

**Neospora caninum –  
eine Abortursache beim Rind**

Astrid Katja Mayr

Aus der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik  
Vorstand: Prof. Dr. R. Stolla  
und dem Institut für Vergleichende Tropenmedizin  
und Parasitologie  
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. K. Pfister

**Neospora caninum - eine Abortursache beim Rind**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig – Maximilians – Universität München

von  
Astrid Katja Mayr  
aus  
Neusäß

München 2004

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. R. Stolla

Referent: Univ.-Prof. Dr. R. Stolla

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. P. Kölle

Tag der Promotion: 13. Februar 2004

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>GESCHICHTE</b>	<b>2</b>
<b>3.</b>	<b>MORPHOLOGIE UND BIOLOGIE VON <i>NEOSPORA CANINUM</i></b>	<b>7</b>
<b>3.1</b>	<b>Phylogenetischer Standpunkt</b>	<b>7</b>
<b>3.2</b>	<b>Lebenszyklus der Apicomplexa</b>	<b>11</b>
<b>3.3</b>	<b>Lebenszyklus von <i>Neospora caninum</i></b>	<b>13</b>
<b>3.4</b>	<b>Struktur</b>	<b>15</b>
3.4.1	Tachyzoiten	15
3.4.2	Gewebssysteme	17
3.4.3	Bradyzoiten	19
3.4.4	Oozysten	20
3.4.5	Sporozysten und Sporozoiten	20
<b>3.5</b>	<b>Arten und Differenzierung der <i>Neosporen</i></b>	<b>20</b>
3.5.1	<i>Neospora caninum</i> und <i>Neospora hughesi</i>	20
3.5.2	<i>Neospora</i> -Isolate	24
<b>3.6</b>	<b>Wirtsspektrum</b>	<b>27</b>
<b>3.7</b>	<b>Wirt-Parasit-Interaktionen</b>	<b>32</b>
3.7.1	Rolle der sekretorischen Organellen	33
3.7.2	Adhäsion und Invasion	34
<b>3.8</b>	<b>Antigene</b>	<b>36</b>
<b>4.</b>	<b>IN-VITRO-KULTIVIERUNG</b>	<b>40</b>
<b>5.</b>	<b>EPIDEMIOLOGIE</b>	<b>43</b>
<b>5.1</b>	<b>Geographische Verbreitung</b>	<b>43</b>
<b>5.2</b>	<b>Seroprävalenz</b>	<b>47</b>
<b>5.3</b>	<b>Häufigkeit wiederholter Aborte</b>	<b>48</b>
<b>5.4</b>	<b>Risikofaktoren</b>	<b>50</b>

<b>5.5</b>	<b>Übertragungsmöglichkeiten</b>	51
5.5.1	Vertikal	52
5.5.2	Horizontal	53
5.5.2.1	Orale Infektion durch Oozysten	53
5.5.2.2	Orale Infektion durch Tachyzoiten	54
5.5.2.3	Orale Infektion durch bradyzoitenhaltiges Gewebe	55
<b>6.</b>	<b>INFEKTIONSVERSUCHE BEI VERSCHIEDENEN TIERARTEN</b>	56
<b>6.1</b>	<b>Versuche mit Mäusen und kleinen Wiederkäuern</b>	56
<b>6.2</b>	<b>Infektionsversuche möglicher Endwirte</b>	57
<b>6.3</b>	<b>Infektionsversuche bei Primaten</b>	58
<b>7.</b>	<b>KLINIK DER NEOSPOROSE</b>	59
<b>7.1</b>	<b>Klinische Erscheinungen der adulten Rinder</b>	59
<b>7.2</b>	<b>Klinik der kongenital infizierten Kälber</b>	60
<b>8.</b>	<b>DIAGNOSTIK</b>	61
<b>8.1</b>	<b>Untersuchungsmaterial</b>	61
<b>8.2</b>	<b>Serologie</b>	61
8.2.1	Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	62
8.2.2	Indirekter Immunfluoreszenz Test (IFAT)	63
8.2.3	Agglutinations-Test	63
<b>8.3</b>	<b>Erregernachweis</b>	63
8.3.1	Histologie	64
8.3.1.1	Lichtmikroskopie	64
8.3.1.2	Elektronenmikroskopie	64
8.3.2	Immunhistochemie	64
8.3.3	Polymerase Chain Reaction (PCR)	65
8.3.4	Diagnostische In-vitro-Kultivierung	66
<b>8.4</b>	<b>Tierversuch</b>	66
<b>9.</b>	<b>PATHOLOGIE UND HISTOPATHOLOGIE</b>	67
<b>9.1</b>	<b>Pathologie und Histopathologie der abortierten Foeten</b>	67
<b>9.2</b>	<b>Pathologie und Histopathologie der kongenital infizierten Kälber</b>	68

<b>9.3</b>	<b>Abortpathogenese</b>	69
<b>10.</b>	<b>DIFFERENTIALDIAGNOSTISCH RELEVANTE ERREGER</b>	71
<b>10.1</b>	<b>Infektiöse Auslöser</b>	71
10.1.1	Parasiten	71
10.1.1.1	<i>Toxoplasma</i>	71
10.1.1.2	<i>Hammondia</i>	72
10.1.1.3	Weitere Parasiten	72
10.1.2	Bakterien	73
10.1.2.1	<i>Brucella</i>	74
10.1.2.2	<i>Leptospira</i>	74
10.1.2.3	<i>Chlamydia</i>	75
10.1.2.4	<i>Coxiella</i>	75
10.1.2.5	<i>Mykoplasma</i>	76
10.1.2.6	<i>Salmonella</i>	76
10.1.2.7	<i>Listeria</i>	77
10.1.2.8	Weitere Bakterien	77
10.1.3	Viren	77
10.1.3.1	IBR-IPV-Viren	78
10.1.3.2	BVD-Virus	78
10.1.3.3	Weitere Viren	79
10.1.4	Pilze	79
10.1.4.1	<i>Aspergillus</i>	79
10.1.4.2	<i>Mucorales</i>	79
10.1.4.3	<i>Candida</i>	80
<b>10.2</b>	<b>Nicht infektiöse Auslöser</b>	80
10.2.1	Intoxikationen	80
10.2.2	Medikamente	80
10.2.3	Physikalische Einflüsse	81
<b>11.</b>	<b>IMMUNOLOGIE</b>	82
<b>11.1</b>	<b>Natürliche Immunität</b>	82
<b>11.2</b>	<b>Immunantwort bei nicht-trächtigen Kühen</b>	84
<b>11.3</b>	<b>Immunantwort bei trächtigen Kühen</b>	85
<b>12.</b>	<b>THERAPIE</b>	87
<b>12.1</b>	<b>Herdenmanagement</b>	87
<b>12.2</b>	<b>In-vitro-Wirksamkeit von Medikamenten</b>	87
<b>12.3</b>	<b>Erfolge bei anderen Tierspezies</b>	89

<b>13.</b>	<b>INFEKTIONSPRÄVENTION</b>	91
<b>14.</b>	<b>IMPfstOFFENTWICKLUNG</b>	93
<b>15.</b>	<b>WIRTSCHAFTLICHE AUSWIRKUNGEN</b>	95
<b>16.</b>	<b>DISKUSSION</b>	98
<b>17.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	102
<b>18.</b>	<b>SUMMARY</b>	104
<b>19.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	106

# ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
ABR	Abortus-Bang-Ringprobe
al.	aliter, Mitarbeiter
B.	<i>Babesia</i>
BAE	bovine Aortaendothelzellen
Balb/c Maus	Bagg Albino Maus
BHV	bovines Herpesvirus
BM	bovine Monozyten
BPA-1; -2; -3; -4	( <i>Neospora caninum</i> -Isolat)
BT-3	( <i>Neospora caninum</i> -Isolat)
BVD	bovine Virusdiarrhoe
C.	<i>Candida</i>
CN1	( <i>Neospora hughesi</i> -Isolat)
DAT	direkter Agglutinationstest
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DHFTS	Dihydrofolat-Thymidylatsynthase
DMSO	Dimethylsulfoxid
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
Fam.	Familie
GPI-Anker	Glykosylphosphatidylinositolanker
H.	<i>Hammondia</i>
IAAT	immuno absorbent agglutination test
IBR	infektiöse bovine Rhinotracheitis
IFAT	indirect fluorescent antibody test
Ig	Immunglobulin
IHA	indirekter Haemagglutinationstest
IL	Interleukin
IPV	infectiöse pustulöse Vulvovaginitis
Iscom	immunstimulrender Komplex
ITS	Internal transcribed spacer
JPA1	( <i>Neospora caninum</i> -Isolat)
KBA-1; -2	( <i>Neospora caninum</i> -Isolat)



kDa	Kilodalton
L.	<i>Leptospira</i>
LA	Langsam-Agglutination
LAT	Latex-Agglutinationstest
M.	<i>Mykoplasma</i>
MAR	Mikroagglutinationstest
MPA	Methylprednisolonacetat
N.	<i>Neospora</i>
N54	(Oberflächenantigen)
NC-1; -2; -3; -4; -5	<i>Neospora caninum</i> -1 ( <i>Neospora caninum</i> -Isolat)
NC-6-Argentina	( <i>Neospora caninum</i> -Isolat)
Nc-Bahia	<i>Neospora caninum</i> Bahia ( <i>Neospora caninum</i> -Isolat)
NC-Beef	( <i>Neospora caninum</i> -Isolat)
NC-GER1	( <i>Neospora caninum</i> -Isolat)
NcGRA	(Oberflächenantigen)
NCDG1	(Oberflächenantigen)
NCGRA2	(Oberflächenantigen)
NC-Illinois	( <i>Neospora caninum</i> -Isolat)
NC-liv	( <i>Neospora caninum</i> -Isolat)
Nc-LivB1; 2	<i>Neospora caninum</i> Liverpool ( <i>Neospora caninum</i> -Isolat)
NC-Nowra	( <i>Neospora caninum</i> -Isolat)
NCP24	(Oberflächenantigen)
NC-Porto1	( <i>Neospora caninum</i> -Isolat)
NC-PGI	( <i>Neospora caninum</i> -Isolat)
NC-PVI	( <i>Neospora caninum</i> -Isolat)
NcSAG	<i>Neospora caninum</i> surface antigen
NcSRS	<i>Neospora caninum</i> antigen related sequence
Nc-SweB1	<i>Neospora caninum</i> Sweden B1 ( <i>Neospora caninum</i> -Isolat)
NE1	( <i>Neospora hughesi</i> -Isolat)
Nh-A1	( <i>Neospora hughesi</i> -Isolat)
NhGRA	(Oberflächenantigen)
NhSAG	<i>Neospora hughesi</i> surface antigen
NhSRS	<i>Neospora hughesi</i> antigen related sequence
NT	Neutralisationstest

PAS	periodic acid schiff
PyrR1	Pyrimethaminresistente Mutante 1
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RAPD-PCR	random amplified polymorphic c-DNA polymerase chain reaktion
S	Svedberg (Einheit)
S.	<i>Sarcocystis</i>
SAG	surface antigen
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SFT	Sabin Feldmann-Test
sp.	Spezies
spp.	Spezies (Pl.)
ssrRNA	small subunit ribosomal ribonucleic acid
Subfam.	Subfamilie
T. gondii	<i>Toxoplasma gondii</i>
VV	Vacciniavirus

## 1. EINLEITUNG

Die Abortinzidenz beim Rind nach dem dritten Graviditätsmonat liegt bei drei Prozent (DE KRUIF, 1993). Als infektiöse Ursachen wurden bisher im deutschsprachigen Raum hauptsächlich Bakterien diagnostiziert. Die Nachweisquote von bakteriell bedingten Aborten schwankte zwischen 13 und 33 Prozent (WEBER et al., 1997).

In den USA wird im Zusammenhang mit Aborten zunehmend von der Neosporose, einer durch das intrazellulär parasitierende Protozoon *Neospora (N.) caninum* hervorgerufenen Krankheit berichtet. Bis zu 40 Prozent aller Aborte werden dort auf Neosporen zurückgeführt (DUBEY und ROMMEL, 1992).

Es handelt sich dabei um eine weltweit verbreitete Erkrankung. Natürliche Infektionen konnten in Hunden, Rindern, Ziegen, Schafen, Pferden und Hirschen nachgewiesen werden. Erstmals wurde die Erkrankung bei Hunden beschrieben, die Symptome wie neuromuskuläre Störungen, Paresen und Paralysen zeigten. Sind Rinder betroffen, kommt es zu Aborten, Mumifikationen, Geburt lebensschwacher oder infizierter, aber klinisch inapparenter Kälber. Letztere können als adulte Tiere den Parasiten über die Plazenta weitergeben und tragen somit zur unbemerkten Verbreitung bei (HEMPHILL, 1999). Dies, die reduzierte Milchproduktion und reduzierte Gewichtszunahmen bei seropositiven Masttieren führen zu großen Verlusten in der Landwirtschaft (BARLING et al., 2001b; THURMOND und HIETALA, 1997b).

In der vorliegenden Arbeit wurde eine systematische Recherche der englisch- und deutschsprachigen Literatur über den Erreger *N. caninum* und die Neosporose durchgeführt. Insbesondere wird dabei auf die Bedeutung von *N. caninum* als Aborterreger beim Rind eingegangen.

## 2. GESCHICHTE

Im Jahre 1974 wurde bereits von nicht identifizierbaren Sporozoen berichtet, die Enzephalomyelitis bei Schafen und Pferden verursachten.

Ein sechs Monate altes Schaf zeigte zuerst Inkoordinationen der Hintergliedmaßen, gefolgt von generellen neurologischen Ausfällen. Außerdem fielen Blindheit und Headshaking auf. In einer anderen Herde traten bei einem fünf Monate alten Tier Inkoordinationen der Hintergliedmaßen auf, die nach drei Wochen zur vollständigen Paralyse der hinteren Körperhälfte führten. Mindestens sechs andere Schafe aus dieser Herde, zwischen zwei Monaten und drei Jahren alt, zeigten in den folgenden acht Monaten Inkoordinationen, die sich aber wieder verloren. Bei licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden Sporozoen in Gehirn und Rückenmark festgestellt. Serologische Untersuchungen ergaben bei den klinisch auffälligen Tieren negative *Toxoplasma*-Titer, während bei Kontaktschafen ein schwacher Titer von 1:64 nachgewiesen wurde (HARTLEY und BLACKMORE, 1974).

Die acht untersuchten Pferde zeigten ebenfalls neurologische Symptome, die von Kau- und Schluckbeschwerden, Kreisbewegungen, ataktischen Bewegungsabläufen und Schwierigkeiten beim Rückwärtsgehen und bei Seitwärtsbewegungen bis zur Hypermetrie der Gliedmaßen reichten. Auch hier wurden in Gehirn und Rückenmark Sporozoen gefunden. In den Cerebrospinalflüssigkeiten konnten keine *Toxoplasma*-Antikörper nachgewiesen werden (BEECH und DODD, 1974).

In Norwegen wurde 1984 ein parasitärer Erreger von Enzephalitis und Myositis bei Hundewelpen isoliert (BJERKAS et al., 1984). Es handelt sich im beschriebenen Fall um einen Wurf von sechs Boxerwelpen. Im frühen Welpenalter erschienen die Hunde klinisch unauffällig. Fünf Tiere entwickelten zwei bis sechs Monate nach der Geburt neurologische Störungen, die nach einigen Monaten zu Paresen führten. Ein Welpen erkrankte subklinisch. Der Parasit wurde mikroskopisch hauptsächlich im Zentralnervensystem nachgewiesen, wo er Läsionen, Nekrosen oder Entzündungserscheinungen verursachte. In geringerem Ausmaß wurden auch in der Skelettmuskulatur parasitär bedingte Entzündungen festgestellt. Auch bei dem subklinisch erkrankten Tier zeigten Zentralnervensystem und Muskulatur Merkmale einer chronischen Entzündung mit Fibrosierungen (BJERKAS et al., 1984).

Durch den elektronenmikroskopischen Nachweis der charakteristischen Organellen - ein Konoid, 22 subpellikular gelegene Mikrotubuli, relativ wenige, nach unterschiedlichen Richtungen orientierte Mikronemen, und schließlich elf oder mehr Rhoptrien - (SCHOLTYSECK et al., 1973) konnte der Parasit den Apicomplexa zugeordnet werden. Er teilte sich durch Schizogonie (Endodyogenie) in zwei Merozoiten und wurde deshalb innerhalb der Apicomplexa zur Klasse der Sporozoa gezählt (BJERKAS et al., 1984). Lichtmikroskopisch konnte der Parasit nicht von *Toxoplasma (T.) gondii* unterschieden werden. Ultrastrukturell ähnelten die Merozoiten sowohl *T. gondii* (SULZER et al., 1979) als auch *Besnoita*, hatten aber mehr Rhoptrien (SCHOLTYSECK et al., 1973). Die Unempfindlichkeit von Mäusen bei Infektionsversuchen und das Fehlen von Antikörpern gegen *T. gondii* sprachen dagegen, daß es sich bei dem beschriebenen Parasit um eine *Toxoplasma*-Art handelte (DUBEY, 1977).

DUBEY und Mitarbeiter (1988a) beschrieben das Auftreten einer letalen Toxoplasmose-ähnlichen Krankheit bei 23 Hunden. Bei 13 Tieren wurde *T. gondii* nachgewiesen. Die anderen zehn Tiere wiesen ähnliche, jedoch nicht identische protozoäre Parasiten auf. Die Seren reagierten auch nicht mit Antikörpern gegen *T. gondii* im Immunperoxidase-Test. Die zystenbildenden Protozoen befanden sich vor allem in Gehirn und Rückenmark. Die Parasiten konnten in Zellkulturen isoliert werden und wurden als *N. caninum* in die mikrobiologische Nomenklatur aufgenommen. In der Sektion wurden hauptsächlich Myositis und Meningoenzephalomyelitis diagnostiziert. Ein Tier wies eine ulzerierende Dermatitis auf. Experimentell mit *N. caninum* infizierte Hunde zeigten Lähmungen, neurologische Ausfälle wie Ataxien, aber auch spontane Todesfälle (DUBEY et al., 1988b).

LINDSAY und DUBEY (1989b) gelang es, Antikörper in Kaninchen zu produzieren. Die *N. caninum*-Tachyzoiten aus natürlich infizierten Hunden wurden isoliert und dann mehrfach in Zellkulturen passagiert. Mit diesen Tachyzoiten konnten Kaninchen immunisiert und das Antiserum gewonnen werden. Tachyzoiten und Bradyzoiten von *N. caninum* wurden immunhistochemisch in formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Geweben infizierter Hunde identifiziert. Mit Hilfe dieser Methode konnte eine Differenzierung von *Neospora* und *Toxoplasma* vorgenommen werden. Bei mit *Toxoplasma*, *Hammondia (H.) hammondi*, *Sarcocystis (S.) cruzi*, *S. capricanis*, *S. tenella*, *Besnoita jellisoni*, *Caryospora bigenetica*, *Hepatozoon canis* oder *Atoxoplasma*-Spezies infiziertem Gewebe fand keine Reaktion statt. So konnten BJERKAS und DUBEY (1991) in konserviertem Gewebe aus den 1984 in Norwegen erkrankten Hundewelpen den Erreger nachträglich als *N. caninum* identifizieren.

DUBEY und Mitarbeiter (1988a) gelang es durch eine retrospektive Analyse histopathologischer Präparate nachzuweisen, daß *N. caninum* bereits im Jahre 1957 existierte und in den Vereinigten Staaten bei mehreren Hunden schwere neuromuskuläre Störungen verursachte. Auch BJERKAS und LANDSVERK wiesen bei einem 1967 seziierten Saluki im Gehirngewebe mittels Immunperoxidase-Techniken und Elektronenmikroskopie den neuen, damals noch nicht klassifizierten Parasiten nach (BJERKAS und LANDSVERK, 1986).

LINDSAY und DUBEY entwickelten 1989 und 1990 erste experimentelle Tiermodelle. Sie untersuchten die Biologie, Übertragung und Chemotherapie von *N. caninum* bei Mäusen, Ratten, Hunden, Katzen und Schafen (LINDSAY und DUBEY 1989a,c; 1990a,b). Auf die Versuche wird in Punkt 6 noch näher eingegangen.

