

# Neospora caninum und Neosporose : Grundlagenforschung am Institut für Parasitologie und mögliche Anwendungen

Autor(en): **Hemphill, A. / Müller, N. / Sager, H.**

Objektyp: **Article**

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

Band (Jahr): **142 (2000)**

Heft 5

PDF erstellt am: **20.06.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-592182>

## **Nutzungsbedingungen**

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

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

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

## **Haftungsausschluss**

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

# ***Neospora caninum* und Neosporose – Grundlagenforschung am Institut für Parasitologie und mögliche Anwendungen**

A. Hemphill, N. Müller, H. Sager und B. Gottstein

Institut für Parasitologie der Universität Bern

## **Das Institut für Parasitologie der Universität Bern**

Die Aufgaben, denen sich das Institut u.a. (nebst Aus-, Fort- und Weiterbildung) stellt, sind geeignete Diagnostikmethoden zu entwickeln, Prozesse der Entstehung von Krankheiten (Pathogenese) und der Immunabwehr zu erforschen, Zusammenhänge der Epidemiologie zu untersuchen sowie effektive Massnahmen zur Therapie und zur Bekämpfung von Parasitosen auszuarbeiten. Die zukunftsorientierte Forschung muss bestehende oder voraussehbare Probleme erkennen (z.B. die Zunahme emergierender Parasitosen), eine Basis zur Risikobewertung schaffen und neue Lösungswege suchen (z.B. die Entwicklung von Impfstoffen gegen Parasitosen). Angesichts des zum Teil raschen Wandels epidemiologischer Voraussetzungen, z.B. durch veränderte Formen der Tierhaltung in der Landwirtschaft und der Heimtierhaltung sowie durch Klimaveränderungen und erhöhter Reise- und Transporttätigkeiten gewisser Tiergruppen, sind ständige epidemiologische Überwachungsuntersuchungen sowie die Entwicklung angepasster Bekämpfungsstrategien notwendig. Im Bereich des öffentlichen Gesundheitswesens wirkt das Institut an der Aufgabe mit, die Übertragung pathogener Parasiten von Tieren auf Menschen zu verhüten bzw. zu reduzieren. Ein aktuelles Beispiel aus diesem Gebiet ist die alveoläre Echinokokkose des Menschen, bei der das Institut in der Grundlagenforschung federführend mitwirkt. Dasselbe gilt für die bovine Neosporose, die im vorliegenden Artikel als Beispiel näher erläutert werden soll. Abschliessend möchten wir darauf hinweisen, dass ein von beiden veterinärparasitologischen Instituten in Bern und Zürich erarbeitetes Dokument zur Darlegung der Ziele und Aufgaben der Veterinärparasitologie in der Schweiz besteht. Das Dokument, das auch die Aufgabenverteilung zwischen den beiden Instituten sowie die komplementären Kollaborationen festlegt, könnte als Beispiel für eine synergistisch wirksame Zusammenarbeit im Zusammenhang mit der VetSuisse-Kreation verwendet werden.

