and fetal brain, heart, liver, spleen, thigh muscle, placenta and amniotic fluid, and analyzed for the presence of *T. gondii* DNA by qPCR targeting a *T. gondii* specific 529 base pair repeat element. In all dams and fetuses of the control groups, no *T. gondii* DNA was detected in any of the maternal and fetal tissues and organs analyzed (Supplementary Table 2, line 43-74). In all dams of the infection groups, *T. gondii* DNA was detected in at least one maternal organ, indicating that all dams were successfully infected (Supplementary Table 2, line 1, 6, 11, 14, 17, 22, 27, 32, 36). In all fetuses of dams dissected on gestation day 33, i.e. 10 days after inoculation of dams, no *T. gondii* DNA was detected in any of the tissues and organs analyzed (Supplementary Table 2, line 2-5, 7-10, 12, 13). Thus, infection of fetuses dissected on gestation day 33 was considered as unsuccessful and the corresponding fetuses were excluded from further analysis. In all fetuses of dams dissected on gestation days 40 and 48, i.e. 17 and 25 days after inoculation of dams, *T. gondii* DNA was detected in at least two tissues and organs of each fetus, indicating their successful infection (Supplementary Table 2, line 15, 16, 18-21, 23-25, 28-31, 33-35, 37-41).

Publikationen

Supplementary Table 2. *T. gondii* qPCR results separated by tissue and organ for each dam and corresponding fetuses of the infection groups. Data on grey background represent Ct values for *T. gondii* in the heart, liver and spleen of dams inoculated with *T. gondii* on gestation day 30 and dissected on gestation 30, 40 or 48, respectively. Data on white background represent Ct values for *T. gondii* in the fetal brain, heart, liver, lung, spleen, muscle, placenta and amniotic fluid of corresponding dams inoculated with *T. gondii* on gestation day 30 and dissected on gestation 30, 40 or 48, respectively. A minus sign represents a negative result defined by a quantification cycle (Ct) equal to or higher than 40 in the qPCR analysis. No result could be obtained in the qPCR analysis for samples with the designation “IH”, indicating qPCR inhibition. The term “ND” represents values that were not determined. Fetal positivity rate represents the percentage of positive samples for a specific tissue or organ from all fetuses dissected on the same gestation day. Given the high number of qPCR inhibitions in the fetal liver and lung samples, fetal positivity rate was not determined in these two organs

40

Line	Dam no.	Fetus no.	Infection Dose	Day of gestation	Brain	Heart	Liver	Lung	Spleen	Muscle	Placenta	Amniotic fluid
1	1		100	33	ND	29.67	IH	ND	IH	ND	ND	ND
2	1	A	100	33	-	-	IH	-	-	IH	-	-
3	1	B	100	33	-	-	-	-	-	-	IH	-
4	1	C	100	33	-	-	IH	-	-	-	-	-
5	1	D	100	33	-	-	IH	-	-	-	-	-
6	2		100	33	ND	32.26	35.71	ND	IH	ND	ND	ND
7	2	A	100	33	-	-	IH	-	-	-	IH	-
8	2	B	100	33	-	-	IH	-	-	-	IH	-
9	2	C	100	33	-	-	-	-	-	-	IH	-
10	2	D	100	33	-	-	IH	-	-	-	-	-
11	3		100	33	ND	30.90	35.66	ND	IH	ND	ND	ND
12	3	A	100	33	-	-	-	-	-	-	-	-
13	3	B	100	33	-	-	-	-	-	-	-	-
14	4		100	40	ND	28.26	32.71	ND	IH	ND	ND	ND
15	4	A	100	40	31.30	31.25	IH	IH	31.41	32.43	27.87	39.92
16	4	B	100	40	31.77	31.54	IH	IH	31.77	-	29.66	-
17	5		100	40	ND	29.43	33.39	ND	IH	ND	ND	ND
18	5	A	100	40	33.27	31.19	IH	31.68	31.48	-	31.01	-

Publikationen

Line	Dam no.	Fetus no.	Infection Dose	Day of gestation	Brain	Heart	Liver	Lung	Spleen	Muscle	Placenta	Amniotic fluid
19	5	B	100	40	30.93	29.74	IH	IH	34.10	32.50	30.68	-
20	5	C	100	40	39.05	-	IH	37.39	-	-	29.53	-
21	5	D	100	40	33.33	37.02	IH	-	36.36	35.46	33.70	-
22	6		100	40	ND	30.78	34.18	ND	IH	ND	ND	ND
23	6	A	100	40	35.58	36.08	IH	-	32.66	37.21	30.83	-
24	6	B	100	40	-	32.56	IH	IH	-	-	33.73	-
25	6	C	100	40	36.96	-	IH	-	-	-	IH	38.76
26			Fetal positivity rate		89%	78%	ND	ND	67%	44%	100%	22%
27	7		100	48	ND	29.23	IH	ND	IH	ND	ND	ND
28	7	A	100	48	33.50	34.40	IH	IH	-	35.50	22.94	30.52
29	7	B	100	48	31.19	34.47	IH	IH	-	38.16	25.06	29.70
30	7	C	100	48	36.30	31.64	IH	IH	-	37.04	24.64	28.09
31	7	D	100	48	35.28	34.73	IH	IH	-	IH	31.24	27.58
32	8		100	48	ND	30.36	IH	ND	IH	ND	ND	ND
33	8	A	100	48	33.57	34.51	IH	IH	36.27	-	IH	25.78
34	8	B	100	48	33.31	IH	IH	IH	IH	IH	30.49	31.69
35	8	C	100	48	30.05	33.43	IH	IH	36.09	IH	27.66	33.59
36	9		100	48	ND	31.88	IH	ND	IH	ND	ND	ND
37	9	A	100	48	31.92	32.02	IH	35.63	-	35.00	31.89	31.99
38	9	B	100	48	29.72	IH	IH	IH	38.67	-	33.85	30.42
39	9	C	100	48	30.56	34.18	IH	IH	34.73	34.56	23.63	26.97
40	9	D	100	48	27.06	32.23	IH	IH	32.52	34.58	22.29	29.91
41	9	E	100	48	31.44	31.39	IH	IH	36.02	34.48	28.38	23.88
42			Fetal positivity rate		100%	100%	ND	ND	58%	78%	100%	100%
43	10	A	0	33	-	-	-	-	-	-	IH	-
44	10	B	0	33	-	-	IH	-	-	-	IH	-
45	10	C	0	33	-	-	IH	-	-	-	IH	-
46	10	D	0	33	-	-	IH	-	-	-	IH	-
47	11		0	33	ND	-	-	ND	IH	ND	ND	ND
48	11	A	0	33	-	-	IH	-	-	-	IH	-

41

Publikationen

Line	Dam no.	Fetus no.	Infection Dose	Day of gestation	Brain	Heart	Liver	Lung	Spleen	Muscle	Placenta	Amniotic fluid
49	11	B	0	33	-	-	IH	-	-	-	IH	-
50	11	C	0	33	-	-	-	-	-	-	IH	-
51	12		0	33	ND	IH	-	ND	IH	ND	ND	ND
52	12	A	0	33	-	-	IH	-	-	-	IH	-
53	12	B	0	33	-	-	-	-	-	-	IH	-
54			Fetal positivity rate		0%	0%	ND	ND	0%	0%	ND	0%
55	13		0	40	ND	-	-	ND	IH	ND	ND	ND
56	13	A	0	40	-	-	IH	IH	-	IH	IH	-
57	13	B	0	40	-	-	IH	IH	-	-	IH	-
58	14		0	40	ND	-	-	ND	IH	ND	ND	ND
59	14	A	0	40	-	-	IH	IH	-	IH	-	-
60	14	B	0	40	-	-	IH	-	-	-	IH	-
61	14	C	0	40	-	-	IH	IH	-	IH	IH	-
62	15		0	40	ND	IH	-	ND	IH	ND	ND	ND
63	44	A	0	40	-	-	IH	IH	-	IH	IH	-
64	44	B	0	40	-	-	IH	IH	-	IH	-	-
65			Fetal positivity rate		0%	0%	ND	ND	0%	0%	ND	0%
66	16		0	48	ND	-	-	ND	IH	ND	ND	ND
67	16	A	0	48	-	IH	IH	IH	-	-	IH	-
68	17		0	48	ND	-	-	ND	IH	ND	ND	ND
69	17	A	0	48	-	-	IH	IH	-	-	IH	-
70	17	B	0	48	-	-	IH	-	IH	-	-	-
71	18		0	48	ND	-	-	ND	IH	ND	ND	ND
72	18	A	0	48	-	-	IH	IH	IH	IH	IH	-
73	18	B	0	48	-	-	IH	IH	IH	IH	IH	-
74			Fetal positivity rate		0%	0%	ND	ND	0%	0%	0%	0%

42

***T. gondii* DNA was present in various fetal tissues and organs including the brain**

Using qPCR analysis, *T. gondii* DNA was detected in all fetal placentas and in the majority of the fetal brain (89%), heart (78%) and spleen (67%) samples on gestation day 40 (Supplementary Table 2, line 26). By gestation day 48, the percentage of fetal tissues and organs containing *T. gondii* increased with its DNA being present in all fetal placental, amniotic fluid, brain and heart samples and in the majority of the fetal spleen (58%) and thigh muscle (78%) samples (Supplementary Table 2, line 42).

We next translated the Ct values obtained by qPCR into genomic equivalents of tachyzoites by interpolation from a parasite dilution curve and compared values from the same tissue or organ between different durations of infection, i.e. duration between inoculation of the dam and sampling of animals (Fig. 1). No significant differences were found between the *T. gondii* DNA loads of the intra-embryonic tissues and organs, i.e. brain, heart, lung, spleen and thigh muscle when different durations of infection were compared (Fig. 1a, b). However, *T. gondii* DNA load in the amniotic fluid was significantly higher in fetuses dissected on gestation day 48, i.e. 25 days after inoculation of dams, when compared with those infected for a shorter duration, i.e. dissected on gestation day 40, thus 17 days after inoculation of dams (Fig. 1a, b).

When *T. gondii* DNA loads were compared between different tissues and organs within the same group of duration of infection, *T. gondii* DNA loads in fetuses dissected on gestation 40 were significantly higher in the placenta than in the amniotic fluid and distinct intra-embryonic tissues and organs, i.e. thigh muscle and lung (Fig. 1a). Moreover, in fetuses dissected on gestation 48, *T. gondii* DNA loads were significantly higher in the placenta and amniotic fluid than in the thigh muscle and spleen (Fig. 1b). No marked differences were found when *T. gondii* DNA loads were compared between the intra-embryonic tissues and organs, i.e. brain, heart, lung, spleen and muscle, on gestation day 40 (Fig. 1a). However, upon longer duration of infection, dissected on gestation day 48, i.e. 25 days after inoculation of dams, highest median *T. gondii* DNA loads in the fetus were observed in the brain being significantly higher when compared with the spleen (Fig. 1b).

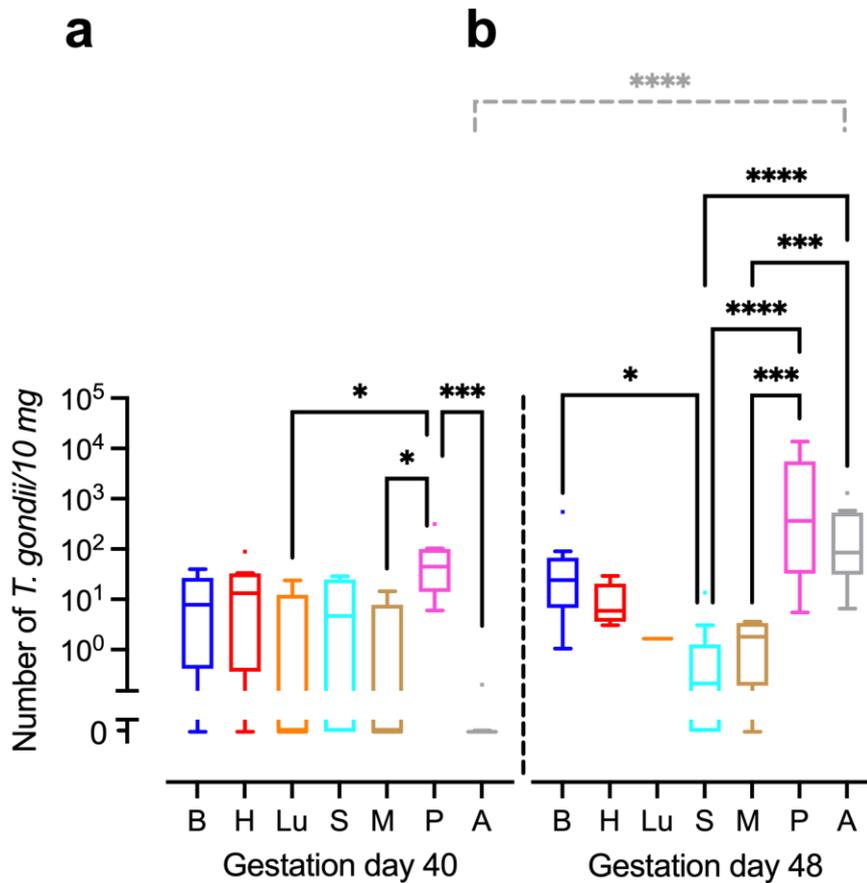


Fig. 1 *T. gondii* DNA loads in the guinea pig fetus congenitally infected with *T. gondii*. **a, b** *T. gondii* DNA loads in 10 mg tissue were obtained by qPCR in fetuses of dams inoculated with *T. gondii* on gestation day 23 and dissected on day 40 (**a**) and 48 (**b**). Center line, median; box limits, upper and lower quartiles; whiskers, 1.5x interquartile range; points, outliers. B, brain; H, heart; Lu, lung; S, spleen; M, thigh muscle; P, fetal placenta; A, amniotic fluid. Solid lines indicate comparison of fetal tissues and organs obtained from dams infected for the same duration of infection. Dashed lines indicate comparison between the same tissue and organ within the different durations of infection. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$. Individual P values: comparison between tissues and organs on gestation day 40: $P = 0.0433$, P vs Lu; $P = 0.0108$, P vs M; $P = 0.0002$, P vs A; comparison between tissues and organs on gestation day 48: $P = 0.0172$ B vs S; $P < 0.0001$, P vs S, $P < 0.0001$, A vs S; $P = 0.0001$, P vs M; $P = 0.0005$, A vs M; comparison between gestation days 40 and 48: $P < 0.0001$, A. Only statistically significant differences are shown. Individual n values: comparison between tissues and organs on gestation day 40: $n = 9$, B; $n = 9$, H; $n = 5$, Lu; $n = 9$, S; $n = 9$, M; $n = 8$, P; $n = 9$, A; comparison between tissues and organs on gestation day 48: $n = 12$, B; $n = 11$, H; $n = 1$, Lu; $n = 11$, S; $n = 9$, M; $n = 11$, P; $n = 12$, A.

The forebrain constitutes a main target region of *T. gondii* in the fetal brain

We next investigated, whether there is a specific target region of *T. gondii* within the guinea pig fetal brain. For this, we analyzed 5 randomly chosen sections per brain of *T. gondii* infected fetuses dissected on gestation day 40 and 48 by immunohistochemistry using an antibody for the *T. gondii* tachyzoite-specific surface antigen SAG1 (KASPER et al. 1983, BURG et al. 1988) and quantified delineated

SAG1+ clusters (Fig. 2a). A SAG1+ cluster most likely represents a spatially delimited accumulation of *T. gondii* tachyzoites consisting of a primary tachyzoite, which initially invades the host cell, and its daughter cells, which arise from several cycles of endodyogeny (DUBEY et al. 1998, ATTIAS et al. 2020). We found *T. gondii* tachyzoite clusters to be present in one out of five (20%) brains of fetuses dissected on gestation day 40 and four out of ten (40 %) brains dissected on gestation day 48. When different brain regions, i.e. telen-, dien-, mesen-, meten- and myeloncephalon, were compared, all *T. gondii* tachyzoite clusters were located in the forebrain, i.e. telen- and diencephalon, with highest numbers being present in the neocortex (Fig. 2b). No *T. gondii* tachyzoite clusters were observed in brain regions caudal to the diencephalon (Fig. 2b). To verify the presence of *T. gondii* tissue cysts, we performed SAG1 immunohistochemistry together Dolichos biflorus agglutinin (DBA) staining on adjacent sections, in which *T. gondii* were detected by SAG1 immunohistochemistry (Supplementary Fig. 1). DBA binds to N-acetylgalactosamine moieties present on the *T. gondii* cyst wall⁵⁷. *T. gondii* tissue cysts were solely detected in one section of a fetus dissected on gestation day 48. All cysts contained SAG1+ parasites, i.e. tachyzoites, thus indicating that they are at a very early stage of development.

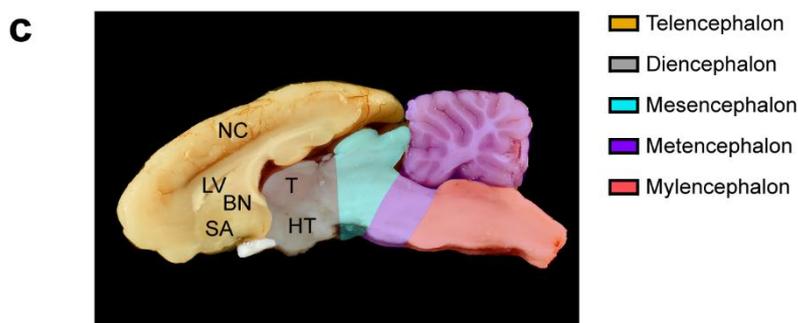
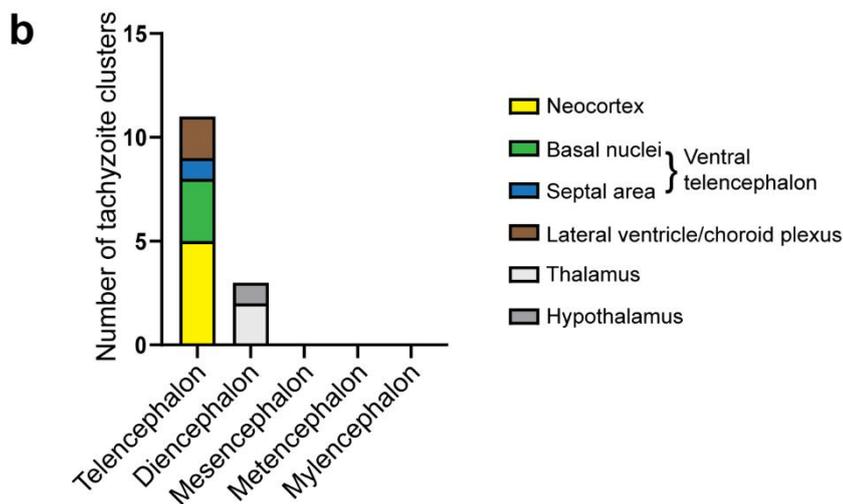
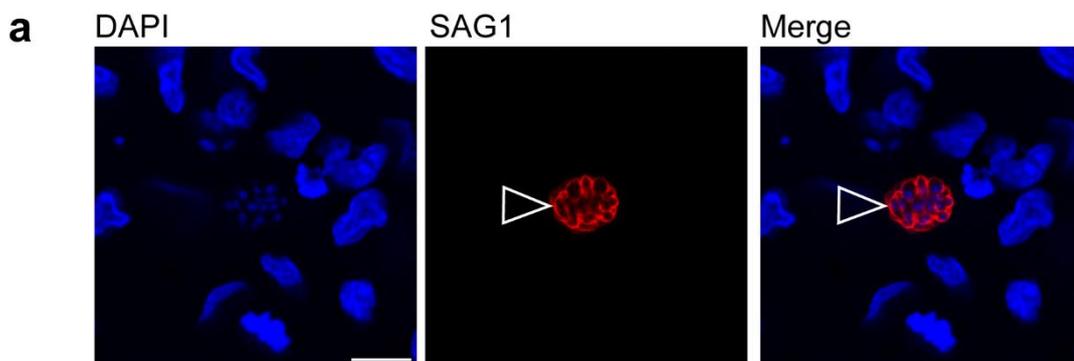
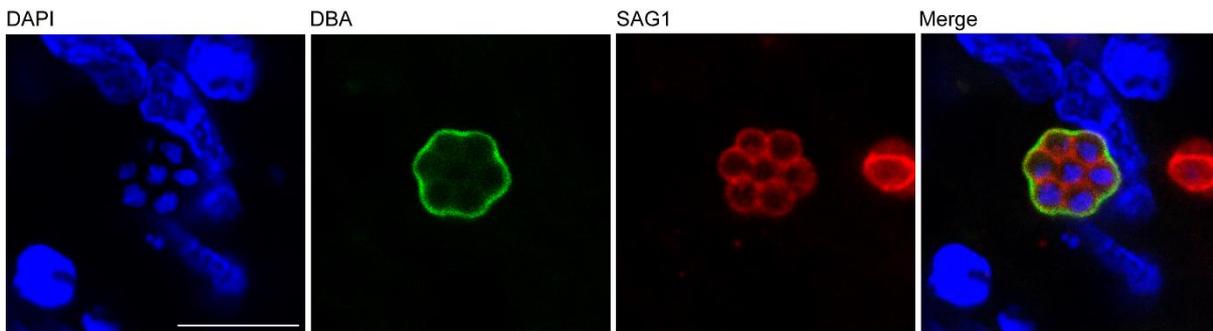


Fig. 2 Localization of *T. gondii* tachyzoite clusters in the fetal guinea pig brain. **a** DAPI staining (blue) and immunofluorescence for SAG1 (red) on a 30 μm brain section of a guinea pig fetus of a dam inoculated with *T. gondii* on gestation day 23 and dissected on day 48. Open arrowheads indicate a SAG1+ *T. gondii* tachyzoite cluster. Scale bar, 10 μm . **(b)** Number of tachyzoite clusters detected by SAG1 immunofluorescence in the distinct brain regions of guinea pig fetuses of dams inoculated with *T. gondii* on gestation day 23 and dissected on day 40 and 48. Data are from all guinea pig fetal brains with Ct value below 35 as determined by qPCR for *T. gondii* (n=5 for gestation day 40, n=10 for gestation day 48, Supplementary Table 1). **(c)** Median section of an adult guinea pig brain. NC, neocortex; LV, lateral ventricle; BN, basal nuclei; SA septal area; T, thalamus; HT, hypothalamus.



Supplementary Fig. 1 Identification of *T. gondii* tachyzoites in tissue cysts. DAPI staining (blue), DBA staining (green) and immunofluorescence for SAG1 (red) on a 30 μm brain cryosection of a guinea pig fetus of a dam inoculated with *T. gondii* on gestation day 23 and dissected on day 48. Scale bar, 10 μm .

***T. gondii* infects neural progenitor cells, neurons, and astrocytes in the fetal forebrain**

In a further step, we elucidated, which specific cell types are infected by *T. gondii* in the guinea pig fetal brain. To this end, we analyzed cortical sections of *T. gondii* infected fetuses dissected on gestation day 40 and 48 by double or triple immunohistochemistry using antibodies for SAG1 and one of the following cytoplasmic marker protein(s): (i) Nestin, an intermediate filament protein of NPCs (LEND AHL et al. 1990), (ii) MAP2, a microtubule associated protein of neuronal dendrites and soma (BERNHARDT and MATUS 1984), and neurofilament H, an intermediate filament protein of neuronal axons (SHAW and WEBER 1982, CARDEN et al. 1987), and (iii) GFAP, an intermediate filament protein of astrocytes (BIGNAMI and DAHL 1973, KÁLMÁN and HAJÓS 1989). Interestingly, *T. gondii* tachyzoites were completely encapsulated by Nestin+ immunofluorescence signal (Fig. 3a), thus revealing their presence in NPCs. Moreover, *T. gondii* tachyzoites were detected in neurons and astrocytes as visualized by the complete encapsulation of MAP2 and neurofilament H (Fig. 3b), and GFAP immunofluorescence signal, respectively (Fig. 3c). Together, this demonstrates the ability of *T. gondii* to infect NPCs, neurons as well as astrocytes in the fetal guinea pig brain following its vertical transmission.

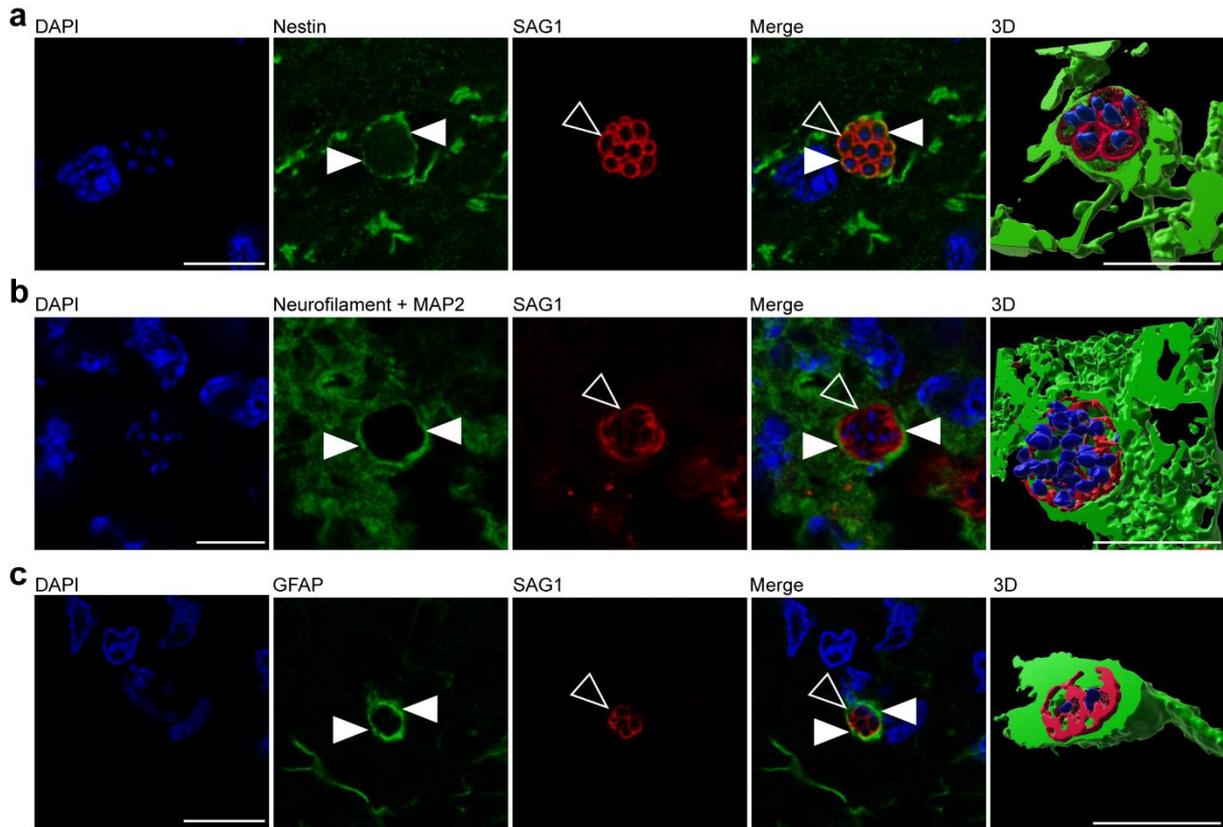


Fig. 3 Host cells of *T. gondii* in the fetal guinea pig brain. **a, b, c** DAPI staining (blue) and immunofluorescence for Nestin (green, **a**), neurofilament H and MAP2 (green, **b**), or GFAP (green, **c**), and SAG1 (red) on 30 μ m brain cryosections of guinea pig fetuses of dams inoculated with *T. gondii* on gestation day 23 and dissected on day 40 (**b**) or 48 (**a, c**). Image showing Nestin immunofluorescence represents a maximum intensity projection of 3 optical sections with a thickness of 0.2 μ m each (**a**). Image showing MAP2 immunofluorescence represents a maximum intensity projection of 2 optical sections with a thickness of 0.2 μ m each (**b**). Closed arrowheads indicate Nestin+ (**a**), neurofilament H/MAP2+ (**b**), or GFAP+ (**c**) cytoplasm. Open arrowheads indicate SAG1+ tachyzoites. 3D graphics were created by surface rendering for visualization only using Imaris. Scale bars, 10 μ m.

***T. gondii* infection results in a decrease of neurons and NPC count in the fetal neocortex**

To gain insight into the direct implications of the *T. gondii* infection in the guinea pig fetal neocortex, specifically on the pool size of the infected cells, we analyzed cortical sections at a medium position of the lateral ventricle per brain of the control and infection groups by immunohistochemistry using antibodies for characteristic marker proteins of the cells of interest. We first focused on neurons and used an antibody for the pan-neuronal marker Hu C/D (Fig. 4a-d, BARAMI et al. 1995, OKANO and DARNELL 1997). Quantification of Hu C/D+ cells revealed no significant differences in neuron number between fetuses of the control and the infection group dissected on gestation day 40 (Fig. 4a, b, e). However, on gestation day 48, the number of Hu C/D+ cells was significantly lower in the neocortex of fetuses infected with *T. gondii* when compared with those of the control group (Fig. 4c-e). No major differences in the distribution of Hu C/D+ cells between the control and infection groups on both gestation days were obvious, indicating that the apical-basal migration of neurons is not affected in the *T. gondii* infected brains.