Ende der 80er Jahre wurden in Kalifornien zahlreiche Aborte bei Milchkühen beobachtet, die auf eine Protozoeninfektion zurückzuführen waren. 445 Rinderfoeten aus 56 Herden wurden von 1987-1989 im California Veterinary Diagnostic Laboratory System untersucht. Sie wiesen nonsuppurative Myokarditis sowie eine multifokale Enzephalitis auf, die der *Toxoplasma*-Enzephalitis bei Schaffoeten ähnelte. Die im Gehirn nachgewiesenen Protozoen zeigten keine Reaktionen mit *Toxoplasma*-spezifischen Antikörpern (BARR et al., 1990). THILSTED und DUBEY ließen aus diesen Kühen isolierte Einzeller erfolgreich mit Antikörpern gegen *N. caninum* reagieren und identifizierten sie somit (THILSTED und DUBEY, 1989).

*N. caninum* wurde 1989 in der Plazenta eines Rindes nachgewiesen, das einen fünf Monate alten Foetus abortiert hatte. Die Kotyledonen waren nekrotisch und enthielten Protozoen, die sich strukturell von *Sarcocystis spp.* und *T. gondii* unterschieden. Auch in diesem Fall konnte *N. caninum* identifiziert werden (SHIVAPRASAD et al., 1989).

DUBEY und LINDSAY (1989b) infizierten eine pluripare 8-jährige Beaglehündin am Tag 35 der Trächtigkeit mit 1,5 Millionen *N. caninum*-Tachyzoiten subkutan und intramuskulär. 28 Tage nach der Inokulierung warf sie acht Welpen. Von diesen starb einer kurz nach der Geburt, ein zweiter zwei Tage post partum, drei Welpen wurden an den Tagen zwei, drei und 20 post partum wegen Trinkschwäche und Hypothermie euthanasiert. Die verbleibenden drei Welpen erschienen klinisch unauffällig. Bei sechs von acht Welpen wurden Serum-Antikörper gegen *N. caninum* gefunden. Die Sektion der fünf toten Tiere zeigte Myokarditis, Hepatitis, Enzephalitis und Pneumonie in unterschiedlicher Ausprägung. Gewebe aus Plazenta, Gehirn, Leber und Lunge der Welpen wurden homogenisiert und auf bovine Monozyten-Zellkulturen gebracht. Anschließend wurden die gewonnenen Organismen durch IFAT als *N. caninum* identifiziert. Ähnliche Versuche zum Nachweis der

diaplazentaren Übertragung wurden auch bei Katzen (DUBEY und LINDSAY, 1989a), Schafen (DUBEY et al., 1990b) und Mäusen (COLE et al., 1995) durchgeführt. Bei diesen Tierarten konnte dieser Übertragungsweg bestätigt werden.

Der Nachweis der diaplazentaren Übertragung beim Rind wurde erst 1992 erbracht (DUBEY et al., 1992c). Hierbei wurden drei Jersey-Kühe subkutan und intramuskulär mit 26 Millionen *N. caninum*-Tachyzoiten am Tag 129 (Kuh 1), 126 (Kuh 2) und 81 (Kuh 3) nach der Besamung infiziert. Kuh 1 mußte wegen einer gangränösen Mastitis 32 Tage nach der Inokulierung euthanasiert werden. Ihr Foetus zeigte eine hochgradige nonsuppurative, nekrotisierende Enzephalitis. *N. caninum* wurde mit Hilfe von Anti-*N. caninum*-Serum immuno-histologisch, in Bioassays mit Mäusen sowie durch Inokulierung von bovinen Monozytenkulturen mit Gewebe-Homogenisat nachgewiesen. Kuh 2 und 3 abortierten 101 bzw. 74 Tage nach der Inokulierung der *N. caninum*-Tachyzoiten kleine, autolytierte Foeten. Plazenta und Foeten waren für Laboruntersuchungen nicht verwertbar (DUBEY et al., 1992c). Ein Jahr später gelang erstmals die Isolierung von *N. caninum* aus einem abortierten Foetus (CONRAD et al., 1993a). Durch intravenöse und intramuskuläre Applikation dieses Isolates, BPA-1, konnten wiederum Aborte beim Rind induziert werden (BARR et al., 1994b).

Die Neosporose wird mittlerweile weltweit als ein wichtiger Grund für Aborte und Fruchtbarkeitsprobleme bei Rindern angesehen. Sie verursacht bis zu 40 % der Aborte bei Rindern in Kalifornien (DUBEY und ROMMEL, 1992) und bis zu 25% in den Niederlanden (WOUDA et al., 1999a). Es liegen bestätigte Fälle aus ca. 30 Ländern vor, u. a. Argentinien (CAMPERO et al., 1998), Australien (REICHEL, 2000), Brasilien (GONDIM et al., 1999a,b), Deutschland (CONRATHS et al., 1996), Israel (HARMELIN et al., 1995a,b), Japan (OGINO et al., 1992), USA (DRYER et al., 2000) und Zimbabwe (JARDINE und WEELS, 1995).

Morphologische Untersuchungen zeigten, daß es sich bei der bovinen und der caninen Form um dieselbe Spezies handelt (BARBER et al., 1993; DUBEY und LINDSAY, 1996; JARDINE, 1996). Dagegen wurden Einzeller, die aus dem Gehirn eines Pferdes in Kalifornien isoliert wurden, aufgrund morphologischer Unterschiede als neue Spezies unter der Bezeichnung *Neospora hughesi* (*N. hughesi*) in die Nomenklatur aufgenommen (MARSH et al., 1998).

McALLISTER und Mitarbeiter (1998a) konnten den Verdacht bestätigen, daß der Hund den Endwirt von *N. caninum* darstellt. Vier Hunde wurden durch Verfütterung von Mäusen, die Gewebiszysten von *N. caninum* enthielten, oral infiziert. Der Kot der Hunde wurde über einen Zeitraum von 30 Tagen nach der Verfütterung täglich mittels Flotation auf Oozysten untersucht. Drei Tiere schieden unsporulierte Oozysten aus, die innerhalb von drei

Tagen sporulierten und je zwei Sporozysten mit je vier Sporozoiten enthielten. Labormäuse wurden mit fäkalen Extrakten dieser Hunde oral und subkutan infiziert und morphologisch, serologisch, immunhistologisch und durch genetische Analysen auf *N. caninum* untersucht. Es wurden Tachyzoiten in Leber, Lunge und Milz sowie neurologische Symptome festgestellt. Durch PCR wurden die Tachyzoiten als *N. caninum* identifiziert. 14 Tage nach oraler Aufnahme der fäkalen Extrakte der Hunde hatten zwei von 24 Balb/c Mäusen einen *N. caninum* Antikörper-Titer von über 1:50.

Auch bei Hirschen (WOODS et al., 1994), Gamsen, Rehwild (FERROGLIO und ROSSI, 2001), Ziegen (DUBEY et al., 1992a), Schafen (DUBEY et al., 1990b), Büffeln (HUONG et al., 1998), Kojoten (LINDSAY et al., 1996c), Dingos (BARBER et al., 1997), und Füchsen (BUXTON et al., 1997c) konnten mittlerweile natürliche *Neospora*-Infektionen nachgewiesen werden. Sämtliche Infektionen wurden auf *N. caninum* zurückgeführt. Ihr Auftreten sowohl in freier Wildbahn (FERROGLIO und ROSSI, 2001) als auch in Zoos (DUBEY et al., 1996b) und bei Haustieren weist auf die starke tierartliche und geographische Verbreitung hin.



### **3. MORPHOLOGIE UND BIOLOGIE VON *NEOSPORA CANINUM***

#### **3.1 Phylogenetischer Standpunkt**

Klassifizierung, Taxonomie und Nomenklatur von gewebssystembildenden Kokzidien werden seit vielen Jahren kontrovers diskutiert. Unklar ist bis heute der phylogenetische Standpunkt von *Neospora*, *Toxoplasma* und *Sarcocystis* (TENTER und JOHNSON, 1997). Die Probleme der Klassifizierung ergaben sich daraus, daß die Lebenszyklen der verschiedenen Gruppen erst vor kurzem erforscht wurden bzw. zum Teil bis heute nicht vollständig bekannt sind (HEYDORN und MEHLHORN, 2001). Des weiteren ist zu bedenken, daß möglicherweise bisher nur 1% aller existierenden Spezies der Apicomplexa beschrieben wurden. Außerdem wurde die Suche bisher auf sehr wenige Arten fokussiert, die von medizinischem oder veterinärmedizinischem Interesse, aber nicht unbedingt repräsentativ für das gesamte Vorkommen sind (COX, 1994).

Als Einteilungskriterium dienten die Lebenszyklen wie auch Morphologie und Lokalisation der Entwicklungsstadien. Besondere Bedeutung kommt dem Aufenthaltsort der asexuellen Parasitenstadien im Zwischenwirt zu. Seit 1879 die Klasse der Sporozoa und Subklasse der Coccidia benannt wurden, haben sich die diagnostischen Möglichkeiten stark erweitert. In den späten 50ern ergänzte das Elektronenmikroskop das Lichtmikroskop und erbrachte zusätzliche Erkenntnisse, so daß phänotypische Kriterien ebenfalls zur Einteilung der Kokzidien herangezogen werden. Zu diesen Kriterien zählen Wirtsspezifität, Heteroxenität, Übertragungsmodus, Lokalisation der Sporogonie und ähnliches. Der neueste Ansatz aus den 90ern basiert auf molekularbiologischen Grundlagen. Dabei soll die small subunit ribosomal ribonucleic acid (ssrRNA) neue Einblicke in die Phylogenese geben. Mit ihrer Hilfe wurden bereits Klassifizierungen bei Bakterien wie auch bei Pflanzen und Tieren durchgeführt, da ihre Primär- und Sekundärstruktur während der Evolution konserviert wurde. Die Sequenz kann entweder direkt von der ssrRNA oder von ihren Genen abgelesen werden. Hier kommen auch die molekularbiologischen Methoden zum Einsatz, wie z.B. Genklonierung, Sequenzierung, reverse Transkription der RNA und Vermehrung von Genen durch PCR (TENTER und JOHNSON, 1997). Aus all diesen Ansätzen ergeben sich viele verschiedene Modelle zur Klassifizierung.

Die meisten Informationen über die taxonomische Position des Parasiten erhält man aus molekularen Daten. Die Analyse der kleinen Untereinheit der rRNA wurde zum Standard in der Biochemie, um Aufschluß in die phylogenetischen Beziehungen von Organismen zu

bringen (BARTA et al., 1997). Ein Grund dafür ist der hohe Grad an Konservierung während der Evolution, ihre Allgegenwart und die Einfachheit, mit der diese Sequenzen geklont werden können (MEDLIN et al., 1988; SOGIN, 1989). Das rRNA Molekül hat eine spezifische Sekundärstruktur, die für Formation und Funktion der Ribosomen nötig ist (GUTELL et al., 1994). Primär- und Sekundärstruktur sind sogar innerhalb sehr unterschiedlicher Taxa gleichermaßen erhalten (HILLIS und DIXON, 1991). So ist die Sekundärstruktur für die Sequenz der rRNA Gene und auch für die Anordnung der rRNA Sequenzen verantwortlich (HICKSON et al., 1996; KJER, 1995). Des Weiteren können Aufbau der Helix und Haarnadelschleife als ein Einteilungskriterium herangezogen werden (MUSE, 1995), da die Basenpaare der Helixstruktur ein Resultat kompensatorischer Mutationen sind. Die Sequenzen dieser Moleküle wurden intensiv betrachtet, um Beziehungen innerhalb der Apicomplexa zu untersuchen (BARTA et al., 1991; ELLIS et al., 1995; ESCALANTE und AYALA, 1995). Im Vergleich verschiedener Isolate von *N. caninum* und *T. gondii* ergab sich ein Unterschied in lediglich vier Nukleotiden bei der rRNA (MARSH et al., 1995). Aufgrund des hohen Homologiegrades ihrer 18 S rRNA wurde vorgeschlagen, *N. caninum* und *T. gondii* zusammen ins Genus *Toxoplasma* einzuordnen (HOLMDAHL et al., 1997). Es ist davon auszugehen, daß sich die beiden Arten im Lauf der Evolution voneinander abgespalten haben (ELLIS et al., 1994).

Im Gegensatz dazu wurde in einem Vergleich der Genome von *Neospora*, *Sarcocystis* und *Toxoplasma* mit Hilfe der polymorphen DNA (RAPD)-PCR keine signifikante Beziehung zwischen *Neospora* und *Toxoplasma* nachgewiesen (GUO und JOHNSON, 1995). In dieser Studie wurde eher eine engere Beziehung zwischen *Sarcocystis muris* und *T. gondii* vermutet, als zwischen *N. caninum* und *T. gondii*. Außerdem wurde demonstriert, daß keine Homologe der drei dominanten *T. gondii*-Gene B1, p22 und p30 in *N. caninum* existieren (BRINDLEY et al., 1993; Müller et al., 1996). Zudem besteht eine auffällige Variabilität zwischen der Internal transcribed spacer 1 (ITS 1) Region von *N. caninum* und *T. gondii* (HOLMDAHL und MATTSON, 1996; HOMAN et al., 1997).

Im Jahre 2001 wurden von SCHOCK und Mitarbeitern ebenfalls mit der RAPD-Technik, Isolate von *T. gondii*, *Sarcocystis* sp., *Cryptosporidium* und Neosporen auf genetische Unterschiede untersucht. Die Autoren kamen zu dem Schluß, daß die Neosporen den Toxoplasmen am nächsten stehen.

Eine weitere Versuchsreihe, die die Frage klären sollte, ob *N. caninum* einen Stamm der Toxoplasmen darstellt, zielte darauf, festzustellen, ob eine Immunisierung mit *T. gondii* eine experimentelle Infektion mit *N. caninum*-Tachyzoiten verhindern kann. Als

Versuchstiere dienten trächtige Schafe, deren Foeten alle abstarben. Trotz der bestehenden Kreuzimmunität konnte der Tod der Früchte nicht verhindert werden (INNES et al., 2001a).

Erste Studien des Genoms und der Phylogenie auf molekularer Ebene erfolgten 1994 (ELLIS et al., 1994). Untersuchungen am Genom von 43 Apicomplexa-Spezies (MORRISON, 1996; MORRISON und ELLIS, 1997) ergaben die Einordnung der Gattungen *Eimeria*, *Sarcocystis*, *Toxoplasma* und *Neospora* in Übereinstimmung mit den taxonomischen Schemata von LEVINE (1985, 1988) und VIVIER und DESPOERTES (1990) in die Klasse der Kokzidien.

Die subzelluläre Struktur von *N. caninum* weist im elektronenmikroskopischen Bild morphologische Charakteristika der Sarcocystidae auf, so zum Beispiel den apikalen Komplex am anterioren Parasitenende (LEVINE, 1988).

Deshalb wird *N. caninum* im Stamm der Apicomplexa zur Familie der Sarcocystidae gezählt und darin wegen der erwähnten Sequenzhomologien als eine Schwestergruppe von *T. gondii* geführt (ELLIS et al., 1994).

**Tab. 1:** Die aktuelle Klassifizierung der Apicomplexa nach CURRENT et al. (1990)

Stamm Apicomplexa
Klasse Sporozoa
Subklasse Coccidia
Ordnung Eucoccidia
Unterordnung Eimeriina
Fam. Cryptosporidiidae
Genus <i>Cryptosporidium</i>
Fam. Eimeriidae
Genus <i>Eimeria</i>
Genus <i>Isospora</i>
Fam. Sarcocystidae
Subfam. Sarcocystinae
Genus <i>Sarcocystis</i>
Genus <i>Frankelia</i>
Subfam. Toxoplasmatinae
Genus <i>Toxoplasma</i>
Genus <i>Besnoita</i>
Genus <i>Hammondia</i>
Genus <i>Neospora</i>

Die Familie der Sarcocystidae umfaßt etwa 200 bekannte Arten von heteroxenen, also mehrwirtigen Kokzidien, die Gewebssysteme im Zwischenwirt formen. Aufgrund phänotypischer Merkmale kann eine Unterteilung in die Unterfamilien Sarcocystinae und Toxoplasmatinae erfolgen. Mit ca. 180 Spezies wird die Mehrheit dieser Kokzidien den Sarcocystinae zugeteilt (LEVINE, 1988; TENTER und JOHNSON, 1997). Die wenigen Parasiten, die zu den Toxoplasmatinae gezählt werden, unterteilen sich wieder in vier verschiedene Genera: *Toxoplasma* (*T. gondii*), *Neospora* (*N. caninum*, *N. hughesi*), *Hammondia* (*H. hammondi*, *H. heydorni*) und *Besnoitia* (*B. bennetti*, *B. besnoiti*, *B. caprae*, *B. darlingi*, *B. tarandi*, *B. wallacei*) (DUBEY und BEATTIE, 1988; FRENKEL et al., 1987; SMITH, 1981).

Einige Autoren sind der Meinung, daß die Genera *Hammondia* und *Toxoplasma* wegen ihrer phänotypischen Ähnlichkeiten identisch sind (LEVINE, 1977; 1988; KOGUT, 1990). Allerdings muß diese Folgerung als fraglich bezeichnet werden, da innerhalb der Genera nur wenige Spezies beschrieben sind und bisher nur von *T. gondii* und *H. hammondi* ein kompletter Lebenszyklus bekannt ist (MUGRIDGE et al., 1999). *T. gondii* und *N. caninum* haben ein ähnliches, aber nicht identisches Wirtsspektrum und unterscheiden sich sowohl in Biologie als auch Epidemiologie. Als weitere Schwierigkeit bei der Einteilung gilt die Tatsache, daß die ssrRNA Gensequenzen innerhalb der verschiedenen Linien sehr variieren. Vor allem zwischen virulenten und avirulenten Stämmen bestehen Unterschiede, so daß die Gensequenz von *N. caninum* in den Bereich der Heterogenie fällt. Dies bedeutet, daß gleichartige, erbliche Merkmale mit identischem Phänotyp auch durch verschiedene nicht allele Gene entstehen können (LUTON et al., 1995).

Mehrere morphologische und biologische Merkmale deuten darauf hin, daß *N. caninum* näher mit *H. heydorni* als mit *T. gondii* verwandt ist. Schwierig für die Bewertung ist allerdings, daß die Lebenszyklen noch nicht vollständig identifiziert sind. Für beide Parasiten sind jedoch canine Endwirte nachgewiesen. Aus Gensequenzuntersuchungen an der kompletten 18S rRNA und der ITS1-Sequenz ergab sich ein näherer Verwandtschaftsgrad zwischen *N. caninum* und *H. heydorni* als zwischen den genannten und *H. hammondi* oder *T. gondii* (ELLIS et al., 1999; MUGRIDGE et al., 1999). *H. heydorni* und *N. caninum* benutzen Hunde sowohl als Zwischen- wie auch als Endwirte. Beider Oozysten sind morphologisch nicht zu unterscheiden. So stellt sich auch die Frage, wie viele der *H. heydorni*-Oozysten ausscheidenden Hunde in Wirklichkeit *N. caninum*-Oozysten ausscheiden. Beide Parasiten sind in vielen Tieren weit verbreitet (McALLISTER et al., 1998a).

Zusammenfassend kann man sagen, daß die zahlreichen Widersprüche in der Literatur bezüglich der Phylogenie der Apicomplexa eher auf strategischen Unterschieden zur Klärung der Sequenzanordnung zu basieren scheinen als auf Differenzen in den verwendeten Daten oder den etablierten Methoden zur Stammbaumbildung.

Es bedarf noch weiterer Untersuchungen verschiedener Isolate hinsichtlich ihrer Taxonomie, um gesicherte Aussagen treffen zu können (HEYDORN und MEHLHORN, 2001). Auch sollten alle Proteine des apikalen Komplexes identifiziert und zur Einteilung mit herangezogen werden, da sie über die Jahre auf molekularer und morphologischer Ebene konserviert wurden (TOMLEY und SOLDATI, 2001). Die Eingliederung der Spezies *N. hughesi* steht noch aus.