## **Einleitung zur Neosporose**

*Neospora caninum* ist morphologisch und auch phylogenetisch sehr nahe mit *Toxoplasma gondii* verwandt (Hemphill, 1999). *N. caninum* verursacht die Neosporose, entsprechende klinische Symptome bei Hunden sind schwere neuromuskuläre Störungen, Parese und Paralyse, während bei Rindern Aborte und die Geburt von lebensschwachen Kälbern die hauptsächlichen klinischen Probleme darstellen. Infektionen können aber auch klinisch inapparent auftreten und dazu führen, dass der Parasit vertikal, d.h. via diaplazentäre Infektionen, an die Nachkommengeneration weitergegeben wird. *Neospora*-Infektionen sind mittlerweile auch bei Hirschen, Ziegen, Pferden und Schafen beschrieben worden (Dubey und Lindsay, 1996; Marsh et al., 1998), scheinen dort jedoch relativ selten aufzutreten. Tatsache ist, dass die Neosporose keine neue Krankheit ist: In retrospektiven Studien konnte gezeigt werden, dass *N. caninum* bereits im Jahre 1957 als Erreger schwerer neuromuskulärer Störungen in einer Gruppe von Hunden verantwortlich gewesen ist (Dubey et al., 1990). Vor allem wegen der hohen Prävalenz bei Rindern gilt *N. caninum* weltweit als einer der wichtigsten bovinen Aborterreger, und seine wirtschaftliche Bedeutung wird heute als sehr hoch eingestuft (Dubey, 1999). Als diagnostische Hilfsmittel stehen Methoden zum direkten und indirekten Nachweis des Parasiten zur Verfügung. Die Herstellung monoklonaler Antikörper und polyklonaler Antiseren gegen intakte *N. caninum*-Tachyzoiten erlaubte die Entwicklung immunohistochemischer Methoden. Eine weitere direkte Nachweismethode ist die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR). Es bestehen heute verschiedene PCR-Tests zur spezifischen Detektion von *Neospora*-DNA in infizierten Geweben und in Körperflüssigkeiten (Lit. siehe Ellis, 1998). Eine solche PCR wurde auch am Institut für Parasitologie in Bern entwickelt und basiert auf einer *Neospora*-spezifischen DNA-Sequenz (Kaufman et al., 1996; Yamage et al., 1996). Dieser Test wird heute routinemässig zu diagnostischen Zwecken verwendet (Müller et al., 1996; Gottstein et al., 1998). Zum serologischen Nachweis einer Infektion stehen heute zwei Techniken im Vordergrund:

Der indirekte Immunfluoreszenz-Antikörper-Test (IFAT) sowie der Enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA), bei dem sowohl somatische Antigene (Björkman et al., 1994; Gottstein et al., 1998) als auch potentiell rekombinante Antigene (Lally et al., 1996; Louie et al., 1997) eingesetzt werden.

In der Schweiz sind vor kurzer Zeit erste serologische und molekulare Untersuchungen zur Prävalenz von *N. caninum* in Rindern abgeschlossen worden (Gottstein et al., 1998). Für *Neospora caninum* wurde dabei eine Seroprävalenz von 11.5% (194 von 1689 untersuchten Seren) ermittelt. Parallel dazu wurden Hirngewebeproben von 83 abortierten Foeten mittels *Neospora-spezifischer* PCR untersucht. Es zeigte sich, dass *Neospora*-DNA in 29% (24 von 83) der abortierten Foetenhirnen nachgewiesen werden konnte (Gottstein et al., 1998). Dies zeigt deutlich, dass auch in der Schweiz *N. caninum* ein bedeutendes Abortproblem bei Rindern darstellt. Demzufolge wurde in Zusammenarbeit mit dem BVET und sechs Kantonstierärzten eine grössere Fall-Kontrollstudie (Neo'99) initiiert, die im Jahr 2000 abgeschlossen werden und Grundlagen für eventuelle Bekämpfungsmassnahmen liefern soll. Nebst der «angewandten» Forschung auf der Basis von Feldproblemen erschien es uns auch wichtig, die Zellbiologie und die Auseinandersetzung des Parasiten mit seinem Wirt und seiner Wirtszelle genauer zu untersuchen, um – basierend auf den erworbenen Erkenntnissen – auch naturwissenschaftlich-biologische-Grundlagen für Lösungen zur Prävention und Therapie der Neosporose zu erhalten.

### Einige Aspekte der Biologie von *Neospora caninum*

*N. caninum* ist ein obligat intrazellulärer Parasit, dessen Lebenszyklus 3 Stadien beinhaltet: Tachyzoiten, Bradyzoiten und Sporozoiten.

