

## OMGEKEERDE CORRELATIE TUSSEN MYOSITIS EOSINOPHILICA EN AANTALLEN *SARCOCYSTIS* CYSTOZOÏTEN IN RUNDERHARTSPIER

*Inverse correlation between myositis eosinophila and number of sarcocystis cystozoits in heart tissue of cattle*

H. De Bosschere, R. Ducatelle

Vakgroep Pathologie, Bacteriologie en Pluimveeziekten  
Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Gent  
Salisburylaan 133, B-9820, Merelbeke, België  
hendrik.debosschere@rug.ac.be

### SAMENVATTING

Myositis eosinophila (ME) bij het rund wordt gekenmerkt door grijsgroene letsels in het vlees, waardoor het rund afgekeurd wordt. Histologisch en immunologisch zijn er aanwijzingen dat *Sarcocystis* betrokken is bij het ontstaan van myositis eosinophila.

Met behulp van een digestietechniek werd de prevalentie van *Sarcocystis* bij runderen in België kwantitatief onderzocht. Hiervoor werd gebruik gemaakt van hartspierweefsel van normale dieren (n=24) en van runderen afgekeurd voor myositis eosinophila (n=10). De prevalentie van *Sarcocystis* was voor beide groepen 100%. Bij de karkassen met myositis eosinophila werden significant minder cystozoïten per gram hartspierweefsel geteld dan bij normale dieren. Een mogelijke verklaring hiervoor is dat bij runderen met ME de intramusculaire sarcocysten worden vernietigd door een overgevoeligheidsreactie tegenover *Sarcocystis*. Deze reactie kan de oorzaak zijn van de grijsgroene verkleurde myositis eosinophila letsels.

### ABSTRACT

**Myositis eosinophila (ME) in cattle is characterised by grey-greenish lesions in the muscular tissue, which is a reason for condemnation. There are histological and immunological indications that *Sarcocystis* is involved in the pathogenesis of myositis eosinophila. Using a digestion-technique, a quantitative analysis of *Sarcocystis* was performed on heart tissue of normal carcasses (n=24) and of carcasses condemned for ME (n=10) in Belgium. The incidence of *Sarcocystis* was 100% in both groups. In the carcasses with myositis eosinophila, less cystozoits per gram heart tissue were counted than in normal carcasses. A possible explanation for this is the hypothesis which suggests that myositis eosinophila in cattle is the result of sarcocyst destruction by a hypersensitivity-reaction. This hypersensitivity-reaction may be the cause of the grey-greenish lesions observed in ME.**

**Keywords: Myositis eosinophila - *Sarcocystis* - Cattle**

### INLEIDING

Myositis eosinophila of sarcosporidiose is de benaming voor typische grijsgroene letsels die soms in het spiervlees van klinisch gezonde runderen na het slachten worden aangetroffen. Histopathologisch zijn de letsels erg variabel. Soms worden enkel sarcocysten aangetroffen in het spierweefsel zonder enige

reactie van de gastheer. De groene kleur van de letsels bij ME is waarschijnlijk het gevolg van de infiltratie van eosinofielen in en tussen de spiervezels. De letsels evolueren verder door vorming van een granuloma met infiltratie van rondcellen en macrofagen. Algemeen wordt aangenomen dat ME te maken heeft met infectie door *Sarcocystis*.

Het economisch belang van deze aandoening is niet duidelijk. Gezien de prevalentie van *Sarcocystis* hoog is en de besmettingsdruk vrij zwaar, is het niet ondenkbeeldig dat de continue blootstelling van rundvee aan *Sarcocystis* leidt tot productieverliezen (Fayer en Dubey, 1986). Uitgebreide letsels van een runderkarkas tengevolge van ME geven een afwijkend uitzicht van het karkas en noodzaken de keurder in het slachthuis daarom tot gehele afkeuring. In lichte (gelokaliseerde) gevallen kan gedeeltelijke afkeuring volgen. (K.B. 9 Maart 1953, bijlage 2, hoofdstuk II en III en Richtlijn 64/433/EEG van 26 juni 1964, art. 5a, III). ME heeft hierdoor in de vleesindustrie een economische betekenis. ME wordt wereldwijd aangetroffen in runderkarkassen. De prevalenties variëren vrij sterk naargelang de literatuurbron en de streek. Zo werd in België in de periode van begin 1960 tot eind 1970 0,003% van de geslachte dieren afgekeurd omwille van ME (Van Hoof *et al.*, 1972). In de Calvadosstreek in Frankrijk werden in 1992 0,002% karkassen met ME vastgesteld (Fortier *et al.*, 1993). Exacte cijfers zijn moeilijk te bekomen, omdat enerzijds een karkas met ME geklasseerd wordt onder de categorie "afwijkend uitzicht" en anderzijds omdat veel gevallen pas bij het versnijden van de karkassen aan het licht komen.