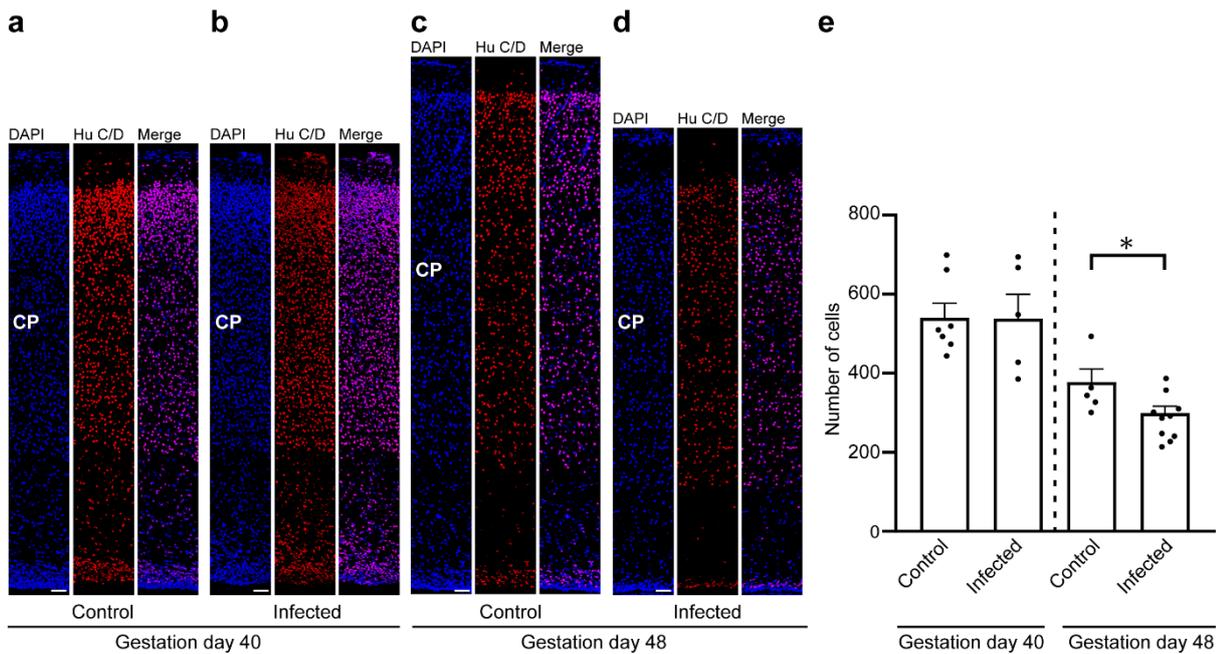


Fig. 4 Hu C/D expression in the fetal guinea pig neocortex. a-d DAPI staining (blue) and immunofluorescence labeling for Hu C/D (red) on 30 μm brain cryosections of guinea pig fetuses of control dams (a, c) or dams inoculated with *T. gondii* on gestation day 23 (b, d) and dissected on day 40 (a, b) or 48 (c, d). The entire cortical wall is shown. CP, cortical plate. Scale bars, 50 μm. (e) Quantification of Hu C/D+ cells in the cortical wall, expressed as number of cells per 100 μm ventricular surface. Cortical wall corresponding to a total ventricular surface of 150-800 μm was analyzed. Data represent mean ± SEM. Data of the infection groups are from all guinea pig brains with Ct value below 35 as determined by qPCR for *T. gondii* (n=5 for gestation day 40, n=10 for gestation day 48, Supplementary Table 1). Data of the control group are as follows: n=7 for gestation day 40, n=5 for gestation day 48. *, $P < 0.05$ ($P = 0.0181$, $df = 13$).

We next analyzed cortical sections by double immunohistochemistry using antibodies for distinct NPC markers, i.e. Pax6, a transcription factor characteristically expressed by APs and basal radial glia, and Tbr2, a transcription factor characteristically expressed by basal intermediate progenitors (Fig. 5a, b, ENGLUND et al. 2005, FIETZ et al. 2010, HANSEN et al. 2010, REILLO et al. 2011). As shown previously (KALUSA et al. 2021), no Tbr2+ cells were detected in the neocortex of the control and infected groups on gestation day 48, indicating that cortical neurogenesis in the guinea pig has terminated before. On gestation day 40, which constitutes mid-neurogenesis in the guinea pig neocortex (KALUSA et al. 2021), no significant differences in the number of Pax6+ and/or Tbr2+ cells of the VZ between the control and infected fetuses were detected (Fig. 5c), indicating that the pool size of the primary NPCs, i.e. APs, is largely unaffected in the developing neocortex of fetuses infected with *T. gondii* when compared with that of controls. We then focused our analysis on the secondary NPCs in the SVZ/IZ, i.e. BPs. Interestingly, their total number, i.e. the sum of Pax6+/Tbr2-, Pax6+/Tbr2+, Pax6-/Tbr2+ NPCs, on gestation day 40 was significantly lower in *T. gondii* infected fetuses when compared with that of controls (Fig. 5d). When investigating whether this reduction was attributable to a specific BP subpopulation, we found the number of Pax6+/Tbr2+ BPs to be significantly decreased in *T. gondii* infected fetuses when compared with controls (Fig. 5d). Together, our data show that *T. gondii* infection of NPCs and neurons in the fetal guinea pig neocortex impacts their number, resulting in a reduction of the NPC pool during mid-neurogenesis and that of neurons at end-neurogenesis. No significant

differences were observed when the cortical thickness was compared between the control and infection group of both gestation days (Supplementary Fig. 2). Together, this suggests that the reduced cell numbers lead to a decrease in cell density but not to a decrease in cortical wall thickness in the brain of *T. gondii* infected fetuses.

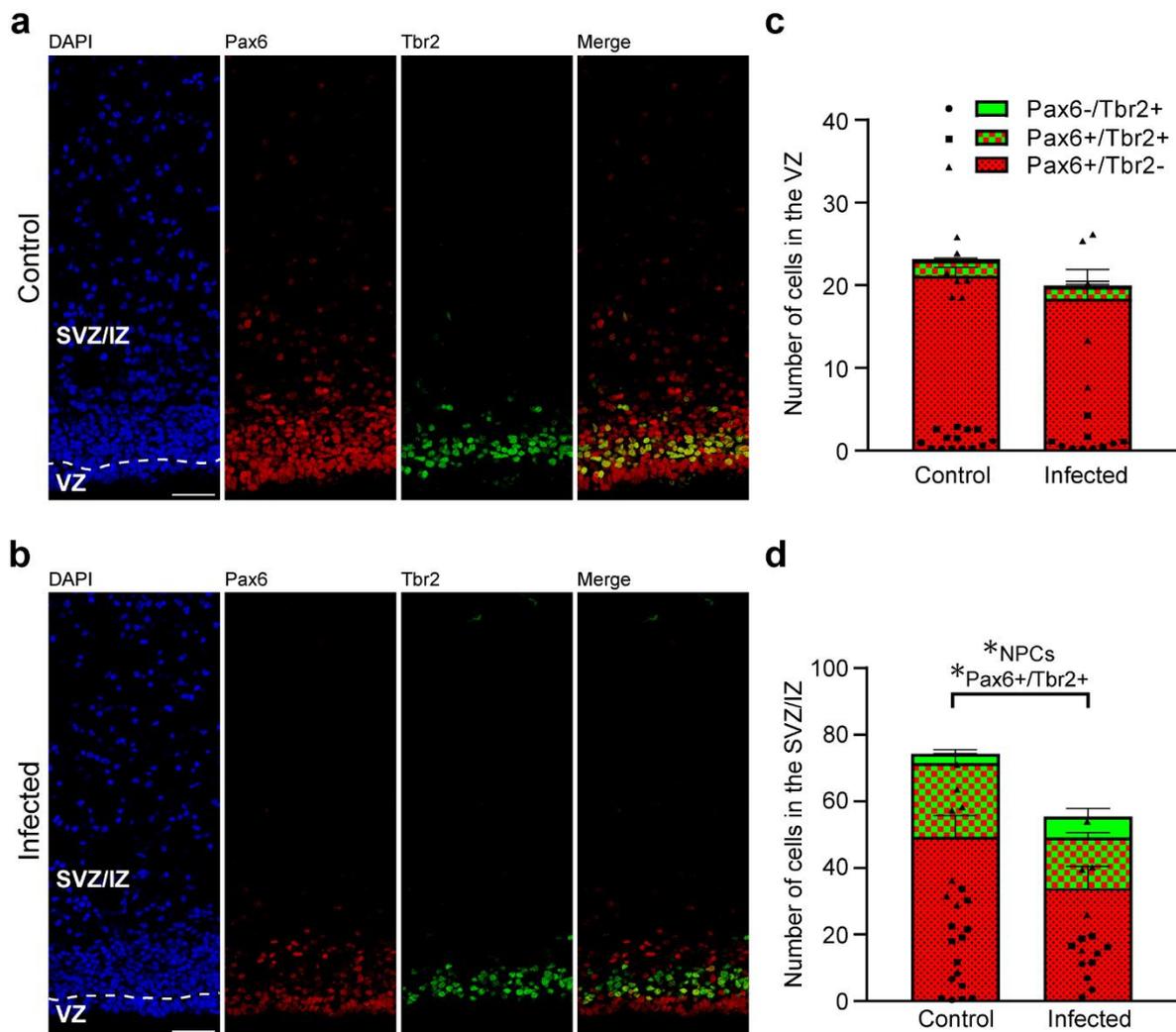
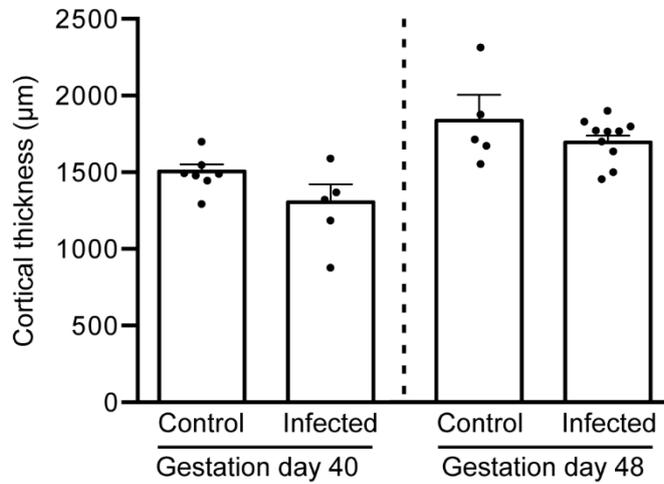


Fig. 5 Pax6 and Tbr2 expression in the fetal guinea pig neocortex. **a, b** DAPI staining (blue) and immunofluorescence labeling for Pax6 (red) and Tbr2 (green) on 30 μm brain cryosections of guinea pig fetuses of control dams (**a**) or dams inoculated with *T. gondii* on gestation day 23 (**b**) and dissected on day 40. Scale bar, 50 μm . **c, d** Quantification of Pax6+ (red) and/or Tbr2+ (green) NPCs in the ventricular zone (VZ, **c**) and subventricular zone/intermediate zone (SVZ/IZ), **d**), expressed as number of cells per 100 μm ventricular surface. Cortical wall corresponding to a total ventricular surface of 230-500 μm was analyzed. The dashed line indicates the border between VZ and SVZ/IZ. Data represent mean \pm SEM. Data of the infection groups are from all guinea pig brains with Ct value below 35 as determined by qPCR for *T. gondii* (n=5 for gestation day 40, Supplementary Table 1). Control group: n=7 for gestation day 40. *, $P < 0.05$ ($P = 0.0440$, $df = 10$, NPCs, i.e. the sum of Pax6+/Tbr2-, Pax6+/Tbr2+, Pax6-/Tbr2+ cells, in SVZ/IZ; $P = 0.0441$, $df = 10$, Pax6+/Tbr2+ cells in SVZ/IZ).



Supplementary Fig. 2 Cortical thickness of the fetal guinea pig neocortex. Data represent mean \pm SEM. Data of the infection groups are from all guinea pig brains with Ct value below 35 as determined by qPCR for *T. gondii* (n=5 for gestation day 40, n=10 for gestation day 48, Supplementary Table 2). Data of the control group are as follows: n=7 for gestation day 40, n=5 for gestation day 48.

In a final step, we focused on astrocytes and analyzed cortical sections by immunohistochemistry using an antibody for GFAP (Fig. 6a, b). Similar to previous observations (KALUSA et al. 2021), mature astrocytes, which exhibit a typical star-shaped appearance, were first detected after the end of neurogenesis, i.e. on gestation day 48 in the guinea pig neocortex (Fig. 6a, b). We then quantified the GFAP immunofluorescence intensity in the control and infected fetuses obtained on gestation day 48 and found no difference when the two groups were compared (Fig. 6c). This indicates that *T. gondii* infection of the fetal guinea pig neocortex does not affect the number of astrocytes.

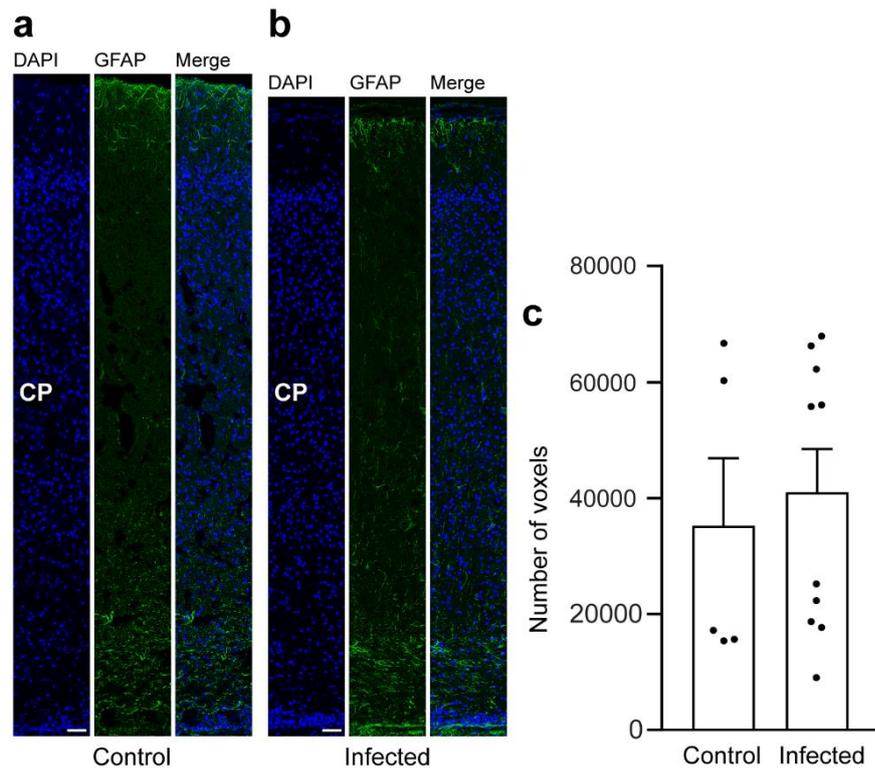
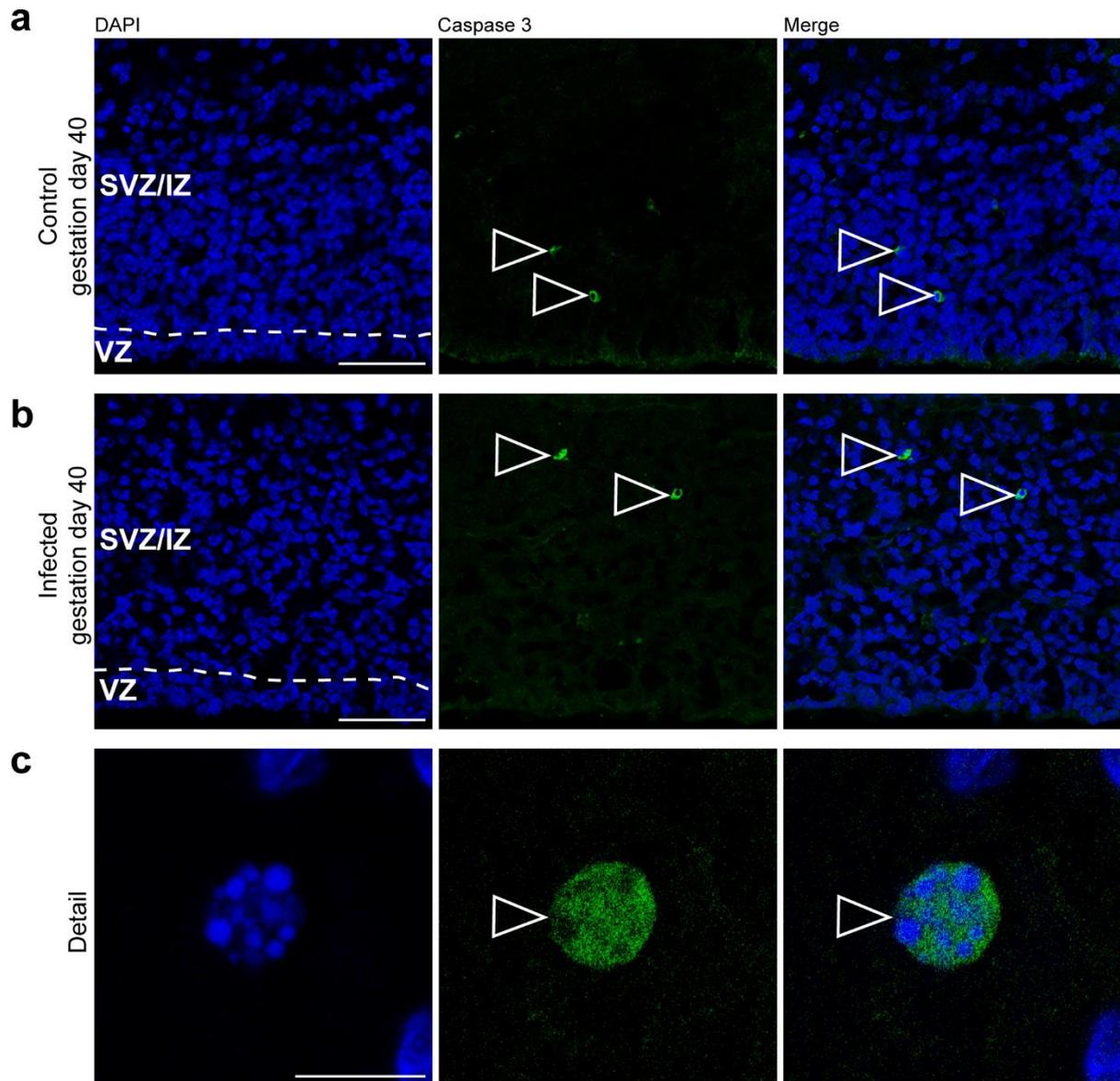


Fig. 6 GFAP expression in the fetal guinea pig neocortex. **a** and **b** DAPI staining (blue) and immunofluorescence for GFAP (green) on 30 μm brain cryosections of guinea pig fetuses of control (**a**) or infected (**b**) dams dissected on gestation day 48. Dams were inoculated with *T. gondii* on gestation day 23. Scale bar, 50 μm . The entire cortical wall is shown. CP, cortical plate. Scale bars, 50 μm . (**c**) Quantification of GFAP+ labelling intensity in the cortical wall, expressed as number of voxels per 100 μm ventricular surface. Cortical wall corresponding to a total ventricular surface of 150-250 μm was analyzed. Data represent mean \pm SEM. Data of the infection groups are from all guinea pig brains with Ct value below 35 as determined by qPCR for *T. gondii* (n=10 for gestation day 48, Supplementary Table 1). Data of the control group are as follows: n=5. ($P = 0.3325$, $df = 13$).

***T. gondii* infection of the fetal neocortex is not associated with an increase in cell death**

Previous studies demonstrated the ability of *T. gondii* to induce cell death (ZHAO et al. 2009, WANG et al. 2014, GAGGERO et al. 2022). In order to investigate whether cell death accounts for the observed NPC and neuron loss in the *T. gondii* infected guinea pig neocortex, we analyzed cortical sections of the control and infection groups by immunohistochemistry using an antibody for caspase-3, a marker of programmed cell death (Supplementary Fig. 3, THORNBERRY and LAZEBNIK 1998, SLEE et al. 2001). Only a few apoptotic cells were detected in the cortical wall of the control group at both stages analyzed (Table 1). Similarly, the number of apoptotic cells in the cortical wall of fetuses dissected on gestation day 40 and 48 was markedly low (Table 1). No significant difference in their number was detected when the control and infection groups were compared (Table 1). Moreover, we analyzed DAPI-stained nuclei for pyknosis and/or karyorrhexis, which are hallmarks of cell death, in the cortical wall of the neocortex of both infection groups. We found all pyknotic and fragmented nuclei

to be present in caspase-3+ cells. Together, this suggests that cell death is unlikely to account for the reduction in NPC and neuron count observed in the neocortex of *T. gondii* infected fetuses.



Supplementary Figure 3 Identification of apoptotic cells by immunohistochemistry for activated caspase 3. DAPI staining (blue) and immunohistochemistry for activated caspase 3 (green) on a 30 μ m brain cryosection of a guinea pig fetus of control (a) or infected (b) dam dissected on gestation day 40. Arrowheads indicate activated caspase 3-expressing cells. Scale bars, 50 (a, b) , 10 μ m (c). VZ, ventricular zone; SVZ, subventricular zone; IZ, intermediate zone.

Table 1: Quantification of apoptotic cells in the cortical wall of fetuses of the control and *T. gondii* infection group on gestation day 48. 1, number of apoptotic cells identified by immunohistochemistry for activated caspase 3 and quantified in the cortical wall per 100 μ m ventricular surface. 2, cortical zone in which apoptotic cells were detected. SVZ, subventricular zone, CP, cortical plate. 3, Mean \pm SEM of the number apoptotic cells quantified in the cortical wall per 100 μ m ventricular surface of the infection and control group. Brains of fetuses, whose Ct value was below 35 were included in the

Publikationen

analysis. Mann-Whiney test was used to compare the number of apoptotic cells between the control and infection group; P (gestation day 40) = 0.5758, P (gestation day 48) = 0.1538).

Fetus no.	Group	Gestation day	Number of apoptosis ¹	of Cortical Zone ²	Mean \pm SEM ³
13A	Control	40	0		
13B	Control	40	0		
14A	Control	40	0		
14B	Control	40	0		0.7143 \pm 0.4738
14C	Control	40	2	SVZ	
15A	Control	40	0		
15B	Control	40	3	SVZ	
16A	Control	48	0		
17A	Control	48	0		
17B	Control	48	0		0
18A	Control	48	0		
18B	Control	48	0		
4A	Infected	40	1	SVZ	
4B	Infected	40	0		
5A	Infected	40	2	SVZ	0.6 \pm 0.4
5B	Infected	40	0		
5D	Infected	40	0		
7A	Infected	48	0		
7B	Infected	48	1	SVZ	
8A	Infected	48	1	SVZ	
8B	Infected	48	0		
8C	Infected	48	0		
9A	Infected	48	1	CP	0,4 \pm 0.1633
9B	Infected	48	0		
9C	Infected	48	0		
9D	Infected	48	0		
9E	Infected	48	1	CP	

Focal microglioses are present in the brain of *T. gondii* infected fetuses

In the following, we aimed to gain insight into the fetal immune response against *T. gondii* in the guinea pig neocortex, focusing on microglia, which represent the resident immune cells in the central nervous system first (GINHOUX et al. 2013, FILIANO et al. 2015). For this, the adjacent section of the brain section in which *T. gondii* tachyzoites were detected and a control section of a corresponding brain area of fetuses dissected on gestation day 40 and 48 were stained with antibodies for Iba1, a characteristic marker of microglia (ITO et al. 1998, OKERE and KABA 2000) and SAG1 (Fig. 7a, b). In fetuses of the control group, microglia were present in the neocortex as early as gestation day 40, i.e. during mid-neurogenesis (Fig. 7a). Remarkably, in the brain of guinea pig fetuses of both infection groups, all *T. gondii* tachyzoites were found in the center of the microglia aggregations and microglia nodules were only present in association with tachyzoites (Fig. 7c, d). Quantification of Iba1 immunofluorescence intensity in the tachyzoite related lesions and corresponding brain areas of the control group revealed a significant increase in the Iba1 fluorescence labelling intensity in the brain of *T. gondii* infected fetuses

(Fig. 7e). This suggests that parasitic lesions are associated with focal or multifocal microglioses in the brain of guinea pig fetuses 17 days after inoculation of dams with *T. gondii*.

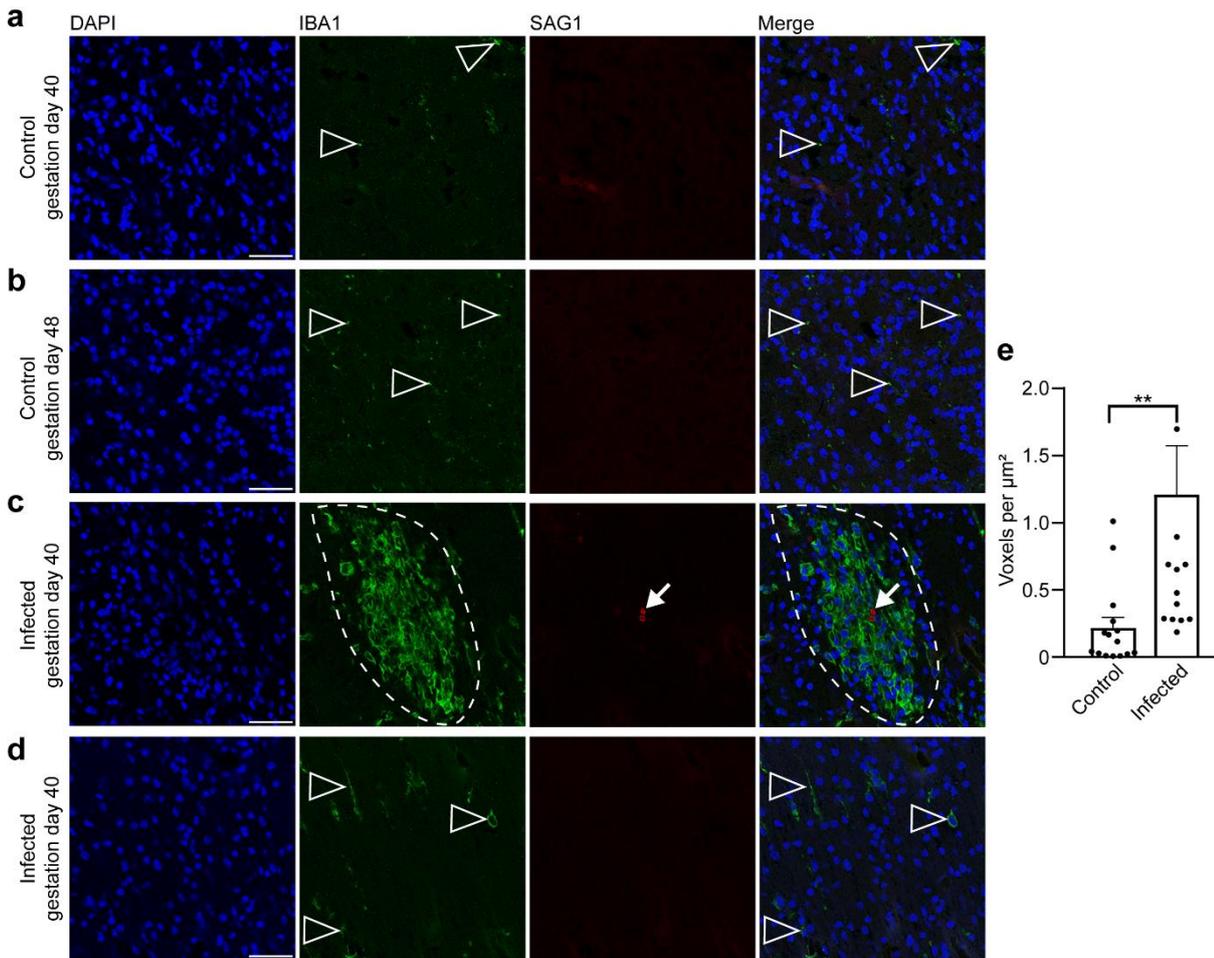
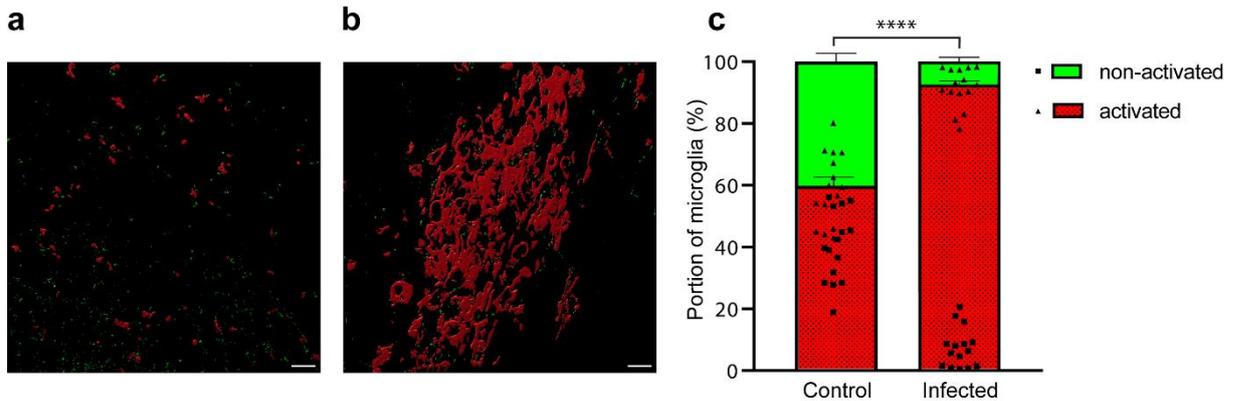


Fig. 7 Localization of microglia in foci of *T. gondii* tachyzoite clusters the fetal guinea pig brain. **a-c** DAPI staining (blue) and immunofluorescence for Iba1 (green) and SAG1 (red) on 30 μm brain cryosections of guinea pig fetuses of control dams dissected on gestation day 40 (**a**) or 48 (**b**) and dams inoculated with *T. gondii* on gestation day 23 and dissected on day 40 (**c**, **d**). Scale bar, 50 μm. Arrowheads indicate Iba1+ microglia. Arrows indicate SAG1+ *T. gondii* tachyzoites. Dashed line outlines an agglomeration of Iba1+ microglia surrounding SAG1+ *T. gondii* tachyzoites. Image in (**d**) shows the same section and brain region as in (**c**) without the presence of tachyzoites. (**e**) Quantification of Iba1 labelling intensity as detected by immunofluorescence labeling for Iba1. Labelling intensities were quantified in a 200 x 200 μm area including a tachyzoite cluster of guinea pig fetuses of dams inoculated with *T. gondii* on gestation day 23 and from a 200 x 200 μm area covering the same brain region of control fetuses, dissected on gestation day 40 and 48. Results were expressed as voxels per μm². Data represent mean ± SEM and are from 15 *T. gondii* tachyzoite clusters observed in 5 fetuses dissected on gestation day 40 and 48 (Figure 2) and the corresponding regions of the control groups. **, $P < 0.01$ ($P = 0.0064$, $df = 28$, $n = 15$). Dots not displayed: Infected: 4.01, 2.52, 4.62.