Die Ergebnisse von Analysen der *ssrRNA* liegen bisher in der Subfamilie der Sarcocystinae nur für *Sarcocystis*, *Toxoplasma* und *Neospora* vor. Somit kann diese Klassifizierung noch nicht als endgültig betrachtet werden.

### 3.2 Lebenszyklus der Apicomplexa

Der Lebenszyklus der Apicomplexa gliedert sich in die Stadien der Sporogonie, Schizogonie und Gamogonie (siehe Abb. 1).

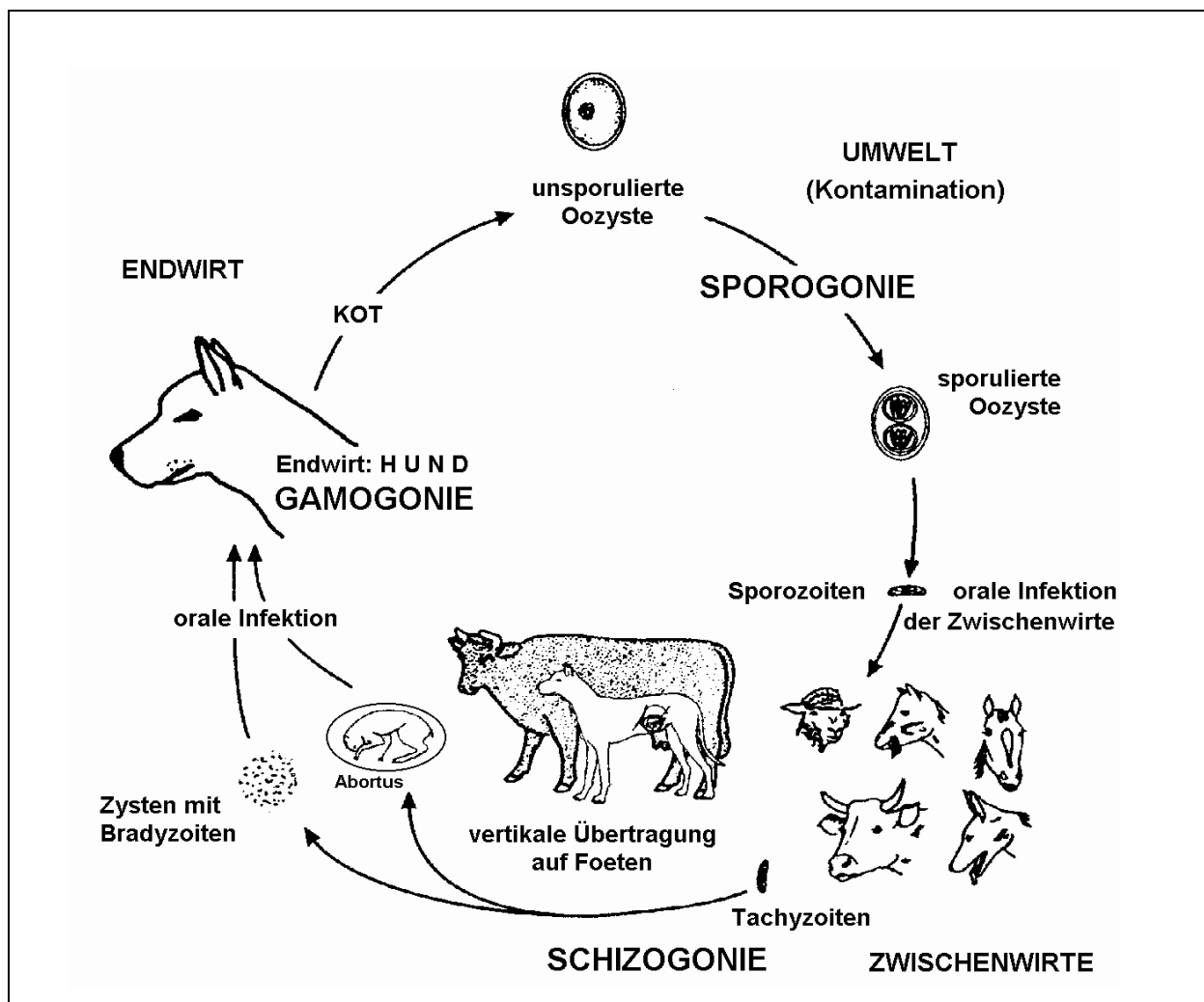
Die **Sporogonie** findet außerhalb des Wirtes statt. Die vom Endwirt Hund ausgeschiedene Oozyste (Dauerstadium) bildet zwei Sporozysten mit je vier Sporozoiten und wird dann als sporulierte Oozyste bezeichnet, die jetzt infektiös ist (infektiöses Stadium).

Die **Schizogonie** wird auch Endodyogenie genannt und stellt ein Vermehrungsstadium dar. Aus einer Mutterzelle entstehen zwei Tochterindividuen nach mitotischer Teilung des Kerns, Zuordnung des Zytoplasmas und Teilung der Organellen. Diese Tochterindividuen werden Endozoiten oder Merozoiten genannt, die sich wiederum schnell teilen und dann als Tachyzoiten bezeichnet werden. Dies findet im Zwischenwirt statt, in dem immer die Vermehrungs- und Entwicklungsprozesse ablaufen (SCHOLTYSECK, 1973).

Die **Gamogonie** stellt die geschlechtliche Differenzierung der Merozoiten dar und führt zur Bildung von männlichen Mikrogamonten und weiblichen Makrogamonten. Nach einer weiteren Mitose werden sie Mikrogameten bzw. Makrogameten genannt. Bei der Gametogamie oder Syngamie findet die Vereinigung zur Zygote statt, die nach der Umhüllung als Oozyste bezeichnet wird. Die Gamogonie ist bei verwandten Kokzidien wie *Toxoplasma* und *Sarcocystis* (DUBEY und BEATTIE, 1988) in dieser Form nachgewiesen

und findet als sexueller Teil des Vermehrungszyklus im Endwirt statt. Diese Vorgänge werden bei allen Sporozoen vermutet, sind aber bei den Neosporen noch nicht nachgewiesen. Hier wurde bisher nur ein Oozystenstadium gefunden, nicht jedoch Gamonten und Gameten (McALLISTER et al., 1998a).

Die bei der Schizogonie entstehenden ungeschlechtlichen Tachyzoiten sind in der Lage, eine Hülle auszubilden, in der weitere langsame Teilungen stattfinden. Die infektiösen Zystozoen werden nun auch Bradyzoiten genannt. Tachyzoiten sind also schnell teilende Stadien, während Bradyzoiten langsam teilende Gebilde sind, die vor allem in neuralem Gewebe Zysten bilden (WOUDA, 2000). Zu den geschlechtlichen Stadien gehören Oozysten, Sporozysten und Sporozoiten (LINDSAY et al., 1999).



**Abb. 1:** Schematischer Entwicklungszyklus von *N. caninum* (nach LÖSCHENBERGER et al., 2000)

### 3.3 Lebenszyklus von *Neospora caninum*

Der Lebenszyklus von *N. caninum* konnte noch nicht vollständig dargestellt werden. Allerdings konnte in einer Studie gezeigt werden, daß Hunde nach Verfütterung von *N. caninum*-haltigen Gewebszysten aus Mäusen 8-27 Tage post infektionem unsporulierte Oozysten ausscheiden. Somit wurde der Hund als Endwirt erstmals bestätigt. Es fehlen noch Nachweise von Stadien, die im Endwirt Hund, in dem der geschlechtliche Part der Vermehrung stattfindet, auftreten (McALLISTER et al., 1998a).

Die ausgeschiedenen Oozysten verbleiben in der Umwelt und sporulieren (Sporogonie) in einem Zeitraum von 24 Stunden (LINDSAY et al., 1999) bis zu drei Tagen (McALLISTER et al., 1998a). Erst dann sind sie infektiös. Über die Infektiosität von Gewebszysten nach oraler Aufnahme durch den Hund ist wenig bekannt, da die infizierten Tiere im Versuch nur eine geringe Menge unsporulierter Oozysten ausschieden. Zudem kam es bei einem der drei Versuchshunde trotz Ausscheidung von Oozysten nicht zur Serokonversion. Auch über die Ausscheidungsfrequenz können zur Zeit noch keine Angaben gemacht werden (LINDSAY et al., 1999; McALLISTER et al., 1998a). Die erforderlichen Umweltbedingungen sind noch ungeklärt, ebenso die Frage, ob noch andere Caniden als Endwirte fungieren. Lediglich in einer Versuchsreihe mit Musteliden konnte festgestellt werden, daß nach Verfütterung von Gewebszysten keine Oozysten ausgeschieden wurden, die denen von *N. caninum* ähnelten (McALLISTER et al., 1999). Allerdings lassen serologische Untersuchungen von wild lebenden Kojoten und Füchsen darauf schließen, daß auch sie bei der Verbreitung der *N. caninum*-Oozysten eine Rolle spielen (BUXTON et al., 1997a; LINDSAY et al., 1999; SIMPSON et al., 1997). SIMPSON und Mitarbeiter (1997) beschrieben einen Fall in Cornwall, Großbritannien, bei dem in einem Rinderbestand mit 120 Tieren innerhalb von neun Monaten 30 Aborte auftraten. Von 17 serologisch untersuchten Rindern zeigten 14 Tiere positive *N. caninum*-Titer. Vorberichtlich lag eine häufige Verunreinigung der verfütterten Silage mit Fuchskot vor. Von 16 daraufhin erlegten Füchsen stellten sich im caninem IFAT (indirect fluorescent antibody test) 13 als negativ, zwei als fraglich und einer als stark positiv heraus. Als zweifelhaft muß dahingestellt bleiben, ob der canine Test auch für Füchse geeignet ist. Es ergibt sich daraus die Forderung nach Entwicklung neuer IFAT-Tests.

Die unbekannte Dauer der intestinalen Immunität bezüglich *N. caninum* erschwert die Deutung der IFAT-Untersuchungen. Ein positiver IFAT-Titer kann einen immunen Hund anzeigen, die Grundsätzlichkeit dieser Aussage ist jedoch nicht belegt. Ein negativer IFAT-

Titer zeigt nicht unbedingt ein Tier an, das noch nie mit *N. caninum* in Berührung gekommen ist (LINDSAY et al., 1999). Ein experimentell infizierter Hund, der auch Oozysten ausschied, war im Versuch von McALLISTER und Mitarbeiter serologisch negativ. Des weiteren ist nichts über die Dauer des *N. caninum*-Titers im Hund nach beendeter Oozystenausscheidung bekannt (McALLISTER et al., 1998a).

In der Umwelt sporulierte Oozysten enthalten je zwei Sporozysten mit jeweils vier Sporozoiten. Der Zwischenwirt infiziert sich durch Aufnahme von Futter oder Wasser, das mit oozystenhaltigem Hundekot verunreinigt wurde. Dies stellt eine von drei bisher nachgewiesenen horizontalen Infektionsmöglichkeiten dar, die jedoch nur bei Labormäusen experimentell nachgewiesen werden konnte (McALLISTER et al., 1998b). Weitere Ausführungen zu den Übertragungsmöglichkeiten werden in Punkt 5.5 gemacht. Als natürliche Zwischenwirte sind zur Zeit Rinder (ANDERSON et al., 1991; 1995), Büffel (HUONG et al., 1998), Schafe (DUBEY et al., 1990b), Ziegen (DUBEY et al., 1992a), Hirsche (WOODS et al., 1994), Pferde (DUBEY und PORTERFIELD, 1990; LINDSAY et al., 1996d), Hunde (DUBEY et al., 1988a,b), Dingos (BARBER et al., 1997), Kojoten (LINDSAY et al., 1996c) und Rotfüchse (BUXTON et al., 1997a) bekannt.

Die Sporozoiten werden im Zwischenwirt frei und bilden durch Schizogonie (Endodyogenie) Tachyzoiten aus, welche sich schnell teilen. Sie befallen Organsysteme wie Gehirn, Rückenmark, Herz, Lunge, Leber, Muskulatur, Haut, Plazenta und Fruchthüllen (DUBEY und LINDSAY, 1993; 1996). Auch die von Tachyzoiten befallenen Zelltypen sind zahlreich: Makrophagen, Fibroblasten, Myozyten, Hepatozyten, Nervenzellen, Gefäßendothelzellen und Nierengangendothelzellen (BJERKAS und PRESTHUS, 1989; DUBEY, 1993; DUBEY et al., 1988a; SPEER und DUBEY, 1989).

Tachyzoiten dringen aktiv in die Wirtszellen ein und sind innerhalb von fünf Minuten nach dem ersten Kontakt intrazellulär (HEMPHILL et al., 1996). Sie liegen im Zytoplasma und bilden eine Parasitenvakuole aus, von der es mehr als eine pro Zelle geben kann. Sie proliferieren innerhalb der Vakuole durch Endodyogenie und produzieren mehrere 100 neue Parasiten einige Tage post infectionem. Proliferierende Tachyzoiten formen eine Pseudozyste, die keine Zystenwand besitzt. Durch das Auflösen der Wirtszelle können benachbarte Zellen infiziert werden (DUBEY und LINDSAY, 1996).

Die Resistenz von Bradyzoiten und Gewebszysten gegenüber Salzsäure unterstützte schon früh die Annahme, daß ein Teil des Lebenszyklus von *N. caninum* im Magen-Darm-Trakt von Caniden ablaufen könnte. LINDSAY und DUBEY (1990a,b) setzten Gehirnmaterial von infizierten Mäusen einer Pepsin-Salzsäure-Lösung (pH 0,8) aus. Die



Proben wurden nach zehn Minuten durch Zentrifugation wieder von der Lösung befreit und subkutan in Swiss White Mäuse injiziert. 28 Tage nach der Inokulierung konnte in allen zehn infizierten Mäusen ein Parasitenbefall nachgewiesen werden.

Nach Aufnahme durch den Endwirt Hund durchläuft *N. caninum* im Darmtrakt wiederum die Gamogonie.

Als Infektionsmöglichkeiten sind bisher bekannt die orale Aufnahme von Oozysten, Bradyzoiten und Tachyzoiten oder die diaplazentare Übertragung von Tachyzoiten (ANDERSON et al., 1997; COLE et al., 1995; DE MAREZ et al., 1999; McALLISTER et al., 1998a). Darauf wird in Punkt 5.5 näher eingegangen.

## **3.4 Struktur**

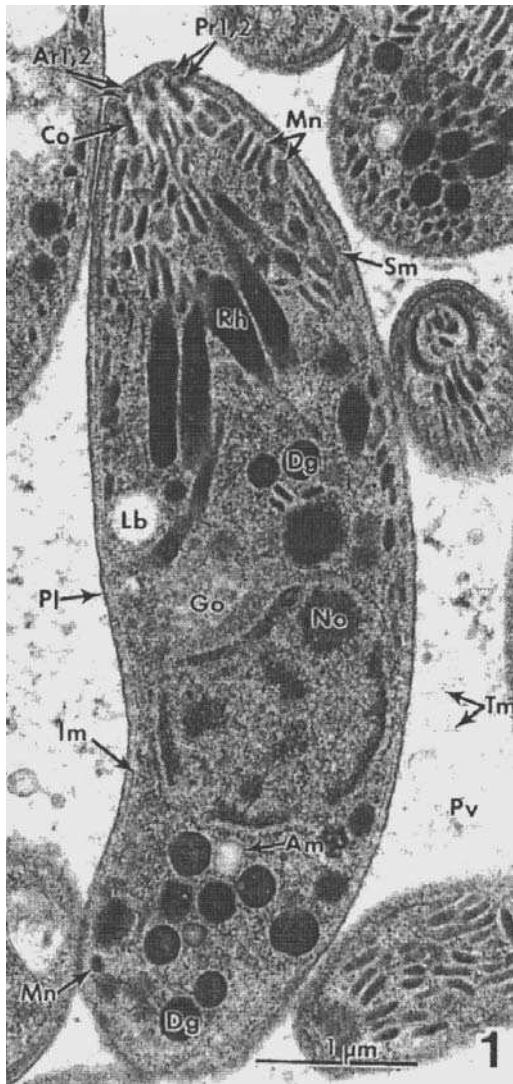
### **3.4.1 Tachyzoiten**

Tachyzoiten sind ovoid, bananenförmig oder globulär, 3-7 µm lang, 1-5 µm breit und besitzen ein definiertes Vorder- und Hinterende (siehe Abb. 2). Ihre Größe variiert in Abhängigkeit vom Teilungsstadium (DUBEY und LINDSAY, 1996). Sie besitzen eine dreilagige Plasmamembran und einen apikalen Komplex. In diesem bilden 22 Mikrotubuli mit assoziierten Proteinen eine zytoskelettale Struktur. Der apikale Komplex ist für die Erkennung und das Eindringen in die Wirtszelle von Bedeutung (HEMPHILL et al., 1998). Außerdem enthält er zwei apikale Ringe, ein Konoid und ein oder zwei polare Ringe (DUBEY und LINDSAY, 1996; HEMPHILL, 1999; SPEER et al., 1999). Ultrastrukturell sind die aus Zellkulturen gewonnenen Tachyzoiten mit den in vivo gewachsenen identisch. Jedoch wurden nur in aus Zellkulturen gewonnenen Parasiten Mikroporen gefunden (LINDSAY et al., 1993; SPEER und DUBEY, 1989). Elektronenmikroskopisch sichtbare Parasitenvakuolen traten nur in in vitro infizierten Zellen in Erscheinung (DUBEY et al., 1988a; SPEER und DUBEY, 1989). Ob es sich hierbei um einen Artefakt handelt, ist noch unklar. Über das Auftreten von intravakuolären Tubuli gibt es unterschiedliche Angaben (BJERKAS und PRESTHUS, 1988; 1989; SPEER und DUBEY, 1989).

Wie alle zu den Apicomplexa gehörenden Parasiten besitzen auch Neosporen zahlreiche Organellen. Dazu gehören Mitochondrien, 40-150 Mikronemen, acht bis 18 Rhoptrien, von denen einige den Zellkern berühren, ein Golgi-Apparat, ein rauhes und glattes endoplasmatisches Retikulum, ein Plastid (Golgi adjunct), Zellkern mit Nukleolus,

Polysomen, Mikrosomen und Lipidkörper. Die Zahl der Mikronemen, welche kleine vesikuläre Strukturen darstellen, ist sehr unterschiedlich. Sie liegen hauptsächlich senkrecht an der inneren Membran (DUBEY und LINDSAY, 1996). Die Rhoptrien sind kegelförmige Organellen, die typisch für die Apicomplexa sind. Sie sind sekretorisch tätig, enthalten inhomogenes elektronendichtes Material und befinden sich an der Längsachse der Zelle. Bei den Vorgängen zur Invasion der Wirtszelle sind sie aktiv (BECKERS et al., 1997), indem sie ihren Inhalt während des Invasionsprozesses in die Wirtszelle sezernieren (DUBREMETZ et al., 1993). Rhoptry-Proteine werden in die Parasitenvakuolenmembran eingebaut, die nach dem Eindringen in die Wirtszelle gebildet wird und die Parasiten einschließt (BECKERS et al., 1994). Die unterschiedlichen Zahlenangaben aus verschiedenen Untersuchungen rühren wahrscheinlich daher, daß es Schwierigkeiten bereitet, Rhoptrien von den dichten Granula zu unterscheiden (BJERKAS et al., 1984; DUBEY, 1993). Als dichte Granula stellen sich runde Organellen dar, die am vorderen und hinteren Ende des Parasiten liegen und Moleküle enthalten, die nach der Zellinvasion produziert werden (HEMPHILL, 1999; HEMPHILL et al., 1998). Ihre Dicke wird mit dem doppelten bis vierfachen Durchmesser der Mikronemen angegeben. Die Granula entsprechen den sekretorischen Vesikeln der Säugerzellen und werden wahrscheinlich durch Abschnürung vom Golgi-Apparat gebildet (CESBRON-DELAUW, 1994). Sezernierte Moleküle werden entweder auf die Parasitenoberfläche transportiert, um es dem Parasiten zu ermöglichen, in die Wirtszelle einzudringen, oder sie werden während oder nach der Wirtszellpenetration in die Parasitenvakuole gebracht (CESBRON-DELAUW, 1994; DUBREMETZ und McKERROW, 1995; GALINSKI und BARNWELL, 1996; KASPER und MINNEO, 1994). Diese Moleküle spielen eine noch unklare Rolle bei der Proliferation des Parasiten in der Wirtszelle (HEMPHILL et al., 1998). Auch die Mikronemen gehören zu den sekretorischen Organellen und sind denen der exokrinen Säugerzellen analog (BECKERS et al., 1997).