Tachyzoiten sind in verschiedensten Geweben und Zelltypen von Zwischenwirten wie Hund und Rind gefunden worden (Dubey und Lindsay, 1993; 1996). Dies weist darauf hin, dass *N. caninum* sowie auch *T. gondii* eine geringe Wirtszellspezifität aufweisen. Tachyzoiten sind 10–15 µm lang, 1–2 µm breit und besitzen eine charakteristische bananenförmige Gestalt mit einem definierten Vorder- und Hinterende. Am Vorderende des Parasiten befindet sich der apikale Komplex, eine zytoskeletale Struktur, die hauptsächlich aus Mikrotubuli und assoziierten Proteinen besteht. Integriert in diesen apikalen Komplex sind 3 Typen von sekretorischen Organellen: Mikronemen, Rhoptrien und elektrodichtende Granuli (*dense granules*). Alle drei sind an

verschiedenen Stadien der Wirtszell-Invasion beteiligt (Hemphill et al., 1996). Untersuchungen bei *T. gondii*-Tachyzoiten (Dubremetz, 1999) haben gezeigt, dass Mikronemen ihre Komponenten in dem Moment an die Oberfläche sezernieren, in dem der Parasit mit der Wirtszelloberfläche in engeren Kontakt tritt. Die Sekretion von Rhoptrien findet während des Eindringens in die Wirtszelle statt, und die «*dense granules*» werden erst dann sezerniert, wenn der Parasit sich innerhalb der Wirtszelle befindet. Intrazellulär parasitieren die Tachyzoiten in einer parasitophoren Vakuole, welche vom übrigen Zytoplasma durch eine parasitophore Membran (PVM) abgetrennt ist. Die Tachyzoiten proliferieren durch Endodyogenie, und 3–4 Tage nach Infektion sind bereits hunderte von neuen Tachyzoiten gebildet, die eine intrazelluläre Pseudozyste bilden. Die Wirtszelle lysiert und setzt Tachyzoiten frei. Sofort werden benachbarte Wirtszellen infiziert, und der Vorgang wiederholt sich mehrere Male. Auf diese Weise und in Wechselwirkung mit immunpathologischen Vorgängen können schwere gewebszerstörende Schäden auftreten.

Im Gegensatz zu Tachyzoiten vermehren sich *N. caninum*-Bradyzoiten nur sehr langsam. Sie bilden vornehmlich innerhalb des zentralen Nervensystems intrazelluläre Gewebezysten von 200–300 µm Durchmesser, die von einer dicken, PAS-positiven Zystenwand umgeben sind. Diese Gewebezysten können über längere Zeit, vermutlich jahrelang, im Gewebe persistieren, ohne klinische Symptome hervorzurufen (Hemphill, 1999). Beim Verzehr von Gewebe, welches solche Zysten enthält, kann es zu Neuinfektion mit *N. caninum* kommen. McAllister et al. (1998) haben dies auf eindrückliche Art gezeigt. Gewebezysten-enhaltendes Hirngewebe von experimentell infizierten Mäusen wurde an Hunde verfüttert, und nach 30 Tagen sind im Kot dieser Hunde Oozysten nachgewiesen worden. Morphologisch sind solche Oozysten nicht von denjenigen von *T. gondii* und *Hammondia heydorni* zu unterscheiden (McAllister et al., 1998). Die Möglichkeit, dass andere karnivore Endwirte existieren, muss noch genauer untersucht werden (Lindsay et al., 1999). Um Strategien zur Bekämpfung der potentiellen Kontamination mit *N. caninum*-Oozysten zu entwickeln, wird es nötig sein, die endogenen Stadien, die zur Oozystenbildung im Darm des Hundes führen, zu identifizieren, und es muss untersucht werden, wie diese endogenen Stadien immunologisch und zellbiologisch mit dem Wirt interagieren.

Die Infektion eines immunkompetenten Wirtes mit *N. caninum* bleibt im Normalfall symptomlos. Entweder kann die Immunantwort die Infektion erfolgreich bekämpfen, oder es wird die Differenzierung zum hypobiotischen Bradyzoitenstadium

induziert. Während einer Trächtigkeit jedoch sind *N. caninum*-Tachyzoiten, ähnlich wie bei *T. gondii*, in der Lage, sich durch die Plazenta durchzuarbeiten und den Fetus zu infizieren, was gegebenenfalls Aborte hervorrufen kann. Dieser Prozess kann sich im gleichen Tier bei mehreren Trächtigkeiten wiederholen (Dubey et al., 1990; Barr et al., 1993).