During activation in response to various stimuli, e.g. brain infection, microglia undergo distinct morphological changes. Non-activated microglia mainly exhibit a ramified morphology, whereas fully activated microglia acquire an amoeboid shape 76. In order to analyze whether *T. gondii* infection is

associated with a change in microglia morphology in the fetal brain, microglia in the tachyzoite related lesions and corresponding brain areas of the control group of fetuses dissected on gestation day 40 and 48 were classified as activated and non-activated using Imaris surface classification (Supplementary Figure 4). This revealed that tachyzoite related lesions contain a higher proportion of amoeboid to ramified microglia than corresponding control areas. Together, this indicates that a fetal immune response against *T. gondii* associated with the presence of formation of activated microglia nodules is established in the brain of *T. gondii* infected fetuses as early as gestation day 40.



Supplementary Fig. 4: Microglia classification. Immunohistochemistry for activated (red) and non-activated (red) microglia on 30 μm brain cryosection of a fetus of a control (a) or infected (b) dam dissected on gestation day 40. Scale bars, 15 μm . Imaris surface classification was used to analyze the microglia accordingly. (c) Classification of the proportions of voxels representing activated or non-activated microglia. Microglia were analyzed in a 200 x 200 μm area including a tachyzoite cluster of guinea pig fetuses of dams inoculated with *T. gondii* on gestation day 23 and from a 200 x 200 μm area covering the same brain region of control fetuses, dissected on gestation day 40 and 48. Data in represent mean \pm SEM and are from 15 *T. gondii* tachyzoite clusters observed in 5 fetuses dissected on gestation day 40 and 48 (Figure 2) and the corresponding regions of the control groups. ****, $P < 0.0001$, $df = 28$.

Secondary to microglia, astroglia may be recruited to the site of inflammation in the brain (MATEJUK and RANSOHOFF 2020), which is represented by an increased expression of GFAP (RODRÍGUEZ et al. 2022). In order to analyze whether astrocytes contribute to the immune response in foci of *T. gondii* tachyzoites, we analyzed the adjacent section of the brain section, in which *T. gondii* tachyzoites were detected on gestation day 48, by immunohistochemistry for GFAP (Fig. 8a, b). Quantification of the GFAP labelling intensity in the tachyzoite related lesions and corresponding brain areas of the control group revealed no significant difference between the control and infection group (Fig. 8c). This indicates that parasitic lesions are not associated with focal or multifocal astroglia in the brain of guinea pig fetuses 25 days after inoculation of dams with *T. gondii*.

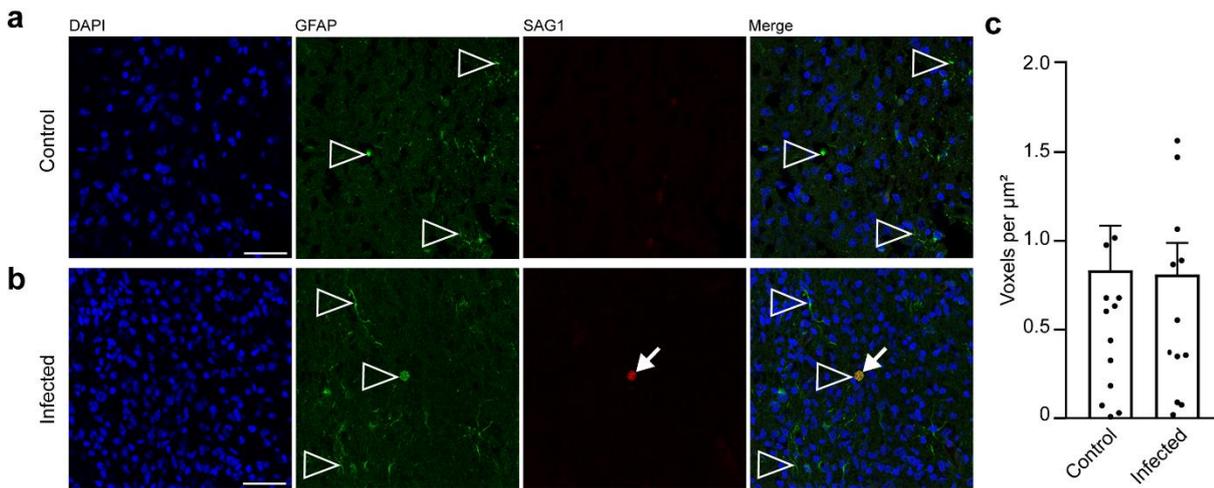


Fig. 8 Localization of astroglia in foci of *T. gondii* tachyzoite clusters in the fetal guinea pig brain. **a** and **b** DAPI staining (blue) and immunofluorescence for GFAP (green) and SAG1 (red) on 30 μm brain cryosections of guinea pig fetuses of control (**a**) or infected (**b**) dams dissected on gestation day 48. Dams were inoculated with *T. gondii* on gestation day 23. Scale bar, 50 μm . Arrowheads indicate GFAP+ astroglia. Arrows indicate SAG1+ *T. gondii* tachyzoites. (**c**) Quantification of GFAP labelling intensity as detected by immunofluorescence labeling for GFAP. Intensities were quantified in a 200 x 200 μm area including a tachyzoite cluster of guinea pig fetuses of dams inoculated with *T. gondii* on gestation day 23 and from a 200 x 200 μm area covering the same brain region of control fetuses, dissected on day 40 and 48. Results were expressed as voxels per μm^2 . Data represent mean \pm SEM and are from 15 *T. gondii* tachyzoite clusters observed in 5 fetuses dissected on gestation day 40 and 48 (Figure 2) and the corresponding regions of the control groups. ($P = 0.4688$, $df = 28$, $n = 15$). Dots not displayed: Control: 3.54, 2.52, Infected: 2.51.

Discussion

This project provides novel and fundamental contributions to the understanding of the pathogenesis of congenital toxoplasmosis, specifically in the context of neocortex development and alterations of fetuses infected with *T. gondii*. We have previously established the guinea pig as a highly suitable animal model for human congenital toxoplasmosis in an attempt to overcome difficulties in performing clinical studies in pregnant women and in evaluating work in cell and tissue culture systems that fail to re-capitulate the complexity of a living animal (GROCHOW et al. 2021). Since all dams survived and no resorptions, abortions or stillbirth of fetuses were observed during the entire trial, our data confirm that oral administration of 100 *T. gondii* oocysts of the ME49 strain in the beginning of the second trimester of gestation, i.e. on gestation day 23, has no major impact on the guinea pig dam and offspring survival rate (GROCHOW et al. 2021). Moreover, we show that the administration of *T. gondii* oocysts to the dams has no negative effect on litter size.

We found no *T. gondii* DNA in the wide range of tissues and organs investigated, i.e. brain, heart, liver, lung, spleen, muscle, placenta and amniotic fluid, of fetuses dissected on gestation day 33, indicating that 10 days are not sufficient for a significant congenital transmission of the parasite and subsequent infection of the guinea pig fetus. When fetuses dissected on gestation days 40 and 48 were analyzed, *T.*

Publikationen

gondii DNA was in two or more tissues or organs of each fetus, revealing that the parasite is stably transmitted to a larger extent to and replicates in the fetus 17 and 25 days after oral inoculation of the dam. These data are in line with a former study (FLORI et al. 2003), in which pregnant guinea pigs were orally inoculated with 100 tissue cysts of the 76 K strain. We previously observed that the duration a pregnant dam is infected affects the *T. gondii* load in the guinea pig offspring (GROCHOW et al. 2021). Indeed, this study shows that longer duration of *T. gondii* infection results in higher *T. gondii* DNA load in the extra-embryonic amniotic fluid. However, no differences in *T. gondii* DNA load were observed within the intra-embryonic tissues and organs. Given that in our previous study (GROCHOW et al. 2021), the duration of *T. gondii* incubation was up to 51 days, we suppose that the timespan, i.e. 8 days, between the two infection groups analyzed in this study was simply not long enough for any significant changes in the *T. gondii* DNA loads of the fetal tissues and organs to occur. Upon infection for 17 days, we observed no significant differences in the *T. gondii* DNA load between any of the fetal tissues and organs analyzed, which is consistent with previously published data (GROCHOW et al. 2021). Interestingly, when animals were analyzed after 25 days of inoculation, highest median *T. gondii* DNA loads in the fetus were observed in the brain. Moreover, the fetal brain possesses a remarkably high *T. gondii* positivity rate in both infection groups analyzed. Together, this confirms that the brain constitutes a preferred host organ of *T. gondii* in mammals including human (FLORI et al. 2003, PUSCH et al. 2009, WANG et al. 2011, MÜLLER et al. 2017, DARD et al. 2018, SAMOJŁOWICZ et al. 2019, GROCHOW et al. 2021).

All *T. gondii* tachyzoites were located in the forebrain of guinea pig fetuses, mostly in the telencephalic basal nuclei and neocortex, which is in line with published data obtained in postnatal mammals including mice and human showing high *T. gondii* cyst burden to be present in the telencephalon including the amygdala, hippocampus and various parts of the pallium such as the entorhinal, somatosensory, motor, orbital, frontal association and visual cortex (VYAS et al. 2007, DI CRISTINA et al. 2008, BERENREITEROVÁ et al. 2011). Moreover, we found *T. gondii* tachyzoites to be present in the choroid plexus and the lateral ventricle, thus providing further evidence for the notion that translocation across the choroid plexus and cerebrospinal fluid is a means for *T. gondii* to enter the brain (FIGUEIREDO et al. 2022, ROSS et al. 2022).

This study provides important new data on the in vivo host cells of *T. gondii* in the offspring neocortex before birth. Similar to in vivo data in the adult brain demonstrating that neurons and astrocytes represent targets of *T. gondii*, we observed *T. gondii* to infect neurons and astrocytes in the brain of guinea pig fetuses following the parasite's vertical transmission (FERGUSON and HUTCHISON 1987, MELZER et al. 2010, CABRAL et al. 2016, MENDEZ and KOSHY 2017). In this regard it is of great importance that NPCs are almost exclusively present in high abundance in the prenatal neocortex (FIETZ and HUTTNER 2011, DEHAY et al. 2015, MOLNÁR et al. 2019, KALUSA et al. 2021, VILLALBA et al. 2021, ANDREWS et al. 2022, VAID and HUTTNER 2022). Indeed, this study reveals that *T. gondii* infects NPCs in the brain of guinea pig fetuses congenitally infected with the parasite. These data are consistent with in vitro studies using a primary murine NPC culture (MARCOS et al. 2020, PIRES et al. 2021). As a result of congenital infection, we found the total number of BPs, which are known to generate the majority of cortical neurons (HAUBENSAK et al. 2004, MIYATA et al. 2004, NOCTOR et al. 2004, HANSEN et al. 2010, BETIZEAU et al. 2013) to be markedly reduced in the neocortex of guinea pig fetuses during mid-neurogenesis. Specifically, we found the reduction in BP number to be mainly attributed to the Pax6+/Tbr2+ BP subtype population. On the assumption that sustained Pax6 expression in NPCs is linked to higher cell proliferation (BETIZEAU et al. 2013, WONG et al. 2015),

Publikationen

our data suggest that proliferative BPs committed to the neuronal lineage are most affected by *T. gondii* infection. As delaying the switch of symmetric proliferative NPC divisions to asymmetric neurogenic NPC divisions results in an exponential accumulation of neurons over time (STEPIEN et al. 2021), one would assume that the impact of reduced BP proliferation on neuron count manifests during final stages of neurogenesis. Indeed, our data reveal that the number of neurons is significantly reduced in the neocortex of fetuses infected with *T. gondii* on gestation 48, i.e. at end-neurogenesis when compared to healthy controls. These data confirm previous studies in children showing prenatal infection with *T. gondii* is associated with microcephaly (CAPOBIANGO et al. 2014, MCAULEY 2014). Importantly, given that the reduction in neuron number is not primarily linked to an increase in neuronal cell death, our findings also indicate that, instead of neuron loss, impaired neurogenesis may underlie the reduction in neuron number observed in the neocortex of offspring congenitally infected with *T. gondii*.

Again, the reduction in BP cell counts observed in the neocortex of *T. gondii* infected fetuses was not associated with an increase in their cell death. Similarly, in vitro data using a primary murine NPC culture showed that an infection by the ME49 strain of *T. gondii* results in reduced NPC proliferation with no apoptosis induction (PIRES et al. 2021). In this regard it is interesting to note that *T. gondii* infection has been shown to result in dysregulation of the host cell cycle, specifically to arrest host cell cycle before progression to mitosis (BRUNET et al. 2008, MOLESTINA et al. 2008, KIM et al. 2016). Moreover, recent data indicate that *T. gondii* induces a M cell cycle arrest by propagating chromosome segregation errors, mitotic spindle alteration and blockage of cytokinesis progression in primary bovine endothelial cells (VELÁSQUEZ et al. 2019). Therefore, one possible scenario might be that alterations in the BP cell cycle progression, specifically a blockage of its cell division rate, may explain the decrease in neurogenesis of the neocortex of *T. gondii* infected fetuses. Interestingly, *T. gondii* is able to inject effector proteins, e. g. rhoptry proteins, into cells it does not invade with the injected cells exceeding the infected cells many times over (KOSHY et al. 2012). In this regard it is interesting to note, that *T. gondii* rhoptry protein ROP16 has been found to partially mediate cell cycle arrest in a human neuroblastoma cell line (CHANG et al. 2015). Hence, it could be assumed that *T. gondii* invasion and secretion of *T. gondii* effector proteins into distinct NPCs collectively subvert their functions leading to a global reduction in neurogenesis in infected fetuses. As an additional explanation, indirect environmental effects from the host response, e.g. from microglia may contribute to the observed reduction of the BP cell pool. Future studies will focus on the cellular and molecular alterations including the mode and rate of cell division of NPCs in the fetal brain induced by *T. gondii* as well as the specific molecular mechanisms that play a role in parasite invasion, proliferation, clearing of cells and injection of effector proteins in the fetal brain. To precisely determine *T. gondii* cell tropism in the fetal brain, highly sensitive methods, e.g. flow cytometry, should be used to complement the data provided by this study.

Moreover, our data indicate that congenital *T. gondii* infection does not affect the number of astrocytes in the fetal guinea pig brain, thus confirming the results of a recent in vitro study using a primary murine NPC culture, in which no alterations in the number of astrocytes were observed upon *T. gondii* infection (MARCOS et al. 2020). NPCs are known to generate glial cells including astrocytes at later stages of cortical development once neurogenesis is mostly complete (LEE et al. 2000, ROWITCH and KRIEGSTEIN 2010). As we found no alteration in the number of Pax6+/Tbr2- NPC BPs, which are not committed to the neuronal lineage, it is very likely that the generation of astrocytes – contrary to that of neurons – by NCPs is not affected in the neocortex of guinea pig fetuses upon vertical *T. gondii*

Publikationen

transmission, which in turn implies that distinct NPC subtypes differ in their susceptibility to *T. gondii* infection. However, as astrocytes – in contrast to neurons – maintain the ability to self-renew (ROBEL et al. 2011, LANGE CANHOS et al. 2021), it cannot be ruled out that a decrease in astrocyte generation by NPCs was compensated by increased in astrocyte proliferation, leading to recovery of their quantity.

After birth, *T. gondii* infection of the central nervous system triggers an immune response by microglia, the resident immune cells of the brain and spinal cord, during the acute phase of infection (CHIEBAO et al. 2021, COWAN et al. 2022). We previously observed focal or multifocal microglioses in the neocortex of newborn guinea pigs prenatally infected with *T. gondii* (GROCHOW et al. 2021). During prenatal development, microglia start to colonize the brain concurrently with neurogenesis and prior to the generation of other glial cells (VERNEY et al. 2010, SCHLEGELMILCH et al. 2011, SWINNEN et al. 2013, TAY et al. 2017). As such, they might play various roles and are involved in neurogenesis, gliogenesis, and neuronal circuit formation (HATTORI 2022). Here, we show that the fetal guinea pig neocortex is populated by microglia as early as day 40 of gestation, i.e. during mid-neurogenesis. We found that congenital *T. gondii* infection results in the formation of activated microglia nodules in the guinea pig fetal brain in the second and third trimester of gestation, i.e. on gestation days 40 and 48, which suggests that microglia generate immune responses, specifically contributing to host defense of the brain against *T. gondii*, long before birth. Microglia are able to induce the activation of astrocytes, which may act as immunocompetent cells by secreting inflammatory cytokines and producing reactive oxygen species (BRAHMACHARI et al. 2006, MATEJUK and RANSOHOFF 2020). Indeed, previous data showed activated astrocytes to be associated with foci of microglia containing *T. gondii* tachyzoite clusters in the adult murine cortex following reactivation of chronic brain infection (DELLACASA-LINDBERG et al. 2011). However, in this study no signs of focal astrogliosis associated with *T. gondii* tachyzoite clusters in the guinea pig brain were observed on gestation day 48. Given the time span of 25 days between inoculation of dams and analysis of the fetal brain, it is likely that this time window is too short for astrocytes to become activated to a large extent. Therefore, future studies using longer incubation periods and specific markers of astrocyte activation will reveal whether astrocytes - in addition to microglia - are part of the host defense against *T. gondii* in the fetal brain following congenital infection.

In summary, our data reveal that the neocortex is a major target region of *T. gondii* in fetuses of congenitally infected guinea pigs. We show for the first time that *T. gondii* infects NPCs, neurons and astrocytes in the fetal brain. Our results indicate that the reduction in neuron numbers observed in the neocortex of offspring congenitally infected with *T. gondii* is associated with its reduced generation and that microglia activation and recruitment to *T. gondii* tachyzoites is already established during the period of mid-neurogenesis. Together, our findings contribute considerably to the understanding of the cortical malformations observed in individuals congenitally infected with *T. gondii* and help to establish new treatments and solutions for congenital toxoplasmosis.

Methods

Ethics and animal welfare approval

Publikationen

All animal experiments were performed in accordance with German animal welfare legislation. The guinea pig study was approved by the Landesdirektion Sachsen (TVV 45/17, DD24.1-5131./390/47) and infection of cats to provide oocyst infection material was permitted by the ethics commission of the Animal Care and Use Committee of the German Lower Saxony State Office for Consumer Protection and Food Safety (Niedersaechsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit; reference number 33.19 42502-05-17A206).

Animals

Female Dunkin Hartley guinea pigs (n=18) were obtained from Charles River Laboratories (Ecully, France) and housed in the animal-care facility of the Institute of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig, Leipzig, Germany under previously described conditions (GROCHOW et al. 2021). In brief, dams were kept in groups of two in 50 x 70 x 50 cm wire mesh cages and provided water supplemented with 400 mg/l ascorbic acid, standard diet pellets (Altromin Spezialfutter, Lage, Germany) and fresh vegetables ad libitum. Room temperature was maintained at 19-25 °C and relative humidity at 55% ($\pm 10\%$). Light and dark cycle was set to 12:12 h. All dams were assessed daily based on a scoring system (Supplementary Table 1) during the entire trial.

Mating and pregnancy examination

Dams were mated at the animal-care facility of the Institute of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig, Germany. Before, their sexual cycle was synchronized by oral administration of Altrenogest (Regumate® Equine 2,2mg/ml, MSD Tiergesundheit, Unterschleißheim, Germany) at 0.22 mg/kg body weight once a day for 15 days (GROCHOW et al. 2021). Natural mating was initiated two days after the end of treatment by housing four females with one breeding ram for 4 days. Successful pregnancy was examined by ultrasound scan using GE Logiq 400 CL (pet mode, 7-10 MHz sample, GE Healthcare, Solingen, Germany). The day of successful mating is considered as gestation day 0 \pm 2 (GROCHOW et al. 2021). During ultrasound scan, the reproductive system, i.e. ovary and uterus wall, of all dams was examined.

Serological investigation

Blood samples of all dams were collected from the Vena saphena lateralis immediately before infection and centrifuged (2500 x g, 10 min, 4 °C). Serum was analyzed by immunoblotting against *T. gondii* surface antigen p30 (SAG1) as previously described (BURRELLS et al. 2018), but using a peroxidase conjugated anti-guinea pig IgG (H + L, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA) instead of a peroxidase conjugated anti-mouse IgG.

Infection

T. gondii oocysts (Strain ME49) were provided by the Institute of Parasitology, University of Veterinary Medicine Hannover, Germany. Oocysts were generated as previously described (GROCHOW et al.

Publikationen

2021). In brief, seronegative cats were given meat supplemented with brain, muscle, liver and spleen of guinea pigs chronically infected with *T. gondii*. Cat feces were purified using a sucrose solution gradient. Isolated oocysts were stored in 2% sulfuric acid at 4 °C for 1.5-2.5 months. Immediately before infection, 1 M sodium hydroxide solution was added to the oocyst suspension. Sporulated oocysts were quantified using a Neubauer-Improved cell counting chamber (Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen, Germany). Oocysts were suspended in 500 µl phosphate buffered saline (PBS) and administered orally with a 16 G buttoned cannula (Henry Schein Dental, Langen, Germany). Guinea pigs were randomly divided into a control ($n = 9$) and infection ($n = 9$) group. Dams of the infection group were administered 100 oocysts on gestation day 23. Dams of the control group received 500 µl PBS solution only.

Euthanasia and dissection

Three dams and their corresponding litters of the control and infection group were euthanized by intraperitoneal injection of 500 mg/kg pentobarbital sodium on gestation day 33, 40 and 48, respectively. Fetuses were carefully dissected, and tissue samples were obtained from fetal brain, heart, liver, spleen, quadriceps femoris muscle, fetal placenta and amniotic fluid. Up to 600 mg of tissue was sampled per location. In case the entire tissue or organ weighed more, samples were taken randomly from at least 4 different regions. Except for the brain, the entire tissue and organ samples were frozen at -80 °C until further processing. Immediately after the removal of the brain, the cerebral hemispheres were separated. One cerebral hemisphere was frozen at -80 °C and used for qPCR. The other cerebral hemisphere was fixed in 4% paraformaldehyde for 4 days, stored in PBS at 4°C and used for immunohistochemistry.

Tissue homogenization and DNA Extraction

Fetal tissue samples were processed using NucleoMag-Tissue kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) according to the manufacturer's instructions with the following modifications: tissue samples (up to 600 mg) were incubated with lysis buffer (T1) supplied with the NucleoMag-Tissue kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) at ratio 1:2 and two stainless steel balls (diameter 6 mm, TIS Wälzkörpertechnologie, Gauting, Germany) were added. The sample solution was homogenized using a TissueLyser II (Qiagen, Hilden, Germany) at 3000 Hz for 60 sec. Next, proteinase K of the NucleoMag-Tissue kit was added to the sample solution at ratio 1:10 and the solution was incubated at 56 °C overnight. 220 µl of lysate, corresponding to 100 mg of starting material, was used for all further extraction steps that were carried out using a King Fisher Flex resulting in 100 µl purified DNA (ThermoScientific, Waltham, USA).

Quantitative PCR

A probe-based qPCR was applied, in which the 529 bp repeat element, characterized by high specificity and sensitivity for detection of *T. gondii*, was used as a sequence (BELAZ et al. 2015, BIER et al. 2019). For all tissue and organ samples, qPCR was carried out as follows: primers and probes (MWG-Biotech, Ebersberg, Germany) were applied as previously described according to the assay protocol "Toxo529REP PCR" (Supplementary Table 3, TALABANI et al. 2009, GROCHOW et al. 2021). An internal control according to HOFFMANN et al. (2006) was used for inhibition detection as previously described (Supplementary Table 3, SCHARES et al. 2020, GROCHOW et al. 2021). When a negative

Publikationen

result was due to PCR inhibition, the respective data was excluded from the data analysis. qPCR reactions were carried out in a CFX96 cycler (Biorad Laboratories, Kabelsketal, Germany) using 10 µl of purified DNA and the PerfeCTa MultiPlex qPCR ToughMix (VWR International, Dresden, Germany). qPCR conditions were as follows: 2 min at 50 °C and 10 min at 95 °C (initial denaturation). This was followed by 55 cycles, each consisting of 15 sec at 95 °C (denaturation) and 1 min at 60 °C (hybridization and elongation). All qPCR results were evaluated using the CFX manager software version 1.6 (Biorad Laboratories, Kabelsketal, Germany). PCR results with a quantification cycle (Ct) equal to or higher than 40 were stated as Ct = 40 and considered as negative (GROCHOW et al. 2021). Brains of fetuses, whose Ct value was below 35 were included in the immunohistochemistry analysis. To establish a standard curve, tachyzoites were extracted from cell culture under the same conditions. Different negative extracts (guinea pig brain and muscle) were used for a 10-fold dilution series (2.8 x 10¹ to 2.8 x 10⁵) in quintuplicates. The parameters for this semi-logarithmic standard curve are as follows: $y = 3.406x + 36.36$, $R^2 = 0.9977$, $E = 96.6\%$. Using this curve, Ct values were translated into genomic equivalents of tachyzoites.

Supplementary Table 3. Primers, probes and their final concentrations in *Toxoplasma gondii* real-time qPCR assay.

Assay	Names of primers and probes	Sequences of primers and probes 5'-3'	Probe labelling	Final concentration	Reference
Toxo529REP PCR	TalF	TGG TTG GGA AGC GAC GAG AG		800 nM	Talabani et al. 2009
	TalR	CAT CAC CAC GAG GAA AGC GTC		800 nM	Talabani et al. 2009
	TalP1_FAM	TGT CGT GCC AGC TGC ATT A	5'-FAM, 3'-BHQ1	200 nM	Talabani et al. 2009
Internal control PCR, IC2 PCR	EGFP1-F	GAC CAC TAC CAG CAG AAC AC		500 nM	Hoffmann et al. 2006
	EGFP2-R	GAA CTC CAG CAG GAC CAT G		500 nM	Hoffmann et al. 2006
	EGFP1-Hex	AGC ACC CAG TCC GCC CTG AGC A	5'-HEX, 3'-BHQ1	160 nM	Hoffmann et al. 2006

Immunocytochemistry

Cerebral hemispheres were processed and subjected to an immunohistochemistry protocol as described previously (SAUERLAND et al. 2018). In brief, fixed hemispheres were dehydrated in 30% sucrose in PBS at room temperature, embedded in Tissue-Tek (Sakura Finetek, Staufen im Breisgau, Germany) and stored at -20 °C. Sections were cut at 30 µm using a Leica cryostat (Leica CM1850, Leica Biosystems, Wetzlar, Germany) and stored at -20 °C. Complete brain was cut coronally.

For analysis of regional tropism of *T. gondii* tachyzoites, five randomly chosen sections per brain of all fetuses with Ct value below 35 were used. For analysis of *T. gondii* host cells, 6-8 sections per brain in close proximity to the section, in which *T. gondii* tachyzoites observed, were analyzed. For quantification of neurons, NPCs, apoptosis and astrocytes in the neocortex, the section at a medium position of the lateral ventricle with regard to the rostro-caudal axis per brain of all fetuses with Ct value

Publikationen

below 35 was used. For analysis of focal micro- and astrogliosis, the adjacent section, to which *T. gondii* tachyzoites were observed, was evaluated.

Sections for Pax6, Tbr2 and Hu C/D immunohistochemistry were subjected to an antigen retrieval protocol by heating sections for 1 h at 90 °C in 0.01 M citrate buffer (pH 6). All sections were permeabilized with 0.3% Triton X-100 in PBS and quenched with 0.1 M glycine. Antibodies were diluted in 0.2% gelatine-PBS. Primary antibodies were incubated overnight at 4 °C and secondary antibodies were incubated for 1h at room temperature. The following primary antibodies were used: Pax6 (1:200, rabbit, Biologend, London, United Kingdom, 901301), Tbr2 (1:200, sheep, R&D Systems, Abingdon, United Kingdom, AF6166), Hu C/D (1:500, rabbit, Abcam, Amsterdam, Netherlands, ab184267), neurofilament H (1:500, chicken, Abcam, Amsterdam, Netherlands, ab8135), SAG1 (1:1200, mouse, Bio-Rad Laboratories, Feldkirchen, Germany, 9070-2020), MAP2 (1:1000, chicken, Abcam, Amsterdam, Netherlands, ab5392), GFAP (1:500, rabbit, antibodies.com, Cambridge, United Kingdom, A85419), caspase 3 (1:400, rabbit, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany, C8487) and IBA1 (1:500, rabbit, SynapticSystems, Göttingen, Germany, 234003). Pax6, Tbr2, Hu C/D, neurofilament H, MAP2 and GFAP antibodies have previously been successfully used in the immunohistochemistry analysis of fetal guinea pig brain tissue (KALUSA et al. 2021). Dolichos biflorus agglutinin FITC-conjugated were obtained from Biozol (1:200, Eching, Germany, VEC-FL-1031- 5). Donkey secondary antibodies coupled to Alexa Fluor® 488 chicken (A11039), mouse (A21202), and rat (A21208), Alexa Fluor® 555 mouse (A31570) and rabbit (A31572), Alexa Fluor® 647 sheep (A21448) (1:500, Invitrogen, Darmstadt, Germany) and Alexa Fluor® 647 chicken (703-606-155) (1:500, Jackson ImmunoResearch Europe, Ely, UK) were used. All sections were counterstained with DAPI (1:500, Sigma, Taufkirchen, Germany), mounted in Mowiol (Merck Biosciences, Darmstadt, Germany), coverslipped and kept at 4 °C.

Confocal Laser Scanning Microscopy and Deconvolution

Brain sections were imaged with a confocal laser scanning microscope (CLSM) Leica TCS SP8 (Leica Microsystems, Mannheim, Germany), using the software Leica Application Suite X (LAS-X 3.5.7). Images were acquired using the following microscope settings: bidirectional scan, scan speed 600 Hz, pinhole 1 Airy unit, and 3x line averaging. Sequential scanning of each channel separately was used to minimize cross talk between applied dyes. DAPI was excited at 405 nm (PMT detection range: 493 – 541 nm), Alexa Fluor® 488 at 488 nm (PMT detection range 493 – 541 nm), Alexa Fluor® 555 at 561 nm (HyD detection range 565 – 618 nm), and Alexa Fluor® 647 at 633 nm (HyD detection range 648 – 699 nm). The transmission (attenuator value) of each laser line was set so that the signal (8 bit-encoding) was just above saturation.

For analysis of regional tropism of *T. gondii* tachyzoites, tachyzoite clusters were manually determined under transmitted light using a 40x/1.10 W objective. For analysis of *T. gondii* host cells, a 63x/1.2 W objective was used and a scan resolution equivalent to a voxel size of 69 x 69 x 356 nm. Image stacks consisting of up to 61 layers were recorded to ensure that the entire parasite and compartment of the infected host cell was completely included. For quantification of neurons, NPCs and apoptosis, and of Iba1 and GFAP labelling intensity, a 40x/1.10 W objective was used and a scan resolution equivalent to a voxel size of 75 x 75 x 200 nm. Tile scans were recorded as z-stacks consisting of up to 5 layers.