Innerhalb der Wirtszelle befinden sich die Tachyzoiten in einer Vakuole, die durch eine Membran die parasitären Bestandteile von denen der Wirtszelle trennt. Diese Membran stammt von der Oberflächenmembran der Wirtszelle und wird vom Parasiten kurz nach der Zellinvasion verändert. Eine einzelne Wirtszelle kann von mehreren Parasiten befallen werden und so auch mehrere Vakuolen enthalten. Der interzelluläre Bereich in den Vakuolen wird von einem tubulären Netzwerk ausgefüllt, das zumindest teilweise von den Tachyzoiten produziert wird (HEMPHILL, 1996; HEMPHILL et al., 1998).



- Mn: Mikronemen
- PV: Parasitenvakuole
- Dg: dichte Granula
- Rh: Rhoptrien
- Am: Amylopektin
- Im: innere Membran
- No: Nukleolus
- Go: Golgi-Komplex
- Pl: Plasmalemma
- Co: Konoid
- Ar: apikaler Ring
- Lb: Lipidkörperchen
- Pr: polarer Ring
- Sm: subpellikuläre Mikrotubuli

**Abb. 2:** Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Tachyzoiten von *N. caninum* (nach SPEER et al., 1999)

### 3.4.2 Gewebszysten

Gewebszysten haben einen Durchmesser von ca. 100 µm, sind im Querschnitt oval und beinhalten 20-100 Bradyzoiten (siehe Abb. 3). Die Zystenwand ist bis zu 4 nm dick (DUBEY, 1993) und stellt eine physiologische und chemische Barriere dar (HEMPHILL, 1999). Sie besteht aus einer äußeren, elektronendichten Plasmamembran, und einer inneren, dickeren, körnigen Schicht, der verzweigte, tubuläre Strukturen anhaften (BJERKAS und DUBEY, 1991). Die tubulären Strukturen sind 30-85 µm dick und 300-950 µm lang (SPEER et al., 1999). Die Wanddicke steigt mit dem Alter der Infektion. Eine kleine, neue Zyste wird

folglich von einer dünneren Wand umgeben als eine ältere und größere. Es liegt keine Kompartimentierung durch Septen vor, aber die fein granuläre Matrix enthält Röhrenchen und Bläschen, die einen Durchmesser von 30-450 nm haben und mit mäßig elektronendichtem Material gefüllt sind. Man findet verschiedene in Teilung befindliche Parasiten-Stadien, die sich durch Endodyogenie vermehren (JARDINE, 1996).

Die Grundsubstanz der Zysten enthält gewundene und verzweigte Bläschen, kleine, unregelmäßig geformte elektronendichte Körper und gelappte lipidähnliche Einschlüsse (BJERKAS und DUBEY, 1991; JARDINE, 1996).

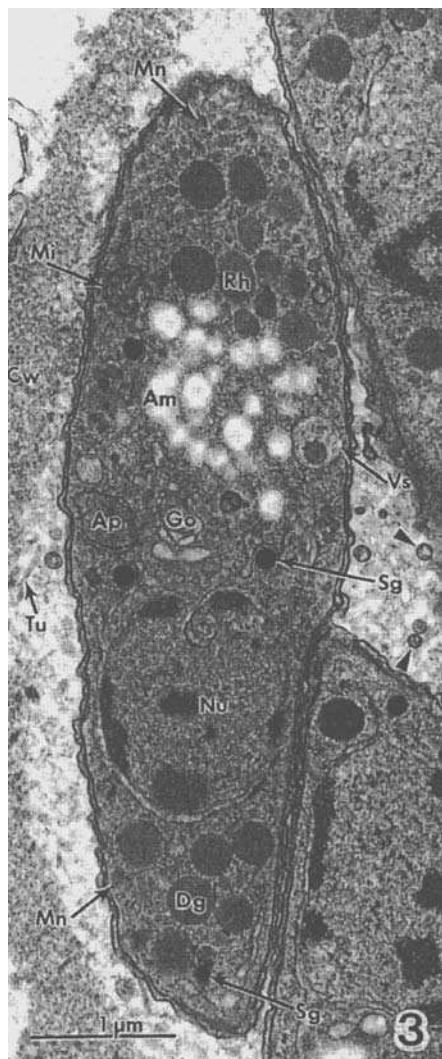


**Abb. 3:** Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Gewebszyste von *N. caninum* (nach JARDINE, 1996)

### 3.4.3 Bradyzoiten

Bradyzoiten sind ungefähr 6-8  $\mu\text{m}$  lang, 1-2  $\mu\text{m}$  breit und enthalten die gleichen Organellen wie die Tachyzoiten (siehe Abb. 4). Außerdem beherbergen sie bläschenartige, von Membranen umkleidete Organellen, die kurze, flache membranöse Segmente und kleinere Vesikel umschließen. Es sind weniger Rhoptrien als in Tachyzoiten vorhanden, diese sind aber gleichmäßiger in ihrer Elektronendichte. Außerdem fallen zahlreiche Periodic Acid Schiff (PAS)-positive Amylopektin-Körnchen auf (JARDINE, 1996).

Zwischen den Bradyzoiten gibt es vesikuläre Strukturen (BJERKAS und DUBEY, 1991; BJARKAS und PRESTHUS, 1989). Selten finden sich Mikroporen (BJARKAS und DUBEY, 1991; JARDINE, 1996; SPEER und DUBEY, 1989).



- Mn: Mikronemen
- Nu: Nukleus
- Dg: dichte Granula
- Sg: kleine dichte Granula
- Go: Golgi-Apparat
- Ap: Plastid
- Am: Amylopektin
- Rh: Rhoptrien
- Cw: Zystenwall
- Mi: Mitochondrien

**Abb. 4:** Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Bradyzoiten von *N. caninum* (nach SPEER et al., 1999)

### 3.4.4 Oozysten

Unsporulierte Oozysten sind sphäroid und durchschnittlich 11,7 x 11,3 µm groß. Sporulierte *N. caninum*-Oozysten sind morphologisch nicht von denen von *H. heydorni* in Hunde Kot und von *T. gondii* und *H. hammondi* in Katzen Kot zu unterscheiden. Ihre Wand ist glatt, farblos und 0,6-0,8 µm dick. Meistens ist nur eine Membran sichtbar, manchmal jedoch scheint es mehrere zu geben. Oozysten sporulieren außerhalb des Wirtes in einem Zeitraum von 24 Stunden (LINDSAY et al., 1999) bis zu drei Tagen (McALLISTER et al., 1998a) und sind erst dann infektiös. Die meisten Oozysten enthalten zwei Sporozysten, jedoch gibt es auch Oozysten, die eine bis acht Sporozysten enthalten (LINDSAY et al., 1999).

### 3.4.5 Sporozysten und Sporozoiten

Sporozysten sind ellipsoid und ca. 8,4 x 6,1 µm groß. Die Wand ist 0,5-0,6 µm dick, glatt und farblos. Ein sphärischer Restkörper enthält ein Gerüst aus kleinen, kompakten Körnchen von 4,3 x 3,9 µm Größe, oder wird von vielen verstreuten Körnchen von bis zu 1 µm Größe vertreten. Gelegentlich treten kleine lichtbrechende Körnchen in den Sporozysten auf (LINDSAY et al., 1999).

Sporozoiten sind länglich, ca. 6,5 x 2,0 µm groß und oft an einer Seite etwas abgeflacht. Der Nukleus liegt zentral oder leicht dezentral (LINDSAY et al., 1999).

## 3.5 Arten und Differenzierung der Neosporen

### 3.5.1 *Neospora caninum* und *Neospora hughesi*

Seit der Entdeckung der Neosporose stellt sich die Frage nach der Existenz inter- und intraspezifisch verschiedener Arten oder zumindest verschiedener Stämme.

Bei den aus Hund und Rind gewonnenen *Neospora*-Isolaten handelt es sich um die gleiche Art, nämlich *N. caninum* (BARBER et al., 1995; PAYNE und ELLIS, 1996; STENLUND et al., 1997; YAMANE et al., 1997). Es konnten keine antigenetischen Unterschiede festgestellt werden. Darüber hinaus wiesen die Isolate beider Herkunft dieselben

Internal transcribed spacer 1 (ITS-1)-Gensequenzen auf (HOLMDAHL et al., 1997). Unterschiede in diesen Sequenzen gelten als Unterscheidungsmerkmal zwischen den Arten (MARSH et al., 1998). Bei den Isolaten, die bei Pferden entdeckt wurden, konnten jedoch molekulare, immunologische und strukturelle Unterschiede zu *N. caninum* gefunden werden (MARSH et al., 1996; 1998). Diese neue Spezies wurde nach dem in der Reproduktionsmedizin tätigen John P. Hughes als *N. hughesi* bezeichnet.

In der ITS1-Region von *N. hughesi* besteht ein Unterschied von sieben Nukleotiden verglichen mit der von *N. caninum*. Die antigenetische Äquivalenz verschiedener *N. hughesi*-Isolate aus unterschiedlichen geographischen Regionen scheint mehr als zufällig zu sein, da sie vom gleichen Wirt, dem Pferd, stammen (CHEADLE et al., 1999b, c; MARSH et al., 1996). Die Möglichkeit einer gemeinsamen Infektionsquelle ist sehr unwahrscheinlich. In der kleinen Untereinheit der rRNA-Gensequenzen von caninen, bovinen und equinen Isolaten bestehen keine Unterschiede.

Gewebszysten von *N. hughesi* sind kleiner, besitzen eine dünnere Wand (bis zu 1,0 µm dick) und kleinere Bradyzoiten als *N. caninum* (MARSH et al., 1998). Bis jetzt ist aber noch nicht klar, ob Pferde nur von *N. hughesi* infiziert werden, oder ob auch *N. caninum* eine Rolle spielt. Dies ist fraglich, seit bei einem Pferd in Kalifornien und bei einem kongenital infizierten Fohlen in Wisconsin (LINDSAY et al., 1996d) Zysten mit dickeren Wänden als bisher bekannt entdeckt wurden (DAFT et al., 1996).

Die zunehmende Bedeutung des Parasiten wird anhand einer Studie an 296 Schlachtpferden in USA deutlich, in der der durchschnittliche *N. caninum*-Antikörpertiter bei 23% lag (DUBEY et al., 1999c). In Alabama lag der Titer nur bei 12% (CHEADLE et al., 1999c). In Frankreich wurde der Titer mit 23% angegeben (PITEL et al., 2001). In Südkorea lag der Titer in einer Studie an klinisch gesunden Pferden nur bei 2% (GUPTA et al., 2002). In Brasilien und Argentinien konnten bei Pferden keine Antikörper gegen *N. caninum* gefunden werden (DUBEY et al., 1999b, c, d). Es erfolgte nur in Südkorea eine Messung des *N. hughesi*-Antikörpertiters, der negativ war. So kann die Frage, ob es sich möglicherweise um eine Kreuzreaktion handelt, oder um eine tatsächliche Infektion mit *N. caninum*, nicht endgültig geklärt werden (GUPTA et al., 2002).

Bei acht klinisch relevanten Fällen konnte *N. hughesi* als Erreger nachgewiesen werden. Symptomatisch traten Aborte und neurologische Ausfälle auf (DUBEY und PORTERFIELD, 1990; GRAY et al., 1996; MARSH et al., 1998). Allerdings muß bedacht werden, daß eine routinemäßige Erfassung des Parasiten zur Zeit noch nicht möglich ist.

MARSH und Mitarbeiter charakterisierten zwei Tachyzoiten-Antigene von *N. hughesi*, die molekulare und antigenetische Unterschiede gegenüber den homologen Antigenen von *N. caninum* aufweisen. Die bisher bekannten *N. hughesi*-Isolate (siehe Tab. 4) sind sich sehr ähnlich, aber unterscheiden sich von den Isolaten, die aus Hunden oder Rindern stammen. Es besteht ein Sequenzunterschied im Oberflächenantigen SAG 1 (surface antigen) und in den Oberflächenantigen verwandten Sequenzen SRS (surface antigen related sequence). Beim Vergleich von NhSAG1 (*N. hughesi* surface antigen 1) mit NcSAG1 (*N. caninum* surface antigen 1) ergibt sich ein Unterschied in der Aminosäuresequenz von 6% und beim Vergleich von NhSRS1 und NcSRS1 von 9%. Dies kann als molekularer Marker zur Unterscheidung der Arten betrachtet werden (MARSH et al., 1999).

Polyklonale monospezifische Antikörper gegen NcSAG1 scheinen bei *N. caninum* und *N. hughesi* gleichermaßen zu reagieren. Die schwach abweichenden homologen Gene in der *Neospora* Spezies teilen sich also ein Epitop des NcSAG1-Antigens, das von polyklonalen monospezifischen Antikörpern erkannt wird, nicht aber vom monoklonalen Antikörper. Diese antigenetische Unterscheidung ist auf den Polymorphismus in diesem Gen zurückzuführen und kann zur Differenzierung zwischen *N. hughesi* und *N. caninum* dienen (HOWE et al., 1998).

Die NhSRS2-Antigen-Wanderung ist im SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) langsamer als die des NcSRS2-Antigens. Der Grund hierfür ist nicht klar, da das Hauptprotein in *N. hughesi* und *N. caninum* das gleiche ist. Diese Tatsache läßt vermuten, daß es sich bei der unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit um Anpassung oder um post-translationale Modifikationsunterschiede zwischen den beiden Proteinen handelt (MARSH et al., 1999).

Proteine der dichten Granula NhGRA6 und NhGRA7 werden zur Unterscheidung herangezogen werden. NhGRA6 ist am 3'-Ende 96 Nukleotide länger als NcGRA6 und NhGRA7 unterscheidet sich auf der Nukleinsäureebene zu 14,8% von NcGRA7 (WALSH et al., 2001).

Weitere vergleichende Studien von anderen homologen Proteinen in anderen Parasitenstadien, wie Sporozoiten oder Bradyzoiten, sollen zusätzlich Informationen über die Struktur und Funktion dieser Proteine in *Neospora spp.* geben. Ob antigenetische Unterschiede in diesen Parasiten eine Rolle in der Wirtsspezifität spielen oder nur das evolutionäre Auseinanderlaufen widerspiegeln, muß noch untersucht werden (MARSH et al., 1999).



Bisher sind bei *N. hughesi* nur die asexuellen Stadien des Lebenszyklus Gewebszysten, Bradyzoiten und Tachyzoiten beschrieben.

Die **Gewebszysten** sind ca. 7,0-16,0 x 10,5-19,5 µm groß. Ihre Wanddicke kann zwischen 0,15 µm und 1,0 µm variieren (durchschnittlich 0,43 µm). Die Wand besteht aus einer äußeren Membran mit einer unterschiedlich breiten, inneren körnigen Schicht. Sie ist überwiegend aus kleinen Vesikeln zusammengesetzt, mit wenigen, schmalen, tubulären Konturen und wenigen dichten Granula. Sie besitzt also die gleichen Merkmale wie die Wand der Gewebszyste von *N. caninum*, ist aber dünner. Die Grundsubstanz ist transparent und enthält einige große und kleine tubulo-vesikuläre Strukturen (MARSH et al., 1998).

Die **Bradyzoiten** sind 1,7-2,8 x 4,4-5,8 µm groß, von einer Zystenwand umgeben und besitzen ein im vorderen Bereich liegendes Konoid, einen polaren Ring, 22 subpellikuläre Mikrotubuli, viele Mikronemen und zahlreiche anterior gelegene Rhoptrien, gefüllt mit einem uniformen elektronendichten körnigen Material. Die meisten elektronendichten Granula liegen dicht gedrängt um den Nukleus. Gelegentlich gibt es ein großes doppelt umhülltes Vesikel an einem Ende, das teilweise oder ganz mit der inneren Pellikula verschmolzen ist. Weiterhin besitzen die Bradyzoiten einen im hinteren Bereich liegenden Nukleus, ein bis zwei lange tubuläre Mitochondrien, einen Golgi-Komplex, ein rauhes und glattes endoplasmatisches Retikulum, freie Ribosomen, zusätzliche membrangebundene Vesikel und unscharf begrenzte transparente Bezirke, die als Amylopektin-Körnchen (MARSH et al., 1998) interpretiert wurden. Eine einzelne Mikropore sowie plastidähnliche Strukturen wurden am hinteren Ende des Nukleus gefunden (KÖHLER et al., 1997).

Die **Tachyzoiten** befinden sich in einer Parasitenvakuole innerhalb des Wirtszellzytoplasmas oder in einigen Fällen direkt im Zytoplasma. In Kultur sind die Tachyzoiten ca. 1,8-3,0 µm breit und 4,0-7,0 µm lang, besitzen einen sichtbaren Nukleus und teilen sich durch Endodyogenie. Sie liegen einzeln, in größeren Gruppen oder eingeschlossen in einer Vakuole im Gewebe. In einem einzelnen Tachyzoiten wurden 13 bis 27 Rhoptrien gezählt, die wie Mikronemen angeordnet, aber parallel zur Membran liegen. Die hohe Anzahl kann zur Unterscheidung von *N. caninum* herangezogen werden, da bei letzteren nur 8 bis 18 Rhoptrien gezählt wurden (DUBEY und LINDSAY, 1996).

*N. hughesi* besitzt ultrastrukturelle Merkmale, die die Zugehörigkeit zu den Apicomplexa bestätigen. Hierzu gehören der Polarring, das Konoid, die Rhoptrien und Mikronemen, die an einem Zellpol liegen und als Apikalkomplex bezeichnet werden (BARR et al., 1991b; BJERKAS und PRESTHUS, 1988; LEVINE, 1985; SPEER und DUBEY, 1989).

Allerdings gibt es bezüglich der Unterscheidung der beiden *Neospora*-Arten noch Forschungsbedarf. Es ist bisher noch nicht gelungen Oozysten aus dem Kot von Hunden zu isolieren, die mit *N. hughesi* infizierten Mäusen gefüttert wurden. Außerdem ist alleine durch serologische Tests wie ELISA, IFAT und direkten Agglutinationstest keine Unterscheidung zwischen den Arten möglich (WALSH et al., 2000). Es muß also geklärt werden, ob auch bei *N. hughesi* der Hund den Endwirt darstellt und ob die Infektion vertikal weiter gegeben werden kann (LINDSAY, 2001).

### 3.5.2 *Neospora*-Isolate

Frühere Studien zur Differenzierung zwischen caninen (siehe Tab. 3) und bovinen Isolaten (siehe Tab. 2) von *N. caninum* ergaben keine ausgeprägten Unterschiede (BARBER et al., 1995; MARSH et al., 1995; PAYNE und ELLIS; 1996; STENLUND et al., 1997; YAMANE et al., 1997).

Es scheint aber ein großer Pathogenitätsunterschied verschiedener Isolate innerhalb einer Wirtsspezies vorzuliegen. Bei einem Vergleich von den Isolaten, NC-Liverpool und NC-SweB1, konnten Unterschiede bezüglich Schwere und Charakter der Entzündungsreaktion im Gehirn von infizierten Balb/c Mäusen festgestellt werden. NC-Liverpool führte zu nekrotisierender bis granulomatöser Enzephalitis, während NC-SweB1 eine nonsuppurative und nekrotisierende Enzephalitis verursachte (ATKINSON et al., 1999). Das Körpergewicht der Mäuse, die mit Nc-SweB1 infiziert wurden, änderte sich nur wenig oder war gleichbleibend, wohingegen bei den mit NC-Liverpool infizierten Tieren ein schneller Gewichtsverlust eintrat und die Mäuse starben oder aus Tierschutzgründen durchschnittlich 27 Tage nach der Infektion euthanasiert wurden. Die Tötung erfolgte bei einem Körpergewichtsverlust von 20-25% (ATKINSON et al., 1999). Frühere Studien ergaben ebenfalls Pathogenitätsunterschiede bei zwei weiteren caninen Isolaten, NC-1 und NC-3 (LINDSAY et al., 1991; 1995a). Im Mausmodell (Balb/c Mäuse) konnten durch NC-3 keine klinischen Anzeichen von Neosporose oder Gehirnläsionen induziert werden. Im Gegensatz dazu zeigten die mit NC-1 infizierten Tiere ausgeprägte Veränderungen im Gehirn.