## Wirt-Parasit Interaktionen

Die Untersuchung zellbiologischer und immunologischer Grundlagen von Wirt-Parasit-Interaktionen sollen Grundlagen zur Diagnose, Bekämpfung und Prävention der Neosporose liefern. Eine unabdingbare Voraussetzung für die Identifizierung von möglichen Vakzine Kandidaten und für die Verbesserung von immundiagnostischen Werkzeugen ist die Charakterisierung von Parasitenproteinen und Glykoproteinen, welche an der komplexen Beziehung zwischen dem Parasiten und seinem Wirt beteiligt sind. Wirt-Parasit-Interaktionen lassen sich auf zwei Ebenen definieren: Auf der Ebene des Wirt-Organismus, wo eine komplexe immunologische Auseinandersetzung mit dem Parasiten stattfindet, und auf der Ebene der individuellen Interaktion zwischen Parasit und einzelnen Wirtszellen.

## Immunologische Grundlagen

Der grundsätzliche Typ einer Immunreaktion bestimmt zum grossen Teil, ob eine Infektion erfolgreich ausfällt oder ob sie abgewehrt werden kann, d.h., ob der Parasit überlebt oder zerstört wird. Der wiederholbare diaplazentäre Infektionsmodus, der bei Rindern auftreten kann, weist darauf hin, dass sich (im Gegensatz zu *T. gondii*-Infektionen beim Schaf) keine effiziente Langzeitimmunität ausbildet. Zur Erforschung der Immunologie der Neosporose haben wir am Institut für Parasitologie ein Mausmodell erarbeitet, welches sowohl Resistenz als auch Empfänglichkeit gegenüber einer Erkrankung reflektieren kann. Das Modell beruht auf resistenten C57BL/6-Mäusen und daraus abgeleiteten k.o.-Mäusen ( $\mu$ MT-Mäusen), die aufgrund einer genetischen Modifizierung eine erworbene Antikörperdefizienz haben und dadurch empfänglich geworden sind (Eperon et al., 1999). Resistente C57BL/6-Mäuse zeigen nach experimenteller i.p.-Infektion mit  $10^5$ -*N. caninum*-Tachyzoiten keine klinischen Symptome. Das reaktive Zytokinmuster beinhaltet vor allem IL-12 und IFN- $\gamma$ , währenddessen die Synthese inflammatorischer Zytokine wie IL-1 und TNF- $\alpha$  weitgehend ausbleibt. Immunohistologische Untersuchungen am

Hirngewebe zeigten keinerlei Läsionen und eine nur sehr geringe Befallsintensität. Im Gegensatz dazu wiesen  $\mu$ MT-Mäuse bereits 25 Tage nach Infektion gravierende neurologische Symptome auf. Es wurden zum Teil erhebliche multifokale nekrotische Läsionen im Hirngewebe festgestellt, die auf eine hohe Befallsintensität mit *N. caninum*-Tachyzoiten zurückgeführt wurden. Diese Experimente haben gezeigt, dass die humorale Immunität einen wichtigen Bestandteil einer protektiven Immunität gegen *N. caninum* darstellt.