Publikationen

Deconvolution of CLSM images, using Huygens Professional, version 20.10 (SVI, Hilversum, The Netherlands), was applied to reduce optical aberrations and to correct for the discrepancy in refractive indices (IR) of the embedding (IR = 1.49) and immersion media (IR = 1.33). Microscopic parameters were set according to the image metadata. A theoretical point spread function was used, and the following deconvolution parameters were set for batch processing with the Classic Maximum Likelihood Estimation (CMLE) algorithm: maximum iterations = 40, quality change threshold = 0.01, signal-to-noise ratio = 6.6667. Background for images of *T. gondii* host cell analysis and quantification of apoptosis and Iba1 and GFAP labelling intensity, all channels = 0. Background for images of quantification of neurons and NPCs: DAPI = 10.5, Alexa Fluor® 488 = 12, Alexa Fluor® 647 = 8.

Data Analysis

The ventricular zone (VZ), subventricular zone (SVZ), intermediate zone (IZ) and cortical plate (CP) were identified based on their cytoarchitecture and, in case of the SVZ, based on the presence and abundance of Tbr2 positive nuclei. In brief, the VZ represents a densely packed cell layer lining the lateral ventricle and whose nuclei exhibit radial morphology. The SVZ is located basally to the VZ and exhibits a looser and sparser cell arrangement than the VZ. The apical border of the SVZ is marked by the presence of a continuous Tbr2 positive nuclear layer. The IZ contains very low cell density and lies between the SVZ and the CP. The CP is a cell layer adjacent to the IZ, which represents a high cell density and radially aligned nuclei.

Imaris 9.7.2 (Oxford Instruments, Abingdon, UK) was used for image analysis. For quantification of neurons, NPCs and apoptosis, and of Iba1 and GFAP labelling intensity, only the middle layer of the z-stacks was used.

For quantification of neurons and NPCs, colocalization between channels for DAPI and Hu C/D, DAPI and Pax6, DAPI and Tbr2, DAPI and Pax6 and Tbr2 was displayed. Intensity thresholds for corresponding channels were set as follows: DAPI = 10.5, Hu C/D = 9, Pax6 and Tbr2 = 13 each. The segmentation of colocalized signals was achieved by the following settings: surface detail = 0.2 μm , thresholding: background subtraction, diameters of largest sphere = 6 μm , manual threshold value: DAPI and Hu C/D = 2, DAPI and Pax6 = 8, DAPI and Tbr2 = 8, DAPI and Pax6 and Tbr2 = 4.5, seed point diameter = 6 μm , quality: DAPI and Hu C/D > 1, DAPI and Pax6 > 2, DAPI and Tbr2 > 2, DAPI and Pax6 and Tbr2 > 1.8. If nuclei of individual cells were displayed as merged objects by automatic segmentation, these objects were separated manually. The number of cells was quantified in a rectangle spanning the corresponding cortical zone with an apical edge length of 100 μm .

For astrocyte analysis in the neocortex, the number of voxels representing GFAP labelling with intensities greater than 50 out of 255 (8-bit coding) was quantified in a rectangle spanning entire cortical wall with an apical edge length of 100 μm . Apoptotic cells were quantified in a rectangle spanning the entire cortical wall with an apical edge length of 100 μm . Cells with a caspase-3 fluorescence intensity of more than 50 out of 255 (8-bit coding) and nuclear changes (e.g. segmentations) detected in the DAPI signal were considered as positive (Supplementary Fig. 3). For analysis of focal micro- and astrogliosis, Iba1 and GFAP labelling was analyzed in a 200 x 200 μm area around the tachyzoite clusters and of the same region in the brain of the control group was analyzed. The number of voxels representing Iba1 and GFAP labelling with intensities greater than 50 out of 255 (8-bit coding) was quantified and the results were expressed as voxels per μm^2 (voxels projected onto an image area). Subsequently, microglia in this

Publikationen

area were classified according to activated and non-activated using Imaris 9.9.1 (Oxford Instruments, Abingdon, UK). Surface rendering of all 5 z-stacks was used with the following parameters: surface detail = 0.2 μm , thresholding: absolute intensity 12.7, filter bounding box 250 x 250 nm. All objects consisting of less than 894 voxels (equivalent to a projected area of 1 μm^2) were considered ramified, i.e., non-activated, and all objects that were larger were considered amoeboid, i.e., activated. Data were shown as a proportion of the respective microglia population. After data analysis, Adobe Photoshop was used for better visualization using selective gradation curve fitting of the weak DAPI-signal on the nuclei of *T. gondii* in Figs. 2, 3, and Supplementary Fig. 1 and for a general gradation curve fitting of all channels in Figs. 4 to 7 and Supplementary Fig. 1 and 3.

Statistics and reproducibility

Statistical analysis was performed using Graphpad Prism 9.4.1 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA) software. Normal distribution of all parameters was tested by Anderson-Darling test and Shapiro-Wilk test. *T. gondii* DNA loads obtained by qPCR analysis and number of apoptotic cells were not normally distributed and analyzed by Mann-Whitney test (for comparison of two groups) and Kruskal-Wallis test (for comparison of more than two groups) followed by Dunn's *post hoc* test. All other data were normally distributed and analyzed using one tailed unpaired t-test. *P* values < 0.05 were considered statistically significant. Significance levels were split further as to $**P < 0.01$, $***P < 0.001$, $****P < 0.0001$.

Data availability

Data generated and analyzed during this study are included in this published article or can be obtained from the corresponding author (Simone.fietz@vetmed.uni-leipzig.de) on request.

References

- Aguirre AA, Longcore T, Barbieri M, Dabritz H, Hill D, Klein PN, Lepczyk C, Lilly EL, McLeod R, Milcarsky J, Murphy CE, Su C, VanWormer E, Yolken R, Sizemore GC. The one health approach to toxoplasmosis: Epidemiology, control, and prevention strategies. *EcoHealth* 2019;16:378–90. doi: 10.1007/s10393-019-01405-7.
- Andrews MG, Subramanian L, Salma J, Kriegstein AR. How mechanisms of stem cell polarity shape the human cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci*. 2022;23:711–24. doi: 10.1038/s41583-022-00631-3.
- Angevine JB, Sidman RL. Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse. *Nature*. 1961;192:766–8. doi: 10.1038/192766b0.
- Attias M, Teixeira DE, Benchimol M, Vommaro RC, Crepaldi PH, Souza W de. The life-cycle of *Toxoplasma gondii* reviewed using animations. *Parasit Vectors*. 2020;13:588. doi: 10.1186/s13071-020-04445-z.
- Barami K, Iversen K, Furneaux H, Goldman SA. Hu protein as an early marker of neuronal phenotypic differentiation by subependymal zone cells of the adult songbird forebrain. *J Neurobiol*. 1995;28:82–101. doi: 10.1002/neu.480280108.

Publikationen

- Belaz S, Gangneux J-P, Dupretz P, Guiguen C, Robert-Gangneux F. A ten-year retrospective comparison of two target sequences, REP-529 and B1, for *Toxoplasma gondii* detection by quantitative PCR. *J Clin Microbiol.* 2015;53:1294–300. doi: 10.1128/JCM.02900-14.
- Berenreiterová M, Flegr J, Kuběna AA, Němec P. The distribution of *Toxoplasma gondii* cysts in the brain of a mouse with latent toxoplasmosis: implications for the behavioral manipulation hypothesis. *PLoS ONE.* 2011;6:e28925. doi: 10.1371/journal.pone.0028925.
- Bernhardt R, Matus A. Light and electron microscopic studies of the distribution of microtubule-associated protein 2 in rat brain: a difference between dendritic and axonal cytoskeletons. *J Comp Neurol.* 1984;226:203–21. doi: 10.1002/cne.902260205.
- Betizeau M, Cortay V, Patti D, Pfister S, Gautier E, Bellemin-Ménard A, Afanassieff M, Huissoud C, Douglas RJ, Kennedy H, Dehay C. Precursor diversity and complexity of lineage relationships in the outer subventricular zone of the primate. *Neuron.* 2013;80:442–57. doi: 10.1016/j.neuron.2013.09.032.
- Bier NS, Schares G, Johne A, Martin A, Nöckler K, Mayer-Scholl A. Performance of three molecular methods for detection of *Toxoplasma gondii* in pork. *Food Waterborne Parasitol.* 2019;14:e00038. doi: 10.1016/j.fawpar.2019.e00038.
- Bigna JJ, Tochie JN, Tounouga DN, Bekolo AO, Ymele NS, Youda EL, Sime PS, Nansseu JR. Global, regional, and country seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in pregnant women: a systematic review, modelling and meta-analysis. *Sci Rep.* 2020;10:12102. doi: 10.1038/s41598-020-69078-9.
- Bignami A, Dahl D. Differentiation of astrocytes in the cerebellar cortex and the pyramidal tracts of the newborn rat. An immunofluorescence study with antibodies to a protein specific to astrocytes. *Brain Res.* 1973;49:393–402.
- Blader I, Coleman B, Chen C-T, Gubbels M-J. The lytic cycle of *Toxoplasma gondii*: 15 years later. *Annu Rev Microbiol.* 2015;69:463–85. doi: 10.1146/annurev-micro-091014-104100.
- Brahmachari S, Fung YK, Pahan K. Induction of glial fibrillary acidic protein expression in astrocytes by nitric oxide. *J Neurosci.* 2006;26:4930–9. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5480-05.2006.
- Brunet J, Pfaff AW, Abidi A, Unoki M, Nakamura Y, Guinard M, Klein J-P, Candolfi E, Mousli M. *Toxoplasma gondii* exploits UHRF1 and induces host cell cycle arrest at G2 to enable its proliferation. *Cell Microbiol.* 2008;10:908–20. doi: 10.1111/j.1462-5822.2007.01093.x.
- Burg JL, Perelman D, Kasper LH, Ware PL, Boothroyd JC. Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of *Toxoplasma gondii*. *J Immunol.* 1988;141:3584–91.
- Burrells A, Taroda A, Opsteegh M, Schares G, Benavides J, Dam-Deisz C, Bartley PM, Chianini F, Villena I, van der Giessen J, Innes EA, Katzer F. Detection and dissemination of *Toxoplasma gondii* in experimentally infected calves, a single test does not tell the whole story. *Parasit Vectors.* 2018;11. doi: 10.1186/s13071-018-2632-z.
- Cabral CM, Tuladhar S, Dietrich HK, Nguyen E, MacDonald WR, Trivedi T, Devineni A, Koshy AA. Neurons are the primary target cell for the brain-tropic intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog.* 2016;12:e1005447. doi: 10.1371/journal.ppat.1005447.
- Capobianco JD, Breganó RM, Navarro IT, Rezende Neto CP, Casella AMB, Mori FMRL, Pagliari S, Inoue IT, Reiche EMV. Congenital toxoplasmosis in a reference center of Paraná, Southern Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2014;18:364–71. doi: 10.1016/j.bjid.2013.11.009.

Publikationen

- Carden MJ, Trojanowski JQ, Schlaepfer WW, Lee VM. Two-stage expression of neurofilament polypeptides during rat neurogenesis with early establishment of adult phosphorylation patterns. *J Neurosci*. 1987;7:3489–504. doi: 10.1523/JNEUROSCI.07-11-03489.1987.
- Chang, S. et al. *Toxoplasma gondii* rhoptry protein ROP16 mediates partially SH-SY5Y cells apoptosis and cell cycle arrest by directing Ser15/37 Phosphorylation of p53. *Int J Biol Sci*. 11, 1215–1225 (2015).
- Chiebao DP, Bartley PM, Chianini F, Black LE, Burrells A, Pena HFJ, Soares RM, Innes EA, Katzer F. Early immune responses and parasite tissue distribution in mice experimentally infected with oocysts of either archetypal or non-archetypal genotypes of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology*. 2021;148:464–76. doi: 10.1017/S0031182020002346.
- Cook AJ, Gilbert RE, Buffolano W, Zufferey J, Petersen E, Jenum PA, Foulon W, Sempriani AE, Dunn DT. Sources of *Toxoplasma* infection in pregnant women: european multicentre case-control study. European Research Network on Congenital Toxoplasmosis. *BMJ*. 2000;321:142–7. doi: 10.1136/bmj.321.7254.142.
- Cowan MN, Sethi I, Harris TH. Microglia in CNS infections: insights from *Toxoplasma gondii* and other pathogens. *Trends Parasitol*. 2022;38:217–29. doi: 10.1016/j.pt.2021.12.004.
- Dard C, Marty P, Brenier-Pinchart M-P, Garnaud C, Fricker-Hidalgo H, Pelloux H, Pomares C. Management of toxoplasmosis in transplant recipients: an update. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2018;16:447–60. doi: 10.1080/14787210.2018.1483721.
- Dehay C, Kennedy H, Kosik KS. The outer subventricular zone and primate-specific cortical complexification. *Neuron*. 2015;85:683–94. doi: 10.1016/j.neuron.2014.12.060.
- Dellacasa-Lindberg I, Fuks JM, Arrighi RBG, Lambert H, Wallin RPA, Chambers BJ, Barragan A. Migratory activation of primary cortical microglia upon infection with *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun*. 2011;79:3046–52. doi: 10.1128/IAI.01042-10.
- Di Cristina M, Marocco D, Galizi R, Proietti C, Spaccapelo R, Crisanti A. Temporal and spatial distribution of *Toxoplasma gondii* differentiation into bradyzoites and tissue cyst formation *in vivo*. *Infect Immun*. 2008;76:3491–501. doi: 10.1128/IAI.00254-08.
- 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, Miller NL, Frenkel JK. The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. *J Exp Med*. 1970;132:636–62. doi: 10.1084/jem.132.4.636.
- Elsheikha HM. Congenital toxoplasmosis: priorities for further health promotion action. *Public Health*. 2008;122:335–53. doi: 10.1016/j.puhe.2007.08.009.
- Englund C, Fink A, Lau C, Pham D, Daza RAM, Bulfone A, Kowalczyk T, Hevner RF. Pax6, Tbr2, and Tbr1 are expressed sequentially by radial glia, intermediate progenitor cells, and postmitotic neurons in developing neocortex. *J. Neurosci*. 2005;25:247–51. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2899-04.2005.
- Ferguson DJ, Hutchison WM. The host-parasite relationship of *Toxoplasma gondii* in the brains of chronically infected mice. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*. 1987;411:39–43. doi: 10.1007/BF00734512.
- Fietz SA, Huttner WB. Cortical progenitor expansion, self-renewal and neurogenesis-a polarized perspective. *Curr Opin Neurobiol*. 2011;21:23–35. doi: 10.1016/j.conb.2010.10.002.

Publikationen

- Fietz SA, Kelava I, Vogt J, Wilsch-Bräuninger M, Stenzel D, Fish JL, Corbeil D, Riehn A, Distler W, Nitsch R, Huttner WB. OSVZ progenitors of human and ferret neocortex are epithelial-like and expand by integrin signaling. *Nat Neurosci*. 2010;13:690–9. doi: 10.1038/nn.2553.
- Figueiredo CA, Steffen J, Morton L, Arumugam S, Liesenfeld O, Deli MA, Kröger A, Schüler T, Dunay IR. Immune response and pathogen invasion at the choroid plexus in the onset of cerebral toxoplasmosis. *J Neuroinflammation* 2022;19:17. doi: 10.1186/s12974-021-02370-1.
- Filiano AJ, Gadani SP, Kipnis J. Interactions of innate and adaptive immunity in brain development and function. *Brain Res*. 2015;1617:18–27. doi: 10.1016/j.brainres.2014.07.050.
- Fischer HG, Nitzgen B, Reichmann G, Gross U, Hadding U. Host cells of *Toxoplasma gondii* encystation in infected primary culture from mouse brain. *Parasitol Res*. 1997;83:637–41. doi: 10.1007/s004360050311.
- Flori P, Hafid J, Bourlet T, Raberin H, Genin C, Sung RTM. Experimental model of congenital toxoplasmosis in guinea pigs: Use of quantitative and qualitative PCR for the study of maternofetal transmission. *J Med Microbiol*. 2002;51:871–8. doi: 10.1099/0022-1317-51-10-871.
- Flori P, Hafid J, Thonier V, Bellete B, Raberin H, Tran Manh Sung R. Parasite load in guinea pig foetus with real time PCR after maternofetal transmission of *Toxoplasma gondii*. *Parasite*. 2003;10:133–40. doi: 10.1051/parasite/2003102133.
- Gaggero, G. Campora M, Dose B, Taietti D, Vena A, Delfino E. Neuro-toxoplasmosis and fatal necrotizing cerebellitis. *Autops Case Rep*. 12, e2021363 (2022).
- Gilbert R, Tan HK, Cliffe S, Guy E, Stanford M. Symptomatic *Toxoplasma* infection due to congenital and postnatally acquired infection. *Arch Dis Child*. 2006;91:495–8. doi: 10.1136/adc.2005.088385.
- Ginhoux F, Lim S, Hoeffel G, Low D, Huber T. Origin and differentiation of microglia. *Front Cell Neurosci*. 2013;7:45. doi: 10.3389/fncel.2013.00045.
- Götz M, Stoykova A, Gruss P. Pax6 controls radial glia differentiation in the cerebral cortex. *Neuron*. 1998;21:1031–44. doi: 10.1016/s0896-6273(00)80621-2.
- Grochow T, Beck B, Rentería-Solís Z, Schares G, Maksimov P, Strube C, Seeger J, Raqué L, Ulrich R, Dauschies A, Fietz SA. Establishment and validation of a guinea pig model for human congenital toxoplasmosis. *Parasit Vectors*. 2021;14:389. doi: 10.1186/s13071-021-04890-4.
- Halonen SK, Weiss LM. Toxoplasmosis. *Handb Clin Neurol*. 2013;114:125–45. doi: 10.1016/B978-0-444-53490-3.00008-X.
- Hansen DV, Lui JH, Parker PRL, Kriegstein AR. Neurogenic radial glia in the outer subventricular zone of human neocortex. *Nature*. 2010;464:554–61. doi: 10.1038/nature08845.
- Hattori Y. The behavior and functions of embryonic microglia. *Anat Sci Int* 2022;97:1–14. doi: 10.1007/s12565-021-00631-w.
- Haubensak W, Attardo A, Denk W, Huttner WB. Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: a major site of neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:3196–201. doi: 10.1073/pnas.0308600100.
- Hoffmann B, Depner K, Schirrmeier H, Beer M. A universal heterologous internal control system for duplex real-time RT-PCR assays used in a detection system for pestiviruses. *J Virol Methods*. 2006;136:200–9. doi: 10.1016/j.jviromet.2006.05.020.

Publikationen

- Ito D, Imai Y, Ohsawa K, Nakajima K, Fukuuchi Y, Kohsaka S. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Brain Res Mol Brain Res*. 1998;57:1–9. doi: 10.1016/s0169-328x(98)00040-0.
- Jones JL, Lopez A, Wilson M, Schulkin J, Gibbs R. Congenital toxoplasmosis: a review. *Obstet Gynecol Surv*. 2001;56:296–305. doi: 10.1097/00006254-200105000-00025.
- Kálmán M, Hajós F. Distribution of glial fibrillary acidic protein (GFAP)-immunoreactive astrocytes in the rat brain. I. Forebrain. *Exp Brain Res*. 1989;78:147–63. doi: 10.1007/BF00230694.
- Kalusa M, Heinrich MD, Sauerland C, Morawski M, Fietz SA. Developmental differences in neocortex neurogenesis and maturation between the altricial dwarf rabbit and precocial guinea pig. *Front Neuroanat*. 2021;15:678385. doi: 10.3389/fnana.2021.678385.
- Kasper LH, Crabb JH, Pfefferkorn ER. Purification of a major membrane protein of *Toxoplasma gondii* by immunoabsorption with a monoclonal antibody. *J Immunol*. 1983;130:2407–12.
- Kelava I, Reillo I, Murayama AY, Kalinka AT, Stenzel D, Tomancak P, Matsuzaki F, Lebrand C, Sasaki E, Schwamborn JC, Okano H, Huttner WB, Borrell V. Abundant occurrence of basal radial glia in the subventricular zone of embryonic neocortex of a lissencephalic primate, the common marmoset *Callithrix jacchus*. *Cereb Cortex*. 2012;22:469–81. doi: 10.1093/cercor/bhr301.
- Kim MJ, Jung B-K, Cho J, Song H, Pyo K-H, Lee JM, Kim M-K, Chai J-Y. Exosomes secreted by *Toxoplasma gondii*-infected L6 cells: Their effects on host cell proliferation and cell cycle changes. *Korean J Parasitol*. 2016;54:147–54. doi: 10.3347/kjp.2016.54.2.147.
- Koshy, A. A. Koshy AA, Dietrich HK, Christian DA, Melehani JH, Shastri AJ, Hunter CA, Boothroyd JC. *Toxoplasma* co-opts host cells it does not invade. *PLoS Pathog*. 8, e1002825 (2012).
- Lange Canhos L, Chen M, Falk S, Popper B, Straub T, Götz M, Sirko S. Repetitive injury and absence of monocytes promote astrocyte self-renewal and neurological recovery. *Glia*. 2021;69:165–81. doi: 10.1002/glia.23893.
- Lee JC, Mayer-Proschel M, Rao MS. Gliogenesis in the central nervous system. *Glia*. 2000;30:105–21. doi: 10.1002/(sici)1098-1136(200004)30:2<105::aid-glia1>3.0.co;2-h.
- Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell*. 1990;60:585–95. doi: 10.1016/0092-8674(90)90662-X.
- Marcos AC, Siqueira M, Alvarez-Rosa L, Cascabulho CM, Waghbi MC, Barbosa HS, Adesse D, Stipursky J. *Toxoplasma gondii* infection impairs radial glia differentiation and its potential to modulate brain microvascular endothelial cell function in the cerebral cortex. *Microvasc Res*. 2020;131:104024. doi: 10.1016/j.mvr.2020.104024.
- Matejuk A, Ransohoff RM. Crosstalk between astrocytes and microglia: an overview. *Front Immunol*. 2020;11:1416. doi: 10.3389/fimmu.2020.01416.
- McAuley JB. Congenital toxoplasmosis. *J Pediatric Infect Dis Soc*. 2014;3 Suppl 1:S30-5. doi: 10.1093/jpids/piu077.
- Meireles LR, Ekman CCJ, Andrade HF de, Luna, Expedito José de Albuquerque. Human toxoplasmosis outbreaks and the agent infecting form. Findings from a systematic review. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2015;57:369–76. doi: 10.1590/S0036-46652015000500001.
- Melzer TC, Cranston HJ, Weiss LM, Halonen SK. Host Cell Preference of *Toxoplasma gondii* Cysts in Murine Brain: A Confocal Study. *J Neuroparasitology*. 2010;1. doi: 10.4303/jnp/N100505.

Publikationen

- Mendez OA, Koshy AA. *Toxoplasma gondii*: Entry, association, and physiological influence on the central nervous system. PLoS Pathog. 2017;13:e1006351. doi: 10.1371/journal.ppat.1006351.
- Miyata T, Kawaguchi A, Saito K, Kawano M, Muto T, Ogawa M. Asymmetric production of surface-dividing and non-surface-dividing cortical progenitor cells. Development. 2004;131:3133–45. doi: 10.1242/dev.01173.
- Molestina RE, El-Guendy N, Sinai AP. Infection with *Toxoplasma gondii* results in dysregulation of the host cell cycle. Cell Microbiol. 2008;10:1153–65. doi: 10.1111/j.1462-5822.2008.01117.x.
- Molnár Z, Clowry GJ, Šestan N, Alzu'bi A, Bakken T, Hevner RF, Hüppi PS, Kostović I, Rakic P, Anton ES, Edwards D, Garcez P, Hoerder-Suabedissen A, Kriegstein A. New insights into the development of the human cerebral cortex. J Anat. 2019;235:432–51. doi: 10.1111/joa.13055.
- Molyneaux BJ, Arlotta P, Menezes JRL, Macklis JD. Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. Nat Rev Neurosci. 2007;8:427–37. doi: 10.1038/nrn2151.
- Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. Lancet. 2004;363:1965–76. doi: 10.1016/S0140-6736(04)16412-X.
- Mouveaux T, Roger E, Gueye A, Eysert F, Huot L, Grenier-Boley B, Lambert J-C, Gissot M. Primary brain cell infection by *Toxoplasma gondii* reveals the extent and dynamics of parasite differentiation and its impact on neuron biology. Open Biol. 2021;11:210053. doi: 10.1098/rsob.210053.
- Müller J, Aguado-Martínez A, Ortega-Mora L-M, Moreno-Gonzalo J, Ferre I, Hulverson MA, Choi R, McCloskey MC, Barrett LK, Maly DJ, Ojo KK, van Voorhis W, Hemphill A. Development of a murine vertical transmission model for *Toxoplasma gondii* oocyst infection and studies on the efficacy of bumped kinase inhibitor (BKI)-1294 and the naphthoquinone buparvaquone against congenital toxoplasmosis. J Antimicrob Chemother. 2017;72:2334–41. doi: 10.1093/jac/dkx134.
- Noctor SC, Martínez-Cerdeño V, Ivic L, Kriegstein AR. Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. Nat Neurosci. 2004;7:136–44. doi: 10.1038/nn1172.
- Okano HJ, Darnell RB. A hierarchy of Hu RNA binding proteins in developing and adult neurons. J Neurosci. 1997;17:3024–37. doi: 10.1523/JNEUROSCI.17-09-03024.1997.
- Okere CO, Kaba H. Heterogenous immunohistochemical expression of microglia-specific ionized calcium binding adaptor protein (Iba1) in the mouse olfactory bulb. Brain Res. 2000;877:85–90. doi: 10.1016/s0006-8993(00)02656-1.
- Opsteegh M, Kortbeek TM, Havelaar AH, van der Giessen JWB. Intervention strategies to reduce human *Toxoplasma gondii* disease burden. Clin Infect Dis. 2015;60:101–7. doi: 10.1093/cid/ciu721.
- Parlog A, Schlüter D, Dunay IR. *Toxoplasma gondii* induced neuronal alterations. Parasite Immunol. 2015;37:159–70. doi: 10.1111/pim.12157.
- Pires LB, Barbosa HS, Santiago MF, Adesse D. Infection of mouse neural progenitor cells by *Toxoplasma gondii* affects in vitro proliferation, differentiation and migration. bioRxiv. 2021:2021.05.31.446482. doi: 10.1101/2021.05.31.446482.
- Pusch L, Romeike B, Deckert M, Mawrin C. Persistent *Toxoplasma* bradyzoite cysts in the brain: incidental finding in an immunocompetent patient without evidence of a toxoplasmosis. Clin Neuropathol. 2009;28:210–2. doi: 10.5414/npp28210.
- Rakic P. Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. J Comp Neurol. 1972;145:61–83. doi: 10.1002/cne.901450105.

Publikationen

- Rakic P. Neurons in rhesus monkey visual cortex: systematic relation between time of origin and eventual disposition. *Science*. 1974;183:425–7. doi: 10.1126/science.183.4123.425.
- Rakic P. Specification of cerebral cortical areas. *Science*. 1988;241:170–6. doi: 10.1126/science.3291116.
- Rakic P. A small step for the cell, a giant leap for mankind: a hypothesis of neocortical expansion during evolution. *Trends Neurosci*. 1995;18:383–8. doi: 10.1016/0166-2236(95)93934-p.
- Reillo I, Juan Romero C de, García-Cabezas MÁ, Borrell V. A role for intermediate radial glia in the tangential expansion of the mammalian cerebral cortex. *Cereb Cortex*. 2011;21:1674–94. doi: 10.1093/cercor/bhq238.
- Robel S, Berninger B, Götz M. The stem cell potential of glia: lessons from reactive gliosis. *Nat Rev Neurosci*. 2011;12:88–104. doi: 10.1038/nrn2978.
- Rodríguez AM, Rodríguez J, Giambartolomei GH. Microglia at the crossroads of pathogen-induced neuroinflammation. *ASN Neuro*. 2022;14:17590914221104566. doi: 10.1177/17590914221104566.
- Ross EC, Olivera GC, Barragan A. Early passage of *Toxoplasma gondii* across the blood-brain barrier. *Trends Parasitol*. 2022;38:450–61. doi: 10.1016/j.pt.2022.02.003.
- Rowitch DH, Kriegstein AR. Developmental genetics of vertebrate glial-cell specification. *Nature*. 2010;468:214–22. doi: 10.1038/nature09611.
- Samojłowicz D, Twarowska-Małczyńska J, Borowska-Solonyanko A, Poniatowski ŁA, Sharma N, Olczak M. Presence of *Toxoplasma gondii* infection in brain as a potential cause of risky behavior: a report of 102 autopsy cases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2019;38:305–17. doi: 10.1007/s10096-018-3427-z.
- Sauerland C, Menzies BR, Glatzle M, Seeger J, Renfree MB, Fietz SA. The basal radial glia occurs in marsupials and underlies the evolution of an expanded neocortex in therian mammals. *Cereb Cortex*. 2018;145–57. doi: 10.1093/cercor/bhw360.
- Schares G, Dubey JP, Rosenthal B, Tuschy M, Bärwald A, Conraths FJ. Sensitive, quantitative detection of *Besnoitia darlingi* and related parasites in intermediate hosts and to assess felids as definitive hosts for known and as-yet undescribed related parasite species. *Int J Parasitol Parasites Wildl*. 2020;11:114–9. doi: 10.1016/j.ijppaw.2020.01.011.
- Schlegelmilch T, Henke K, Peri F. Microglia in the developing brain: from immunity to behaviour. *Curr Opin Neurobiol*. 2011;21:5–10. doi: 10.1016/j.conb.2010.08.004.
- Schlüter D, Däubener W, Schares G, Groß U, Pleyer U, Lüder C. Animals are key to human toxoplasmosis. *Int J Med Microbiol*. 2014;304:917–29. doi: 10.1016/j.ijmm.2014.09.002.
- Shaw G, Weber K. Differential expression of neurofilament triplet proteins in brain development. *Nature*. 1982;298:277–9. doi: 10.1038/298277a0.
- Slee EA, Adrain C, Martin SJ. Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem*. 2001;276:7320–6. doi: 10.1074/jbc.M008363200.
- Stepien BK, Vaid S, Huttner WB. Length of the neurogenic period—a key determinant for the generation of upper-layer neurons during neocortex development and evolution. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:676911. doi: 10.3389/fcell.2021.676911.