Das Verhalten von NC-SweB1 scheint im Versuchstier pathogenetisch dem von NC-3 zu ähneln, wohingegen das von NC-Liverpool dem von NC-1 ähnelt (ATKINSON et al., 1999). NC-Liverpool induzierte in Mäusen eine frühere IgG-Antwort als NC-SweB1. Außerdem bemerkte man in nicht reduzierenden Gelen kleine antigenetische Unterschiede

zwischen den beiden Isolaten. Ein Antigen von 50 kDa Größe scheint in NC-Liverpool signifikant immunogener zu sein als in NC-SweB1 (BARBER et al., 1995). Die Isolate NC-Liverpool und NC-SweB1 erscheinen mittels RAPD (random amplified polymorphic c-DNA)-PCR genetisch sehr unterschiedlich. Ob der genetische Unterschied für die unterschiedliche Pathogenität verantwortlich ist, konnte noch nicht geklärt werden.

Mittels RAPD-PCR wurde herausgefunden, daß *N. caninum* den virulenten Linien von *T. gondii* ähnelt (ATKINSON et al., 1999). Diese Beobachtung rechtfertigt umfassende phylogenetische Analysen der 18 S rDNA, die zeigen, daß beide Protozoen sehr eng verwandt sind (ELLIS et al., 1994; MORRISON und ELLIS, 1997).

Über genetische Übereinstimmungen innerhalb der weiteren bekannten bovinen und caninen Isolate liegen noch keine Berichte vor.

Die Differenzierung zwischen den Arten *N. caninum* und *N. hughesi* wird mit polyklonalen Antikörpern durchgeführt, die durch Infektion von Kaninchen mit BPA1, einem in den USA charakterisierten Isolat, erzeugt und gewonnen werden. Sie reagieren mit einigen Antigenen, die in allen Parasiten-Lysaten vorkommen. Nur die Reaktionsintensität unterscheidet sich zwischen *N. hughesi*- und *N. caninum*-Lysaten. Einige Antigene haben eine schwache Reaktion in den *N. hughesi*- und eine stärkere Reaktion in den *N. caninum*-Lysaten.

Außerdem gibt es Antigene von 63, 29, 16 und ca. 70 kDa, die in den *N. hughesi*-Präparaten vorhanden sind, nicht aber in *N. caninum*-Lysaten beschrieben wurden. Im Gegensatz dazu haben die *N. caninum*-Lysate (PPA1 und CN1) mehrere Antigene, ca. 18, 27, 33 und 45 kDa groß, die mit entsprechendem Antiserum reagieren und nicht in den *N. hughesi*-Lysaten vorkommen (MARSH et al., 1998).

Die DNA-Sequenzen der ITS 1 (Internal transcribed spacer-1)-Regionen von *N. hughesi* sind zu 98% identisch mit den Sequenzen von *N. caninum*. Beim Vergleich der ITS-1 Regionen fand man gleichbleibende Sequenzunterschiede zwischen *N. hughesi* verglichen mit vier *N. caninum*-Isolaten (CN1, NC-1, NC-Liv und BPA1) an den Nukleotid-Positionen 44, 64, 73, 96, 247, 343 und 397 (MARSH et al., 1998).

**Tab. 2:** *Neospora*-Isolate aus Rindern:

<b>Isolat</b>	<b>Herkunftsland</b>	<b>Autor</b>
BPA-1	USA	CONRAD et al., 1993a
BPA-2	USA	CONRAD et al., 1993a
BPA-3	USA	BARR et al., 1993
BPA-4	USA	BARR et al., 1993; MARSH et al., 1995
BT-3	Japan	SAWADA et al., 2000
JPA-1	Japan	YAMANE et al., 1997
KBA-1	Korea	KIM et al., 2000
KBA-2	Korea	KIM et al., 2000
NC-Beef	USA	McALLISTER et al., 2000
NC-Illinois	USA	GONDIM et al., 2002
NC-LivB1	Großbritannien	DAVISON et al., 1999b
NC-LivB2	Großbritannien	TREES und WILLIAMS, 2000
NC-Nowra	Australien	MILLER et al., 2002
NC-PGI	Italien	FIORETTI et al., 2000
NC-Porto1	Portugal	CANADA et al., 2002
NC-PVI	Italien	MAGNINO et al., 1999
NC-SweB1	Schweden	STENLUND et al., 1997

**Tab. 3:** *Neospora*-Isolate aus Hunden:

<b>Isolat</b>	<b>Herkunftsland</b>	<b>Autor</b>
NC-1	USA	DUBEY et al., 1988b
NC-2	USA	HAY et al., 1990
NC-3	USA	CUDDON et al., 1992
NC-4	USA	DUBEY et al., 1998b
NC-5	USA	DUBEY et al., 1998b
NC-6-Argentina	Argentinien	BASSO et al., 2001
NC-Bahia	Brasilien	GONDIM et al., 2001
NC-GER	Deutschland	PETERS et al., 2000
NC-Liv	Großbritannien	BARBER et al., 1995

**Tab. 4:** *Neospora*-Isolate aus Pferden:

<b>Isolat</b>	<b>Herkunftsland</b>	<b>Autor</b>
CN-1	USA	DAFT et al., 1996
NE-1	USA	MARSH et al., 1996
Nh-A1	USA	CHEADLE et al., 1999c

### **3.6 Wirtsspektrum**

**Natürliche** Infektionen mit *N. caninum* wurden bisher bei Büffeln, Dingos, Füchsen, Hirschen, Gemsen, Rehwild, Hunden, Kojoten, Pferden, Rindern, Schafen und Ziegen nachgewiesen (siehe Tab. 5-7). Zur Diagnosestellung dienten Pathologie, Histopathologie, Immunhistochemie, Mikroskopie, In-vitro-Kultivierung, PCR, ELISA, IFAT und Tierversuche.

Die natürliche Infektion erfolgt auf drei Wegen: diaplazentar, oral durch Aufnahme von ausgeschiedenen Oozysten, oder durch Aufnahme von Gewebszysten, die sich in Geweben infizierter Wirte befinden. Die diaplazentare Übertragung auf die Jungtiere kann sich im gleichen Tier mehrmals wiederholen (BARR et al., 1993). Es gibt auch pränatal infizierte Jungtiere, die klinisch unauffällig geboren werden und den Parasiten in verschiedenen Körpergeweben beherbergen (HEMPHILL, 1999).

**Tab. 5 - 7:** Übersicht über **natürlich infizierte** Wirte  
(Zoologische Einteilung nach AHNE, 2000)

**Tab. 5:** Arten in der Ordnung der Paarhufer (Artiodactyla)

**O. Paarhufer (Artiodactyla)**

<b>U.O. Wiederkäuer (Ruminantia)</b>		
<b>Fa. Hornträger</b>		<b>Autor</b>
<b>U.Fa. Rinderartige (Bovidae)</b>		
Büffel	<i>Bubalus arnee bubalis</i>	HUONG et al., 1998
Rind	<i>Bos taurus</i>	DUBEY und LINDSAY, 1996
<b>U.Fa. Ziegenartige (Capridae)</b>		
Schaf	<i>Ovis ammon aries</i>	DUBEY et al., 1990b HELMICK et al., 2002
Ziege	<i>Capra hircus</i>	DUBEY et al., 1992a
Gemsen	<i>Rupicapra rupicapra</i>	FERROGLIO und ROSSI, 2001
<b>Fa. Hirsche (Cervidae)</b>		
Maultierhirsch	<i>Odocoileus hemionus columbianus</i>	WOODS et al., 1994
Siam-Leierhirsch	<i>Cervus eldi siamensis</i>	DUBEY et al., 1996b
Weißwedelhirsch	<i>Odocoileus virginianus</i>	DUBEY et al., 1999a LINDSAY et al., 2002
Rothirsch	<i>Cervus elaphus</i>	FERROGLIO und ROSSI, 2001
Rehwild	<i>Capreolus capreolus</i>	FERROGLIO und ROSSI, 2001
<b>U.O. Schweineartige (Suiformes)</b>		
<b>Fa. Altweltliche Schweine (Suidae)</b>		
Hausschwein	<i>Sus scrofa domesticus</i>	HELMICK et al., 2002

**Tab. 6:** Arten in der Ordnung der Unpaarhufer (Perissodactyla)

**O. Unpaarhufer (Perissodactyla)**

<b>U.O. Pferdeverwandte (Hippomorpha)</b>		
<b>Fa. Equidae</b>		<b>Autor</b>
Pferd	<i>Equus przewalskii f. caballus</i>	DUBEY und PORTERFIELD, 1990
<b>U.O. Tapire und Nashörner (Ceratomorpha)</b>		
Breitmaulnashorn	<i>Ceratotherium simum</i>	WILLIAMS et al., 2002

**Tab. 7:** Arten in der Ordnung der Raubtiere (Carnivora)

**O. Raubtiere (Carnivora)**

<b>U.O. Landraubtiere (Fissipedia)</b>		<b>Autor</b>
<b>Fa. Hundeartige (Caniden)</b>		
Dingo	<i>Canis familiaris dingo</i>	BARBER et al., 1997
Hund	<i>Canis familiaris</i>	DUBEY und LINDSAY, 1989b
Kojote	<i>Canis latrans</i>	LINDSAY et al., 1996c
Rotfuchs	<i>Vulpes vulpes</i>	BUXTON et al., 1997a

**Experimentelle** Infektionsversuche wurden bei einer Reihe weiterer Tierarten unternommen (siehe Tab. 8-12). Durch diese Versuche sollten mehr Informationen über Lebenszyklus, Pathogenese, mögliche Endwirte und Verbreitung des Parasiten gewonnen werden (HEMPHILL, 1999).

Die Inokulierung des Parasiten erfolgte in den Versuchen oral, subkutan, intramuskulär, intraperitoneal (DUBEY und LINDSAY, 1993), intravenös (DUBEY und LINDSAY, 1996) oder auch intrauterin (BARR et al., 1994a). Durch die Infektion von verschiedenen Mauslinien konnte eine Art Produktion und Vorratshaltung des Parasiten in Gewebssystemen entwickelt werden, auf die jederzeit zurückgegriffen werden kann (LINDSAY und DUBEY, 1989c). Infektionsversuche bei fleischfressenden Vögeln sollten Aufschluß darüber geben, ob auch federtragende Wirbeltiere zu den Wirten zählen und so zur Verbreitung von *N. caninum* beitragen (McGUIRE et al., 1999).

Genauere Ausführungen über die Übertragungsmöglichkeiten, experimentellen Infektionsversuche und diagnostischen Möglichkeiten finden sich in Punkt 5.5, 6 und 8.

**Tab. 8 - 12:** Übersicht über **Infektionsversuche** bei verschiedenen Tierarten  
(Zoologische Einteilung nach AHNE, 2000)

**Tab. 8:** Arten in der Ordnung der Paarhufer (Artiodactyla)

**O. Paarhufer (Artiodactyla)**

<b>U.O. Wiederkäuer (Ruminantia)</b>		
<b>Fa. Hornträger</b>		<b>Autor</b>
<b>U.Fa. Rinderartige (Bovidae)</b>		
Rind	<i>Bos taurus</i>	DUBEY et al., 1996a BARR et al., 1994b
<b>U.Fa. Ziegenartige (Capridae)</b>		
Schaf	<i>Ovis ammon aries</i>	McALLISTER et al., 1996b; BUXTON et al., 1997b
Ziege	<i>Capra hircus</i>	LINDSAY et al., 1995b

**Tab. 9:** Arten in der Ordnung der Raubtiere (Carnivora)

**O. Raubtiere (Carnivora)**

<b>U.O. Landraubtiere (Fissipedia)</b>		
<b>Fa. Hundartige (Canidae)</b>		<b>Autor</b>
Hund	<i>Canis familiaris</i>	DUBEY et al., 1988b DUBEY und LINDSAY, 1989b
Polarfuchs	<i>Alopex lagopus</i>	BJERKAS et al., 1984
Kojote	<i>Canis latrans</i>	LINDSAY et al., 1996c
<b>Fa. Katzenartige (Felidae)</b>		
Katze	<i>Felis domesticus</i>	DUBEY und LINDSAY, 1989a DUBEY et al., 1990d
<b>Fa. Marderartige (Mustelidae)</b>		
Frettchen	<i>Mustela putorius</i>	McALLISTER et al., 1999
Hermelin	<i>Mustela erminea</i>	McALLISTER et al., 1999
Nerz	<i>Mustela frenata</i>	McALLISTER et al., 1999
<b>Fa. Kleinbären (Procyonidae)</b>		
Waschbär	<i>Procyon lotor</i>	DUBEY et al., 1993



**Tab. 10:** Arten in der Ordnung der Herrentiere (Primates)

**O. Herrentiere (Primates)**

<b>Fa. Meerkatzenartige (Cercopithecoidea)</b>		<b>Autor</b>
Rhesusaffe	<i>Macaca mulatta</i>	BARR, et al., 1994a HO et al., 1997b

**Tab. 11:** Arten in der Ordnung der Nagetiere (Rodentia)

**O. Nagetiere (Rodentia)**

<b>U.O. Mäuseverwandte (Hystricomorpha)</b>		<b>Autor</b>
<b>Fa. Mäuse (Muridae)</b>		
Maus	<i>Mus musculus domesticus</i>	COLE et al., 1995 LONG und BAZLER, 1997 McGUIRE et al., 1997 LINDSAY und DUBEY, 1990a
Ratte	<i>Rattus norvegicus</i>	LINDSAY und DUBEY, 1990c
<b>Fa. Wühler (Cricetidae)</b>		
Gerbil	<i>Meriones unguiculatus</i>	GONDIM et al., 1999c
<b>U.O. Hasenartige (Lagomorpha)</b>		
<b>Fa. Hasenartige (Leporidae)</b>		
Kaninchen	<i>Oryctocagus cuniculus</i>	ANDERSON et al., 1991
<b>U.O. Meerschweinchenverwandte (Caviomorpha)</b>		
<b>Ü.Fa. Meerschweinchenartige (Cavioidea)</b>		
<b>Fa. Meerschweinchen (Caviidae)</b>		
Meerschweinchen	<i>Cavia aperea porcellus</i>	SCHARES et al., 2001a

**Tab. 12:** Arten in der Klasse der Vögel (Aves)

<b>Kl. Vögel (Aves)</b>	<b>Autor</b>
<b>O. Taubenvögel (Columbiformes)</b>	
Haustaube <i>Columbia livia</i>	McGUIRE et al., 1999
<b>O. Greifvögel (Falconiformes)</b>	
Rotschwanzbuzzard <i>Buteo jamaicensis</i>	BAKER et al., 1995
<b>O. Sperlingsvögel (Passeriformes)</b>	
Nordamerikanische Aaskräh <i>Corvus brachyrhynchus</i>	BAKER et al., 1995
<b>U.O. Singvögel (Oscines)</b>	
Zebrafink <i>Poephila guttata</i>	McGUIRE et al., 1999
<b>O. Eulen (Strigiformes)</b>	
Schleiereule <i>Tyto alba</i>	BAKER et al., 1995
Truthahngeier <i>Cathartes aura</i>	BAKER et al., 1995

### 3.7 Wirt-Parasit-Interaktionen

Die Erforschung der Wirt-Parasit-Interaktionen ermöglicht die Etablierung diagnostischer Verfahren, die Herstellung von Medikamenten und in Zukunft eventuell die Entwicklung von Impfstoffen.

Die Wirt-Parasit-Beziehungen hängen stets von der Immunlage des Wirtes ab. Das Immunsystem reagiert auf die Parasiten oder Parasitenkomponenten, die Antigene. Es entscheidet darüber, ob eine Infektion stattfindet, der Parasit eliminiert wird oder überlebt. Die auslösenden Faktoren für die nekrotischen Läsionen, die bei den mit *N. caninum*-infizierten Geweben auftreten, entstehen durch die immunpathologischen Prozesse des Wirtes. Die genauen Mechanismen sind derzeit noch nicht bekannt, so daß noch weitere Untersuchungen zur Immunbiologie der Neosporen auf der Ebene des Wirt-Organismus nötig sind (HEMPHILL, 1999).

Die Wirt-Parasit-Interaktionen finden auf zellulärer Ebene statt, d. h. daß der Parasit und die Zielzelle direkten physikalischen Kontakt haben. Die Kontaktierung gelingt wahrscheinlich über einen Rezeptor, der auf der Oberflächenmembran der Wirtszelle sitzt und an Parasitenliganden bindet. Dieser Prozeß wurde bereits in anderen Apicomplexa-Spezies,

wie beispielsweise *Toxoplasma* beschrieben, konnte aber bei *N. caninum* noch nicht nachgewiesen werden (HOLDER, 1994; KASPER und MINNEO, 1994).

Schließlich muß noch erwähnt werden, daß die im Folgenden beschriebenen Vorgänge nur in In-vitro-Modellen untersucht wurden.

### 3.7.1 Rolle der sekretorischen Organellen

Alle zu den Apicomplexa gehörenden Protozoen besitzen spezielle sekretorische Organellen, die bei der Zell-Invasion und der intrazellulären Entwicklung eine Rolle spielen. Dazu gehören das Konoid, die Mikronemen, die Rhoptrien und die dichten Granula (HEMPHILL, 1999).

Das **Konoid** liegt am apikalen Pol des Parasiten und stellt einen ringförmigen Komplex dar, in den die verschiedenen Organellen münden.

**Mikronemen** sind Organellen, die vor der Invasion Exozytose-Moleküle produzieren und freisetzen, die für die Erkennung und Verbindung der Wirtszelle mit der Parasitenoberfläche verantwortlich sind. Dieser Vorgang wurde in anderen Sporozoen, wie *Toxoplasma* und *Plasmodium*, nachgewiesen. Bei diesen konnten bereits verschiedene Mikronemen-Proteine charakterisiert werden (BANNISTER und DLUZEWSKI, 1990). Das erste Protein, NcMIC3, das bei *N. caninum* identifiziert wurde, kann zwei bis drei Stunden nach der Wirtszellinvasion nachgewiesen werden. Es wird in Richtung hinteres Tachyzoiten-Ende auf die Oberfläche sezerniert (NAGULESWARAN et al., 2001).

Die **Rhoptrien** sind große Organellen, die am Vorderende des Parasiten liegen. Sie besitzen schmale Röhren, durch die bei direktem Kontakt von Zelle zu Zelle eine Verbindung entsteht und ein Stoffaustausch ermöglicht wird. So können Proteine aus den Rhoptrien an die Zielzelle gelangen, die die Plasmamembran und das kortikale Aktin-Skelett verändern und die Invasion ermöglichen. Auch hier liegen genaue Daten über zehn Rhoptry-Proteine von *T. gondii* vor, jedoch bis vor kurzem keine über *N. caninum* (LERICHE und DUBREMETZ, 1991). Erst im Jahr 2001 konnte durch monoklonale Antikörper (Tg786) ein 42 kDa-Protein, eine Protease, in den Rhoptrien bei *N. caninum* ausgemacht werden. Die Protease besitzt dieselbe Größe und Lage im Rhoptry, verglichen mit *T. gondii*, und soll die Membran der Wirtszelle auflösen (AHN et al., 2001).