## Zellbiologische Grundlagen der Wirtzellinvasion

Die primären Wirt-Parasit-Interaktionen finden auf der zellulären Ebene statt, wo in der Initialphase einer Infektion ein direkter physischer Kontakt zwischen Parasiten- und Wirtszellmembran stattfindet. Für obligat intrazelluläre Parasiten wie *N. caninum* ist diese Ebene der Interaktion sehr wichtig, da bestimmte Rezeptoren auf der Wirtszelloberfläche mit entsprechenden Liganden auf der Parasitenoberfläche interagieren und es dem Parasiten erst anschliessend möglich wird, durch koordinierte Sekretion von Mikronemen, Rhoptrien und «dense granules» in die Wirtszelle einzudringen und sich zu etablieren. Frühere Untersuchungen an verwandten Spezies wie *Toxoplasma*, *Sarcocystis*, *Eimeria* und auch *Plasmodium* haben gezeigt, dass die Mehrheit der bisher identifizierten und charakterisierten Antigene entweder mit der Oberfläche der Parasiten assoziiert oder in den sekretorischen Organellen dieser Parasiten lokalisiert sind. Im Gegensatz zu anderen obligat intrazellulären Parasiten, die in ihre Wirtszellen eindringen, indem sie endozytotische oder phagozytotische Prozesse auslösen, haben alle Vertreter der Apicomplexa, einschliesslich *N. caninum*, die Fähigkeit, durch einen aktiven Prozess in ihre Wirtszelle einzudringen. Dieser Prozess beinhaltet Adhäsion an Wirtszellrezeptoren, Motilität des Parasiten und Modifikation der parasitophoren Membran. Dies verhindert die Fusionierung dieser Vakuole mit den lysosomalen Vesikeln der Wirtszelle. Die Identifizierung und Charakterisierung von *N. caninum*-Antigenen gilt als Schlüsselposition im Verständnis des Infektions- und Überlebensmodus von *N. caninum*. Dementsprechend fokussierten wir unsere Suche nach Proteinen auf solche, die während der Adhäsion oder des Eindringens in die Wirtszelle mit Membranen interagieren würden. Die biochemische Isolierung von Membran-assoziierten *N. caninum*-Tachyzoitenproteinen war deshalb ein erster Schritt. Mit Hilfe von affinitätsgereinigten Antikörpern konnten vier Proteine identifiziert werden. Es handelt

sich dabei um zwei immunodominante Oberflächenantigene und um zwei weitere Proteine, die je mit den Mikronemen und den «dense granules» assoziiert sind. Wie bei *T. gondii* sind die meisten Oberflächenproteine von *N. caninum*-Tachyzoiten mit einem Glycosylphosphatidylinositol-(GPI-) Anker in die Plasmamembran eingebettet. Die beiden von uns entdeckten immunodominanten Hauptoberflächenantigene, Nc-p43 und Nc-p36 (Hemphill et al., 1997; Sonda et al., 1998) sind sich strukturell sehr ähnlich und weisen in Bezug auf ihre Aminosäuresequenz starke Homologien zu entsprechenden Oberflächenantigenen von *T. gondii* auf. *N. caninum*-Tachyzoiten, die mit Antikörpern gegen Nc-p43 behandelt wurden, zeigten eine stark reduzierte Infektionsrate, was auf eine funktionelle Bedeutung dieses Proteins beim Vorgang der Wirtszellinvasion hindeutete (Hemphill, 1996). Während Nc-p43 sowohl in Tachyzoiten als auch in Bradyzoiten exprimiert wurde, beschränkte sich die Expression von glykosyliertem Nc-p36 auf Bradyzoiten (Fuchs et al., 1998). Das Auftreten von Glykoproteinen auf der Oberfläche von *N. caninum* ist ungewöhnlich, da Untersuchungen bei *T. gondii* und *Plasmodium falciparum* gezeigt haben, dass eine Glykosylierung keine dominante Modifikation der Parasitenoberfläche darstellt. Aufgrund anschließender Lektinbindungsstudien konnten wir zeigen, dass die Oberfläche von nativen *Neospora*-Tachyzoiten – im Gegensatz zu denjenigen von *Toxoplasma* – tatsächlich glykosyliert ist (Fuchs et al. 1999). Nun wurde es möglich, mittels Lektinaffinitätschromatographie spezifische Glykoproteine aus der Membran von *N. caninum* zu isolieren. Ähnliche Arbeiten haben wir ebenfalls mit Nc-p33 (Hemphill et al., 1998), einem «dense granule»-assoziierten Antigen, welches nach dem Eindringen des Parasiten in die Wirtszelle in das Lumen der parasitophoren Vakuole sezerniert wird, sowie dem Mikronemen-assoziierten Antigen Nc-p38 (Sonda et al., 1999) durchgeführt.