Publikationen

- Swinnen N, Smolders S, Avila A, Notelaers K, Paesen R, Ameloot M, Brône B, Legendre P, Rigo J-M. Complex invasion pattern of the cerebral cortex by microglial cells during development of the mouse embryo. *Glia*. 2013;61:150–63. doi: 10.1002/glia.22421.
- Talabani H, Asseraf M, Yera H, Delair E, Ancelle T, Thulliez P, Brézin AP, Dupouy-Camet J. Contributions of immunoblotting, real-time PCR, and the Goldmann-Witmer coefficient to diagnosis of atypical toxoplasmic retinochoroiditis. *J Clin Microbiol*. 2009;47:2131–5. doi: 10.1128/JCM.00128-09.
- Tay TL, Savage JC, Hui CW, Bisht K, Tremblay M-È. Microglia across the lifespan: from origin to function in brain development, plasticity and cognition. *J Physiol*. 2017;595:1929–45. doi: 10.1113/JP272134.
- Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: From animals to humans. *Int J Parasitol*. 2000;30:1217–58.
- Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science*. 1998;281:1312–6. doi: 10.1126/science.281.5381.1312.
- Vaid S, Huttner WB. Progenitor-based cell biological aspects of neocortex development and evolution. *Front Cell Dev Biol*. 2022;10:892922. doi: 10.3389/fcell.2022.892922.
- Velásquez ZD, Conejeros I, Larrazabal C, Kerner K, Hermosilla C, Taubert A. *Toxoplasma gondii*-induced host cellular cell cycle dysregulation is linked to chromosome missegregation and cytokinesis failure in primary endothelial host cells. *Sci Rep*. 2019;9:12496. doi: 10.1038/s41598-019-48961-0.
- Verney C, Monier A, Fallet-Bianco C, Gressens P. Early microglial colonization of the human forebrain and possible involvement in periventricular white-matter injury of preterm infants. *J Anat*. 2010;217:436–48. doi: 10.1111/j.1469-7580.2010.01245.x.
- Villalba A, Götz M, Borrell V. The regulation of cortical neurogenesis. *Curr Top Dev Biol*. 2021;142:1–66. doi: 10.1016/bs.ctdb.2020.10.003.
- Vyas A, Kim S-K, Giacomini N, Boothroyd JC, Sapolsky RM. Behavioral changes induced by *Toxoplasma* infection of rodents are highly specific to aversion of cat odors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:6442–7. doi: 10.1073/pnas.0608310104.
- Wang G, Gao M. Influence of *Toxoplasma gondii* on in vitro proliferation and apoptosis of hepatoma carcinoma H7402 cell. *Asian Pac J Trop Med*. 2016;9:63–6. doi: 10.1016/j.apjtm.2015.12.013.
- Wang T, Liu M, Gao X-J, Zhao Z-J, Chen X-G, Lun Z-R. *Toxoplasma gondii*: the effects of infection at different stages of pregnancy on the offspring of mice. *Exp Parasitol*. 2011;127:107–12. doi: 10.1016/j.exppara.2010.07.003.
- Wang, T., Zhou J, Gan X, Wang H, Ding X, Chen L, Wang Y, DU J, Shen J, Yu L. *Toxoplasma gondii* induce apoptosis of neural stem cells via endoplasmic reticulum stress pathway. *Parasitology*. 141, 988–995 (2014).
- Weiss LM, Kim K. The development and biology of bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Front Biosci*. 2000;5:D391-405.
- Wong FK, Fei J-F, Mora-Bermúdez F, Taverna E, Haffner C, Fu J, Anastassiadis K, Stewart AF, Huttner WB. Sustained Pax6 expression generates primate-like basal radial glia in developing mouse neocortex. *PLoS Biol*. 2015;13:e1002217. doi: 10.1371/journal.pbio.1002217.

Publikationen

Zhao, Y. O., Khaminets, A., Hunn, J. P. & Howard, J. C. Disruption of the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole by IFN γ -inducible immunity-related GTPases (IRG proteins) triggers necrotic cell death. PLoS Pathog. 5, e1000288 (2009).

Acknowledgments

We thank Yasmina Schmitt, Josephine Schiffner, Andrea Bärwald, Alrik-Markis Kunisch, Mareen Tuschy, Susanne Zahnow, Jenny Mein, and Gregor Pfeiffer for their technical support as well as Katharina Rauhe and Katrin Balzejak for their support in oocyst collection. Moreover, we thank Hans-Jürgen Raqué for providing the ultrasonography equipment, and Johannes Kauffold and Haukur Sigmarsson for their help in obtaining medications. We thank Dr. Jan Schinköthe (Institute of Veterinary Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Leipzig University) for providing the brain image used in Figure 2c. We are thankful for the technical and conceptual support provided by the BioImaging Core Facility, Leipzig University. We acknowledge the support provided by the National Research Platform for Zoonoses/Federal Ministry of Education and Research (01KI1801), and the Research Academy Leipzig and the Vice-Rector for Research and Young Academics (Pre-Doc-Award conferred to Thomas Grochow and Simone A. Fietz), University of Leipzig, Germany.

Author information

Institute of Veterinary Anatomy, Histology and Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, Leipzig University, Leipzig, Germany: Thomas Grochow, Britta Beck, Simone A. Fietz

Institute of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Leipzig University, Leipzig, Germany: Thomas Grochow, Britta Beck, Zaida Rentería-Solís, Arwid Dauschies

BioImaging Core Facility, Faculty of Veterinary Medicine, Leipzig University, Leipzig, Germany: Johannes Kacza

Institute for Parasitology, Centre for Infection Medicine, University of Veterinary Medicine Hannover, Hannover, Germany: Christina Strube

National Reference Laboratory for Toxoplasmosis, Institute of Epidemiology, Friedrich-Loeffler-Institut, Federal Research Institute for Animal Health, Greifswald-Insel Riems, Germany:

Gereon Schares, Pavlo Maksimov

Veterinary practice Raqué, Leipzig, Germany: Lisa Raqué

Contributions

SAF conceived the study. SAF and AD designed and supervised the study. TG, BB, GS, PM, JK, and LR performed research. CS contributed materials. TG analyzed data. TG, ZRS, GS, PM, JK, AD and SF discussed data. TG and SAF wrote the paper. AD, ZRS, CS, JK, RU edited the paper. All authors read and approved the manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Publikationen

Materials & Correspondence

Correspondence and material requests should be addressed to simone.fietz@vetmed.uni-leipzig.de

4 Übergreifende Diskussion

T. gondii ist ein potentieller Krankheitserreger bei vielen Wirbeltierarten, einschließlich des Meerschweinchens und des Menschen (HENRY und BEVERLEY 1977, HAUMONT et al. 2000, TENTER et al. 2000, FLORI et al. 2002, FLORI et al. 2003, MONTOYA und LIESENFELD 2004, BIGNA et al. 2020). Aufgrund des Neurotropismus des Parasiten können bei Meerschweinchen zentralnervöse Symptome beobachtet werden. Besonders pränatale Infektionen des Embryos führen beim Menschen zu massiven Gehirnschäden mit Todesfolge oder starken Funktionsverlusten und Missbildungen (WRIGHT 1972, DESMONTS und COUVREUR 1974, WONG und REMINGTON 1994, TENTER et al. 2000, JONES et al. 2001, MONTOYA und LIESENFELD 2004, HAVELAAR et al. 2007).

4.1 Etablierung eines Tierversuchsmodells für die humane kongenitale Toxoplasmose

Nach postnataler Infektion befällt *T. gondii* während der akuten Phase vorzugsweise Gliazellen und beim chronischen Verlauf insbesondere Neurone im Kortex von Mensch und Tier. Die *T. gondii*-Infektion führt dabei zu Beeinträchtigungen der Morphologie und Funktion der infizierten Zellen. Für das pränatale Gehirn lagen zur Pathogenese und zum Infektionsverlauf, insbesondere zum Zelltropismus von *T. gondii*, bisher keine detaillierten Informationen vor. Dabei ist zu beachten, dass in höheren Säugetieren die Neurogenese zum überwiegenden Teil pränatal stattfindet und neurale Stammzellen in hoher Abundanz nur im pränatalen Kortex vorhanden sind (SAUERLAND et al. 2018, KALUSA et al. 2021). Ob und in welchem Ausmaß *T. gondii* neurale Stammzellen, Neurone und/oder Gliazellen im sich entwickelnden bzw. pränatalen Gehirn nach kongenitaler Infektion befällt, war bislang unbekannt. Für die kongenitale Toxoplasmose, insbesondere für die humane kongenitale Toxoplasmose, war der eingangs durchgeführten Recherche zufolge bisher kein geeignetes Tiermodell definiert. Für die Untersuchung dieser schwerwiegenden Erkrankung – v. a. des Menschen – ist es von großer Bedeutung, ein geeignetes Tiermodell zu etablieren. Aufgrund der relativ kurzen Trächtigkeitsdauer von ca. 20 – 22 Tagen sind Maus und Ratte für die Untersuchung der kongenitalen Toxoplasmose eher weniger geeignet (FLORI et al. 2002, FLORI et al. 2003, VARGAS-VILLAVICENCIO et al. 2016). So liegt der Höhepunkt der Neurogenese der Subplate, welche den Bereich unter der Kortikalplatte darstellt und für die Entwicklung des Neokortex von entscheidender Bedeutung ist, bei der Maus um den 11. und bei der Ratte um den 15. Trächtigkeitstag (CAVINESS 1982, BAYER und ALTMAN 1990, FINLAY und DARLINGTON 1995). Jedoch beträgt die Inkubationszeit für eine durch Oozysten induzierte kongenitale Toxoplasmose bis zu 20 Tage (JONES. et al. 2003). Somit kann man den Einfluss der kongenitalen Infektion auf die Neurogenese bei Maus und Ratte auf diesem natürlichen Infektionsweg nicht untersuchen. Zudem zeichnen sich beide Spezies – im Unterschied zum Menschen – als primäre Nesthocker durch einen relativ geringen Reifegrad des Gehirns zum Zeitpunkt der Geburt aus.

Der Mensch entwickelt eine hämomonochoriale discoidale Plazenta. Dabei trennt nur eine Chorionschicht die fötalen Kapillaren vom mütterlichen Blut. Mäuse und Ratten hingegen bilden eine hämotrichoriale discoidale Plazenta aus, bei der 3 Schichten die fötalen Kapillaren vom mütterlichen Blut trennen. Große Haussäugetiere wie Wiederkäuer und Schweine weisen eine relativ lange Trächtigkeitsdauer auf (z. B. Rind: ca. 280 Tage, Schaf und Ziege ca. 150 Tage, Schwein ca. 114 Tage). Dies würde eine Untersuchung einer kongenitalen Toxoplasmoseinfektion selbst in den Frühphasen der Neurogenese ermöglichen (VARGAS-VILLAVICENCIO et al. 2016). Jedoch unterscheiden sich Mensch und diese Großtierarten im Hinblick auf die Plazentation, insbesondere in der Morphologie der

Übergreifende Diskussion

Plazenta. So entwickeln diese Tiere, anders als der Mensch, eine epitheliochoriale Plazenta, bei der ein einlagiges Chorionepithel die intakte Wand des Endometriums und die darunter liegenden mütterlichen Kapillaren begrenzt, weshalb sie als Tiermodelle für die Untersuchung humaner kongenitaler Infektionen weniger geeignet sind (KRESSIN et al. 2019).

Das Meerschweinchen ist ein Nestflüchter, dessen Gehirn – ähnlich wie das des Menschen – zum Zeitpunkt der Geburt einen relativ hohen Reifegrad aufweist (WORKMAN et al. 2013). In Analogie zum menschlichen Kortex findet im pränatalen Kortex des Meerschweinchens die Neurogenese v. a. im zweiten Trimester der Trächtigkeit statt (FIETZ et al. 2010, KALUSA et al. 2021). In der Plazentation sowie in der Morphologie der Plazenta gibt es zwischen Meerschweinchen und Mensch zudem große Übereinstimmungen. Die transplazentare Übertragung von *T. gondii* nach oraler Infektion des Muttertieres konnte im Meerschweinchen bereits erfolgreich nachgewiesen werden (FLORI et al. 2002). Ähnlich des Menschen weist das Meerschweinchen eine hämomonochoriale Plazenta auf, bei der ein einlagiges, synzytiales Chorionepithel im direkten Kontakt mit dem mütterlichen Blut steht. Außerdem wird bei beiden Arten während der Gestation Progesteron von der Plazenta produziert. Weiterhin besitzt das Meerschweinchen eine relativ lange Tragezeit von ca. 66 Tagen, was die Untersuchung einer kongenitalen Toxoplasmoseinfektion ermöglicht, bevor die Neurogenese einsetzt. Zudem ist der Sexualzyklus des Meerschweinchens durch einen zyklisch wiederkehrenden Östrus gekennzeichnet (MESS 2007, GRIGSBY 2016, CARTER 2020). Diese Gemeinsamkeit zum Menschen hat für experimentelle Studien den Nachteil, dass, im Gegensatz zu Tieren mit einer provozierten Ovulation, wie z. B. Kaninchen, die Tiere nur während des Östrus verpaart werden können. Mit Hilfe eines 15-tägigen Progesteronblocks ist es aber möglich, weibliche Meerschweinchen zu synchronisieren und gezielt terminiert zu verpaaren (GRÉGOIRE et al. 2012, PUBLIKATION 1). Dabei konnten Erstverpaarungserfolge von bis zu 100% erzielt werden. In der eigenen Studie wurde, als Basis für folgende experimentelle Untersuchungen, der neurologische Untersuchungsgang beim Meerschweinchen etabliert und validiert. Aufgrund der eigenen Befunde bietet sich in Übereinstimmung mit früheren Publikationen anderer Autoren das Meerschweinchen als Modelltier für die Untersuchung der kongenitalen Toxoplasmose, insbesondere der humanen kongenitalen Toxoplasmose, an (HAUMONT et al. 2000, FLORI et al. 2002, FLORI et al. 2003, VARGAS-VILLAVICENCIO et al. 2016).

Um das Meerschweinchenmodell für die humane kongenitale Toxoplasmose zu etablieren, musste zuerst der am besten geeignete *Toxoplasma*-Genotyp und die geeignetste Infektionsform gefunden werden. Die Entscheidung fiel auf einen Typ II Stamm (ME49), weil dieser den in Europa vorherrschenden Genotyp darstellt (MAKSIMOV et al. 2012, AMOUEI et al. 2020). Ob die in der eigenen Studie generierten Ergebnisse auch für andere Genotypen, die sich durch Unterschiede in der Pathogenität auszeichnen, gelten, muss noch geklärt werden.

Als Infektionsquelle standen 3 infektiöse Entwicklungsstadien (Tachyzoiten, Bradyzoiten aus Gewebezysten und Sporozoitien aus Oozysten) zur Verfügung. Die intraperitoneale Infektion von Meerschweinchen mit Tachyzoiten ist bereits von HAUMONT et al. (2000) und FLORI et al. (2002) beschrieben worden. Der größte Vorteil dieser Methode ist es, dass die Generierung der Tachyzoiten in der Zellkultur standardisiert und im Sinne des 3R-Prinzips (replace, reduce, refine) ohne weitere Tierversuche auskommt. Aufgrund ihrer geringen Tenazität müssten Tachyzoiten parenteral appliziert werden, weil sie nach peroraler Gabe den niedrigen pH-Wert im Magens in der Regel nicht überleben (DUBEY 2016). Allerdings stellt eine parenterale Infektion per se keinen natürlichen Infektionsweg dar

Übergreifende Diskussion

und eine Infektion adulter Meerschweinchen über Tachyzoiten kommt in der Natur nicht vor. FLORI et al. (2003) haben die orale Infektion von Meerschweinchen mittels Gewebezysten bereits etabliert. Die Erzeugung einer hinreichenden Anzahl von Gewebezysten erfordert einen Tierversuch, was als unvermeidbarer Nachteil gesehen werden kann. Zwar handelt es sich bei der oralen Gabe von zystenhaltigem Gewebe nicht um den natürlichen Infektionsweg des Meerschweinchens, aber zur Untersuchung der Abläufe im Sinne eines Infektionsmodells für den Menschen ist es durchaus begründbar diesen Infektionsmodus zu betrachten.

Als rein herbivores Tier werden Meerschweinchen in der Natur fast ausschließlich über mit Oozysten kontaminierte Lebensmittel oder Wasser infiziert. Die Infektion mit Oozysten spielt auch beim Menschen, neben den Gewebezysten, eine wichtige Rolle. Man geht davon aus, dass 43 – 78 % der menschlichen *T. gondii*-Infektionen über mit Oozysten kontaminierte Lebensmittel oder Wasser verursacht werden (BOYER et al. 2011, AGUIRRE et al. 2019). Oozysten können *in vitro* nicht produziert werden, sodass eine Passagierung des Parasiten im Tierversuch mit nachfolgender Isolation der Oozysten aus den Fäzes nötig ist.

In der vorliegenden Studie wurden erstmals Oozysten als Infektionsquelle für eine kongenitale Infektion des Meerschweinchens genutzt (PUBLIKATION 1). Da aus diesem Grund keine Erfahrungswerte vorlagen, wurde bei der Wahl der Anzahl der Oozysten, die für die Infektion genutzt wurden, auf eine Studie von MÜLLER et al. (2017) zurückgegriffen. Diese Autoren konnten im Mausmodell bei mit 5 oder 25 Oozysten infizierten trächtigen Tieren die höchsten Wurfgrößen bei gleichzeitig hundertprozentiger kongenitaler Übertragungsrate erzielt werden. Entsprechend des ca. zwanzigfachen Körpergewichts eines Meerschweinchens im Vergleich zur Maus wurden die Infektionsdosen auf 100 oder 500 Oozysten festgelegt. Zusätzlich wurde eine Niedrigdosis mit lediglich 10 Oozysten gewählt, eine Oozystenanzahl, die bei Mäusen gute Ergebnisse ergab, für die Annahme, dass nicht das Körpergewicht für die Dosis ausschlaggebend ist. Es konnte gezeigt werden, dass eine Infektion mit 500 Oozysten unabhängig vom Infektionszeitpunkt für die Föten immer tödlich ist. Die mit 10 oder 100 Oozysten infizierten Tiere zeigten gute Übertragungsraten. Zusätzlich hatten diese Tiere ein relativ ausgeglichenes Verhältnis zwischen den möglichen Schicksalen der Nachkommen (Lebendgeburt, Totgeburt, Abort, Fruchtresorption; PUBLIKATION 1). Bei einem Tier, welches mit nur 10 Oozysten inokuliert wurde, konnte weder ein positives qPCR-Ergebnis der Nachkommen noch ein Antikörpertiter des Muttertieres festgestellt werden, sodass die Infektion dieses Tieres als nicht erfolgreich gewertet werden musste. Ein möglicher Grund hierfür könnte sein, dass eine höhere Schwellendosis zur sicheren Infektion von Meerschweinchen nötig ist. Dies ist allerdings unwahrscheinlich, da die anderen Würfe dieser Infektionsgruppe alle positiv waren. MÜLLER et al. (2017) konnten mit der halben Dosis bei allen Würfen eine Infektion erreichen. Eine wahrscheinlichere Ursache könnte die Methodik der Einstellung der niedrigen Dosis sein, die über eine Neubauer-Improved-Zählkammer erfolgte. Dieses Verfahren eignet sich vor allem für die Bestimmung von hohen Oozystendichten. Durch die starke Verdünnung von 30 Oozysten je μl Oozystenstamm suspension auf zehn Oozysten je 500 μl Infektionslösung kann es zu unvermeidbaren Abweichungen von der sehr niedrigen Soll-Oozystenmenge in einzelnen Präparationen im Versuch gekommen sein, sodass möglicherweise vereinzelt die Oozystendichte zu gering war, um eine erfolgreiche Infektion zu erreichen. Wahrscheinlich könnte mit der Verwendung eines Durchflusszytometers bei solch niedriger Dosierung eine höhere Sicherheit hinsichtlich der Oozystenanzahl geben, was allerdings mit einem relativ hohen technischen Aufwand verbunden ist, der in der vorliegenden Studie nicht umsetzbar war. Da im Versuch (PUBLIKATION 1) keine signifikanten Unterschiede zwischen den mit 10 und 100 Oozysten infizierten

Übergreifende Diskussion

Tieren festgestellt werden konnten, wurden die folgenden Versuche (MANUSKRIFT 3) mit 100 Oozysten durchgeführt.

Für den Schweregrad und die allgemeine Übertragungswahrscheinlichkeit einer kongenitalen Infektion ist beim Menschen vor allem der Zeitpunkt der Infektion von hoher Bedeutung, d. h. in welchem Schwangerschaftstrimester sie stattfindet (DESMONTS und COUVREUR 1984, WONG und REMINGTON 1994, DUNN et al. 1999, THULLIEZ 2001). Die gewählten Infektionszeitpunkte in den eigenen Untersuchungen liegen ungefähr in der Mitte des jeweiligen Trimesters. Zu diesen Zeitpunkten erfolgen wichtige Entwicklungen in der Neurogenese. Der Tag 15 p. c. liegt noch vor Beginn der Neurogenese. Zu diesem Termin erfolgt vor allem die Stammzellproliferation. Am Tag 30 p. c. kommt es zum Höhepunkt der Neurogenese im Sinne einer Stammzellendifferenzierung. Am Tag 48 p. c. ist schließlich das Ende der Neurogenese erreicht (KALUSA et al. 2021).

Insbesondere eine *T. gondii*-Infektion der Muttertiere im ersten Trimester, d. h. am 15. Tag der Trächtigkeit, endete für alle Würfe tödlich, wobei die meisten Nachkommen während der Schwangerschaft resorbiert wurden, wie dies auch beim Menschen nachgewiesen wurde (WONG und REMINGTON 1994, JONES et al. 2001). Interessanterweise endete auch eine spätere Infektion der Muttertiere im dritten Trimester (48. Trächtigkeitstag) für die meisten Würfe tödlich, wobei ein sehr hoher Anteil der Nachkommen tot geboren wurde oder abortiert wurde (PUBLIKATION 1). In ähnlicher Weise zeigte eine frühere Studie an Meerschweinchen, dass eine *T. gondii*-Infektion am Ende des zweiten Trächtigkeitstrimesters zu signifikant höheren Nachkommenverlusten führt als eine Infektion im ersten Trächtigkeitstrimester (FLORI et al. 2002). Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu Befunden bei Menschen, bei denen eine Infektion im dritten Trimester der Schwangerschaft für den Fötus oft ohne gravierende Folgen bleibt (WONG und REMINGTON 1994, DUNN et al. 1999). Eine mögliche Erklärung für diesen Unterschied könnte sein, dass *T. gondii* bei Meerschweinchen die Plazenta bei einer Infektion im dritten Trimester der Trächtigkeit stärker infiltriert und zerstört als dies beim Menschen der Fall ist. Da das Plazentagewebe von den Muttertieren unmittelbar nach dem Abort verzehrt wurde, war eine Untersuchung des Plazentagewebes in der ersten Studie nicht möglich (PUBLIKATION 1). Im Folgeversuch konnte die Parasitenbürde der Plazenten untersucht werden, da die Tiere bereits vor der Geburt euthanasiert wurden. Hier zeigten die Plazenten, insbesondere im letzten Trächtigkeitstrimester, die höchsten Parasitenmengen aller Organe (MANUSKRIFT 3). Dieser Fakt stützt die These, dass Toxoplasmen beim Meerschweinchen die Plazenta in der späten Phase der Trächtigkeit verstärkt infiltrieren und wahrscheinlich auch funktionell beeinträchtigen. Abschließend könnte dies durch eine pathologisch-histologische Untersuchung bestätigt werden, die aber nicht Aufgabenstellung der eigenen Studien war.

Eine Toxoplasmose kann aufgrund des Neurotropismus des Parasiten auch zu neurologischen Symptomen beim Muttertier führen (STAGNO et al. 1980, FARKASH et al. 1986, MONTOYA und LIESENFELD 2004, HAVELAAR et al. 2007). Vor dieser Studie gab es nur wenige Daten über neurologische Befunde bei Meerschweinchen, was zu einer Fehleinschätzung von Symptomen und zur Auswahl ungeeigneter diagnostischer Tests in früheren Studien geführt hat (MANCINELLI 2015). Um das Meerschweinchen als Modelltier für die humane kongenitale Toxoplasmose zu etablieren, war es folglich von entscheidender Bedeutung, einen neurologischen Untersuchungsgang für das Meerschweinchen zu erstellen und zu validieren. MANUSKRIFT 2 liefert erstmals detaillierte Daten über die neurologische Untersuchung inklusive der reflektorischen Bewertungen beim Meerschweinchen.

4.2 Folgen der kongenitalen Toxoplasmose auf das sich entwickelnde Meerschweinchen-gehirn

Nachdem das Meerschweinchen als Tierversuchsmodell für die humane kongenitale Toxoplasmose etabliert worden ist, konnte es für weitere Untersuchungen verwendet werden. Im Fokus stand insbesondere, welche Auswirkungen der Parasit auf das sich entwickelnde Nervensystem, insbesondere den Neokortex hat. Hierfür wurde anhand der in PUBLIKATION 1 gewonnenen Daten ein geeigneter Infektionszeitpunkt ausgewählt. Tiere, die im ersten Trimester, d. h. am Trächtigkeitstag 15, infiziert wurden, lieferten keine auswertbaren Ergebnisse, weil die Embryonen abstarben oder resorbiert wurden. Somit musste ein späterer Zeitpunkt gewählt werden. In der Mitte der Trächtigkeit, d. h. am Trächtigkeitstag 30, konnten mit der qPCR die höchsten *Toxoplasma*-Gehalte im Gehirn erhoben werden. Das ist sicherlich auf die längere Infektionsdauer, während der sich der Parasit replizieren kann, zurückzuführen. Allerdings ist dieser Zeitpunkt für eine Untersuchung zum Einfluss der *Toxoplasma*-Infektion auf das sich entwickelnde Gehirn zu spät, da die Erreger mindestens 10 Tage von der Infektion des Muttertiers bis zum Erreichen des Fötus brauchen (BÉRARD-BADIER et al. 1968). Zu diesem Zeitpunkt (Trächtigkeitstag 40) ist ein Großteil der Neurogenese bereits abgeschlossen. Deshalb wurde festgelegt, die Tiere am Trächtigkeitstag 23 zu infizieren. Dieser Tag liegt zwischen den oben genannten Infektionszeitpunkten und stellt den Beginn des zweiten Trimesters dar. Hier befindet sich die Neurogenese des Gehirns noch im Anfangsstadium, sodass der Einfluss der *Toxoplasma*-Infektion trotz der 10-tägigen Inkubationszeit auf die Neurogenese noch untersucht werden kann. Als Euthanasiezeitpunkte wurden die Trächtigkeitstage 33, 40 und 48 gewählt. Tag 33 repräsentiert den Höhepunkt der Neurogenese, Tag 40 das Ende der Neurogenese und Tag 48 das Gehirn nach Abschluss der Neurogenese ab (KALUSA et al. 2021).

Während des Versuchs haben alle Muttertiere überlebt und es kam zu keinen Komplikationen während der Trächtigkeit, wie z. B. Fruchtresorptionen oder Aborte (MANUSKRIPT 3). Dieser Befund stützt die in PUBLIKATION 1 gewonnenen Daten, dass sich 100 Oozysten des ME49 Genotyps zur Infektion im zweiten Trimester gut eignen. Anschließend wurde der Erfolg der Infektion und die Parasitenbürde der Muttertiere an Herz-, Leber- und Milzgewebe sowie bei den Föten an Gehirn-, Herz-, Leber-, Lungen-, Milz-, Muskel-, Plazentagewebe und Amnionflüssigkeit mittels qPCR bestimmt. Dabei zeigte keines der am Trächtigkeitstag 23 infizierten und 10 Tage nach der Infektion euthanasierten Tiere ein positives Resultat in einem der Organe. Bei den Muttertieren dieser Föten konnte hingegen in mindestens einem Organ der positive Nachweis auf *T. gondii*-DNA erbracht werden. Bei den Muttertieren dieser Föten konnte hingegen in mindestens einem Organ der positive Nachweis auf *T. gondii*-DNA erbracht werden. Bei den später am Trächtigkeitstag 40 und 48 entnommenen Föten konnte in mindestens einem Organ der Parasit nachgewiesen werden. Diese Daten stehen im Einklang mit einer früheren Studie, in der trächtigen Meerschweinchen 100 Zysten des 76 K-Stammes oral verabreicht wurden (FLORI et al. 2003). Somit kann die Infektion als erfolgreich gewertet werden, aber die Infektionszeit von lediglich 10 Tagen am Trächtigkeit 33 war vermutlich nicht ausreichend, um den Fötus zu infizieren. Diese Föten wurden für die Untersuchung damit nicht berücksichtigt. Im Gegensatz zu diesen eigenen Befunden fanden BÉRARD-BADIER et al. (1968) bereits ab 10 Tagen p. i. die Parasiten in den Plazenten. Dies könnte durch die Verwendung eines Typ I Stammes (RH) erklärt werden, welcher eine höhere Virulenz als der in dieser Studie (MANUSKRIPT 3) genutzte Typ II Stamm (ME49) aufweist (SIBLEY und BOOTHROYD 1992, HOWE und SIBLEY 1995). Im Gegensatz zu den Ergebnissen in PUBLIKATION 1, konnten in MANUSKIRPT 3 keine signifikanten Unterschiede bei den Parasitenmengen der intraembryonalen Gewebe zum selben Untersuchungszeitpunkt, aber auch

Übergreifende Diskussion

zwischen den Untersuchungszeitpunkten reproduziert werden. Die Vermehrung des Erregers mit einer anschließenden Akkumulation in den verschiedenen Organen vollzieht sich über eine längere Zeitdauer, sodass in den initialen Studien (PUBLIKATION 1) die Dauer der experimentellen *T. gondii*-Infektion bis zu 51 Tage betrug. In den folgenden Experimenten wurden die beiden Infektionsgruppen im Abstand von 8 Tagen untersucht (MANUSKRIFT 3), was wahrscheinlich zu kurz war, um signifikante Unterschiede in der Anzahl von *T. gondii* in den fötalen Geweben und Organen zwischen den beiden Gruppen erkennbar werden zu lassen. Immerhin wurden bei der Analyse der Tiere 25 Tage p. i. die höchsten medianen *T. gondii*-Mengen im Gehirn der Föten registriert. Alle untersuchten fötalen Gehirne waren unabhängig von der untersuchten Infektionsgruppe ohne Ausnahme positiv für *T. gondii*. Dies bestätigt, dass bei Meerschweinchen ebenso wie bei anderen Säugetieren einschließlich des Menschen das Gehirn ein bevorzugtes Wirtsorgan für *T. gondii* ist (TENTER et al. 2000, FLORI et al. 2003, PUSCH et al. 2009, WANG et al. 2011, SULLIVAN und JEFFERS 2012, SCHLÜTER et al. 2014, MÜLLER et al. 2017, DARD et al. 2018, SAMOJŁOWICZ et al. 2019).