Die **dichten Granula** entsprechen den sekretorischen Vesikeln von Säugerzellen, und entstehen wahrscheinlich durch Abschnürung vom Golgi-Apparat. Bei *T. gondii* wurden

bisher sieben Proteine entdeckt, wohingegen bei *N. caninum* noch keines beschrieben wurde (HEMPHILL, 1999). In Proteinen von *T. gondii* gibt es hydrophobe Signalsequenzen, die für die sekretorische Tätigkeit der Granula verantwortlich gemacht werden (CESBRON-DELAUW, 1994). Es ist aber noch nicht klar, ob sie in den Invasionsprozeß selbst involviert sind, oder lediglich die Umschließung der Tachyzoiten in einer Vakuole veranlassen. Eine Immunogold-Elektronenmikroskopie zeigte, daß die Proteine der dichten Granula entweder in die Vakuole oder zur Vakuolmembran wandern (CESBRON-DELAUW, 1994). Bei *T. gondii* konnte durch Immunofluoreszenz, Immunoelektronenmikroskopie und quantitative Immunoessays in In-vitro-Versuchen festgestellt werden, daß jede Organelle mit ihren Sekreten zu bestimmten Zeitpunkten des Eindringens in die Wirtszelle aktiv ist. Außerdem scheint das Aktin-Skelett des Parasiten eine treibende Funktion bei der Invasion des Wirtszell-Zytoplasmas zu haben (HEMPHILL, 1999). Der Wirt muß sich mit diesen Proteinen auseinandersetzen, wenn infizierte Zellen aufgrund großen Parasitenbefalls rupturieren (FISCHER et al., 1998).

### 3.7.2 Adhäsion und Invasion

Die Interaktionen zwischen *N. caninum* und bovinen Aorta-Endothelzellen (BAE) wurden transmissionselektronenmikroskopisch untersucht. Adhäsion und Invasion fanden innerhalb von fünf Minuten nach der Inkubation der Wirtszellen mit den Tachyzoiten statt. Nach 45-60 Minuten erreichte die Invasion ein Plateau, obwohl noch zusätzliche Parasiten an der Endothelzell-Oberfläche saßen und noch nicht infizierte Wirtszellen vorhanden waren. Dies bedeutet, daß nicht jeder Parasit, der sich an die Zelloberfläche der Wirtszelle anheftet, auch automatisch die Wirtszell-Membran penetriert, bzw. daß die Tachyzoiten ihre Fähigkeit zur Infektion der Zielzelle nach einer bestimmten Zeit bei extrazellulärer Lage verlieren (HEMPHILL et al., 1996). Möglicherweise ist die Invasion und Infektion wie bei *T. gondii* vom Zellzyklus der Wirtszelle abhängig. Deswegen wird vermutet, daß bestimmte Oberflächenproteine der Wirtszelle als Parasitenrezeptoren dienen, aber nur zu bestimmten Zykluszeitpunkten produziert werden (GRIMWOOD et al., 1992; HEMPHILL, 1999).

*N. caninum*-Tachyzoiten nehmen Kontakt mit der Wirtszelle auf, ohne daß eine bevorzugte Stelle der Adhäsion festgestellt wurde. Allerdings konnte nachgewiesen werden, daß Kohlenhydrate dabei eine Rolle spielen (FUCHS et al., 1999). Die darauffolgende Invasion beginnt am apikalen Ende des Parasiten und läuft in mehreren Schritten ab. Zur

Penetration sucht der Parasit eine günstige Stelle an der Oberfläche, wobei sich die Parasitenmembran mit der Wirtszellmembran verbindet. Danach wird die Membran der Endothelzelle durchtrennt und der Parasit gelangt in die geöffnete Zelle. Die Membran, die den eintretenden Parasiten umgibt, bildet die Parasiten-Vakuol-Membran. Der Parasit bewegt sich innerhalb dieser Membran weiter in das Innere der Wirtszelle, in die Nähe des Nukleus, und wird bald von Mitochondrien der Wirtszelle umgeben. Danach beginnt der Parasit, Produkte in das Lumen der Parasitenvakuole zu sezernieren. Dadurch werden die Parasitenvakuolen und deren Membran vor Angriffen des Immunsystems des Wirtes geschützt (HEMPHILL et al., 1996). Besonders erwähnenswert ist die Tatsache, daß die Neosporen, wie alle Vertreter der Apicomplexa, aktiv in die Wirtszelle eindringen (HEMPHILL et al., 2000b).

Die Endodyogenie beginnt etwa sechs Stunden post infectionem und dauert ca. 72-80 Stunden. Dadurch entsteht eine Pseudozyste mit hunderten neuen Tachyzoiten, die durch Wirtszell-Lyse frei werden und Nachbarzellen infizieren (HEMPHILL, 1999).

*N. caninum*-Tachyzoiten verbinden sich auch mit paraformaldehyd- und glutaraldehydfixierten bovinen Aorta-Endothelzellen (BAE-Zellen), allerdings ist die Anbindung bei lebenden Zellen effektiver. Dies kann dadurch erklärt werden, daß die Plasmamembran lebender Zellen eine dynamische Struktur mit zusätzlichen Rezeptoren darstellt, an die die Parasiten nach der Inkubation binden. Die Penetrations-Mechanismen von lebenden und fixierten bovinen Aorta-Endothelzellen erscheinen bei der transmissionselektronenmikroskopischen Betrachtung unterschiedlich. Die Penetration der fixierten Zellen ist durch Zerreißen des Plasmalemmas gekennzeichnet. Danach erscheinen mehrere Vesikel um den zum Nukleus vordringenden Parasiten. Bei lebenden Zellen dagegen findet keine Zerreißen des Plasmalemmas statt, da ohne Fixierung die Membran dehnbar ist (HEMPHILL, 1999).

Die Behandlung der Tachyzoiten mit glykolytischen und mitochondrialen Inhibitoren, wie Desoxyglukose, Oligomycin und Antimycin, reduzierte sowohl die Adhäsion als auch die Invasion der BAE-Zellen, während eine gleiche Behandlung der BAE-Zellen keinen inhibitorischen Effekt auf die Penetrationsrate hatte. Dies beweist, daß die Invasion unabhängig von Energien und Stoffwechsel der Wirtszelle stattfinden kann (HEMPHILL, 1999). Eine Identifizierung von Rezeptormolekülen an der Wirtszell-Oberfläche gelang bisher nicht.

Das Entfernen der Kohlenhydrate von der Endothelzell-Oberfläche erhöhte die Effizienz der Adhäsion von *N. caninum*-Tachyzoiten. Auch enzymatische Behandlungen der BAE-Zell-Oberfläche mit Neuraminidase und Hyaluronidase förderten die Anheftung der Tachyzoiten. Dies läßt darauf schließen, daß die Beschaffenheit der Wirtszell-Membran eine große Rolle dabei spielt, ob bzw. wie stark eine Zelle befallen wird (HEMPHILL, 1999).

### 3.8 Antigene

Als Antigene werden körperfremde Makromoleküle bezeichnet, die die Bildung von Antikörpern hervorrufen können. Proteine, Polysaccharide und Nukleinsäuren sind im allgemeinen wirksame Antigene. Die Affinität von Antikörpern gilt nicht für das gesamte Molekül, sondern für spezielle Regionen, die man als antigene Determinanten oder Epitope bezeichnet (STRYER, 1988).

Die Oberflächenantigene von *N. caninum*-Tachyzoiten (siehe Tab. 13 und 14) spielen eine große Rolle bei der Wirtszellinvasion und der Induktion einer Immunantwort (HEMPHILL et al., 1999). Sie sind bei den Apicomplexa über Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker an die äußere Zellmembran gebunden. Auch in Extrakten von *N. caninum*-Tachyzoiten wurden GPI-Anker nachgewiesen. In den untersuchten Fraktionen wurde nach Molekülen gesucht, die gegenüber der GPI-spezifischen Phospholipase D sensitiv waren. Dies gilt als beweisend für das Vorhandensein von GPI-Ankern. Die fehlende Empfindlichkeit gegenüber der Phosphatidylinositol-spezifischen Phospholipase C deutet auf ein durch eine Fettsäure modifiziertes Inositol hin. Chemische Analysen ergaben, daß der *N. caninum*-GPI-Anker nur estergebundene Fettsäuren als hydrophobe Komponenten beinhaltet. Es wurden bisher sieben verschiedene *N. caninum*-GPI-Fraktionen identifiziert. Eine davon ließ eine Beschreibung der chemischen Struktur dieser Glykolipidfraktion zu. Es handelt sich hierbei um ein Ethanolaminphosphat-Mannose 3-Glucosamin-acyl-Phosphatidylinositol (CONRATHS und SCHARES, 2000; NISHIKAWA et al. 2002).

Wegen der globalen Präsenz der Neosporose wurde während der letzten zehn Jahre die Entwicklung von empfindlichen und spezifischen Methoden zum Nachweis der Parasiten in Gewebs- und Körperflüssigkeiten vorangetrieben. Diese diagnostischen Methoden basieren meist auf der Erkennung spezifischer Antikörper gegen die Oberflächenantigene von *N. caninum*, sowohl durch direkte als auch indirekte Verfahren. Neben der Lokalisation auf der Parasitenoberfläche befinden sich Antigene auch in den sekretorischen Zellorganellen, die

**Tab. 13:** Native Antigene von *Neospora caninum* (nach ATKINSON et al., 2000)

Antigen	Lokalisation	Referenzen
p37	dG; Pv	BARTA und DUBEY, 1992
p29/30	dG; Pv	BJERKAS et al., 1994
Ncp35	Zm	HOWE et al., 1998
Ncp29	Zm	HOWE et al., 1998
p16/17	Rhoptry	BJERKAS et al., 1994
p46	?	BARTA und DUBEY, 1992
Ncp43	Zm; dG; Rhoptry	HEMPHILL et al., 1997a
Ncp36	Zm; dG	HEMPHILL et al., 1997b
p33	dG	LALLY et al., 1997
p65	Zm	BASZLER et al., 1996

**Tab. 14:** Rekombinante Antigene von *Neospora caninum* (nach ATKINSON et al., 2000)

Antigen	Lokalisation	Referenzen
NCDG 1/N57 (NCGRA 7)	dG	LALLY et al., 1997
NCDG 2 (NCGRA 6)	dG	LIDDELL et al., 1998
N54	?	LOUIE et al., 1998
recNcp43	Zm; dG	HEMPHILL et al., 1997a
NcSAG 1	Zm	HOWE et al., 1998
NcSRS 2	Zm	HOWE et al., 1998
NcGRA 2	?	ELLIS et al., 2000
NcGRA 1	?	ELLIS et al., 1998

Abkürzungen: dG: dichte Granula  
Pv: Parasitenvakuole  
Zm: Zellmembran  
?: nicht bekannt

während und nach der Wirtszellinvasion eine Rolle spielen, so zum Beispiel in den Mikronemen, Rhoptrien und dichten Granula (HEMPHILL et al., 1999). Die erkannten Antigene werden durch Immunfluoreszenzuntersuchungen, Immunelektronenmikroskopie, Immunpräzipitation, Immunhistologie sowie im Westernblot charakterisiert. Die nachgewiesenen Antigene stammen meist von den Tachyzoiten (ATKINSON et al., 2000).

BARTA und DUBEY identifizierten mit Hilfe von Westernblots und polyklonalem Kaninchenserum Proteine von 16 bis 80 kDa (BARTA und DUBEY, 1992).

In einer Studie wurden vier Hauptproteine und einige untergeordnete *N. caninum*-Antigene charakterisiert. Die vier Hauptproteine, 17, 29/30, 37 und 46 kDa, befanden sich sowohl in natürlich als auch experimentell infizierten Tieren. Die untersuchten Seren stammten von einem natürlich infizierten Hund und einer Kuh, des weiteren von einer experimentell infizierten Kuh, einem Schaf, einer Ziege und einem Schwein. Das 17 kDa-Antigen scheint mit den Rhoptrien verbunden zu sein, während die 29 und 30 kDa-Antigene mit den dichten Granula, dem tubulären Netzwerk und der äußeren Membran der Parasiten-vakuole vergesellschaftet sind (BJERKAS et al., 1994). In Vergleichsstudien wurden diese immunodominanten Proteine nicht in *T. gondii*-Lysaten gefunden. *N. caninum* und *T. gondii* besitzen einige gemeinsame Antigene und zeigen somit Kreuzreaktionen, teilen sich aber nicht die vier dominanten Antigene. Die Unterscheidung von *T. gondii* und *N. caninum* anhand von Gen- und Proteinunterschieden ist sehr wichtig, da beide Parasiten eine ähnliche Morphologie besitzen und ähnliche pathologische Veränderungen und Krankheiten auslösen (HOWE und SIBLEY, 1999).

Eine andere Studie hatte die Gewinnung von spezifischen Antigenen, die ein Massen-Screening durch die ELISA-Technik ermöglichen zum Ziel. Dabei wurden zwei immuno-reaktive Rekombinanten entwickelt, indem bovine Seren von natürlich und experimentell infizierten Rindern entnommen und kloniert wurden. Klon A bestand aus einem Protein von etwa 35 kDa und Klon B aus einem Protein von ca. 30 kDa. Beide Proteine waren sowohl bei *N. caninum*-Antikörpern im Serum von Kühen, die aufgrund von Neosporose abortiert hatten, vorhanden, als auch bei experimentell infizierten. Vergleichsweise wurden zwei Kühe mit den nah verwandten Protozoen *Sarcocystis* und *T. gondii* infiziert. Die Seren wiesen die oben genannten Proteine jedoch nicht auf (LALLY et al., 1996b).

HEMPHILL und GOTTSTEIN (1996) identifizierten und extrahierten ein weiteres Protein (p43) aus *N. caninum*-Tachyzoiten, das bei der Wirtszelladhäsion und -invasion beteiligt zu sein scheint. Antikörper, die gegen dieses Protein produziert wurden, reagierten ausschließlich mit der Membran der *N. caninum*-Tachyzoiten und nicht mit *T. gondii*-



Tachyzoiten. Dies läßt darauf hoffen, daß auch dieses Protein zur Unterscheidung der beiden Infektionen in vivo herangezogen werden kann.

Vergleichsweise wenig ist über die Antigene der Gewebszysten bekannt. Immunhistochemische Studien zeigten gelegentlich Kreuzreaktionen zwischen Gewebszysten von *N. caninum* und *T. gondii* bei Anwendung von polyklonalem Serum (RÜHLMANN et al., 1995).

McALLISTER und Mitarbeiter (1996c) zeigten, daß ein Bradyzoiten-spezifisches rekombinantes Antigen (BAG5) von *T. gondii* Kreuzreaktionen mit *N. caninum*-Bradyzoiten, nicht aber mit Tachyzoiten aufwies.

Die wichtigsten immunodominanten Antigene besitzen ein Molekulargewicht von 16/17, 29/30, 37 und 46 kDa. Als schwierig erweist es sich bei niedrigen Antikörpertitern, alle Antigene zu entdecken. Die 37 kDa- und 29/30 kDa-Antigene (p37 und p29/30) werden am häufigsten nachgewiesenen. Sie dienen deshalb als Hauptziel der diagnostischen serologischen Tests. Diese Antigene wurden geklont (HEMPHILL et al., 1997a, b; HOWE et al., 1998). Ihre Gensequenzen weisen Homologien mit denen auf, die die SRS-2 (surface antigen 1-related sequence 2)- und SAG 1 (surface antigen 1)-Antigene von *T. gondii* codieren. Trotzdem werden aber nur wenige Kreuzreaktionen ausgelöst (SONDA et al., 1998). Es gibt bisher keine Hinweise auf die Verwendbarkeit dieser Antigene in serologischen Tests. Die Antigene NCDG 1/N 57, NCDG 2, N54 und p65 hingegen erwiesen sich bereits als geeignet für serologische Tests (BASZLER et al., 1996; LALLY et al., 1997; LOUIE et al., 1998;). NCDG 1, NCDG 2, N54 und NCGRA 2 sind geklonte Antigene, die durch Immunoscreening mit Serum von infizierten Rindern geschaffen wurden und in einer cDNA-Bibliothek zur Verfügung stehen. NCDG 1 und NCDG 2 scheinen untergeordnete Tachyzoiten- Antigene zu sein, die mit den dichten Granula verbunden sind (LALLY et al., 1997; LIDDELL et al., 1998). NCGRA 1 und -2 sind wahrscheinlich ebenfalls an den dichten Granula lokalisiert. Das kürzlich isolierte NCP20 konnte sowohl in chronisch infizierten Mäusen, als auch in Kühen nachgewiesen werden (ATKINSON et al., 2001).

In zwei Isolaten von *N. caninum* (NC-1 und Liverpool) wurde ein immunoreaktives Protein entdeckt, das als Nc-p33 bezeichnet wurde und nicht in *T. gondii*-Tachyzoiten vorkam. Es ist an den dichten Granula lokalisiert und dem NCDG 1 ähnlich. Kurz nach der Invasion gelangt dieses Protein zur Membran der Parasitenvakuole und ist nach der Infektion im Netzwerk der Parasitenvakuolen zu finden (HEMPHILL et al., 1998).

#### 4. IN-VITRO-KULTIVIERUNG

Die Kultivierung von *N. caninum* kann sowohl in Frischzellen als auch in etablierten Zelllinien erfolgen. Es werden bovine Monozyten (BM), bovine cardiopulmonale Endothelzellen, bovine Nierenzellen, humane Fibroblasten und fetale Mäusehirnzellen (DUBEY und LINDSAY, 1993) verwendet. Eine Kultivierung in Versuchstieren und Hühnerembryos ist ebenfalls möglich. Sie gelingt jedoch nicht in zellfreier Umgebung, selbst dann nicht, wenn Cytochrome, glykolytische, hydrolytische und respiratorische Systeme zur Verfügung stehen. Im wesentlichen entsprechen die Techniken zur Kultivierung und Kryopreservation denen bei *T. gondii* (DUBEY und BEATTIE, 1988).

Bei der Kryopreservation können sowohl Tachyzoiten als auch Bradyzoiten konserviert werden. Durch Zugabe von Dimethylsulfoxid (DMSO) während des Gefrierprozesses erhöht sich die Überlebensrate. Die Konzentration sollte bei mindestens 100.000 Parasitenstadien pro Milliliter im Inokulum liegen, da nicht alle Organismen den Gefrierprozeß überleben (DUBEY und BEATTIE, 1988).

Konservierung der Tachyzoiten:

- Suspension in Gewebeskulturmedium
- Zusatz von 10% DMSO
- Eintauchen in 95% igen Ethanol und Lagerung über mehrere Stunden bei  $-70^{\circ}\text{C}$
- Gefrieren in flüssigem Stickstoff
- Für Experimente Auftauen im Wasserbad bei  $37^{\circ}\text{C}$  (eine Minute)
- Abspülen der DMSO-Suspension und Zentrifugation (DUBEY und BEATTIE, 1988)

Die Wahl von foetalem Kälberserum als Zellnahrung für die In-vitro-Kultivierung kann Komplikationen hervorrufen, da manche der kommerziell verfügbaren Chargen Antikörper enthalten, die gegen *N. caninum* gerichtet sind. Bei deren Zugabe in das Medium kann es zu Agglutination und schnellem Tod der Parasiten kommen. Um bei der In-vitro-Kultivierung von *N. caninum*-Tachyzoiten Komplikationen zu vermeiden, kann anstelle von Kälberserum IgG-freies Pferdeserum verwendet werden, oder man gibt das foetale Kälberserum erst dazu, wenn der Parasit in die Zellen eingedrungen und vor der Agglutination geschützt ist (HEMPHILL, 1999).

Die Proliferationsrate variiert innerhalb der verschiedenen *Neospora*-Isolate und ist zudem von der Art der Wirtszellen abhängig. HEMPHILL und Mitarbeiter (1996) kultivierten Tachyzoiten des NC-1- Isolates in bovinen Aorta-Endothelzellen. Sie teilten sich durch Endodyogenie innerhalb sechs Stunden post infectionem. Die Wirtszellyse fand etwa 72 Stunden post infectionem statt. Befinden sich *N. caninum*-Tachyzoiten nur vier Stunden extrazellulär in einem Wachstumsmedium, kommt es zu einem schnellen Infektionsverlust. *T. gondii* hingegen ist in der Lage, außerhalb der Zelle bis zu 72 Stunden infektiös zu bleiben. *N. caninum*-Gewebssysteme überleben 14 Tage bei 4°C, sind jedoch nach einem Tag bei -20°C nicht mehr infektiös (LINDSAY et al., 1992). In einem dokumentierten Fall dagegen waren Neosporen in einem Kälbergehirn nach dem Gefrieren bei -52°C noch nach vier Monaten infektiös (BRYAN et al., 1994).

DUBEY und LINDSAY (1996) gelang es, mit über acht Jahre hindurch mehrfach passagierten Tachyzoiten, im Experiment Mäuse zu infizieren.