### Potentielle Möglichkeiten zur Prävention einer Neosporose

Der praktische Nutzen immunologischer Forschungsarbeiten sollte in der Entwicklung einer Vakzine oder einer protektiven Immuntherapie zu finden sein. Grundsätzlich können wir uns drei Ziele einer zukünftigen Vakzine vorstellen: Infektionsprävention – Transmissionsprävention – Abortprävention. Die beiden Letzteren wären sicherlich die praktisch interessanteren Varianten. Unsere diesbezügliche Forschung fokussiert vorerst auf das oben beschriebene Mausmodell. Hier haben wir bereits erste Erfolge erzielt, indem wir

Mäuse, die mittels somatischer *N. caninum*-Antigene und einem rekombinanten Nc-p43-Antigen immunisiert worden sind, vor Erkrankung schützen konnten.

Bestehende, persistierende Infektionen bei Muttertieren könnten mittels einer Vakzine schwer zu beeinflussen sein. Eine Alternative zur Verhinderung einer rekrudescenzen, abortiven Neosporose bei bovinen Muttertieren könnte in der strategischen Verabreichung eines kokzidioziden Wirkstoffes sein. In Zusammenarbeit mit einer deutschen Firma erproben wir z.Z. experimentell neue Wirkstoffformulierungen im Mausmodell, auch hier sind bereits erste Erfolge erzielt worden, so dass wir demnächst – in einer zweiten Phase – diese Wirkstoffe beim Rind prüfen werden, dies in Zusammenarbeit mit mehreren Institutionen der beiden veterinärmedizinischen Fakultäten.

### Literatur

Björkman C., Lunden A. (1998): Application of iscom antigen preparations in ELISAs for diagnosis of *Neospora* and *Toxoplasma* infections. *Int. J. Parasitol.* 28, 187–193.

Barr B. C., Conrad P.A., Breitmeyer R., Sverlow K., Anderson M. L., Reynolds J., Chauvet A. E., Dubey J. P., Ardans A. A. (1993): Congenital *Neospora* infection in calves born from cows that had previously aborted *Neospora*-infected fetuses: Four cases (1990–1992). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 202, 113–117.

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

Dubey J.P., Koestner A., Piper R. C. (1990): Repeated transplacental transmission of *Neospora caninum* in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 197, 857–860.

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

Dubey J.P., Lindsay D.S. (1996): A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Vet. Parasitol.* 67, 1–59.

Dubey J.P. (1999): Neosporosis – the first year of research. *Int. J. Parasitol.* 29, 1485–1488.

Dubremetz J. F. (1998): Host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. *Trends Microbiol.* 27, 27–30.

Ellis J.T. (1998): Polymerase chain reaction approaches for the detection of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* 28, 1053–1060.

Eperon S., Brönnimann K., Hemphill A., Gottstein B. (1999): Susceptibility of B-cell deficient C57BL/6 ( $\mu$ MT) mice to *Neospora caninum* infection. *Parasite Immunol.* 21, 225–236.

Fuchs N., Sonda S., Gottstein B., Hemphill A. (1998): Differential expression of cell surface- and dense granule-associated *Neospora caninum* proteins in tachyzoites and bradyzoites. *J. Parasitol.* 84, 753–758.

Fuchs N., Ingold K., Sonda S., Bütikofer P., Hemphill A. (1999): Detection of surface-associated and intracellular glycoconjugates and glycoproteins in *Neospora caninum* tachyzoites. *Int. J. Parasitol.* 29, 1597–1611.