Bei den anschließenden Untersuchungen (MANUSKRIFT 3) standen Alterationen durch den Parasiten im fötalen Gehirn im Fokus, um mögliche Ursachen für schwerwiegende Folgen der kongenitalen Toxoplasmose, wie z. B. die beim Menschen gelegentlich auftretende Mikrozephalie, zu ermitteln. Dazu wurde zunächst der regionale Tropismus der Parasiten innerhalb des Gehirns untersucht. Mittels Immunfluoreszenzfärbungen konnte festgestellt werden, dass sich alle *T. gondii*-Tachyzoiten im Vorderhirn der Meerschweinchenföten, vor allem in den telencephalen Basalkernen und im Neokortex, befanden, was im Einklang mit veröffentlichten Daten steht. So wurde postnatal nach intrauteriner Übertragung bei Mäusen und Menschen eine hohe *T. gondii*-Zystenmenge im Telencephalon, einschließlich der Amygdala, des Hippocampus und verschiedener Teile des Palliums wie dem entorhinalen, somatosensorischen, motorischen, orbitalen, frontalen Assoziations- und visuellen Kortex, berichtet (VYAS et al. 2007, DI CRISTINA et al. 2008, BERENREITEROVÁ et al. 2011). Darüber hinaus wurden *T. gondii*-Tachyzoiten im Plexus choroideus und im lateralen Ventrikel gefunden, was ein weiterer Beleg für die Annahme ist, dass *T. gondii* über den Plexus choroideus und den Liquor in das Gehirn gelangen kann (ALVARADO-ESQUIVEL et al. 2015, FIGUEIREDO et al. 2022, ROSS et al. 2022).

T. gondii-Tachyzoiten konnten in der eigenen Studie (MANUSKRIFT 3) bei Meerschweinchen intrazellulär u. a. in Astrozyten und Neuronen detektiert werden. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen bereits frühere *in vitro* Studien (HALONEN et al. 1996, FISCHER et al. 1997, MOUVEAUX et al. 2021). Entsprechende Befunde gab es bislang für Meerschweinchen nicht. Des Weiteren konnte erstmals *in vivo* nachgewiesen werden, dass *T. gondii* neurale Progenitorzellen infiziert (MANUSKRIFT 3). Diese Daten stimmen mit einer *in vitro*-Studie überein, bei der eine primäre murine neurale Progenitorzellen-Kultur verwendet wurde (PIRES et al. 2021).

Von großer Bedeutung ist die Tatsache, dass neurale Progenitorzellen fast ausschließlich im pränatalen Neokortex in hoher Anzahl vorhanden sind und entscheidend für die Entwicklung des Gehirns sind (FIETZ et al. 2010, FIETZ und HUTTNER 2011, FLORIO und HUTTNER 2014, DEHAY et al. 2015, MOLNÁR et al. 2019, CÁRDENAS und BORRELL 2020, KALUSA et al. 2021, VILLALBA et al. 2021, VAID und HUTTNER 2022). Als Ergebnis der Infektion zeigte sich, dass die Gesamtzahl der basalen Progenitorzellen, einer Subpopulation der neuralen Progenitorzellen, im Neokortex von Meerschweinchenföten während der mittleren Neurogenese deutlich reduziert waren. Von diesen Zellen ist bekannt, dass sie die Mehrheit der kortikalen Neuronen erzeugen (HAUBENSAK et al. 2004,

Übergreifende Diskussion

MIYATA et al. 2004, NOCTOR et al. 2004, HANSEN et al. 2010, FIETZ und HUTTNER 2011, LUI et al. 2011, BETIZEAU et al. 2013).

Insbesondere stellte sich heraus, dass die Verringerung der Anzahl der basalen Progenitorzellen hauptsächlich die Pax6+/Tbr2+ -Subtyp-Population betrifft. Ausgehend von der Annahme, dass die Aufrechterhaltung der Pax6-Expression in basalen Progenitorzellen mit einer höheren Zellproliferation verbunden ist (BETIZEAU et al. 2013, WONG et al. 2015), deuten die Daten darauf hin, dass diese proliferativen basalen Progenitorzellen am stärksten von einer *T. gondii*-Infektion betroffen sind. Da die selbsterneuernde und neurogene Zellteilung im Laufe der Zeit zu einer fortschreitenden Anhäufung von Neuronen führt, könnte man annehmen, dass sich die Auswirkungen einer verringerten basalen Progenitorzellproliferation auf die Anzahl der Neurone in den letzten Phasen der Neurogenese manifestieren (FIETZ et al. 2010, FIETZ und HUTTNER 2011, FLORIO und HUTTNER 2014). Tatsächlich zeigten die eigenen Daten (MANUSKRIFT 3), dass die Anzahl der Neurone im Neokortex von Föten, die am 48. Tag der Trächtigkeit, d. h. zum Abschluss der Neurogenese, mit *T. gondii* intrauterin infiziert sind, im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren deutlich reduziert ist. Diese Daten bestätigen frühere Studien an Kindern, die zeigen, dass eine pränatale Infektion mit *T. gondii* mit Mikrozephalie verbunden ist (CAPOBIANGO et al. 2014, MCAULEY 2014) und bestätigen, dass das Meerschweinchenmodell durchaus, zumindest in Teilbereichen, auf die humane Toxoplasmose übertragbare Befunde liefern kann. Da die Verringerung der Zahl der Neurone nicht in erster Linie mit einem Anstieg des neuronalen Zelltods verbunden ist, ist es sehr wahrscheinlich, dass die Verringerung der Zahl der Neurone im Neokortex von Föten, die kongenital mit *T. gondii* infiziert sind, nicht auf den Verlust von Neuronen, sondern auf eine gestörte Neurogenese zurückzuführen ist (MANUSKRIFT 3).

Dies ist im Einklang mit *in vitro*-Daten unter Verwendung einer primären murinen neuralen Progenitorzellkultur, die zeigten, dass eine Infektion mit dem ME49-Stamm von *T. gondii* zu einer verringerten Proliferation von neuralen Progenitorzellen führt, ohne dass die Apoptose induziert wird (PIRES et al. 2021).

In diesem Zusammenhang ist es interessant festzustellen, dass eine Infektion mit *T. gondii* nachweislich zu einer Dysregulation des Wirtszellzyklus führt, insbesondere zu einer Unterbrechung des Wirtszellzyklus vor dem Übergang zur Mitose (BRUNET et al. 2008, MOLESTINA et al. 2008, KIM et al. 2016). Darüber hinaus deuten neuere Daten darauf hin, dass *T. gondii* einen G2/M-Zellzyklusstillstand auslöst, indem es Chromosomensegregationsfehler, Veränderungen der mitotischen Spindel und eine Blockade der Zytokineseprogression in primären Rinderendothelzellen verbreitet (VELÁSQUEZ et al. 2019). Daher könnte ein mögliches Szenario sein, dass Veränderungen in der Zellzyklusprogression der basalen Progenitorzellen, insbesondere eine Blockierung der Zellteilungsrate, dem Rückgang der Neurogenese im Neokortex von *T. gondii*-infizierten Föten zugrunde liegen.

4.3 Schlussfolgerungen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeiten ist es gelungen das Meerschweinchen für die kongenitale Toxoplasmose, insbesondere für die humane kongenitale Toxoplasmose, als Tiermodell zu etablieren. Dabei wurde erstmals der neurologische Untersuchungsgang für das Meerschweinchen evaluiert. Das Modell konnte genutzt werden, um neue Erkenntnisse bezüglich der Erregertransmission und Pathogenese zu gewinnen. Zusammengenommen tragen die Ergebnisse zum Verständnis der kortikalen Fehlbildungen bei, die bei kongenital mit *T. gondii* infizierten Personen beobachtet werden, und können helfen, neue Behandlungen und Bekämpfungsstrategien für kongenitale Toxoplasmose zu finden.

5 Zusammenfassung

Thomas Grochow

Etablierung und Validierung eines Meerschweinchenmodells für die (humane) kongenitale Toxoplasmose.

Veterinär-Anatomisches Institut und Institut für Parasitologie, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig

Eingereicht im April 2023

85 Seiten, 1 Publikation, 2 eingereichte Manuskripte, 24 Abbildungen, 11 Tabellen, 346 Literaturangaben

Schlüsselwörter: kongenitale Toxoplasmose, Meerschweinchen, Tiermodell, Zelltropismus im fötalen Gehirn, Hirnläsion, neurale Stammzellen, neurologische Untersuchung

Einleitung: Die Toxoplasmose ist eine weltweit häufig auftretende Zoonose. Die Krankheit wird durch den einzelligen Parasiten *Toxoplasma (T.) gondii* ausgelöst. Bei einer primären Infektion während der Schwangerschaft ist *T. gondii* in der Lage, die Plazenta zu überwinden und den Fötus zu infizieren. Dies kann zu schweren und fortschreitenden Symptomen im Fötus führen, die u. a. das zentrale Nervensystem, insbesondere das Gehirn, betreffen. Bislang steht kein geeignetes Tiermodell für die Erforschung der (humanen) kongenitalen Toxoplasmose zur Verfügung. Zudem fehlen detaillierte Daten über den Verlauf der Infektion und die spezifischen Wirtszellen im sich entwickelnden Gehirn.

Ziele der Untersuchungen: Ziel dieses Projekts war es, das Meerschweinchen als Tiermodell für die kongenitale Toxoplasmose zu etablieren. Des Weiteren sollte ein neurologischer Untersuchungsgang für das Meerschweinchen entwickelt werden. Darüber hinaus stand die Charakterisierung der befallenen Wirtszellpopulationen und die Veränderungen im fötalen und neonatalen Gehirn des Meerschweinchens nach vertikaler Übertragung von *T. gondii* im Mittelpunkt.

Tiere, Material und Methoden: Terminiert verpaarte Meerschweinchen (n=27) wurden am 15., 30., oder 48. Trächtigkeitstag oral mit 10, 100 oder 500 *T. gondii*-Oozysten (Stamm ME49) infiziert. 3 Tiere blieben als Kontrollgruppe uninfiziert. Die Nachkommen wurden unmittelbar *post partum* euthanasiert und sezirt. Die Parasitenbelastung in den neonatalen Organen, einschließlich des Gehirns, wurde mittels qPCR bestimmt. Qualitative und quantitative Veränderungen im neonatalen Gehirn wurden durch eine pathohistologische Untersuchung beurteilt.

Im Folgeversuch wurden terminiert verpaarte Meerschweinchen (n=18) am Trächtigkeitstag 33, 40 oder 48 euthanasiert und deren Föten entnommen. Die Hälfte der Tiere wurde zuvor am Trächtigkeitstag 23 mit 100 *T. gondii*-Oozysten infiziert. Die Parasitenbelastung in den Organen der Nachkommen wurde mittels qPCR bestimmt. Neurale Stammzellen und Neurone wurden im Gehirn der Föten durch immunhistologische Färbungen unter Verwendung spezifischer Antikörper (Pax6, Tbr2, Hu C/D) und der konfokalen Laserscanningmikroskopie visualisiert. Anschließend wurde ihre Anzahl mittels Imaris Software und Graphpad Prism in den Föten infizierter und nicht-infizierter Muttertiere quantifiziert und verglichen. Daten zum Zelltropismus wurden durch immunhistologische Färbungen mittels Antikörper

Zusammenfassung

gegen Toxoplasmen (SAG1) und verschiedene Gehirnzellen (Nestin, Neurofilament, Hu C/D, GFAP, Iba1) und darauffolgende konfokaler Laserscanningmikroskopie gewonnen.

Für die Etablierung und Validierung eines neurologischen Untersuchungsganges wurden die Meerschweinchen (n=25) auf Basis des neurologischen Untersuchungsganges für Hunde von 2 erfahrenen Neurologen untersucht.

Die statistische Analyse wurde mit der Software Graphpad Prism 9.0.0 und 9.4.1 durchgeführt (Test auf Normalverteilung: Anderson-Darling Test und D'Agostino&Pearson Test; für den Vergleich von zwei Gruppen: normalverteilt: einseitiger T-Test, nicht normalverteilt: Mann-Whitney Test; für den Vergleich von mehr als 2 Gruppen: normalverteilt: einfache Varianzanalyse gefolgt von Tukey's *post hoc*-Test, nicht normalverteilt: Kruskal-Wallis test gefolgt von Dunn's *post hoc*-Test).

Ergebnisse: Insbesondere die mit 500 Oozysten infizierten Muttertiere zeigten verkürzte Überlebenszeiten und erzeugten keinen einzigen lebenden Nachkommen. Bei den mit 10 und 100 Oozysten infizierten Tieren wurden Lebendgeburten, Totgeburten, Aborte und Fruchtresorptionen (jeweils 11 – 49%) beobachtet. Auffallend war, dass insbesondere die im ersten Trimester der Trächtigkeit infizierten Tiere hohe Raten (75%) von Fruchtresorptionen hatten, was dem Krankheitsbild des Menschen ähnelt.

Im fötalen Gehirn konnte ein Zelltropismus von *T. gondii* in neuronalen Stammzellen, Neuronen und Astroglia nachgewiesen werden. Zudem führte die *T. gondii*-Infektion zu einer signifikant reduzierten Anzahl neuronaler Stammzellen ($P < 0,05$) und Neurone ($P < 0,05$), bei nicht vermehrter Anzahl von Nekrosen und Apoptosen ($P > 0,05$).

Bei der neurologischen Untersuchung hatten insbesondere die Hands-Off-Untersuchungen die beste Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Hingegen zeigten die propriozeptiven Tests an den Beckengliedmaßen, die Drohungsreaktion, der vertikale okulozephaler Reflex und die Unterkiefersensibilität keine konsistente Reaktion (Kooperationsraten 0% – 100%).

Schlussfolgerungen: Es konnte ein neurologischer Untersuchungsgang für das Meerschweinchen etabliert werden. Zudem zeigen die Ergebnisse, dass *T. gondii* bei Meerschweinchen vertikal übertragen wird und das Gehirn der Nachkommen infiziert, was die Eignung zur Untersuchung der kongenitalen Toxoplasmose belegt. Damit steht nun ein geeignetes Nagetiermodell zur Untersuchung der humanen kongenitalen Toxoplasmose zur Verfügung. Dies eröffnet neue Möglichkeiten für experimentelle Studien zur Pathogenese der Toxoplasmose im sich entwickelnden Gehirn bei Mensch und Tier. Es konnte ein klarer Zelltropismus von *T. gondii* gezeigt werden. Die beobachtete Verringerung der Neuronenanzahl konnte auf eine verminderte Bildung durch den Befall von neuronalen Stammzellen zurückgeführt werden. Darüber hinaus tragen unsere Ergebnisse wesentlich zum Verständnis der kortikalen Fehlbildungen bei, die bei kongenital mit *T. gondii* infizierten Personen beobachtet werden und helfen dabei, neue Behandlungen und Lösungen für kongenitale Toxoplasmose zu entwickeln.

6 Summary

Thomas Grochow

Establishment and validation of a guinea pig model for (human) congenital toxoplasmosis.

Institute of Anatomy, Histology and Embryology, and Institute of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Leipzig University

Submitted in April 2023

85 pages, 1 publication, 2 submitted manuscripts, 24 figures, tables, 346 references

Keywords: Congenital toxoplasmosis, guinea pig, animal model, fetal brain cell tropism, brain lesion, neural stem cells, neurological examination.

Introduction: Toxoplasmosis is a worldwide occurring zoonosis. The disease is caused by the unicellular parasite *Toxoplasma (T.) gondii*. In primary infection during pregnancy, *T. gondii* is able to cross the placenta and infects the fetus. This can lead to severe and progressive symptoms in the fetus, including those affecting the central nervous system, especially the brain. To date, no suitable animal model is available for the study of (human) congenital toxoplasmosis. In addition, detailed data on the course of infection and the specific host cells in the developing brain are lacking.

Objectives: The aim of this project was to establish the guinea pig as an animal model for congenital toxoplasmosis. Furthermore, a neurological examination procedure for the guinea pig should be developed. In addition, the focus was on the characterization of the affected host cell populations and the changes in the fetal and neonatal brain of the guinea pig after vertical transmission of *T. gondii*.

Animals, Material and Methods: Terminally mated guinea pigs (n=27) were orally infected with 10, 100, or 500 *T. gondii* oocysts (strain ME49) on gestation day 15, 30, or 48. 3 animals remained uninfected as a control group. The offspring were euthanized and necropsied immediately *post partum*. Parasite loads in neonatal organs, including brain, were determined by qPCR. Qualitative and quantitative changes in the neonatal brain were assessed by pathohistological examination.

In the follow-up experiment, terminally mated guinea pigs (n=18) were euthanized on gestation day 33, 40, or 48, and their fetuses were collected. Half of the animals were previously infected with 100 *T. gondii* oocysts on gestation day 23. Parasite loads in offspring organs were determined by qPCR. Neural stem cells and neurons were visualized in the brain of the fetuses by immunohistological staining using specific antibodies (Pax6, Tbr2, Hu C/D) and confocal laser scanning microscopy. Subsequently, their numbers were quantified and compared using Imaris software and Graphpad Prism in the fetuses of infected and uninfected dams. Cell tropism data were obtained by immunohistochemical staining using antibodies against *Toxoplasma* (SAG1) and various brain cells (nestin, neurofilament, Hu C/D, GFAP, Iba1) followed by confocal laser scanning microscopy.

For the establishment and validation of a neurological examination protocol, guinea pigs (n=25) were examined based on the neurological examination protocol for dogs by 2 experienced neurologists.

Statistical analysis was performed using Graphpad Prism 9.0.0 and 9.4.1 software (test for normal distribution: Anderson-Darling test and D'Agostino&Pearson test; for comparison of two groups:

Summary

normally distributed: one-sided T test, not normally distributed: Mann-Whitney test; for comparison of more than 2 groups: normally distributed: simple analysis of variance followed by Tukey's *post hoc* test, not normally distributed: Kruskal-Wallis test followed by Dunn's *post hoc* test).

Results: In particular, dams infected with 500 oocysts showed shortened survival times and did not produce a single living offspring. Animals infected with 10 and 100 oocysts showed live births, stillbirths, abortions, and fetal resorptions (11 to 49% each). Strikingly, animals infected in the first trimester of gestation in particular had high rates (75%) of fetal resorptions, resembling the clinical picture in humans.

In the fetal brain, cell tropism of *T. gondii* was detected in neural stem cells, neurons, and astroglia. In addition, *T. gondii* infection resulted in significantly reduced numbers of neural stem cells ($P < 0.05$) and neurons ($P < 0.05$), with no increased number of necroses and apoptoses ($P > 0.05$).

In neurologic examination, hands-off examinations in particular had the best reproducibility of results. In contrast, proprioceptive testing in the pelvic limbs and menace response, vertical oculocephalic reflex, and mandibular sensitivity did not show a consistent response (cooperation rates 0% to 100%).

Conclusions: A neurological examination protocol for the guinea pig was established. In addition, the results show that *T. gondii* is transmitted vertically in guinea pigs and infects the brain of the offspring, demonstrating its suitability for the study of congenital toxoplasmosis. Thus, a suitable rodent model is now available for the study of human congenital toxoplasmosis. This opens new possibilities for experimental studies on the pathogenesis of toxoplasmosis in the developing brain in humans and animals. Distinct cell tropism of *T. gondii* was demonstrated. The observed reduction in neuron number could be attributed to decreased formation due to neural stem cell infection. Furthermore, our results contribute significantly to the understanding of the cortical malformations observed in individuals congenitally infected with *T. gondii* and help to develop new treatments and solutions for congenital toxoplasmosis.

7 Literaturverzeichnis

- Aguirre AA, Longcore T, Barbieri M, Dabritz H, Hill D, Klein PN, Lepczyk C, Lilly EL, McLeod R, Milcarsky J, Murphy CE, Su C, VanWormer E, Yolken R, Sizemore GC. The one health approach to toxoplasmosis: Epidemiology, control, and prevention strategies. *EcoHealth*. 2019;16:378–90. doi: 10.1007/s10393-019-01405-7.
- Akanmu AS, Osunkalu VO, Ofomah JN, Olowoselu FO. Pattern of demographic risk factors in the seroprevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in HIV infected patients at the Lagos University Teaching Hospital. *Nig Q J Hosp Med*. 2010;20:1–4. doi: 10.4314/nqjhm.v20i1.57974.
- Alizadeh MA, 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. doi: 10.1080/20477724.2018.1514137.
- Alvarado-Esquivel C, Liesenfeld O, Márquez-Conde JA, Estrada-Martínez S, Dubey JP. Seroepidemiology of infection with *Toxoplasma gondii* in workers occupationally exposed to water, sewage, and soil in Durango, Mexico. *J Parasitol*. 2010;96:847–50. doi: 10.1645/GE-2453.1.
- Alvarado-Esquivel C, Sánchez-Anguiano LF, Hernández-Tinoco J, Ramos-Nevarez A, Estrada-Martínez S, Cerrillo-Soto SM, Medina-Heredia GE, Guido-Arreola CA, Soto-Quintero AA, Beristain-Garcia I. Association between *Toxoplasma gondii* infection and history of blood transfusion: a case-control seroprevalence study. *J Int Med Res*. 2018;46:1626–33. doi: 10.1177/0300060518757928.
- Alvarado-Esquivel C, Sánchez-Anguiano LF, Mendoza-Larios A, Hernández-Tinoco J, Pérez-Ochoa JF, Antuna-Salcido EI, Rábago-Sánchez E, Liesenfeld O. Prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in brain and heart by Immunohistochemistry in a hospital-based autopsy series in Durango, Mexico. *Eur J Microbiol Immunol*. 2015;5:143–9. doi: 10.1556/1886.2015.00014.
- Amouei A, Sarvi S, Sharif M, Aghayan SA, Javidnia J, Mizani A, Moosazadeh M, Shams N, Hosseini SA, Hosseinejad Z, Nayeri Chegeni T, Badali H, Daryani A. A systematic review of *Toxoplasma gondii* genotypes and feline: Geographical distribution trends. *Transbound Emerg Dis*. 2020;67:46–64. doi: 10.1111/tbed.13340.
- Angevine JB, Sidman RL. Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse. *Nature*. 1961;192:766–8. doi: 10.1038/192766b0.
- Arling TA, Yolken RH, Lapidus M, Langenberg P, Dickerson FB, Zimmerman SA, Balis T, Cabassa JA, Scrandis DA, Tonelli LH, Postolache TT. *Toxoplasma gondii* antibody titers and history of suicide attempts in patients with recurrent mood disorders. *J Nerv Ment Dis*. 2009;197:905–8. doi: 10.1097/NMD.0b013e3181c29a23.
- Attardo A, Calegari F, Haubensak W, Wilsch-Bräuninger M, Huttner WB. Live imaging at the onset of cortical neurogenesis reveals differential appearance of the neuronal phenotype in apical versus basal progenitor progeny. *PLoS ONE*. 2008;3:e2388. doi: 10.1371/journal.pone.0002388.
- Attias M, Teixeira DE, Benchimol M, Vommaro RC, Crepaldi PH, Souza W de. The life-cycle of *Toxoplasma gondii* reviewed using animations. *Parasit Vectors*. 2020;13:588. doi: 10.1186/s13071-020-04445-z.
- Aurich C. Anatomie der Haustiere: Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis. 7. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2019.

Literaturverzeichnis

- Azevedo FAC, Carvalho LRB, Grinberg LT, Farfel JM, Ferretti REL, Leite REP, Jacob Filho W, Lent R, Herculano-Houzel S. Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *J Comp Neurol*. 2009;513:532–41. doi: 10.1002/cne.21974.
- Bahia-Oliveira LMG, Jones JL, Azevedo-Silva J, Alves CCF, Oréface F, Addiss DG. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2003;9:55–62. doi: 10.3201/eid0901.020160.
- Balasundaram MB, Andavar R, Palaniswamy M, Venkatapathy N. Outbreak of acquired ocular toxoplasmosis involving 248 patients. *Arch Ophthalmol*. 2010;128:28–32. doi: 10.1001/archophthalmol.2009.354.
- Barbero AM, Frasch HF. Pig and guinea pig skin as surrogates for human in vitro penetration studies: a quantitative review. *Toxicol In Vitro*. 2009;23:1–13. doi: 10.1016/j.tiv.2008.10.008.
- Basavaraju A. Toxoplasmosis in HIV infection: an overview. *Trop Parasitol*. 2016;6:129–35. doi: 10.4103/2229-5070.190817.
- Baum J, Gilberger T-W, Frischknecht F, Meissner M. Host-cell invasion by malaria parasites: insights from *Plasmodium* and *Toxoplasma*. *Trends Parasitol*. 2008;24:557–63. doi: 10.1016/j.pt.2008.08.006.
- Bayer SA, Altman J. Development of layer I and the subplate in the rat neocortex. *Exp Neurol*. 1990;107:48–62. doi: 10.1016/0014-4886(90)90062-W.
- Bérard-Badier M, Laugier M, Loucet E, Payan H. Le placenta dans la toxoplasmose congénitale aiguë expérimentale du cobaye. *Pathol Biol*. 1968;16:829–35. doi: 10.1159/000267659.
- Berenreiterová M, Flegr J, Kuběna AA, Němec P. The distribution of *Toxoplasma gondii* cysts in the brain of a mouse with latent toxoplasmosis: implications for the behavioral manipulation hypothesis. *PLoS ONE*. 2011;6:e28925. doi: 10.1371/journal.pone.0028925.
- Bessières M, Berrebi A, Rolland M, Bloom M, Roques C, Cassaing S, Courjault C, Séguéla J-P. Neonatal screening for congenital toxoplasmosis in a cohort of 165 women infected during pregnancy and influence of in utero treatment on the results of neonatal tests. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2001;94:37–45. doi: 10.1016/S0301-2115(00)00300-6.
- Betizeau M, Cortay V, Patti D, Pfister S, Gautier E, Bellemin-Ménard A, Afanassieff M, Huissoud C, Douglas RJ, Kennedy H, Dehay C. Precursor diversity and complexity of lineage relationships in the outer subventricular zone of the primate. *Neuron*. 2013;80:442–57. doi: 10.1016/j.neuron.2013.09.032.
- Beverley JK. Congenital transmission of toxoplasmosis through successive generations of mice. *Nature*. 1959;183:1348–9. doi: 10.1038/1831348a0.
- Bigna JJ, Tochie JN, Tounouga DN, Bekolo AO, Ymele NS, Youda EL, Sime PS, Nansseu JR. Global, regional, and country seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in pregnant women: a systematic review, modelling and meta-analysis. *Sci Rep*. 2020;10:12102. doi: 10.1038/s41598-020-69078-9.
- Blader I, Coleman B, Chen C-T, Gubbels M-J. The lytic cycle of *Toxoplasma gondii*: 15 years later. *Annu Rev Microbiol*. 2015;69:463–85. doi: 10.1146/annurev-micro-091014-104100.
- Blight AR, McGinnis ME, Borgens RB. Cutaneous trunci muscle reflex of the guinea pig. *J Comp Neurol*. 1990;296:614–33. doi: 10.1002/cne.902960408.
- Boltze J, Förchler A, Nitzsche B, Waldmin D, Hoffmann A, Boltze CM, Dreyer AY, Goldammer A, Reischauer A, Härtig W, Geiger KD, Barthel H, Emmrich F, Gille U. Permanent middle cerebral

Literaturverzeichnis

- artery occlusion in sheep: a novel large animal model of focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2008;28:1951–64. doi: 10.1038/jcbfm.2008.89.
- Boltze J, Nitzsche B, Geiger KD, Schoon H-A. Histopathological investigation of different MCAO modalities and impact of autologous bone marrow mononuclear cell administration in an ovine stroke model. *Transl Stroke Res.* 2011;2:279–93. doi: 10.1007/s12975-011-0101-5.
- Bonametti AM, Passos JdN, Da Silva EM, Bortoliero AL. Surto de toxoplasmose aguda transmitida através da ingestão de carne crua de gado ovino. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1997;30:21–5. doi: 10.1590/s0037-86821997000100005.
- Bongartz U, Nessler J, Maiolini A, Stein VM, Tipold A, Bathen-Nöthen A. Vestibular disease in dogs: association between neurological examination, MRI lesion localisation and outcome. *J Small Anim Pract.* 2020;61:57–63. doi: 10.1111/jsap.13070.
- Bosch-Driessen LE, Berendschot TT, Ongkosuwito JV, Rothova A. Ocular toxoplasmosis. *Ophthalmology.* 2002;109:869–78. doi: 10.1016/S0161-6420(02)00990-9.
- Boughattas S. *Toxoplasma* infection and milk consumption: meta-analysis of assumptions and evidences. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2017;57:2924–33. doi: 10.1080/10408398.2015.1084993.
- Bowie WR, King AS, Werker DH, Isaac-Renton JL, Bell A, Eng SB, Marion SA. Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. *Lancet.* 1997;350:173–7. doi: 10.1016/S0140-6736(96)11105-3.
- Boyer K, Hill D, Mui E, Wroblewski K, Karrison T, Dubey JP, Sautter M, Noble AG, Withers S, Swisher C, Heydemann P, Hosten T, Babiarz J, Lee D, Meier P, McLeod R. Unrecognized ingestion of *Toxoplasma gondii* oocysts leads to congenital toxoplasmosis and causes epidemics in North America. *Clin Infect Dis.* 2011;53:1081–9. doi: 10.1093/cid/cir667.
- Brunet J, Pfaff AW, Abidi A, Unoki M, Nakamura Y, Guinard M, Klein J-P, Candolfi E, Mousli M. *Toxoplasma gondii* exploits UHRF1 and induces host cell cycle arrest at G2 to enable its proliferation. *Cell Microbiol.* 2008;10:908–20. doi: 10.1111/j.1462-5822.2007.01093.x.
- Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL); 2021. Tierschutz - Verwendung von Versuchstieren im Jahr 2019 (zitiert vom 02. 09. 2021), <<https://www.bmel.de/DE/themen/tiere/tierschutz/versuchstierzahlen2019.html>>.
- Capobianco JD, Breganó RM, Navarro IT, Rezende Neto CP, Casella AMB, Mori FMRL, Pagliari S, Inoue IT, Reiche EMV. Congenital toxoplasmosis in a reference center of Paraná, Southern Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2014;18:364–71. doi: 10.1016/j.bjid.2013.11.009.
- Cárdenas A, Borrell V. Molecular and cellular evolution of corticogenesis in amniotes. *Cell Mol Life Sci.* 2020;77:1435–60. doi: 10.1007/s00018-019-03315-x.
- Carter AM. Animal models of human pregnancy and placentation: alternatives to the mouse. *Reproduction.* 2020;160:129-143. doi: 10.1530/REP-20-0354.
- Caviness VS. Neocortical histogenesis in normal and reeler mice: a developmental study based upon 3Hthymidine autoradiography. *Brain Res.* 1982;256:293–302. doi: 10.1016/0165-3806(82)90141-9.
- Chiebao DP, Bartley PM, Chianini F, Black LE, Burrells A, Pena HFJ, Soares RM, Innes EA, Katzer F. Early immune responses and parasite tissue distribution in mice experimentally infected with oocysts of either archetypal or non-archetypal genotypes of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology.* 2021;148:464–76. doi: 10.1017/S0031182020002346.