Niettegenstaande de algemene aanvaarding van de *Sarcocystis* hypothese is over de oorzaak van ME bij runderen tot op heden nog niets met zekerheid bekend (Stephan *et al.*, 1998). Aanvankelijk kon men geen micro-organismen in de letsels terug vinden. (Jensen *et al.*, 1986). Daarom werd de enorme infiltratie van eosinofielen door sommige onderzoekers toegeschreven aan onder meer een bijzondere vorm van leukemie (Gracey, 1986) en infestaties met *Trichinella spiralis*, *Mycoplasma gallisepticum* en onbekende parasieten (Imes en Migaki, 1967, Pullen en Ruth, 1981, Jensen *et al.*, 1986). Sinds vele jaren reeds wordt er een verband gelegd met infecties met *Sarcocystis* spp (Gajadhar en Marquardt, 1992).

Bij het rund komen drie *Sarcocystis* species voor. Deze drie species (*S. cruzi*, *S. hirsuta* en *S. hominis*) worden geassocieerd met ME (Jensen *et al.*, 1986). Experimenteel is men er nog niet in geslaagd om ME te reproduceren door infectieproeven met *Sarcocystis* (Dubey, 1983, Fayer en Dubey, 1984, Jensen *et al.*, 1986, Gajadhar en Marquardt, 1992). De sarcocysten worden gevormd in het spierweefsel van de tussen-gastheer.

Meer concrete aanwijzingen ontstonden er toen meerdere onderzoekers (Gajadhar *et al.*, 1987, Gran-

strom *et al.*, 1989, Gajadhar en Marquardt, 1992) sarcocysten aantreffen in het centrum van ME granulomen door het maken van seriële coupes van de letsels. Verschillende onderzoekers (Vercruyse *et al.*, 1989, Gajadhar en Marquardt, 1992, Fortier *et al.*, 1993) vonden dat myocard het meest geschikte orgaan is waaruit *Sarcocystis* kan worden geïsoleerd.

In gevorderde stadia van ME kunnen er dikwijls geen sarcocysten meer in de granulomen worden aangetroffen, omdat die door de hevige ontstekingsreactie worden vernietigd en vervolgens gefagocyteerd (Jensen *et al.*, 1986, Gajadhar *et al.*, 1987, Bundza en Feltmate, 1989).

In een Canadese studie werd echter aangetoond dat runderen met ME minder sarcozoïten dragen dan normale dieren (Gajadhar en Marquardt, 1992). Deze bevinding werd door Granstrom *et al.* (1989) verklaard als een immunrespons op de aanwezigheid van *Sarcocystis* in spierweefsel waarbij de sarcocysten worden geëlimineerd.

De bedoeling van het hierna beschreven onderzoek was de incidentie van *Sarcocystis* te bepalen bij normale runderen en bij runderen met ME in België ten einde de lokale situatie na te gaan en eventueel ook de gangbare hypothesen te verifiëren.

## MATERIAAL EN METHODEN

Hartspierweefsels van 24 runderen werden verzameld uit de sectiezaal van de dienst Pathologie van de faculteit Diergeneeskunde. Het betrof vleesrunderen en melkrunderen van verschillende rassen (voornamelijk Belgisch Witblauw, Zwartbont en Roodbont) met een minimum leeftijd van 1 jaar. Bij deze dieren waren er geen macroscopische grijsgroene verkleuringen van spierweefsel (ME) zichtbaar. Deze dieren werden als controlegroep beschouwd. Tien harten van minimum 1 jaar oude runderen werden via het Instituut voor Veterinaire Keuring (IVK) verkregen van karkassen die omwille van grijsgroene vlekken werden afgekeurd. Het hart van een kalf van 1 dag oud (gestorven door congenitale afwijking) werd in de proef opgenomen als negatieve controle. Alle andere dieren waren ouder dan 1 jaar.