- Gottstein B., Hentrich B., Wyss R., Thür B., Busato A., Stärk K. (1998): Molecular and immunodiagnostic investigations on bovine neosporosis in Switzerland. *Int. J. Parasitol.* 28, 679–691.
- Hemphill, A. (1996): Subcellular localization and functional characterization of Nc-p43, a major *Neospora caninum* tachyzoite surface protein. *Infect. Immun.* 64, 4279–4287.
- Hemphill A., Gottstein B., Kaufmann H. (1996): Adhesion and invasion of bovine endothelial cells by *Neospora caninum*. *Parasitol.* 112, 183–197.
- Hemphill A., Felleisen R., Connolly B., Gottstein B., Hentrich B., Müller N. (1997): Characterization of a cDNA clone encoding Nc-p43, a major *Neospora caninum* surface protein. *Parasitology* 115, 581–590.
- Hemphill A., Gajendran N., Sonda S., Fuchs N., Gottstein B., Jenkins M. C. (1998). Identification and characterization of a dense granule-associated protein in *Neospora caninum* tachyzoites. *Int. J. Parasitol.* 28, 429–438.
- Hemphill A. (1999): The host–parasite relationship in neosporosis. *Adv. Parasitol.* 43, 47–104.
- Kaufmann H., Yamage M., Roditi I., Dobbelaere D., Dubey J.P., Holmdahl O.J.M., Trees A., Gottstein B. (1996): Discrimination of *Neospora caninum* from *Toxoplasma gondii* and other apicomplexan parasites by hybridisation and PCR. *Mol. Nucl. Prob.* 10, 289–297.
- Lally N. C., Jenkins M. C., Dubey J. P. (1996): Evaluation of two *Neospora caninum* recombinant antigens for use in an ELISA for the diagnosis of bovine neosporosis. *Clinic. Diagn. Lab. Immunol.* 3, 275–279.
- Lindsay D. S., Dubey J. P., Duncan R. B. (1999): Confirmation that dogs are definitive host for *Neospora caninum*. *Vet. Parasitol.* 82, 327–333.
- Louie K., Sverlow K. W., Barr B. C., Anderson M. L., Conrad P. A. (1997): Cloning and characterization of two recombinant *Neospora* protein fragments and their use in serodiagnosis of bovine neosporosis. *Clinic. Diagn. Lab. Immunol.* 4, 692–699.
- Marsh A.E., Barr B.C., Packham A.E., Conrad P.A. (1998): Description of a new *Neospora* species. *J. Parasitol.* 84, 983–991.
- McAllister M.M., Dubey J.P., Lindsay D.S., Jolley W.R., Wills R.A., McGuire A.M. (1998) Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* 28, 1473–1478.
- Müller N., Zimmermann V., Hentrich B., Gottstein B. (1996): Diagnosis of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* Infection by PCR and DNA Hybridization Immunoassay. *J. Clin. Microbiol.* 34, 2850–2852.
- Sonda S, Fuchs N, Connolly B, Fernandez P, Gottstein B, Hemphill A. (1998): The major 36 kDa *Neospora caninum* tachyzoite surface protein is closely related to the major *Toxoplasma gondii* surface antigen 1. *Mol. Biochem. Parasitol.* 97, 97–108.
- Sonda S., Fuchs N., Gottstein B., Hemphill A. (1999): Molecular characterization of a novel microneme antigen of *Neospora caninum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* In press.
- Yamage M., Flechtner O., Gottstein B. (1996): *Neospora caninum*: Specific oligonucleotide primers for the detection of brain «cyst» DNA of experimentally-infected nude mice by the polymerase chain reaction (PCR). *J. Parasitol.* 82, 272–279.

### Korrespondenzadresse

PD Dr. A. Hemphill  
 Institut für Parasitologie der Universität Bern  
 Länggass-Strasse 122  
 CH-3012 Bern  
 E-Mail: andrew.hemphill@ipa.unibe.ch  
 Fax: +41 31 631 26 22

## Entspricht Ihr Röntgen-Generator nicht mehr den neusten BAG-Vorschriften?

Profitieren Sie von unseren günstigen Angeboten!

**Revidierter OCCASIONS-RÖNTGEN-GENERATOR**  
**500 mA/125 kV**  
**mit Vollgarantie und Abnahmeprüfung Fr. 9000.–**

**Revidierte OCCASIONS-RÖNTGENANLAGE**  
**mit Vollgarantie, 500 mA/125 kV. Buckystand,**  
**fahrbarer Tisch Fr. 18 900.–**

R. Liechti AG, Röntgen, 2076 Gals, Tel. 032 338 94 20