Literaturverzeichnis

- Christoph J, Kattner E, Seitz HM, Reiter-Owona I. Strategien zur Diagnostik und Behandlung der pränatalen *Toxoplasma*-Infektion - ein aktueller Überblick. Z Geburtshilfe Neonatol. 2004;208:10–6. doi: 10.1055/s-2004-815517.
- Cook AJ, Gilbert RE, Buffolano W, Zufferey J, Petersen E, Jenum PA, Foulon W, Sempri AE, Dunn DT. Sources of *Toxoplasma* infection in pregnant women: european multicentre case-control study. European Research Network on Congenital Toxoplasmosis. BMJ. 2000;321:142–7. doi: 10.1136/bmj.321.7254.142.
- Cortina-Borja M, Tan HK, Wallon M, Paul M, Prusa A, Buffolano W, Malm G, Salt A, Freeman K, Petersen E, Gilbert RE. Prenatal treatment for serious neurological sequelae of congenital toxoplasmosis: an observational prospective cohort study. PLoS Med. 2010;7. doi: 10.1371/journal.pmed.1000351.
- Costa VM, Langoni H. Detection of *Toxoplasma gondii* in the milk of experimentally infected Wistar female rats. J Venom Anim Toxins incl Trop Dis. 2010;16:368–74. doi: 10.1590/S1678-91992010000200016.
- Couvreur J. Le problème de la toxoplasmose congénitale. L'évolution sur quatre décennies. Presse médicale (Paris, France : 1983) 1999;28:753–7.
- Dard C, Marty P, Brenier-Pinchart M-P, Garnaud C, Fricker-Hidalgo H, Pelloux H, Pomares C. Management of toxoplasmosis in transplant recipients: an update. Expert Rev Anti Infect Ther. 2018;16:447–60. doi: 10.1080/14787210.2018.1483721.
- Dehay C, Kennedy H, Kosik KS. The outer subventricular zone and primate-specific cortical complexification. Neuron. 2015;85:683–94. doi: 10.1016/j.neuron.2014.12.060.
- Desmonts G, Couvreur J. Congenital toxoplasmosis. A prospective study of 378 pregnancies. N Engl J Med. 1974;290:1110–6. doi: 10.1056/NEJM197405162902003.
- Desmonts G, Couvreur J. Toxoplasmose congénitale. Etude prospective de l'issue de la grossesse chez 542 femmes atteintes de toxoplasmose acquise en cours de gestation. Ann Pediatr. 1984;31:805–9.
- Desmonts G, Couvreur J, Alison F, Baudelot J, Gerbeaux J, Lelong M. Epidemiological study on toxoplasmosis; the influence of cooking of butcher's meat on the frequency of human infection. Rev Fr Etud Clin Biol. 1965;10:952–8.
- Dewar AD. Litter size and the duration of pregnancy in mice. Q J Exp Physiol Cogn Med Sci. 1968;53:155–61. doi: 10.1113/expphysiol.1968.sp001954.
- Di Cristina M, Marocco D, Galizi R, Proietti C, Spaccapelo R, Crisanti A. Temporal and spatial distribution of *Toxoplasma gondii* differentiation into bradyzoites and tissue cyst formation *in vivo*. Infect Immun. 2008;76:3491–501. doi: 10.1128/IAI.00254-08.
- Dos Santos TR, Nunes CM, Luvizotto MCR, Moura AB de, Lopes WDZ, da Costa AJ, Bresciani KDS. Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental samples from public schools. Vet Parasitol. 2010;171:53–7. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.02.045.
- Dubey JP. Duration of immunity to shedding of *Toxoplasma gondii* oocysts by cats. J Parasitol. 1995;81:410. doi: 10.2307/3283823.
- Dubey JP. Comparative infectivity of oocysts and bradyzoites of *Toxoplasma gondii* for intermediate (mice) and definitive (cats) hosts. Vet Parasitol. 2006;140:69–75. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.03.018.
- Dubey JP. The history of *Toxoplasma gondii*—the first 100 years. J Eukaryot Microbiol. 2008;55:467–75. doi: 10.1111/j.1550-7408.2008.00345.x.

Literaturverzeichnis

- Dubey JP. History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. Int J Parasitol. 2009a;39:877–82. doi: 10.1016/j.ijpara.2009.01.005.
- Dubey JP. Toxoplasmosis in pigs-the last 20 years. Vet Parasitol. 2009b;164:89–103. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.05.018.
- Dubey JP. Toxoplasmosis in sheep-the last 20 years. Vet Parasitol. 2009c;163:1–14. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.02.026.
- Dubey JP. Toxoplasmosis of animals and humans. 2. Aufl. Boca Raton: CRC Press; 2016.
- Dubey JP, Frenkel JK. Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of *Toxoplasma* cysts. J Protozool. 1976;23:537–46. doi: 10.1111/j.1550-7408.1976.tb03836.x.
- Dubey JP, Jones JL. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. Int J Parasitol. 2008;38:1257–78. doi: 10.1016/j.ijpara.2008.03.007.
- 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, Miller NL, Frenkel JK. The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. J Exp Med. 1970;132:636–62. doi: 10.1084/jem.132.4.636.
- Dubey JP, Shen SK. Rat model of congenital toxoplasmosis. Infect Immun. 1991;59:3301–2. doi: 10.1128/iai.59.9.3301-3302.1991.
- Dubey JP, Urban JF. Diagnosis of transplacentally induced toxoplasmosis in pigs. Am J Vet Res. 1990;51:1295–9.
- Dubey JP, Verma SK, Ferreira LR, Oliveira S, Cassinelli AB, Ying Y, Kwok OCH, Tuo W, Chiesa OA, Jones JL. Detection and survival of *Toxoplasma gondii* in milk and cheese from experimentally infected goats. J Food Prot. 2014;77:1747–53. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-14-167.
- 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. doi: 10.1016/S0140-6736(98)08220-8.
- Eichenwald H. Experimental toxoplasmosis; transmission of the infection *in utero* and through the milk of lactating female mice. Am J Dis Child. 1948;76:307–15. doi: 10.1001/archpedi.1948.02030030317003.
- Elhence P, Agarwal P, Prasad KN, Chaudhary RK. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in North Indian blood donors: implications for transfusion transmissible toxoplasmosis. Transfus Apher Sci. 2010;43:37–40. doi: 10.1016/j.transci.2010.05.004.
- 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. doi: 10.1016/j.pt.2010.01.009.
- Elsheikha HM. Congenital toxoplasmosis: priorities for further health promotion action. Public Health. 2008;122:335–53. doi: 10.1016/j.puhe.2007.08.009.
- Elsheikha HM, Marra CM, Zhu X-Q. Epidemiology, pathophysiology, diagnosis, and management of cerebral toxoplasmosis. Clin Microbiol Rev. 2021;34. doi: 10.1128/CMR.00115-19.
- Ertug S, Okyay P, Turkmen M, Yuksel H. Seroprevalence and risk factors for *Toxoplasma* infection among pregnant women in Aydin province, Turkey. BMC Public Health. 2005;5:66. doi: 10.1186/1471-2458-5-66.

Literaturverzeichnis

- European Commission (EC); 2021. ALURES 2018 - European Commission (zitiert vom 02. 09. 2021), <https://webgate.ec.europa.eu/envdataportal/content/alures/section2_number-of-uses.html>.
- 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;583:1–64.
- Farkash AE, Maccabee PJ, Sher JH, Landesman SH, Hotson G. CNS toxoplasmosis in acquired immune deficiency syndrome: a clinical-pathological-radiological review of 12 cases. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 1986;49:744–8. doi: 10.1136/jnnp.49.7.744.
- Ferguson DJ, Hutchison WM. The host-parasite relationship of *Toxoplasma gondii* in the brains of chronically infected mice. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol. 1987;411:39–43. doi: 10.1007/BF00734512.
- Fietz SA, Huttner WB. Cortical progenitor expansion, self-renewal and neurogenesis—a polarized perspective. Curr Opin Neurobiol. 2011;21:23–35. doi: 10.1016/j.conb.2010.10.002.
- Fietz SA, Kelava I, Vogt J, Wilsch-Bräuninger M, Stenzel D, Fish JL, Corbeil D, Riehn A, Distler W, Nitsch R, Huttner WB. OSVZ progenitors of human and ferret neocortex are epithelial-like and expand by integrin signaling. Nat Neurosci. 2010;13:690–9. doi: 10.1038/nn.2553.
- Fietz SA, Lachmann R, Brandl H, Kircher M, Samusik N, Schröder R, Lakshmanaperumal N, Henry I, Vogt J, Riehn A, Distler W, Nitsch R, Enard W, Pääbo S, Huttner WB. Transcriptomes of germinal zones of human and mouse fetal neocortex suggest a role of extracellular matrix in progenitor self-renewal. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012;109:11836–41. doi: 10.1073/pnas.1209647109.
- Figueiredo CA, Steffen J, Morton L, Arumugam S, Liesenfeld O, Deli MA, Kröger A, Schüler T, Dunay IR. Immune response and pathogen invasion at the choroid plexus in the onset of cerebral toxoplasmosis. J Neuroinflammation. 2022;19:17. doi: 10.1186/s12974-021-02370-1.
- Finlay BL, Darlington RB. Linked regularities in the development and evolution of mammalian brains. Science. 1995;268:1578–84. doi: 10.1126/science.7777856.
- Fischer HG, Nitzgen B, Reichmann G, Gross U, Hadding U. Host cells of *Toxoplasma gondii* encystation in infected primary culture from mouse brain. Parasitol Res. 1997;83:637–41. doi: 10.1007/s004360050311.
- Flegr J, Horáček J. Negative effects of latent toxoplasmosis on mental health. Front Psychiatry. 2019;10:1012. doi: 10.3389/fpsyt.2019.01012.
- Flegr J, Prandota J, Sovičková M, Israili ZH. Toxoplasmosis—a global threat. Correlation of latent toxoplasmosis with specific disease burden in a set of 88 countries. PLoS ONE. 2014;9:e90203. doi: 10.1371/journal.pone.0090203.
- Flori P, Hafid J, Bourlet T, Raberin H, Genin C, Sung RTM. Experimental model of congenital toxoplasmosis in guinea pigs: Use of quantitative and qualitative PCR for the study of maternofetal transmission. J Med Microbiol. 2002;51:871–8. doi: 10.1099/0022-1317-51-10-871.
- Flori P, Hafid J, Thonier V, Belleste B, Raberin H, Tran Manh Sung R. Parasite load in guinea pig foetus with real time PCR after maternofetal transmission of *Toxoplasma gondii*. Parasite. 2003;10:133–40. doi: 10.1051/parasite/2003102133.
- Florio M, Huttner WB. Neural progenitors, neurogenesis and the evolution of the neocortex. Development. 2014;141:2182–94. doi: 10.1242/dev.090571.
- Foulon W, Naessens A, Ho-Yen D. Prevention of congenital toxoplasmosis. J Perinat Med. 2000;28:337–45. doi: 10.1515/JPM.2000.043.

Literaturverzeichnis

- Franco SJ, Martinez-Garay I, Gil-Sanz C, Harkins-Perry SR, Müller U. Reelin regulates cadherin function via Dab1/Rap1 to control neuronal migration and lamination in the neocortex. *Neuron*. 2011;69:482–97. doi: 10.1016/j.neuron.2011.01.003.
- Frenkel JK. *Toxoplasma* in and around us. *BioScience*. 1973;23:343–52. doi: 10.2307/1296513.
- Frenkel JK. Pathophysiology of toxoplasmosis. *Parasitol Today*. 1988;4:273–8. doi: 10.1016/0169-4758(88)90018-X.
- Frenkel JK, Dubey JP, Miller NL. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science*. 1970;167:893–6. doi: 10.1126/science.167.3919.893.
- Frenkel JK, Ruiz A, Chinchilla M. Soil survival of toxoplasma oocysts in Kansas and Costa Rica. *Am J Trop Med Hyg*. 1975;24:439–43. doi: 10.4269/ajtmh.1975.24.439.
- Frenkel LD, Gomez F, Sabahi F. The pathogenesis of microcephaly resulting from congenital infections: why is my baby's head so small? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2018;37:209–26. doi: 10.1007/s10096-017-3111-8.
- Freyre A, Correa O, Falcón J, Mendez J, González M, Venzal JM. Some factors influencing transmission of *Toxoplasma* in pregnant rats fed cysts. *Parasitol Res*. 2001;87:941–4. doi: 10.1007/s004360100486.
- Freyre A, Falcón J, Méndez J, González M. *Toxoplasma gondii*: an improved rat model of congenital infection. *Exp Parasitol*. 2008;120:142–6. doi: 10.1016/j.exppara.2008.06.007.
- Gal JS, Morozov YM, Ayoub AE, Chatterjee M, Rakic P, Haydar TF. Molecular and morphological heterogeneity of neural precursors in the mouse neocortical proliferative zones. *J Neurosci*. 2006;26:1045–56. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4499-05.2006.
- Garosi L, Lowrie M. The neurological examination. In: Platt SR, Olby NJ, Hrsg. *BSAVA manual of canine and feline neurology*. 4. Aufl. Quedgeley: British Small Animal Veterinary Association; 2013. p. 1–24.
- Gay-Andrieu F, Marty P, Pialat J, Sournies G, Drier de Laforte T, Peyron F. Fetal toxoplasmosis and negative amniocentesis: necessity of an ultrasound follow-up. *Prenat Diagn*. 2003;23:558–60. doi: 10.1002/pd.632.
- Gil-Sanz C, Franco SJ, Martinez-Garay I, Espinosa A, Harkins-Perry S, Müller U. Cajal-Retzius cells instruct neuronal migration by coincidence signaling between secreted and contact-dependent guidance cues. *Neuron*. 2013;79:461–77. doi: 10.1016/j.neuron.2013.06.040.
- Gras L, Wallon M, Pollak A, Cortina-Borja M, Evengard B, Hayde M, Petersen E, Gilbert R. Association between prenatal treatment and clinical manifestations of congenital toxoplasmosis in infancy: a cohort study in 13 European centres. *Acta Paediatr*. 2005;94:1721–31. doi: 10.1111/j.1651-2227.2005.tb01844.x.
- Grégoire A, Allard A, Huamán E, León S, Silva RM, Buff S, Berard M, Joly T. Control of the estrous cycle in guinea-pig (*Cavia porcellus*). *Theriogenology*. 2012;78:842–7. doi: 10.1016/j.theriogenology.2012.03.034.
- Grigsby PL. Animal models to study placental development and function throughout normal and dysfunctional human pregnancy. *Semin Reprod Med*. 2016;34:11–6. doi: 10.1055/s-0035-1570031.
- Grochow T, Beck B, Rentería-Solís Z, Schares G, Maksimov P, Strube C, Seeger J, Raqué L, Ulrich R, Dauschies A, Fietz SA. Establishment and validation of a guinea pig model for human congenital toxoplasmosis. *Parasit Vectors*. 2021;14:389. doi: 10.1186/s13071-021-04890-4.

Literaturverzeichnis

- Gross U. Prävalenz und Public-Health-Aspekte der Toxoplasmose. Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz. 2004;47:692–7. doi: 10.1007/s00103-004-0859-7.
- Gross U, Lüder CG, Hendgen V, Heeg C, Sauer I, Weidner A, Krczal D, Enders G. Comparative immunoglobulin G antibody profiles between mother and child (CGMC test) for early diagnosis of congenital toxoplasmosis. J Clin Microbiol. 2000;38:3619–22. doi: 10.1128/JCM.38.10.3619-3622.2000.
- Gupta A, Sanada K, Miyamoto DT, Rovelstad S, Nadarajah B, Pearlman AL, Brunstrom J, Tsai L-H. Layering defect in p35 deficiency is linked to improper neuronal-glia interaction in radial migration. Nat Neurosci 2003;6:1284–91. doi: 10.1038/nn1151.
- Halonen SK, Lyman WD, Chiu FC. Growth and development of *Toxoplasma gondii* in human neurons and astrocytes. J Neuropathol Exp Neurol. 1996;55:1150–6. doi: 10.1097/00005072-199611000-00006.
- Halonen SK, Weiss LM. Toxoplasmosis. Handb Clin Neurol. 2013;114:125–45. doi: 10.1016/B978-0-444-53490-3.00008-X.
- Han W, Sestan N. Cortical projection neurons: sprung from the same root. Neuron. 2013;80:1103–5. doi: 10.1016/j.neuron.2013.11.016.
- Hansen DV, Lui JH, Flandin P, Yoshikawa K, Rubenstein JL, Alvarez-Buylla A, Kriegstein AR. Non-epithelial stem cells and cortical interneuron production in the human ganglionic eminences. Nat Neurosci. 2013;16:1576–87. doi: 10.1038/nn.3541.
- Hansen DV, Lui JH, Parker PRL, Kriegstein AR. Neurogenic radial glia in the outer subventricular zone of human neocortex. Nature. 2010;464:554–61. doi: 10.1038/nature08845.
- Hartley WJ, Marshall SC. Toxoplasmosis as a cause of ovine perinatal mortality. N Z Vet J. 1957;5:119–24. doi: 10.1080/00480169.1957.33275.
- Haubensak W, Attardo A, Denk W, Huttner WB. Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: a major site of neurogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101:3196–201. doi: 10.1073/pnas.0308600100.
- Haumont M, Delhaye L, Garcia L, Jurado M, Mazzu P, Daminet V, Verlant V, Bollen A, Biemans R, Jacquet A. Protective immunity against congenital toxoplasmosis with recombinant SAG1 protein in a guinea pig model. Infect Immun. 2000;68:4948–53.
- Havelaar AH, Kemmeren JM, Kortbeek LM. Disease burden of congenital toxoplasmosis. Clin Infect Dis. 2007;44:1467–74. doi: 10.1086/517511.
- Hendry SH, Schwark HD, Jones EG, Yan J. Numbers and proportions of GABA-immunoreactive neurons in different areas of monkey cerebral cortex. J Neurosci. 1987;7:1503–19. doi: 10.1523/JNEUROSCI.07-05-01503.1987.
- Henry L, Beverley J. Toxoplasmosis in rats and guinea-pigs. J Comp Pathol. 1977;87:97–102. doi: 10.1016/0021-9975(77)90084-6.
- Herrero L, Gracia MJ, Pérez-Arquillué C, Lázaro R, Herrera M, Herrera A, Bayarri S. *Toxoplasma gondii*: pig seroprevalence, associated risk factors and viability in fresh pork meat. Vet Parasitol. 2016;224:52–9. doi: 10.1016/j.vetpar.2016.05.010.
- Hickman DL, Johnson J, Vemulapalli TH, Crisler JR, Shepherd R. Commonly used animal models. Principles of Animal Research for Graduate and Undergraduate Students. 2017:117–75. doi: 10.1016/B978-0-12-802151-4.00007-4.

Literaturverzeichnis

- Hill D, Coss C, Dubey JP, Wroblewski K, Sautter M, Hosten T, Muñoz-Zanzi C, Mui E, Withers S, Boyer K, Hermes G, Coyne J, Jagdis F, Burnett A, McLeod P, Morton H, Robinson D, McLeod R. Identification of a sporozoite-specific antigen from *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol*. 2011;97:328–37. doi: 10.1645/GE-2782.1.
- Hotop A, Hlobil H, Gross U. Efficacy of rapid treatment initiation following primary *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. *Clin Infect Dis*. 2012;54:1545–52. doi: 10.1093/cid/cis234.
- Hovakimyan A, Cunninghamjr E. Ocular toxoplasmosis. *Ophthalmol Clin North Am*. 2002;15:327–32. doi: 10.1016/S0896-1549(02)00030-5.
- Howe DK, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis* 1995;172:1561–6. doi: 10.1093/infdis/172.6.1561.
- Hutchison WM. Experimental transmission of *Toxoplasma gondii*. *Nature*. 1965;206:961–2. doi: 10.1038/206961a0.
- Hutchison WM, Dunachie JF, Siim JC, Work K. Life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Br Med J*. 1969;4:806. doi: 10.1136/bmj.4.5686.806-b.
- Jewell ML, Frenkel JK, Johnson KM, Reed V, Ruiz A. Development of *Toxoplasma* oocysts in neotropical felidae. *Am J Trop Med Hyg*. 1972;21:512–7. doi: 10.4269/ajtmh.1972.21.512.
- Joiner KA, Dubremetz JF. *Toxoplasma gondii*: a protozoan for the nineties. *Infect Immun*. 1993;61:1169–72.
- Jones JL, Lopez B, Alvarez Mury M, Wilson M, Klein R, Luby S, Maguire JH. *Toxoplasma gondii* infection in rural Guatemalan children. *Am J Trop Med Hyg*. 2005;72:295–300.
- 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. doi: 10.1086/605433.
- Jones JL, Lopez A, Wilson M, Schulkin J, Gibbs R. Congenital toxoplasmosis: a review. *Obstet Gynecol Surv*. 2001;56:296–305. doi: 10.1097/00006254-200105000-00025.
- Jones., Adriana Lopez, Marianna Wilson. Congenital toxoplasmosis. *AFP* 2003;67:2131–8.
- Jungersen G, Bille-Hansen V, Jensen L, Lind P. Transplacental transmission of *Toxoplasma gondii* in minipigs infected with strains of different virulence. *J Parasitol*. 2001;87:108–13. doi: 10.1645/0022-3395(2001)087[0108:TTOTGI]2.0.CO;2.
- Kalebic N, Huttner WB. Basal progenitor morphology and neocortex evolution. *Trends Neurosci*. 2020;43:843–53. doi: 10.1016/j.tins.2020.07.009.
- Kalusa M, Heinrich MD, Sauerland C, Morawski M, Fietz SA. Developmental differences in neocortex neurogenesis and maturation between the altricial dwarf rabbit and precocial guinea pig. *Front Neuroanat*. 2021;15:678385. doi: 10.3389/fnana.2021.678385.
- Kapperud G, Jennum PA, Stray-Pedersen B, Melby KK, Eskild A, Eng J. Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy. Results of a prospective case-control study in Norway. *Am J Epidemiol*. 1996;144:405–12. doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a008942.
- Khurana S, Batra N. Toxoplasmosis in organ transplant recipients: evaluation, implication, and prevention. *Trop Parasitol*. 2016;6:123–8. doi: 10.4103/2229-5070.190814.
- Kijlstra A, Jongert E. Control of the risk of human toxoplasmosis transmitted by meat. *Int J Parasitol*. 2008;38:1359–70. doi: 10.1016/j.ijpara.2008.06.002.
- Kim K, Weiss LM. *Toxoplasma*: the next 100years. *Microbes Infect*. 2008;10:978–84. doi: 10.1016/j.micinf.2008.07.015.

Literaturverzeichnis

- Kim MJ, Jung B-K, Cho J, Song H, Pyo K-H, Lee JM, Kim M-K, Chai J-Y. Exosomes secreted by *Toxoplasma gondii*-infected L6 cells: Their effects on host cell proliferation and cell cycle changes. Korean J Parasitol. 2016;54:147–54. doi: 10.3347/kjp.2016.54.2.147.
- 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. doi: 10.1111/j.1469-0691.2007.01771.x.
- Kraft W. Heimtiere als Patienten in der tierärztlichen Praxis – Entwicklung seit 1967. Tierarztl Prax Ausg K. 2005;33:221–6. doi: 10.1055/s-0037-1622468.
- Kressin M, Brehm R, Schnorr B. Embryologie der Haustiere. 7. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2019.
- Kriegstein A, Alvarez-Buylla A. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. Annu Rev Neurosci. 2009;32:149–84. doi: 10.1146/annurev.neuro.051508.135600.
- Kriegstein AR, Götz M. Radial glia diversity: a matter of cell fate. Glia. 2003;43:37–43. doi: 10.1002/glia.10250.
- Kusbeci OY, Miman O, Yaman M, Aktepe OC, Yazar S. Could *Toxoplasma gondii* have any role in Alzheimer disease? Alzheimer Dis Assoc Disord. 2011;25:1–3. doi: 10.1097/WAD.0b013e3181f73bc2.
- Langenecker M, Clauss M, Hässig M, Hatt J-M. Vergleichende Untersuchung zur Krankheitsverteilung bei Kaninchen, Meerschweinchen, Ratten und Frettchen. Tierarztl Prax Ausg K. 2009;37:326–33. doi: 10.5167/UZH-23399.
- Lebech M, Joynson DH, Seitz HM, Thulliez P, Gilbert RE, Dutton GN, Ovlisen B, Petersen E. Classification system and case definitions of *Toxoplasma gondii* infection in immunocompetent pregnant women and their congenitally infected offspring. European Research Network on Congenital Toxoplasmosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1996;15:799–805. doi: 10.1007/BF01701522.
- Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. Cell. 1990;60:585–95. doi: 10.1016/0092-8674(90)90662-X.
- Letinic K, Zoncu R, Rakic P. Origin of GABAergic neurons in the human neocortex. Nature. 2002;417:645–9. doi: 10.1038/nature00779.
- Liberg O, Sandell M, Pontier D, Natoli E. Density spatial organisation and reproductive tactics in the domestic cat and other felids. In: Turner DC, Bateson P, Hrsg. The domestic cat: the biology of its behavior. 2. Aufl. Cambridge: Cambridge University Press; 2000. p. 119–48.
- Liebich HG. Funktionelle Histologie der Haussäugetiere und Vögel: Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis. 5. Aufl. Stuttgart: Schattauer; 2009.
- Ling VJ, Lester D, Mortensen PB, Langenberg PW, Postolache TT. *Toxoplasma gondii* seropositivity and suicide rates in women. J Nerv Ment Dis. 2011;199:440–4. doi: 10.1097/NMD.0b013e318221416e.
- Lodato S, Arlotta P. Generating neuronal diversity in the mammalian cerebral cortex. Annu Rev Cell Dev Biol. 2015;31:699–720. doi: 10.1146/annurev-cellbio-100814-125353.
- Lui JH, Hansen DV, Kriegstein AR. Development and evolution of the human neocortex. Cell. 2011;146:18–36. doi: 10.1016/j.cell.2011.06.030.

Literaturverzeichnis

- Maenz M, Schlüter D, Liesenfeld O, Schares G, Gross U, Pleyer U. Ocular toxoplasmosis past, present and new aspects of an old disease. *Prog Retin Eye Res.* 2014;39:77–106. doi: 10.1016/j.preteyeres.2013.12.005.
- Maksimov P, Zerweck J, Maksimov A, Hotop A, Gross U, Spekker K, Däubener W, Werdermann S, Niederstrasser O, Petri E, Mertens M, Ulrich RG, Conraths FJ, Schares G. Analysis of clonal type-specific antibody reactions in *Toxoplasma gondii* seropositive humans from Germany by peptide-microarray. *PLoS ONE.* 2012;7:e34212. doi: 10.1371/journal.pone.0034212.
- Maldonado YA, Read JS. Diagnosis, treatment, and prevention of congenital toxoplasmosis in the United States. *Pediatrics.* 2017;139. doi: 10.1542/peds.2016-3860.
- Mancinelli E. Neurologic examination and diagnostic testing in rabbits, ferrets, and rodents. *J Exot Pet Med.* 2015;24:52–64. doi: 10.1053/j.jepm.2014.12.006.
- Maquera-Afaray J, Luna-Vilchez M, Salazar-Mesones B, Chiara-Chilet C, Cordero-Campos A, López JW. Toxoplasmosis congénita con enfermedad neurológica severa en un hospital de referencia del Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2022;39:208–13. doi: 10.17843/rpmesp.2022.392.10897.
- Marín O, Rubenstein JLR. Cell migration in the forebrain. *Annu Rev Neurosci.* 2003;26:441–83. doi: 10.1146/annurev.neuro.26.041002.131058.
- McAuley JB. Congenital toxoplasmosis. *J Pediatric Infect Dis Soc.* 2014;3 Suppl 1:S30-5. doi: 10.1093/jpids/piu077.
- McLeod R, Boyer K, Karrison T, Kasza K, Swisher C, Roizen N, Jalbrzikowski J, Remington J, Heydemann P, Noble AG, Mets M, Holfels E, Withers S, Latkany P, Meier P. Outcome of treatment for congenital toxoplasmosis, 1981-2004: the National Collaborative Chicago-Based, Congenital Toxoplasmosis Study. *Clin Infect Dis.* 2006;42:1383–94. doi: 10.1086/501360.
- Mehdi Sharif, Roghiyeh Faridnia, Shahabeddin Sarvi, Shirzad Gholami, Hamed Kalani, Ahmad Daryani. Evaluating of Wistar rat and BALB/c mouse as animal models for congenital, cerebral and ocular toxoplasmosis. *Acta Parasit.* 2018;63:808–13. doi: 10.1515/ap-2018-0098.
- Meireles LR, Ekman CCJ, Andrade HF de, Luna, Expedito José de Albuquerque. Human toxoplasmosis outbreaks and the agent infecting form. Findings from a systematic review. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2015;57:369–76. doi: 10.1590/S0036-46652015000500001.
- Meredith AL, Richardson J. Neurological diseases of rabbits and rodents. *J Exot Pet Med.* 2015;24:21–33. doi: 10.1053/j.jepm.2014.12.007.
- Mess A. The guinea pig placenta: model of placental growth dynamics. *Placenta.* 2007;28:812–5. doi: 10.1016/j.placenta.2007.02.005.
- Mévélec M-N, Ducournau C, Bassuny Ismael A, Olivier M, Sèche E, Lebrun M, Bout D, Dimier-Poisson I. Mic1-3 Knockout *Toxoplasma gondii* is a good candidate for a vaccine against *T. gondii*-induced abortion in sheep. *Vet Res.* 2010;41:49. doi: 10.1051/vetres/2010021.
- Miller NL, Frenkel JK, Dubey JP. Oral infections with *Toxoplasma* cysts and oocysts in felines, other mammals, and in birds. *J Parasitol.* 1972;58:928–37.
- Miman O, Kusbeci OY, Aktepe OC, Cetinkaya Z. The probable relation between *Toxoplasma gondii* and Parkinson's disease. *Neurosci Lett.* 2010;475:129–31. doi: 10.1016/j.neulet.2010.03.057.
- Miyata T, Kawaguchi A, Saito K, Kawano M, Muto T, Ogawa M. Asymmetric production of surface-dividing and non-surface-dividing cortical progenitor cells. *Development.* 2004;131:3133–45. doi: 10.1242/dev.01173.