Nach dem Verfahren zur In-vitro-Formation von *Toxoplasma*-Gewebssystemen entstanden nun auch *N. caninum*-Gewebssysteme in humanen Fibroblasten (BOOTHROYD et al., 1998).

Das Gewebekultur-System wird auch genutzt, um weitere Einzelheiten über die Vorgänge während Adhäsion und Invasion der Wirtszelle zu erfahren (HEMPHILL et al., 1996). Auch genetische Manipulationen der Parasiten sind möglich (BECKERS et al., 1997; HOWE et al., 1997; HOWE und SIBLEY, 1997).

Nicht nur das Tachyzoitenstadium, sondern auch das Bradyzoitenstadium des Parasiten kann eine bestimmte Zeit in vitro kultiviert werden (WEISS et al., 1999). Jedoch müssen diese Gewebssysteme immer wieder sorgfältig untersucht werden, da eine große Anzahl während der Kultivierung absterben kann (HEMPHILL et al., 1999).

In In-vitro-Kulturen können die Empfindlichkeiten der *N. caninum*- Tachyzoiten gegen Chemotherapeutika und Antiprotozoika untersucht werden. Ionophore Antibiotika, Makrolide, Tetracycline und Lincosamide zeigten gute Wirksamkeit gegen Tachyzoiten. Pyrimethamine, Ormetoprim und Trimethoprim zeigten ebenso synergistische Effekte wie Diaveridin und Sulfonamiden (LINDSAY und DUBEY, 1989a; 1990b; LINDSAY et al., 1994; 1996a; 1997). Auf diese Versuche wird in Punkt 12.2 noch näher eingegangen.

Um Fortschritte in der Herstellung von Medikamenten zur Behandlung der Neosporose zu machen, generierten LINDSAY und Mitarbeiter (1996a) zwei Pyrimethamin-resistente Mutanten von *N. caninum*-Tachyzoiten. Eine Mutante wurde durch die Zugabe niedriger Dosen von Pyrimethamin erzeugt und PyrR-1 genannt. Die zweite entstand durch

chemisch induzierte Mutagenese mit N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidin und erhielt die Bezeichnung PyrR-2 Mutante. Beide Mutanten waren auch resistent gegen die Dihydrofolat-Reduktase (DHFR) und Dihydrofolat-Thymidylat-Synthase (DHFTS). Diese Enzyme sind bei der Umwandlung von Folsäure in die biologisch aktive Form Tetrahydrofolat von entscheidender Bedeutung. Tetrahydrofolat ist das Coenzym bei der Kohlenstoff-Übertragung und wichtig für den Aminosäure-Stoffwechsel. Beide Mutanten konnten durch Anwendung einer Kombination von DHFR/TS Inhibitoren und Sulfonamiden zerstört werden. Im Gegensatz dazu konnten nur wenige Wirkstoffgruppen bezüglich ihrer Effektivität gegen *N. caninum* in vivo beurteilt werden (DUBEY et al., 1995; LINDSAY und DUBEY, 1990b).

Durch In-vitro-Kultivierung konnte die Diagnostik zur Erkennung einer *Neospora*-Infektion, aber auch zur Unterscheidung einer Neosporose von einer Erkrankung mit einer nah verwandten Spezies, wie *Toxoplasma* (SUNDERMANN et al., 1997; SUNDERMANN und ESTRIDGE, 1999), *Hammondia* oder anderen *Sarcocystis*-Arten entwickelt werden (GOTTSTEIN et al., 1999).

## 5. EPIDEMIOLOGIE

### 5.1 Geographische Verbreitung

Seit der Identifizierung des Aborterregers 1989 in Kalifornien als *N. caninum* durch THILSTED und DUBEY und der seither eingetretenen stetigen Entwicklung von Nachweismethoden wurde mittlerweile weltweit von *N. caninum*-Vorkommen bei Rindern berichtet (siehe Tab. 15-21 und Abb. 5).

**Tab. 15:** Übersicht über die europäischen Staaten, in denen *N. caninum* bei Rindern festgestellt wurde:

Land	Autoren
Belgien	DE MEERSCHMANN et al., 2002
Dänemark	AGERHOLM et al., 1997; AGERHOLM und BARR, 1994
Deutschland	CONRATHS et al., 1996; CONRATHS und SCHARES, 1999; SCHARES et al., 1997; WEBER et al., 1997; 2000
England	DAVISON et al., 1997; 1999a,b,c,d; LATHE, 1994; OTTER et al., 1993
Frankreich	OULD-AMOROUCHE et al., 1999
Irland	COLLERY, 1995a,b; COLLERY et al., 1996
Italien	MAGNINO et al., 1999; POLI et al., 1998
Niederlande	MOEN et al., 1998; WOUDA et al., 1998a; 1999a
Nordirland	McNAMÉE et al., 1996; McNAMÉE und JEFFREY, 1994
Österreich	EDELHOFER, 2001
Polen	CABAJ et al., 2000
Portugal	THOMPSON et al., 2001
Schweden	BJÖRKMANN und UGGLA, 1999; HOLMDAHL et al., 1995
Schweiz	GOTTSTEIN et al., 1999; HEMPHILL et al., 2000b
Spanien	GONZALES et al., 2000; MAINAR-JAIME et al., 1999; QUINTANILLA-GOZALO et al., 1999
Ungarn	BACSADI et al., 2001; HORNOK et al., 1998
Wales	OTTER et al., 1995, 1997b

**Tab. 16-21:** Übersicht über die außereuropäischen Staaten, in denen *N. caninum* bei Rindern festgestellt wurde:

**Tab. 16:** Afrika

<b>Land</b>	<b>Autoren</b>
Südafrika	JARDINE und LAST, 1993
Zimbabwe	JARDINE und WEELS, 1995

**Tab. 17:** Asien

<b>Land</b>	<b>Autoren</b>
Israel	HARMELIN et al., 1995a,b; PERL et al., 1997
Japan	OGINO et al., 1992; YAMANE et al., 1996
Korea	KIM J.H. et al., 2000, 2002
Taiwan	OOI et al., 2000
Thailand	SUTEERAPARP et al., 1999
Vietnam	HUONG et al., 1998

**Tab. 18:** Australien

<b>Land</b>	<b>Autoren</b>
New South Wales	BOULTON et al., 1995; REICHEL 1998; 2000
Neuseeland	PATITUCCI et al., 1999; PFEIFFER et al., 2002 SCHARES et al., 1999;
Tasmanien	OBENDORF et al., 1995

**Tab. 19:** Kanada

<b>Land</b>	<b>Autoren</b>
British Columbia	McINTOSH und HAINES, 1994
Ontario	ALVES et al., 1996; DUIVENVOORDEN und LUSIS, 1995
Prince Edward Island	BILDFELL et al., 1994; ILLANES et al., 1994
Québec	BERGERON et al., 2000; DESILETS et al., 1998

**Tab. 20:** Vereinigte Staaten von Amerika

<b>Land</b>	<b>Autoren</b>
Illinois	SHIVAPRASAD et al., 1989
Kalifornien	ANDERSON et al., 1995; CONRAD et al., 1993a
Maryland	DYER et al., 2000
New Mexico	THILSTED und DUBEY, 1989
Oklahoma	HELMAN et al., 1998
Pennsylvania	HATTEL et al., 1998
South Dakota	NIETFELD et al., 1992; YAEGER et al., 1994
Texas	BARLING et al., 2001a
Virginia	HAY et al., 1990
Wisconsin	CUDDON et al., 1992; SANDERSON et al., 2000

**Tab. 21:** Mittel- und Südamerika

<b>Land</b>	<b>Autoren</b>
Argentinien	CAMPERO et al., 1998; MOORE et al., 2002 VENTURINI et al., 1999
Brasilien	CORBELLINI et al., 2002; GONDIM et al., 1999a,b
Costa Rica	PEREZ et al., 1998; ROMERO et al., 2002
Mexiko	ABBITT et al., 1993; MORALES et al., 2001





## 5.2 Seroprävalenz

Die durch Neosporose induzierten Aborte finden während des ganzen Jahres statt (ANDERSON et al., 1991; THURMOND et al., 1995). In Kalifornien wurde ein gehäuftes Auftreten in den Wintermonaten von November bis Februar festgestellt (ANDERSON et al., 1991; THURMOND et al., 1995). In den Niederlanden war die Abortrate von Juni bis September höher (MOEN et al., 1998). Man versucht diese Tatsache durch die Haltung und klimatischen Verhältnisse zu erklären. In den Niederlanden ist der Sommer mild und feucht und die Milchkühe von April bis Oktober tagsüber auf der Weide. In Kalifornien sind die Winter mild und feucht und der Sommer heiß und trocken. Das milde und feuchte Klima dieser Jahreszeiten scheint die Überlebenschancen der infektiösen Stadien in der Umwelt zu begünstigen (HEMPHILL et al., 2000a; THURMOND et al., 1995). Klimatische Faktoren scheinen auch für unterschiedliche Seroprävalenzen in den verschiedenen Ländern verantwortlich zu sein (MAGNINO et al., 1999).

Die meisten Neosporose-induzierten Aborte werden bei Milchrassen beschrieben (ANDERSON et al., 1991; 1995; BARR et al., 1991a; WOUDA et al., 1995). In einer Studie in Spanien war die Seroprävalenz in Milchbetrieben mit 35,9 % signifikant höher als die in Mastbetrieben mit 17,9 % (QUINTANILLA-GOZALO et al., 1999). Dafür scheinen die unterschiedlichen Produktions- und Haltungssystemen verantwortlich zu sein (HEMPHILL et al., 2000a). In Dänemark (JENSEN et al., 1999) und Frankreich (OULD-AMROUCHE et al., 1999) wurden Rassendispositionen für Neosporose verneint.

Die Angaben über das Alter der abortierenden Kühe lassen keine Altersprävalenz erkennen. Die älteste Kuh, bei der ein durch Neosporose induzierter Abort nachgewiesen wurde, war acht Jahre alt. Bei einem epidemischen Ausbruch in Neuseeland (1993) abortierten 33 % der Herde. Das Durchschnittsalter der Kühe lag hier bei vier Jahren (THORNTON et al., 1994).

Um die Wahrscheinlichkeit bevorstehender Abortausbrüche abzuschätzen, untersuchten TREES und Mitarbeiter 120 Seren von Rindern, die zwei Tage zuvor abortiert hatten. Bei elf Tieren konnte ein IFAT-Antikörpertiter von  $> 1:1280$  festgestellt werden. Die übrigen 109 Titer der verwerfenden Kühe lagen deutlich darunter. Bei 97 Tieren, die nicht abortiert hatten, konnte kein solch hoher Titer entdeckt werden. Ein hoher Titer macht also einen Neosporose-Abort wahrscheinlich. Ein niedrigerer Titer schließt ihn zwar nicht aus, macht ihn aber unwahrscheinlicher. Eine Verdachtsdiagnose aufgrund eines hohen *N.*

*caninum*-Titer sollte also immer durch direkte Verfahren bestätigt werden (TREES et al., 1994).

McNAMÉE und Mitarbeiter (1996) verglichen die Titer von 40 Muttertieren, die abortiert hatten. Gleichzeitig wurden die Foeten immunhistochemisch auf Neosporose untersucht. In 22 Foeten wurde der Parasit nachgewiesen. In den Seren ihrer Mütter bestand ein Titer von >1:640. Bei den Mutterkühen der 18 negativen Foeten wurde nur in einem Tier ein derart hoher Titer gefunden. Daraufhin wurden 489 Tiere aus verschiedenen Herden untersucht. 12,6 % der abortierten Kühe und nur 3 % der Kontrolltiere wiesen einen IFAT-Titer von >1:640 auf. Daraus wurde gefolgert, daß wahrscheinlich 9,6 % der Kühe aufgrund der Neosporose abortiert hatten. Der Anteil der durch Immunhistochemie diagnostizierten Aborte lag dagegen bei 4,2 %.

Es existieren Vorschläge für IFAT-Titer, die Tiere identifizieren sollen, die vor kurzem aufgrund von *N. caninum* abortiert hatten. Diskutiert werden Titer von 1:640 (CONRAD et al., 1993b), 1:320 (TREES et al., 1994) und 1:200 (DUBEY et al., 1996a). Aufgrund ihrer Uneinheitlichkeit können diese Daten nicht zu Aussagen über bevorstehende Aborte herangezogen werden. Ein hoher Titer kann lediglich auf ein erhöhtes Abortrisiko hinweisen. In einer Studie wurde festgestellt, daß das Abortrisiko in Herden mit infizierten Kühen 3,4 bis 7,0 mal höher ist als in Herden mit nicht infizierten Kühen (THURMOND et al., 1997). Schwierigkeiten bei der Interpretation der Proben stellen die unterschiedlichen IFAT-Tests, Laborbedingungen und Cut-off-Titer dar.

### **5.3 Häufigkeit wiederholter Aborte**

Seit der Entdeckung der Neosporose wird vermutet, daß es durch *N. caninum* zu wiederholten Aborten bei derselben Kuh kommen kann. Das Problem, eine Aussage über die Frequenz der Aborte zu machen, besteht darin, daß die meisten Kühe aus wirtschaftlichen Überlegungen aus den Herden eliminiert werden und deshalb nicht über einen längeren Zeitraum beobachtet werden können (DANNAT et al., 1995; MOEN et al., 1998).

OBENDORF und Mitarbeiter (1995) gelang es, aus zwei von drei abortierten Foeten eines Muttertieres *N. caninum* zu isolieren. Die Aborte erfolgten in drei aufeinanderfolgenden Trächtigkeiten.

In einer anderen Studie konnten bei 112 wegen Neosporose abortierenden Kühen in einer weiteren Trächtigkeit wiederum bei 4 % infizierte und abortierte Foeten identifiziert werden (ANDERSON et al., 1995).

WOUDA und Mitarbeiter (1995) veröffentlichten eine in den Niederlanden durchgeführte Studie, bei der zwei von 26 *Neospora*-positiven Kühen in zwei aufeinander folgenden Trächtigkeiten abortierten. Das ist ein Prozentsatz von < 8 %.

In Nordirland verwarfen in einer Herde 31 Tiere im Zeitraum von 1993-1994. In fünf Fällen wurde *N. caninum* dafür verantwortlich gemacht. Während der darauffolgenden Trächtigkeit abortierten nur drei Tiere aus dieser Herde, jedoch keines der *Neospora*-positiven (McNAMÉE et al., 1996).

Aus den verschiedenen Studien mit ihren unterschiedlichen Ergebnissen läßt sich keine endgültige Aussage über die Wahrscheinlichkeit eines mehrfachen Abortgeschehens machen. Eine Wiederholung ist jedoch grundsätzlich möglich (THURMOND et al., 1997).

Wahrscheinlicher als wiederholte Aborte ist die mehrfache Geburt von infizierten Kälbern (DUBEY und LINDSAY, 1996). BARR und Mitarbeiter untersuchten die Kälber von vier *Neospora*-positiven Mutterkühen in zwei aufeinanderfolgenden Trächtigkeiten. Alle Nachkommen wurden positiv getestet. Sie hatten entweder einen sehr hohen präkolostralen Antikörpertiter im Serum oder Neosporen im Gehirn (BARR et al., 1993).

In einer deutschen Studie wurden 15 Nachkommen von zehn seropositiven Kühen untersucht. 14 Kälber (93 %) waren ebenfalls seropositiv. Nur ein Tier war seronegativ und gebar wiederum ein seronegatives Kalb (SCHARES et al., 1998).

Vermutlich entwickelt nur ein kleiner Anteil der kongenital infizierten Tiere auch eine klinisch relevante Neosporose. Auf zwei Farmen in Kalifornien wurden in 31 % und 54 % der Kälber präkolostrale *N. caninum*-Antikörper entdeckt, ohne einen Hinweis auf eine Bestandsproblematik zu erhalten (PARÉ et al., 1996).

In einer dänischen Studie wurde das Abortrisiko von Kühen beleuchtet, die aus seropositiven Müttern stammen. Ihr Abortrisiko lag in der ersten und zweiten Trächtigkeit signifikant höher als das der Mütter (FRENCH et al., 1999, MOEN et al., 1998, WOUDA et al., 1998b). THURMOND und HIETALA (1997a) kamen zu dem Schluß, daß das Abortrisiko kongenital infizierter Rinder mit jeder Trächtigkeit abnimmt. Die Autoren schließen aber nicht aus, daß dieses Ergebnis durch frühe Schlachtungen verfälscht wird.

## 5.4 Risikofaktoren

Der Hauptinfektionsweg der Neosporose besteht in der vertikalen Weitergabe der Protozoen und erfolgt somit pränatal. Darauf wird in Punkt 5.5.1 eingegangen.

Als bedeutendster bisher bekannter Überträger der horizontalen, also postnatalen Infektion, wurde der Hund nachgewiesen. Er scheidet infektiöse Stadien aus und kann somit eine Infektionsquelle für Rinder darstellen (McALLISTER et al., 1998a). Die Infektion der Wiederkäuer kann durch Aufnahme kontaminierter Futtermittel und Wasser erfolgen. Schon bevor der Hund als Endwirt feststand, wurde die Anwesenheit von Hofhunden auf einem Betrieb mit einem steigenden *N. caninum*-Abortrisiko assoziiert. Auch schien die Anzahl der Hunde eine Rolle zu spielen (BARTELS et al., 1999; MAINAR-JAIME et al., 1999; OULD-AMROUCHE et al., 1999; PARÉ et al., 1998). In den Niederlanden wurde das Verhältnis seropositiver Hofhunde zur Seroprävalenz seropositiver Rinder untersucht. In Betrieben mit seropositiven Hunden war auch die Prävalenz der infizierten Kühe hoch (WOUDA et al., 1999b).

Die Prävalenz der Antikörper, die gegen *N. caninum* gerichtet sind, ist bei auf dem Lande lebenden Hunden signifikant höher als bei Stadthunden (SAWADA et al., 1998; WOUDA et al., 1999b). Offensichtlich sind Hofhunde den Neosporen vermehrt ausgesetzt. Jedoch konnte unter natürlichen Umständen noch nicht nachgewiesen werden, wie sich Hunde infizieren. Die Bedeutung abortierter Foeten und Fruchthüllen als Infektionsquelle muß noch untersucht werden. Denkbar wäre auch eine Infektion über die Aufnahme von Vögeln und Kleinnagern, die eventuell als Transport- oder sogar als Zwischenwirte fungieren könnten (HEMPHILL et al., 2000a).

Daneben muß auch ein Augenmerk auf andere Caniden gelegt werden. In den Niederlanden beispielsweise werden Zusammenhänge zwischen dem Auftreten starker Fuchspopulationen und der Häufigkeit von Aborten gesehen. In Kanada und den USA werden Kojoten für Aborte verantwortlich gemacht. Eine hohe *N. caninum*-Seroprävalenz in Hirschen deutet auch auf das Bestehen eines sylvatischen Zyklusses hin (DUBEY et al., 1999a).

Auch die Anwesenheit von Geflügel wird als Risikofaktor gesehen. Man nimmt an, daß diese Tiere zum einen einen mechanischen Vektor für Oozysten darstellen oder zum anderen sich der Hund durch Fressen von Geflügel infiziert (BARTELS et al., 1999). Auch Tauben können im Experiment als Zwischenwirt dienen und sollten als Risikofaktor angesehen werden (McGUIRE et al., 1999). In einer französischen Arbeit wurde sogar ein

Zusammenhang seropositiver Kühe mit Hasen und Enten gesehen. Katzen hingegen hatten keinen Einfluß (OULD-AMROUCHE et al., 1999).

Die laktogene Infektion von Kälbern wurde experimentell durch Zugabe von Tachyzoiten zur Milch durchgeführt, allerdings kann über die In-vivo-Risikofaktoren von Verfütterung der Milch infizierter Mütter bis heute keine Aussage gemacht werden (DAVISON et al., 1999c; HIETALA und THURMOND, 1999; UGGLA et al., 1998).