De verzamelde hartspierweefsels (jan '99-dec '99) werden ingedeeld in 4 gelijke perioden (januari-maart, april-juni, juli-september, oktober-december). Deze perioden stemmen min of meer overeen met de 4 seizoenen. De stalen werden volgens de digestiemethode van Gajadhar en Marquardt (1992) geanalyseerd. Hierbij werd 100 g hartspierweefsel fijn

gemalen. Het gemalen vlees werd gedurende 1 uur geïncubeerd bij 37°C in een pepsine-HCl oplossing (0,6% pepsine, 0,85% NaCl, 0,8% HCl) onder voortdurend mengen met behulp van een schudtoestel. Hierna werd de oplossing gefiltreerd door gaaswindsel (type Cambric: gewicht 24-35 g/m<sup>2</sup>). Het filtraat werd gedurende 5 minuten gecentrifugeerd bij 2090 toeren per minuut. De bovenstaande vloeistof werd vervolgens afgezogen en de neerslag opgelost in 0.15 M NaCl (pH=7.0). Deze oplossing werd overgebracht in twee conisch eindigende buisjes van 15 ml en vervolgens gecentrifugeerd gedurende 5 minuten bij 2090 toeren per minuut. De bovenstaande vloeistof werd hierna afgezogen, de neerslag opgelost in 1 ml PBS-buffer en aangelengd met 2 ml isotone Percoll-oplossing (0.15 M). De buisjes werden hierna gedurende 20 minuten gecentrifugeerd bij 2250 toeren per minuut bij een temperatuur van 18°C, waarna het supernatant werd verwijderd. De neerslag met daarin de cystozoïten werd in exact 1 ml PBS-buffer opgelost. De cystozoïten werden met behulp van een Bürker telkamer geteld. Het aantal getelde cystozoïten werd omgerekend naar het aantal cystozoïten per gram hartspierweefsel.

De resultaten werden statistisch verwerkt met het Statistix software programma (versie 1.0) gebruikmakend van de niet gepaarde "two sample T-test" na ln-transformatie van de gegevens om normaal verdeelde waarden te bekomen. De perioden per groep werden verwerkt met de Scheffé-test van de "one way analysis of variance-ANOVA"-analyse.

## RESULTATEN

Alle onderzochte stalen waren besmet met cystozoïten, behalve het 1 dag oude kalf (negatieve controle). Algemeen bevatten ME-negatieve (controle) dieren gemiddeld  $33,5 \times 10^3$  cystozoïten per gram myocardweefsel en ME-positieve dieren  $8,05 \times 10^3$  cystozoïten per gram myocardweefsel (Tabel 1). Statistisch werd er geen significant hogere concentratie van cystozoïten waargenomen bij de normale dieren dan bij de ME-positieve karkassen na ln-transformatie met de "two sample T-test". Enkel periode 4 levert een significant verschil ( $P = 0.0153$ ) op tussen ME-positieve dieren en normale dieren. Tussen de verschillende perioden van de normale groep is er een significant verschil van periode 4 tegenover de perioden 1 en 3 en tegenover periode 2. Bij de ME-positieve dieren kon geen significant verschil tussen de ver-

schillende groepen gevonden worden, vermoedelijk door het geringere aantal waarnemingen.