Literaturverzeichnis

- Molestina RE, El-Guendy N, Sinai AP. Infection with *Toxoplasma gondii* results in dysregulation of the host cell cycle. *Cell Microbiol.* 2008;10:1153–65. doi: 10.1111/j.1462-5822.2008.01117.x.
- Molnár Z, Clowry GJ, Šestan N, Alzu'bi A, Bakken T, Hevner RF, Hüppi PS, Kostović I, Rakic P, Anton ES, Edwards D, Garcez P, Hoerder-Suabedissen A, Kriegstein A. New insights into the development of the human cerebral cortex. *J Anat.* 2019;235:432–51. doi: 10.1111/joa.13055.
- Molnár Z, Kaas JH, Carlos JA de, Hevner RF, Lein E, Němec P. Evolution and development of the mammalian cerebral cortex. *Brain Behav Evol.* 2014;83:126–39. doi: 10.1159/000357753.
- Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. *Lancet.* 2004;363:1965–76. doi: 10.1016/S0140-6736(04)16412-X.
- Montoya JG, Remington JS. Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. *Clin Infect Dis.* 2008;47:554–66. doi: 10.1086/590149.
- Mordue DG, Håkansson S, Niesman I, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* resides in a vacuole that avoids fusion with host cell endocytic and exocytic vesicular trafficking pathways. *Exp Parasitol.* 1999;92:87–99. doi: 10.1006/expr.1999.4412.
- Moshfe A, Arefkhan N, Sarkari B, Kazemi S, Mardani A. *Toxoplasma gondii* in blood donors: a study in Boyer-Ahmad County, Southwest Iran. *Interdiscip Perspect Infect Dis.* 2018;2018:3813612. doi: 10.1155/2018/3813612.
- Moura L de, Bahia-Oliveira LMG, Wada MY, Jones JL, Tuboi SH, Carmo EH, Ramalho WM, Camargo NJ, Trevisan R, Graça RMT, Da Silva AJ, Moura I, Dubey JP, Garrett DO. Waterborne toxoplasmosis, Brazil, from field to gene. *Emerg Infect Dis.* 2006;12:326–9. doi: 10.3201/eid1202.041115.
- Mouveaux T, Roger E, Gueye A, Eysert F, Huot L, Grenier-Boley B, Lambert J-C, Gissot M. Primary brain cell infection by *Toxoplasma gondii* reveals the extent and dynamics of parasite differentiation and its impact on neuron biology. *Open Biol.* 2021;11:210053. doi: 10.1098/rsob.210053.
- Müller J, Aguado-Martínez A, Ortega-Mora L-M, Moreno-Gonzalo J, Ferre I, Hulverson MA, Choi R, McCloskey MC, Barrett LK, Maly DJ, Ojo KK, van Voorhis W, Hemphill A. Development of a murine vertical transmission model for *Toxoplasma gondii* oocyst infection and studies on the efficacy of bumped kinase inhibitor (BKI)-1294 and the naphthoquinone buparvaquone against congenital toxoplasmosis. *J Antimicrob Chemother.* 2017;72:2334–41. doi: 10.1093/jac/dkx134.
- Munday BL, Dubey JP. Serology of experimental toxoplasmosis in pregnant ewes and their foetuses. *Aust Vet J.* 1986;63:353–5. doi: 10.1111/j.1751-0813.1986.tb02894.x.
- Nagasawa H. Pattern of pregnancy and parturition in Sprague-Dawley rats. *Jikken Dobutsu.* 1982;31:43–6. doi: 10.1538/expanim1978.31.1_43.
- Nickel R, Schummer A, Seiferle E. *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere.* 4. Aufl. Stuttgart: Parey; 2004.
- Nicolle C, Manceaux L. Sur une infection à corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. *C R Seances Acad Sci.* 1908:763–6.
- Nicolle C, Manceaux L. Sur un protozoaire nouveau du gondi. *C R Seances Acad Sci.* 1909:369–72.
- Noback CR, Strominger NL, Ruggiero DA, Demarest RJ. *The human nervous system: structure and function.* 6. Aufl. Totowa: Humana Press; 2007.
- Noctor SC, Flint AC, Weissman TA, Dammerman RS, Kriegstein AR. Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature.* 2001;409:714–20. doi: 10.1038/35055553.

Literaturverzeichnis

- Noctor SC, Martínez-Cerdeño V, Ivic L, Kriegstein AR. Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat Neurosci.* 2004;7:136–44. doi: 10.1038/nn1172.
- Ohata S, Alvarez-Buylla A. Planar organization of multiciliated ependymal (E1) cells in the brain ventricular epithelium. *Trends Neurosci.* 2016;39:543–51. doi: 10.1016/j.tins.2016.05.004.
- Opsteegh M, Kortbeek TM, Havelaar AH, van der Giessen JWB. Intervention strategies to reduce human *Toxoplasma gondii* disease burden. *Clin Infect Dis.* 2015;60:101–7. doi: 10.1093/cid/ciu721.
- Österreichische Gesellschaft für Hygiene, Mikrobiologie und Präventivmedizin (ÖGHMPH); 2013. Österreichische Richtlinie für das Toxoplasmose-Screening in der Schwangerschaft und frühen Kindheit Screening, Therapie und kindliches Follow-up (zitiert vom 19. 01. 2021), <https://www.oeghmp.at/media/richtlinie_toxoplasmose-screening.pdf>.
- Padilla-Carlin DJ, McMurray DN, Hickey AJ. The guinea pig as a model of infectious diseases. *Comp Med.* 2008;58:324–40.
- Pappas G, Roussos N, Falagas ME. Toxoplasmosis snapshots: global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. *Int J Parasitol.* 2009;39:1385–94. doi: 10.1016/j.ijpara.2009.04.003.
- Paquet C, Yudin MH, Allen VM, Bouchard C, Boucher M, Caddy S, Castillo E, Money DM, Murphy KE, Ogilvie G, van Schalkwyk J, Senikas V. Toxoplasmosis in pregnancy: prevention, screening, and treatment. *J Obstet Gynaecol Can.* 2013;35:78–9. doi: 10.1016/S1701-2163(15)31053-7.
- Park Y-H, Nam H-W. Clinical features and treatment of ocular toxoplasmosis. *Korean J Parasitol.* 2013;51:393–9. doi: 10.3347/kjp.2013.51.4.393.
- Parlog A, Schlüter D, Dunay IR. *Toxoplasma gondii* induced neuronal alterations. *Parasite Immunol.* 2015;37:159–70. doi: 10.1111/pim.12157.
- Paulino JP, Vitor RW. Experimental congenital toxoplasmosis in Wistar and Holtzman rats. *Parasite.* 1999;6:63–6. doi: 10.1051/parasite/1999061063.
- Pearce BD, Kruszon-Moran D, Jones JL. The relationship between *Toxoplasma gondii* infection and mood disorders in the third National Health and Nutrition Survey. *Biol Psychiatry.* 2012;72:290–5. doi: 10.1016/j.biopsych.2012.01.003.
- 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. doi: 10.1111/j.1863-2378.2009.01278.x.
- Phan L, Kasza K, Jalbrzikowski J, Noble AG, Latkany P, Kuo A, Mieler W, Meyers S, Rabiah P, Boyer K, Swisher C, Mets M, Roizen N, Cezar S, Sautter M, Remington J, Meier P, McLeod R. Longitudinal study of new eye lesions in children with toxoplasmosis who were not treated during the first year of life. *Am J Ophthalmol.* 2008;146:375–84. doi: 10.1016/j.ajo.2008.04.033.
- Pinson A, Namba T, Huttner WB. Malformations of human neocortex in development - their progenitor cell basis and experimental model systems. *Front Cell Neurosci.* 2019;13:305. doi: 10.3389/fncel.2019.00305.
- Pires LB, Barbosa HS, Santiago MF, Adesse D. Infection of mouse neural progenitor cells by *Toxoplasma gondii* affects in vitro proliferation, differentiation and migration. *bioRxiv.* 2021:2021.05.31.446482. doi: 10.1101/2021.05.31.446482.
- Pleyer U, Gross U, Schlüter D, Wilking H, Seeber F. Toxoplasmosis in Germany. *Dtsch Arztebl Int.* 2019;116:435–44. doi: 10.3238/arztebl.2019.0435.

Literaturverzeichnis

- Porter SB, Sande MA. Toxoplasmosis of the central nervous system in the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med.* 1992;327:1643–8. doi: 10.1056/NEJM199212033272306.
- Potter GE, W. L. Brueck. Nervous system of guinea pig (*Cavia porcellus*). *Bios.* 1958;29:185–96.
- Prestrud KW, Åsbakk K, Oksanen A, Näreaho A, Jokelainen P. *Toxoplasma gondii* in the Subarctic and Arctic. *Acta Vet Scand.* 2010;52:S7. doi: 10.1186/1751-0147-52-S1-S7.
- Purves D, Hrsg. *Neuroscience*. 5th edition. Sunderland (Mass.): Sinauer; 2012.
- Pusch L, Romeike B, Deckert M, Mawrin C. Persistent *Toxoplasma* bradyzoite cysts in the brain: incidental finding in an immunocompetent patient without evidence of a toxoplasmosis. *Clin Neuropathol.* 2009;28:210–2. doi: 10.5414/npp28210.
- Rakic P. Specification of cerebral cortical areas. *Science.* 1988;241:170–6. doi: 10.1126/science.3291116.
- Rawal BD. Toxoplasmosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1959;53:61–3. doi: 10.1016/0035-9203(59)90084-7.
- Remington JS, Jacobs L, Melton ML. Congenital transmission of toxoplasmosis from mother animals with acute and chronic infections. *J Infect Dis.* 1961;108:163–73. doi: 10.1093/infdis/108.2.163.
- Robert Koch-Institut (RKI); 2018. RKI-Ratgeber - Toxoplasmose (zitiert vom 30. 08. 2021), <https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Toxoplasmose.html;jsessionid=1871061C32E6721F0A8351163970A78A.internet062#doc2390224bodyText9>.
- Robert-Gangneux F, Dardé M-L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clin Microbiol Rev.* 2012;25:264–96. doi: 10.1128/CMR.05013-11.
- Robert-Gangneux F, Gavinet MF, Ancelle T, Raymond J, Tourte-Schaefer C, Dupouy-Camet J. Value of prenatal diagnosis and early postnatal diagnosis of congenital toxoplasmosis: retrospective study of 110 cases. *J Clin Microbiol.* 1999;37:2893–8. doi: 10.1128/JCM.37.9.2893-2898.1999.
- Roberts CW, Alexander J. Studies on a murine model of congenital toxoplasmosis: vertical disease transmission only occurs in BALB/c mice infected for the first time during pregnancy. *Parasitology.* 1992;104:19–23. doi: 10.1017/s0031182000060753.
- Ross EC, Olivera GC, Barragan A. Early passage of *Toxoplasma gondii* across the blood-brain barrier. *Trends Parasitol.* 2022;38:450–61. doi: 10.1016/j.pt.2022.02.003.
- Rüsse I, Sinowatz F. *Lehrbuch der Embryologie der Haustiere*. 3. Aufl. München: Lehmanns; 2010.
- Saadatnia G, Golkar M. A review on human toxoplasmosis. *Scand J Infect Dis.* 2012;44:805–14. doi: 10.3109/00365548.2012.693197.
- Sabin AB. Biological and Immunological Identity of *Toxoplasma* of Animal and Human Origin. *Exp Biol Med.* 1939;41:75–80. doi: 10.3181/00379727-41-10577.
- Sabin AB. Toxoplasmic encephalitis in children. *JAMA* 1941;116:801–7. doi: 10.1001/jama.1941.02820090001001.
- Sabin AB, Feldman HA. Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoon parasite (*Toxoplasma*). *Science.* 1948;108:660–3. doi: 10.1126/science.108.2815.660.
- Sabin AB, Olitsky PK. *Toxoplasma* and obligate intracellular parasitism. *Science.* 1937;85:336–8. doi: 10.1126/science.85.2205.336.
- Saladin KS. *Anatomy & physiology: The unity of form and function*. 6. Aufl. New York: McGraw-Hill; 2012.

Literaturverzeichnis

- Salameh A, Kühne L, Grassl M, Gerdom M, Salisch S von, Vollroth M, Bakhtiary F, Mohr F-W, Dähnert I, Dhein S. Protective effects of pulsatile flow during cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg.* 2015;99:192–9. doi: 10.1016/j.athoracsur.2014.07.070.
- Salomon F-V, Geyer H, Gille U, Hrsg. *Anatomie für die Tiermedizin*. 4. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; Georg Thieme Verlag KG; 2020.
- Samojłowicz D, Twarowska-Małczyńska J, Borowska-Solonyanko A, Poniatowski ŁA, Sharma N, Olczak M. Presence of *Toxoplasma gondii* infection in brain as a potential cause of risky behavior: a report of 102 autopsy cases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2019;38:305–17. doi: 10.1007/s10096-018-3427-z.
- Sauerland C, Menzies BR, Glatzle M, Seeger J, Renfree MB, Fietz SA. The basal radial glia occurs in marsupials and underlies the evolution of an expanded neocortex in therian mammals. *Cereb Cortex.* 2018;28:145–57. doi: 10.1093/cercor/bhw360.
- Sauleau P, Lapouble E, Val-Laillet D, Malbert C-H. The pig model in brain imaging and neurosurgery. *Animal.* 2009;3:1138–51. doi: 10.1017/S1751731109004649.
- Schares G, Vrhovec MG, Pantchev N, Herrmann DC, Conraths FJ. Occurrence of *Toxoplasma gondii* and *Hammondia hammondi* oocysts in the faeces of cats from Germany and other European countries. *Vet Parasitol.* 2008;152:34–45. doi: 10.1016/j.vetpar.2007.12.004.
- Schlüter D, Däubener W, Schares G, Groß U, Pleyer U, Lüder C. Animals are key to human toxoplasmosis. *Int J Med Microbiol.* 2014;304:917–29. doi: 10.1016/j.ijmm.2014.09.002.
- Schnieder T, Boch J, Supperer R, Bauer C. *Veterinärmedizinische Parasitologie*. 6. Aufl. Stuttgart: Parey; 2006.
- Schumacher AC, Elbadawi LI, DeSalvo T, Straily A, Ajzenberg D, Letzer D, Moldenhauer E, Handly TL, Hill D, Dardé M-L, Pomares C, Passebosc-Faure K, Bisgard K, Gomez CA, Press C, Smiley S, Montoya JG, Kazmierczak JJ. Toxoplasmosis outbreak associated with *Toxoplasma gondii*-contaminated venison-high attack rate, unusual clinical presentation, and atypical genotype. *Clin Infect Dis.* 2021;72:1557–65. doi: 10.1093/cid/ciaa285.
- Seeger J, Hoffmann A, Kacza J, Stahl T. *Histologische Übungen für die Tiermedizin*. Hannover: Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH & Co. KG; 2010.
- Sekine K, Honda T, Kawachi T, Kubo K, Nakajima K. The outermost region of the developing cortical plate is crucial for both the switch of the radial migration mode and the Dab1-dependent „inside-out“ lamination in the neocortex. *J Neurosci.* 2011;31:9426–39. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0650-11.2011.
- Serranti D, Buonsenso D, Valentini P. Congenital toxoplasmosis treatment. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2011;15:193–8.
- Shapiro K, Bahia-Oliveira L, Dixon B, Dumètre A, Wit LA de, VanWormer E, Villena I. Environmental transmission of *Toxoplasma gondii*: oocysts in water, soil and food. *Food Waterborne Parasitol.* 2019;15:e00049. doi: 10.1016/j.fawpar.2019.e00049.
- Sibley LD, Boothroyd JC. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. *Nature.* 1992;359:82–5. doi: 10.1038/359082a0.
- Slifko TR, Smith HV, Rose JB. Emerging parasite zoonoses associated with water and food. *Int J Parasitol.* 2000;30:1379–93. doi: 10.1016/s0020-7519(00)00128-4.
- Snow R, Mans C, Rylander H. Neurological examination in healthy chinchillas (*Chinchilla lanigera*). *Lab Anim.* 2017;51:629–35. doi: 10.1177/0023677217698000.

Literaturverzeichnis

- Stagno S, Dykes AC, Amos CS, Head RA, Juranek DD, Walls K. An outbreak of toxoplasmosis linked to cats. *Pediatrics*. 1980;65:706–12.
- Stancik EK, Navarro-Quiroga I, Sellke R, Haydar TF. Heterogeneity in ventricular zone neural precursors contributes to neuronal fate diversity in the postnatal neocortex. *J Neurosci*. 2010;30:7028–36. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6131-09.2010.
- Stiles J, Jernigan TL. The basics of brain development. *Neuropsychol Rev*. 2010;20:327–48. doi: 10.1007/s11065-010-9148-4.
- Su C, Howe DK, Dubey JP, Ajioka JW, Sibley LD. Identification of quantitative trait loci controlling acute virulence in *Toxoplasma gondii*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:10753–8. doi: 10.1073/pnas.172117099.
- Suckow MA, Stevens K, Wilson R. The laboratory rabbit, guinea pig, hamster, and other rodents. Oxford: Academic; 2012.
- Sullivan WJ, Jeffers V. Mechanisms of *Toxoplasma gondii* persistence and latency. *FEMS Microbiol Rev*. 2012;36:717–33. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00305.x.
- Swindle MM, Makin A, Herron AJ, Clubb FJ, Frazier KS. Swine as models in biomedical research and toxicology testing. *Vet Pathol*. 2012;49:344–56. doi: 10.1177/0300985811402846.
- Tenter AM, Fehlhäber K. Toxoplasmose: Eine lebensmittelübertragene Parasitose. *Bundesgesundheitsbl – Gesundheitsforsch – Gesundheitsschutz*. 2002;45:549–55. doi: 10.1007/s00103-002-0431-2.
- Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: From animals to humans. *Int J Parasitol*. 2000;30:1217–58.
- Terpolilli NA, Kim S-W, Thal SC, Kataoka H, Zeisig V, Nitzsche B, Klaesner B, Zhu C, Schwarzmaier S, Meissner L, Mamrak U, Engel DC, Drzezga A, Patel RP, Blomgren K, Barthel H, Boltze J, Kuebler WM, Plesnila N. Inhalation of nitric oxide prevents ischemic brain damage in experimental stroke by selective dilatation of collateral arterioles. *Circ Res*. 2012;110:727–38. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.253419.
- Thalhammer O, Heller-Szöllösy E. Erfahrungen mit routinemässigem Toxoplasmose-Screening bei Schwangeren zwecks Verhütung angeborener Toxoplasmose. Eine prospektive Untersuchung. *Wien Klin Wochenschr*. 1979;91:20–5.
- Thebault A, Kooh P, Cadavez V, Gonzales-Barron U, Villena I. Risk factors for sporadic toxoplasmosis: a systematic review and meta-analysis. *Microb Risk Anal*. 2021;17:100133. doi: 10.1016/j.mran.2020.100133.
- Thiébaud R, Leproust S, Chêne G, Gilbert R. Effectiveness of prenatal treatment for congenital toxoplasmosis: a meta-analysis of individual patients' data. *Lancet*. 2007;369:115–22. doi: 10.1016/S0140-6736(07)60072-5.
- Thulliez P. Maternal and foetal infection. In: Joynson DHM, Wreghitt TG, Hrsg. *Toxoplasmosis: A comprehensive clinical guide*. New York: Cambridge University Press; 2001. p. 193–213.
- Tong D-S, Yang J, Xu G-X, Shen G. Serological investigation on *Toxoplasma gondii* infection in dialysis patients with renal insufficiency. *Zhongguo Xue Xi Chong Bing Fang Zhi Za Zhi*. 2011;23:144, 153.
- Torrey EF, Bartko JJ, Lun Z-R, Yolken RH. Antibodies to *Toxoplasma gondii* in patients with schizophrenia: a meta-analysis. *Schizophr Bull*. 2007;33:729–36. doi: 10.1093/schbul/sbl050.

Literaturverzeichnis

- Torrey EF, Bartko JJ, Yolken RH. *Toxoplasma gondii* and other risk factors for schizophrenia: an update. *Schizophr Bull.* 2012;38:642–7. doi: 10.1093/schbul/sbs043.
- Vaid S, Huttner WB. Progenitor-based cell biological aspects of neocortex development and evolution. *Front Cell Dev Biol.* 2022;10:892922. doi: 10.3389/fcell.2022.892922.
- Vargas-Villavicencio JA, Besné-Mérida A, Correa D. Vertical transmission and fetal damage in animal models of congenital toxoplasmosis: A systematic review. *Vet Parasitol.* 2016;223:195–204. doi: 10.1016/j.vetpar.2016.04.024.
- Vasile F, Dossi E, Rouach N. Human astrocytes: structure and functions in the healthy brain. *Brain Struct Funct.* 2017;222:2017–29. doi: 10.1007/s00429-017-1383-5.
- Velásquez ZD, Conejeros I, Larrazabal C, Kerner K, Hermosilla C, Taubert A. *Toxoplasma gondii*-induced host cellular cell cycle dysregulation is linked to chromosome missegregation and cytokinesis failure in primary endothelial host cells. *Sci Rep.* 2019;9:12496. doi: 10.1038/s41598-019-48961-0.
- Vernau KM, Osofsky A, LeCouteur RA. The neurological examination and lesion localization in the companion rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Vet Clin North Am Exot Anim Pract.* 2007;10:731-58, v. doi: 10.1016/j.cvex.2007.05.003.
- Villalba A, Götz M, Borrell V. The regulation of cortical neurogenesis. *Curr Top Dev Biol.* 2021;142:1–66. doi: 10.1016/bs.ctdb.2020.10.003.
- Vyas A, Kim S-K, Giacomini N, Boothroyd JC, Sapolsky RM. Behavioral changes induced by *Toxoplasma* infection of rodents are highly specific to aversion of cat odors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104:6442–7. doi: 10.1073/pnas.0608310104.
- Wang G, Gao M. Influence of *Toxoplasma gondii* on in vitro proliferation and apoptosis of hepatoma carcinoma H7402 cell. *Asian Pac J Trop Med.* 2016;9:63–6. doi: 10.1016/j.apjtm.2015.12.013.
- Wang T, Liu M, Gao X-J, Zhao Z-J, Chen X-G, Lun Z-R. *Toxoplasma gondii*: the effects of infection at different stages of pregnancy on the offspring of mice. *Exp Parasitol.* 2011;127:107–12. doi: 10.1016/j.exppara.2010.07.003.
- Warnefors E, Rueløkke ML, Gredal H. Results of a modified neurological examination in 26 healthy rabbits. *J Exot Pet Med.* 2019;30:54–9. doi: 10.1053/j.jepm.2018.01.010.
- Webster JP, Lamberton PHL, Donnelly CA, Torrey EF. Parasites as causative agents of human affective disorders? The impact of anti-psychotic, mood-stabilizer and anti-parasite medication on *Toxoplasma gondii*'s ability to alter host behaviour. *Proceedings. Biological sciences.* 2006;273:1023–30. doi: 10.1098/rspb.2005.3413.
- Weiland G, Kuhn D. Experimentelle *Toxoplasma*-infektionen bei der Katze. II. Entwicklungsstadien des Parasiten im Darm. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 1970;83:128–32.
- Weinman D, Chander AH. Toxoplasmosis in swine and rodents; reciprocal oral infection and potential human hazard. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1954;87:211–6. doi: 10.3181/00379727-87-21337.
- Weinman D, Chander AH. Toxoplasmosis in man and swine; an investigation of the possible relationship. *J Am Med Assoc.* 1956;161:229–32. doi: 10.1001/jama.1956.62970030012010.
- Weiss LM, Kim K. The development and biology of bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Front Biosci.* 2000;5:D391-405.

Literaturverzeichnis

- Wells AJ, Vink R, Blumbergs PC, Brophy BP, Helps SC, Knox SJ, Turner RJ. A surgical model of permanent and transient middle cerebral artery stroke in the sheep. *PLoS ONE*. 2012;7:e42157. doi: 10.1371/journal.pone.0042157.
- Welsch U, Kummer W, Deller T. *Histologie – Lehrbuch und Atlas: Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie*. 6. Aufl. München: Urban & Fischer in Elsevier; 2022.
- Wilking 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. doi: 10.1038/srep22551.
- Witkowska A, Price J, Hughes C, Smith D, White K, Alibhai A, Rutland CS. The effects of diet on anatomy, physiology and health in the guinea pig. *J Anim Health Behav Sci*. 2016;1.
- Wolf A, Cowen D. Granulomatous encephalomyelitis due to an *Encephalitozoon* (encephalitozoic encephalomyelitis): a new protozoan disease of man. *Bull Neurol Inst NY*. 1937;6:306–35.
- Wolf A, Cowen D, Paige B. Human toxoplasmosis: occurrence in infants as an encephalomyelitis verification by transmission to animals. *Science*. 1939a;89:226–7.
- Wolf A, Cowen D, Paige BH. Toxoplasmic encephalomyelitis: III. A new case of granulomatous encephalomyelitis due to a protozoon. *Am J Pathol*. 1939b;15:657–694.
- Wolf A, Cowen D, Paige BH. Toxoplasmic encephalomyelitis: IV. Experimental transmission of the infection to animals from a human infant. *J Exp Med*. 1940;71:187–214. doi: 10.1084/jem.71.2.187.
- Wonders CP, Anderson SA. The origin and specification of cortical interneurons. *Nat Rev Neurosci*. 2006;7:687–96. doi: 10.1038/nrn1954.
- Wong FK, Fei J-F, Mora-Bermúdez F, Taverna E, Haffner C, Fu J, Anastassiadis K, Stewart AF, Huttner WB. Sustained Pax6 expression generates primate-like basal radial glia in developing mouse neocortex. *PLoS Biol*. 2015;13:e1002217. doi: 10.1371/journal.pbio.1002217.
- Wong SY, Remington JS. Toxoplasmosis in pregnancy. *Clin Infect Dis*. 1994;18:853–861. doi: 10.1093/clinids/18.6.853.
- Workman AD, Charvet CJ, Clancy B, Darlington RB, Finlay BL. Modeling transformations of neurodevelopmental sequences across mammalian species. *J Neurosci*. 2013;33:7368–83. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5746-12.2013.
- Wright I. Transmission of *Toxoplasma gondii* across the guinea-pig placenta. *Lab Anim*. 1972;6:169–80. doi: 10.1258/002367772781006257.
- Yazar S, Eser B, Yay M. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in Turkish blood donors. *Ethiop Med J*. 2006;44:257–61.
- Yolken RH, Bachmann S, Ruslanova I, Lillehoj E, Ford G, Torrey EF, Schroeder J, Rouslanova I. Antibodies to *Toxoplasma gondii* in individuals with first-episode schizophrenia. *Clin Infect Dis*. 2001;32:842–4. doi: 10.1086/319221.
- Zenner L, Darcy F, Cesbron-Delauw MF, Capron A. Rat model of congenital toxoplasmosis: rate of transmission of three *Toxoplasma gondii* strains to fetuses and protective effect of a chronic infection. *Infect Immun*. 1993;61:360–3. doi: 10.1128/iai.61.1.360-363.1993.
- Zhang YW, Halonen SK, Ma YF, Wittner M, Weiss LM. Initial characterization of CST1, a *Toxoplasma gondii* cyst wall glycoprotein. *Infect Immun*. 2001;69:501–7. doi: 10.1128/IAI.69.1.501-507.2001.

Literaturverzeichnis

Zulpo DL, Sammi AS, Dos Santos JR, Sasse JP, Martins TA, Minutti AF, Cardim ST, Barros LD de, Navarro IT, Garcia JL. *Toxoplasma gondii*: a study of oocyst re-shedding in domestic cats. *Vet Parasitol.* 2018;249:17–20. doi: 10.1016/j.vetpar.2017.10.021.

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei meinen Betreuern Prof. Dr. Dr. Simone Fietz und Prof. Dr. Arwid Dauschies bedanken, dass sie mir die Möglichkeit gaben, dieses spannende Thema zu bearbeiten. Ich fand mit jedem meiner vielen Probleme immer ein offenes Ohr und zielgerichtet konnten diese gelöst werden. Vielen Dank für die konstruktive und stets hervorragende Zusammenarbeit, auch zwischen den Instituten. Eine so herausragende Betreuung stellt keinesfalls eine Selbstverständlichkeit dar. Ebenfalls wäre ohne Britta Beck dieses Projekt niemals möglich gewesen, indem sie es schaffte, in meinen stets wirren Gedanken Ordnung rein zu bringen. Die Qualität der Entnahmen der fötalen Gehirne wäre mit meinen grobmotorischen Fähigkeiten in der Form nicht möglich gewesen, auch hierfür noch einmal herzlichen Dank. Neben Britta möchte ich mich noch herzlich bei Lea Murnik, Manu Kirchner und Maxi Berberich bedanken. Als „anonyme Parasitologen“ konnte man zwischendurch auf dem Paradies oder im Meerschweinchenstall vom Alltagsstress mal ablassen. V. a. Maxi möchte ich noch herzlich danken, die mein furchtbares Englisch in vernünftige Bahnen gelenkt hat. Kevin Richter, Josephine Schiffner und insbesondere Yasmina Schmitt möchte ich für die unendliche Sisyphusarbeit beim Schneiden und Färben Gewebeschnitte herzlich danken. Herzlichen Dank an Janet Reichenbach; ohne sie wäre die Formatierung der Dissertation einer solchen nicht würdig gewesen. Dank Zaida Renteria, Gereon Schares, Alrik Markis Kunisch, Mareen Tuschy und Susi Gurr war ich auch in der Lage, die ganzen molekularbiologischen Arbeiten zu absolvieren. Marion Fritsche, Beate Schneidewind und Rene Schuhmacher danke ich für die beispiellose Hingabe bei der Pflege der Meerschweinchen. Ebenso möchte ich mich bei der Research Akademie Leipzig, dem Albrecht-Daniel-Thaer Institut der Universität Leipzig, dem Bundesministerium für Bildung und Forschung und der nationalen Forschungsplattform für Zoonosen für die Finanzierung des Projekts bedanken.