## DISCUSSIE

De prevalentie in deze studie bedroeg 100%. Ver-cruysse *et al.* (1989) vonden in 1989 een prevalentie van 97% bij geslachte runderen in België. De digestietechniek is de meest gevoelige methode om *Sarcocystis* in karkassen aan te tonen (Ver-cruysse *et al.*, 1989). Pasgeboren kalveren zijn bijna altijd vrij van sarcocysten (Woldemeskel en Gebreab, 1996), hetgeen ook werd gevonden in het 1 dag oude kalf. Uit de resultaten van de huidige studie blijkt er een hoger aantal cystozoïten aanwezig te zijn bij de controledieren ten opzichte van de dieren met ME. Dit is in overeenstemming met de resultaten van Gajadhar en Marquardt (1992). Het duidelijk verschil in de gemiddelden per periode en het significant verschil van periode 4 tegenover de perioden 1 en 3 en tegenover periode 2 bij de normale dieren suggereren dat er een seizoengebonden karakter van deze aandoening bestaat. Een dergelijk seizoengebonden karakter werd aangetoond door Reiten *et al.* (1966) en Van Hoof *et al.* (1972). Bij deze laatstgenoemde ging het om Belgische slachtrunderen, waarbij de hoogste frequentie ME werd vastgesteld in oktober, hetgeen overeenstemt met periode 4 van deze huidige studie. De laagste frequentie van ME werd bij Van Hoof *et al.* (1972) vastgesteld in februari, terwijl bij deze studie het minst cystozoïten geteld werden in periode 2 (april-mei-juni). Dergelijke seizoeninvloeden werden ook bij het schaap beschreven (Collins *et al.*, 1980). Mogelijk heeft deze seizoeninvloed iets te maken met weersfactoren, tijdstip van besmetting en incubatieperiode.

Vergelijkbare resultaten van deze digestiemethode zijn beschikbaar in de literatuur van een Canadees onderzoek (Gajadhar en Marquardt, 1992), waarbij dezelfde conclusie werd getrokken. De absolute waarden verschillen echter met een factor 100. Een zeer grote besmettingsgraad en -druk zouden hier aan de basis kunnen liggen. Dit zou enigszins de hogere frequentie van ME in de V.S. (Jensen *et al.*, 1986) kunnen verklaren ten opzichte van de frequentie van ME in België (Van Hoof *et al.*, 1972), respectievelijk 5% en 0,003%.

Hetzelfde zou kunnen gelden voor Canada. De species zijn dezelfde, maar management en runderrassen kunnen eventueel ook nog een rol spelen.

**Tabel 1. Kwantitatieve analyse (aantal cystozoïten per gram myocard) in hartspierweefsel van ME-positieve en controle runderen.***Table 1. Quantitative analysis (number of cystozoits/g myocard) in hearttissue of ME positive and control cattle.*

Periode	Normaal (x1000)	ME-positief (x1000)
<b>1</b>	7,2	6
<b>(Januari/maart)</b>	10,4	1,5
<i>(January/March)</i>	7,7	1,2
	9,7	
	10,6	
	5,7	
	7,3	
<b>Gemiddeld / Mean</b>	8,4	2,9
<b>2</b>	0,1	1,4
<b>(April/juni)</b>	3,5	4,7
<i>(April/June)</i>	1,9	0,5
	0,1	
	0,5	
<b>Gemiddeld / Mean</b>	1,2	2,2
<b>3</b>	6,5	3,6
<b>(Juli/september)</b>	5,8	
<i>(July/September)</i>	7,4	
	7,5	
	5,5	
	3,8	
	3,2	
<b>Gemiddeld / Mean</b>	12,7	3,6
<b>4</b>	55,4	17,9
<b>(Oktober/december)</b>	54,4	9,8
<i>(October/December)</i>		
	297,6	33,3
	41,2	
	200,6	
<b>Gemiddeld / Mean</b>	129,8	20,3
<b>Gemiddeld / Mean</b>	33,5	8,0
<b>Standaard-deviatie</b>	70,2	10,3

De Canadese studie en het huidige onderzoek tonen eveneens aan dat ME-karkassen minder cystozoïten bevatten, waardoor de hypothese van een overgevoelighedsreactie op *Sarcocystis* die aan de basis ligt van het ontstaan van ME (Granstrom *et al.*, 1989), ondersteund wordt. De overgevoelighedsreactie wordt verantwoordelijk gesteld voor de opruiming van de sarcocysten en sarcozoïten in de spieren, hetgeen resulteert in een geringer aantal sarcozoïten per gram spierweefsel met de digestietechniek.

Om de ME-letsels te verklaren zou een combinatie van overgevoelighedsreacties type I, II (cytotoxische reacties) en type IV (celgemedieerde immuniteit) nodig zijn (Jensen *et al.*, 1986). Voor elk van deze drie mechanismen zijn alle componenten voorhanden.

Een overgevoelighedsreactie zou de lage incidentie van ME verklaren, ondanks de hoge prevalentie van *Sarcocystis* spp. bij runderen. Het feit dat slechts een zeer beperkt aantal dieren door ME getroffen wordt, zou toe te schrijven zijn aan de individuele gevoeligheid van de gastheer (Granstrom *et al.*, 1990). Het kan echter geen allergische reactie op de sarcocysten zelf zijn, aangezien het contact hiermee zo massaal is, dat dit een gegeneraliseerde anafylactische reactie zou teweeg brengen. Het is eerder een reactie op mediators die uit sarcocysten vrijkomen (Granstrom *et al.*, 1989). Bij runderen met ME werd een toename van *Sarcocystis*-specifieke IgE waargenomen (Type I overgevoelighedsreactie) (Granstrom *et al.*, 1989). In 1990 vonden dezelfde auteurs vergelijkbare titers IgE bij ME en normale dieren. Zij verklaarden dit door een IgE-binding in de ME-letsels, hetgeen leidt tot consumptie van IgE in het ME-proces, waardoor er geen stijgende titer IgE werd gedetecteerd bij deze ME-dieren. Dit leidde tot de veronderstelling dat dieren met ME genetisch gepredisponeerd zijn tot het ontwikkelen van een overgevoelighedsreactie type I met productie van IgE. Bij andere diersoorten is een dergelijke genetische predispositie om met een IgE-respons te reageren op specifieke noxen beschreven (Granstrom *et al.*, 1989). Ook bij mensen met ME vertoont het bloedbeeld een duidelijke eosinofilie en bezitten de patiënten antistoffen tegen *Sarcocystis* in tegenstelling tot de rest van de bevolking (Arness *et al.*, 1999). Niet alle personen met *Sarcocystis* antistoffen hebben echter ook ME. Deze waarnemingen bij de mens wijzen dus ook in de richting van een type 1 allergie. De hypothese van Granstrom *et al.* (1989) wordt verder gestaafd door de aanwezigheid van eosinofielen en

mastcellen ter hoogte van de laesies van aangetaste runderen (Jensen *et al.*, 1986).

Ely en Fox (1989) vonden significant hogere IgG-antistoffen tegen *S. cruzi* bij karkassen met ME dan bij normale karkassen. Gasbarre *et al.* (1984) vonden eveneens een gestegen titer van IgM-antistoffen bij ME-dieren. Type II overgevoelighedsreacties worden gemedieerd door geactiveerde T-cellen die na het herkennen van specifieke antigenen, cytokines vrijstellen en lymfocyten en macrofagen aantrekken (McGavin *et al.*, 2001). Type IV overgevoelighedsreacties worden gemedieerd door geactiveerde T-cellen die na het herkennen van specifieke antigenen, cytokines vrijstellen en lymfocyten en macrofagen aantrekken (McGavin *et al.*, 2001). Dit wordt voornamelijk waargenomen tijdens de subacute en de chronische fase van het proces.

## DANKBETUIGING

Het Instituut voor Veterinaire Keuring, meer in het bijzonder Dr. Van De Braembussche en de dierenarts-keurders van verschillende slachthuizen, worden vriendelijk bedankt voor de bijdrage die geleverd werd aan dit onderzoek. Dierenarts D. Abrahamse wordt bedankt voor de verwerking van de stalen en het verzamelen van de literatuur als scriptieonderwerp en Christian Puttevils voor technische ondersteuning.

## LITERATUUR

- Arness M. K., Brown J. D., Dubey J. P., Neafie R. C., Granstrom D. E. (1999). An outbreak of acute eosinophilic myositis attributed to human *Sarcocystis* parasitism. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 61, 548 – 553.
- Bundza A., Feltmate T. E. (1989). Eosinophilic myositis/lymphadenitis in slaughter cattle. *Canadian Veterinary Journal* 30, 514 – 516.
- Collins G. H., Charleston W. A. G., Wiens B. G. (1980). Studies of *Sarcocystis* species VI: a comparison of three methods for the detection of *Sarcocystis* species in muscle. *New Zealand Veterinary Journal* 28, 173.
- Dubey J. P. (1983). Clinical sarcocystosis in calves fed *Sarcocystis hirsuta* sporocysts from cats. *Veterinary Pathology* 20, 90-98.
- Ely R. W., Fox J. C. (1989). Elevated IgG antibody to *Sarcocystis cruzi* associated with eosinophilic myositis in cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 1, 53 – 56.
- Fayer R., Dubey J. P. (1984). Protective immunity against clinical sarcocystosis in cattle. *Veterinary Parasitology* 15, 187 – 201.

- Fayer R., Dubey J. P. (1986). Bovine sarcocystosis. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian* 8, F130 – F142.
- Fortier G., Collobert J. -F., Viel S., Mariau V. (1993). Prévalence de la sarcosporidiose musculaire bovine dans le Calvados. *Recueil de Médecine Vétérinaire* 169, 779 – 781.
- Gasbarre L. C., Suter P., Fayer R. (1984). Humoral and cellular immune respons in cattle and sheep inoculated with *Sarcocystis*. *American Journal of Veterinary Research* 45, 1592 – 1596.
- Gajadhar A. A., Yates W.D.G., Allen J. R. (1987). Association of eosinophilic myositis with an unusual species of *Sarcocystis* in a beef cow. *Canadian Journal of Veterinary Research* 51, 373 – 378.
- Gajadhar A. A., Marquardt W. C. (1992). Ultrastructural and transmission evidence of *Sarcocystis cruzi* associated with eosinophilic myositis in cattle. *Canadian Journal of Veterinary Research* 56, 41 – 46.
- Gracey J. F. (1986). *Meat Hygiene*. 8th edition, Baillière Tindall, London, p. 452.
- Granstrom D. E., Ridley R. K., Yao B., Gershwin L. J., Nesbitt P. M., Wempe L. A. (1989). Type-I hypersensitivity as a component of eosinophilic myositis (muscular sarcocystosis) in cattle. *American Journal of Veterinary Research* 50, 571 – 574.
- Granstrom D. E., Ridley R. K., Yao B., Gershwin L. J., Briggs D. J. (1990). Immunodominant proteins of *Sarcocystis cruzi* bradyzoites isolated from cattle affected or nonaffected with eosinophilic myositis. *American Journal of Veterinary Research* 51, 1151 – 1155.
- Imes G. D., Migaki G. (1967). Eosinophilic myositis in cattle, pathology, and incidence. *Proceedings of the Annual Meeting of the U.S. Livestock Sanitary Association* 71, 111 – 122.
- Jensen R., Alexander A. F., Dahlgren R. R., Jolley W. R., Marquardt W. C., Flack D. E., Bennett B. W., Cox M. F., Harris C. W., Hoffmann G. A., Troutman R. S., Hoff R. L., Jones R. L., Collins J. K., Hamar D. W., Cravans R. L. (1986). Eosinophilic myositis and muscular sarcocystosis in the carcasses of slaughtered cattle and lambs. *American Journal of Veterinary Research* 47, 587 – 593.
- McGavin M. D., Carlton W. W., Zachary J. F. (2001). *Thomson's Special Veterinary Pathology*, 3rd Edition, Mosby, St.-Louis, p. 576 – 577.
- Ndiritu W., Cawthorn R. J., Kibenge F. S. B., Markham R. J. F., Horney B. S., Chan C. B. (1996). Use of genomic DNA probes for the diagnosis of acute sarcocystosis in experimentally infected cattle. *Veterinary Parasitology* 62, 9 – 25.
- Pullen M. M., Ruth G. R. (1981). Eosinophilic myositis in a slaughter heifer. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 178, 140 – 141.
- Reiten A. C., Jensen R., Grimer L. A. (1966). Eosinophilic myositis (sarcosporidiosis, sarco) in beef cattle. *American Journal of Veterinary Research* 27, 903 – 906.
- Stephan R., Tholen R., Meier D. (1998). Grüne Verfärbungen in der Rindermuskulatur und deren fleischhygienerechtliche Beurteilung. *Tierärztliche Praxis* 26, 21 – 23.
- Van Hoof J., Vandenbrande G., Dedeken L. (1972). Sarcosporidiose bij slachtrunderen. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 41, 501 – 514.
- Verduyck J., Franssen J., Vangoubergen M. (1989). The prevalence and identity of *Sarcocystis* cysts in cattle in Belgium. *Journal of Veterinary Medicine B* 36, 148 – 153.
- Woldemeskel M., Gebreab F. (1996). Prevalence of sarcocysts in livestock of Northwest Ethiopia. *Journal of Veterinary Medicine B* 43, 55 – 58.