Ein negativer Einfluß auf die Immunlage der Rinderherde ist nach Möglichkeit zu vermeiden, da er sich positiv auf das Auftreten *N. caninum*-assoziiertes Abortes auswirkt. In Dänemark wurde das Verfüttern schimmeligem Maissilage mit enthaltenen Mykotoxinen als Risikofaktor erkannt. Gleichzeitig untersuchte Stressfaktoren wie Impfungen, hohe Außentemperaturen und diätetische Faktoren hatten keinen Einfluß (BARTELS et al., 1999).

In Schweden wurde in einer Untersuchung ein Zusammenhang zwischen Seropositivität von *N. caninum* und BVD gesehen. Die Autorin fand heraus, daß viele *N. caninum* seropositive Tiere auch Antikörper gegen BVD aufwiesen (BJÖRKMAN et al., 2000). Andere Studien konnten dies nicht bestätigen (BARTELS et al., 1999; GOTTSTEIN et al., 1999).

## 5.5 Übertragungsmöglichkeiten

Die Übertragung der Neosporen kann sowohl vertikal als auch horizontal erfolgen. Bei der vertikalen Übertragung kommt es zu einem diaplazentaren Übergang von Tachyzoiten. 81% bis 93% der Kälber, die von seropositiven Müttern stammen, sind kongenital infiziert (BARR et al., 1993; PARÉ et al., 1996; SCHARES et al., 1998; THURMOND und HIETALA, 1999).

Die horizontale Infektionsmöglichkeit besteht in der oralen Aufnahme von Oozysten, Tachyzoiten oder bradyzoitenhaltigem Gewebe (COLE et al., 1995; DE MAREZ et al., 1999; McALLISTER et al., 1998a).

### 5.5.1 Vertikal

Die diaplazentare Übertragung von Tachyzoiten scheint bei Pflanzenfressern die wichtigste der verschiedenen Übertragungsmöglichkeiten zu sein (ANDERSON et al., 1997; 2000; BJÖRKMAN et al., 1996; PARÉ et al., 1994; 1996; SCHARES et al., 1998; THURMOND et al., 1997; WOUDA et al., 1998b). So läßt sich auch erklären, daß die Erkrankung über Generationen in einer Herde bestehen bleibt (DIJKSTRA et al., 2002). Nach der Übertragung kommt es zum Festsetzen der Tachyzoiten in neuralem Gewebe, Gehirn, Rückenmark, Nerven und auch in der Retina des Foetus. Dort bilden die Parasitenstadien eine Zystenhülle aus (Pseudozysten) und nehmen langsame Teilungen vor (DUBEY et al., 1988a; LINDSAY et al., 1993). Die jetzt als Bradyzoiten bezeichneten Parasiten bilden eine intrazelluläre, stabile Wand aus (HEMPHILL, 1999). Diese Zysten können mehrere Jahre im Wirt bestehen, ohne klinische Symptome zu verursachen (DUBEY und LINDSAY, 1996). SCHARES und Mitarbeiter untersuchten die Nachkommen seropositiver Kühe und kamen zu dem Ergebnis, daß 93% der Nachkommen seropositiver Tiere ebenfalls seropositiv waren. Dieser Befund konnte über Generationen in den Herden nachvollzogen werden (SCHARES et al., 1998). In Schweden kamen BJÖRKMAN und Mitarbeiter schon 1996 zu ähnliche Ergebnissen. Auch in Kalifornien wurde der diaplazentare Übertragungsweg als der wahrscheinlichste für Rinder bestätigt (PARÉ et al., 1994; 1996; THURMOND et al., 1997).

Bei **endemischen** Neosporoseausbrüchen ist die Mehrheit der Kälber von seropositiven Kühen auch positiv. Hier ist eine Abortrate von 5% bis 17,3% p. a. über mehrere Jahre hinweg zu beobachten (THURMOND et al., 1997). In verschiedenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß die Rate der postnatalen Infektion niedrig ist (BARTELS et al., 1999; DAVISON et al., 1999c,d; MOEN et al., 1998; THURMOND et al., 1997; WOUDA et al., 1999a). Es gibt sowohl pathologische als auch serologische Hinweise, daß diese kongenital infizierten Kälber eine chronisch persistierende Infektion haben, die wiederum diaplazentar auf ihre Nachkommen übertragen werden kann. ANDERSON und Mitarbeiter (1997) verglichen eine serologisch negative Gruppe von Tieren mit einer serologisch positiven. Beide Gruppen waren klinisch unauffällig. Alle weiblichen Nachkommen der seropositiven Kühe hatten wiederum seropositive Kälber. Die seronegativen Tiere gebaren seronegative Tiere. Bei der Sektion wurden bei den seropositiven Tieren histologische Läsionen im Gehirn und Rückenmark gefunden. Außerdem ließ sich der Einzeller immunhistochemisch nachweisen. Bei seronegativen Kälbern konnten keine Anzeichen einer Protozoeninfektion nachgewiesen werden. Obwohl in Herden mit

endemischem Infektionsgeschehen der vertikale Übertragungsweg der wahrscheinlichste ist, gibt es auch Hinweise darauf, daß hier ein kleiner Teil der Infektionen postnatal stattfindet. Die Infektionsquellen sind allerdings noch unbekannt (SCHARES et al., 1998; THURMOND und HIETALA, 1999).

In einer Studie mit drei trächtigen Kühen wurde durch orale Verabreichung von je 600 Oozysten eine Infektion der Muttertiere hervorgerufen. Die Kühe bildeten Antikörper und hatten *N. caninum*-spezifisches Gewebe (PCR) im Gehirn. Die Kälber hingegen wurden ausgetragen und waren gesund. Dies läßt darauf schließen, daß mehr als 600 Oozysten für die Induktion einer diaplazentaren Übertragung benötigt werden (TREES et al., 2002).

Auf die Möglichkeit der mehrfachen Übertragung und das Auftreten von Aborten in aufeinanderfolgenden Trächtigkeiten wurde in Punkt 5.3 eingegangen.

Die diaplazentare Übertragung ist auch bei Hunden und Katzen nachgewiesen (BARBER und TREES, 1998; DUBEY und LINDSAY, 1989a, b; DUBEY et al., 1990c).

## 5.5.2 Horizontal

### 5.5.2.1 Orale Infektion durch Oozysten

Die orale Aufnahme von Oozysten induzierte eine meßbare zelluläre und humorale Immunantwort bei Kälbern. Die verabreichten Oozysten stammten von experimentell infizierten Hunden. Es wurden nur serologisch negative Kälber in den Versuch aufgenommen. Nach zwei bzw. vier Wochen wurden *Neospora*-spezifische Antikörper (IgG1 und IgG2) durch IFAT und ELISA festgestellt. Darüber hinaus konnte durch PCR *Neospora*-DNA in Gehirn und Rückenmark nachgewiesen werden (DE MAREZ et al., 1999). Dies läßt die Vermutung zu, daß ein Oozysten ausscheidender Hund als Infektionsquelle in Frage kommt. Auch infizierte Füchse stehen im Verdacht, durch das Ausscheiden von Oozysten zur Kontamination des Futters beizutragen (SIMPSON et al., 1997). Man geht davon aus, daß **sporadische** Aborte durch horizontale Übertragung zustande kommen (ANDERSON et al., 1991).

Bei **epidemischen** Ausbrüchen (ein erheblicher Prozentsatz abortiert innerhalb weniger Monate) bestehen serologische Hinweise, daß die abortierenden Tiere postnatal infiziert worden waren. Diese Erkenntnis ergab sich aus serologischen Untersuchungen von Muttertieren und deren Nachkommen, die keine Korrelationen nachwiesen (THURMOND et

al., 1997; WALDNER et al., 1999). In einem Fall haben 30% der trächtigen Tiere abortiert (THILSTED und DUBEY, 1989). Die Klinik der Abortgeschehen weist auf eine Punktquelle als Ursache für die Infektion hin. Wie diese Quelle genau aussieht, ist noch offen (DIJKSTRA et al., 2001a,b; DUBEY und LINDSAY, 1996; McALLISTER et al., 1996a; 2000; THORNTON et al., 1994). Denkbar wäre eine Konfrontation mit den vom Endwirt ausgeschiedenen Oozysten. Bis heute konnte nicht belegt werden, daß Rinder, die über Oozysten infiziert wurden, die Infektion diaplazentar weitergeben. Es liegen jedoch Studien vor, in denen eine Beziehung zwischen der Präsenz von Hofhunden und der *Neospora*-Seroprävalenz in der Rinderherde nachgewiesen werden konnte. So ist grundsätzlich eine Übertragung des Parasiten vom Hund auf das Rind denkbar (BARTELS et al., 1999; MAINE-JAIME et al., 1999; PARÉ et al., 1998; WOUDA et al., 1999b).

Neben dem Hund wurden auch andere mögliche Infektionsquellen untersucht. So konnte ein erhöhtes Abortrisiko durch *N. caninum* in Verbindung mit auf dem Hof lebendem Geflügel beobachtet werden (BARTELS et al., 1999).

#### **5.5.2.2 Orale Infektion durch Tachyzoiten**

Neben der Infektion durch Oozysten kommt eine postnatale Infektion mit Tachyzoiten in Betracht. Es ließen sich experimentell verschiedene Tiere über die Milch infizieren (COLE et al., 1995). Vier Kälber seronegativer Mütter erhielten sechs Stunden nach der Geburt Kolostrum, dem Tachyzoiten des NcSweB1-Isolates zugegeben wurde. Zwei dieser Kälber, die mit der Flasche getränkt worden waren, entwickelten nach ein bzw. zwei Wochen Fieber und Diarrhöe und wiesen nach vier Wochen einen hohen Antikörpertiter auf. Sie wurden 15 bzw. 19 Wochen nach der Inokulierung euthanasiert. Es wurden keine pathologischen Läsionen gefunden. Es gelang weder immunhistologisch noch in Zellkulturen, aus den Gehirnen Neosporen zu isolieren. Allerdings konnte in den Gehirnen durch PCR Neosporen-DNA festgestellt werden. Die beiden anderen Kälber, die das Kolostrum per Nasenschlundsonde erhalten hatten, entwickelten keine klinischen Symptome und blieben während der gesamten Zeitdauer der Studie seronegativ. Die ausschließliche Infektion der flaschengetränkten Kälber wurde auf eine vermutete Penetration der Parasiten durch die bukkale bzw. pharyngeale Mukosa zurückgeführt, wie es bei *T. gondii* beschrieben wurde (UGGLA et al., 1998).



### **5.5.2.3 Orale Infektion durch bradyzoitenhaltiges Gewebe**

Der wichtigste Versuch zum Beweis der Infektionsmöglichkeit durch Aufnahme von Gewebszysten gelang McALLISTER und Mitarbeiter (1998a). Sie verfütterten experimentell infizierte Mäuse, die Gewebszysten enthielten, an Hunde und wiesen in deren Kot Oozysten nach.

Bei Fleisch- und Aasfressern ist diese Übertragungsmöglichkeit von größerer Bedeutung als beim Rind, bei welchem allerdings ein Infektionsrisiko durch infizierte Kadaver im Futter in Betracht zu ziehen ist.

## 6. INFektionsversuche bei verschiedenen Tierarten

### 6.1 Versuche mit Mäusen und kleinen Wiederkäuern

Erste Tiermodelle mit Mäusen wurden von LINDSAY und DUBEY (1989c; 1990a, b, c) entwickelt. Nach subkutaner Infektion von Mäusen mit *N. caninum*-Tachyzoiten trat eine klinische Neosporose mit Pneumonie, Polymyositis, Enzephalitis, Hepatitis, Pankreatitis und neurologischen Ausfällen nur dann auf, wenn das Immunsystem vor der Infektion durch Prednisolon beeinträchtigt wurde. Diese Studien waren die Grundlage für weitere Untersuchungen, bei denen verschiedene genmanipulierte Mäuse infiziert und die unterschiedlichen Reaktionen erfaßt wurden. Darüberhinaus suchte man eine Möglichkeit, möglichst effizient an bradyzoitenhaltige Gewebssysteme zu gelangen.

McGUIRE und Mitarbeiter (1997) versuchten *N. caninum*-Gewebssysteme in Mäusen zu produzieren. Sie testeten verschiedene Mauslinien, *N. caninum*-Isolate, Inokulierungsdosen der Tachyzoiten und Möglichkeiten der Immunsuppression. Männliche ICR-Mäuse, die mit Methylprednisolonacetat (MPA) behandelt und mit NC-Liverpool-Isolaten infiziert wurden, produzierten die meisten Gewebssysteme und überlebten trotzdem relativ lange (McGUIRE et al., 1997). Außerdem wurde eine Methode entwickelt, die die Gewebssysteme aus dem Mäusegehirn separieren half und die Kryopreservation erlaubte. Dies war die Voraussetzung, daß Zysten von verschiedenen Isolaten für unterschiedliche Versuche vorrätig gehalten werden konnten.

Immundefiziente Mäuse, wie Nacktmäuse (SAWADA et al., 1997; YAMANE et al., 1996), Mäuse, die kein Gamma-Interferon besitzen (DUBEY und LINDSAY, 1996), yMT (antibody knock-out) Mäuse (EPERON et al., 1999) und Balb/c Mäuse erwiesen sich als besonders empfänglich für Neosporose und bildeten auch ausgeprägte Krankheitssymptome aus. Diese Mäuse entwickelten schnell Enzephalomyelitiden und der Parasit wurde kongenital auf die Fröchte übertragen. Es kam zu Resorptionen, Absterben der Foeten oder lebend geborenen Jungen, die mit *N. caninum* infiziert waren (LONG und BASZLER, 1997; LONG et al., 1998). Swiss Webster Mäuse entwickelten ohne Kortikosteroidgaben keine klinische Neosporose, die Parasiten bildeten jedoch stets Gewebssysteme aus (LINDSAY und DUBEY, 1989c, 1990a).

Zur Klärung der Frage, ob *N. caninum*-Bradyzoiten und Gewebssysteme einer Inkubation mit Verdauungsenzymen standhalten, wurden diese Stadien mit einer Pepsin-

Salzsäure-Lösung (pH 0,8) behandelt und anschließend subkutan, intraperitoneal und oral in mit Methylprednisolonacetat vorbehandelte Versuchsmäuse inokuliert. Die Parasiten vermehrten sich in allen Mäusen. Dies ließ schon früh die Vermutung zu, daß ein Fleischfresser den Endwirt darstellen könnte (LINDSAY und DUBEY, 1990a). Bei diesen Versuchen erkannte man die Möglichkeit der kongenitalen Übertragung von *N. caninum* bei verschiedenen Tieren (COLE et al., 1995; DUBEY et al., 1990b; DUBEY und LINDSAY, 1989a, b). Die drei verschiedenen Möglichkeiten der horizontale Übertragung wurde ebenfalls in Tierversuchen bestätigt. In Punkt 5.5.2 wurde bereits darauf eingegangen.

Schafe sind unter natürlichen Umständen von der Erkrankung zwar sehr selten betroffen (DUBEY et al., 1990b), eignen sich aber besonders gut für Versuchszwecke, da bei experimenteller Infektion ähnliche Symptome wie bei Rindern auftreten (BUXTON et al., 1997a,b; JOLLEY et al., 1999; McALLISTER et al., 1996a). Sie bieten so eine gute und kostengünstige Alternative, die bovine Neosporose zu studieren. Dasselbe gilt auch für Versuche mit Ziegen (LINDSAY et al., 1995b), die hoch empfänglich für Neosporen sind (CORBELLINI et al., 2001; INNES et al., 2001a).

## **6.2 Infektionsversuche möglicher Endwirte**

Zum Zweck der Identifikation möglicher Endwirte wurde zunächst vor allem mit Katzen gearbeitet, da sie den Endwirt des eng verwandten Protozoon *T. gondii* darstellen (DUBEY und BEATTIE, 1988) und den Parasiten diaplazentar weitergeben (DUBEY und LINDSAY, 1989a; DUBEY et al., 1990d). Zur Infektion der Tiere wurden Gewebszysten aus dem Gehirn natürlich infizierter Hunde verwendet (CUDDON et al., 1992), später auch von natürlich infizierten Rindern und experimentell infizierten Katzen und Mäusen. Es konnte keine Oozystenausscheidung im Kot nachgewiesen werden, womit die Katze als Endwirt ausgeschlossen wurde.

Experimentelle Infektionen von Hunden (DUBEY und LINDSAY, 1989b), Waschbären (DUBEY et al., 1993), Kojoten (LINDSAY et al., 1996c) und einigen carnivoren Vögeln (BAKER et al., 1995) blieben hinsichtlich der Oozytenausscheidung zunächst erfolglos. Allerdings wurde das Vorhandensein von Parasiten in den verfütterten Geweben nicht lückenlos überprüft, so daß die Ergebnisse nicht als absolut sicher betrachtet wurden (DUBEY und LINDSAY, 1996). Durch den Nachweis einer Oozytenausscheidung beim Hund konnte er als Endwirt identifiziert werden (McALLISTER et al., 1998a).

### 6.3 Infektionsversuche bei Primaten

Besondere Aufmerksamkeit sollte den Infektionsversuchen bei Primaten geschenkt werden. Aufgrund der morphologischen Ähnlichkeit von *N. caninum* und *T. gondii* und der Tatsache, daß die Toxoplasmose Primaten und Menschen befallen kann, stellt sich die Frage nach der Infektionsmöglichkeit von Primaten mit Neosporen, um die Möglichkeit einer Infektion des Menschen zu beurteilen. Eine natürliche Infektion wurde bisher weder bei Menschen noch bei Affen nachgewiesen (HO et al., 1997b).

1994 erfolgte ein Infektionsversuch bei Rhesusaffen. Im ersten Experiment wurden am Tag 65 der Trächtigkeit zwei Foeten im Uterus ihrer Mütter intramuskulär mit Tachyzoiten infiziert. Die 13 und 22 Tage post infectionem durch Hysterotomie entwickelten Fröchte zeigten eine multifokale Enzephalitis und eine verminderte Menge an Amnionsflüssigkeit (BARR et al., 1994a).

Im zweiten Experiment erfolgte eine intramuskuläre und intravenöse Infektion der trächtigen Affen am 43 Tag der Trächtigkeit. Die am Tag 67 und 70 durch Kaiserschnitt entwickelten Foeten wiesen eine chronische multifokale nekrotisierende nonsuppurative Meningoenzephalitis auf. Alle Tiere aus beiden Experimenten hatten *Neospora*-Tachyzoiten in ihren Geweben. Ein *Neospora*-Antikörper-Titer-Nachweis erfolgte in allen vier Blutproben. Daraus läßt sich schließen, daß Primaten empfänglich für Neosporen sind (BARR et al., 1994a).

In einem weiteren Versuch bekamen zwei Rhesusaffen am Tag 43 der Trächtigkeit intravenös und intramuskulär kultivierte Tachyzoiten vom BPA-1-Typ. 67 bzw. 70 Tage später wurden per Hysterotomie die Foeten entwickelt und die Mütter euthanasiert. Mittels PCR gelang der Protozoennachweis in vielen Geweben. Bei Muttertier A waren Lunge und Gehirn, bei Muttertier B das Herz befallen. Bei dem Foetus aus A war der Befund in Gehirn, Herz, Lunge, Milz, Haut, Plazenta, bei dem Foetus aus B zusätzlich auch in der Skelettmuskulatur positiv (HO et al., 1997b).

Die Frage nach einer persistierenden oder wiederholenden diaplazentaren Infektion erfordert noch weitere Untersuchungen (HO et al., 1997b).

Bisher gibt es keinen Hinweis auf eine Neosporen-Infektion beim Menschen. Dieser Aspekt wird in Punkt 16 diskutiert.

## 7. KLINIK DER NEOSPOROSE

### 7.1 Klinische Erscheinungen der adulten Rinder

Eine klinische Neosporose äußert sich vorwiegend in Reproduktionsstörungen. Diese reichen von Fruchtresorptionen über Mumifikationen bis zu Aborten. Es sind sowohl Milch-, als auch Fleischrassen betroffen. Die abortierenden Kühe zeigen kein gestörtes Allgemeinbefinden und normalerweise keine Retentio secundinarum (ANDERSON et al., 2000; DUBEY, 1999b).

Tiere jeden Alters können betroffen sein. Der Abort findet meist ab dem dritten Monat der Trächtigkeit statt. Grundsätzlich besteht die Möglichkeit einer Infektion mit darauffolgenden Fruchttod auch in früheren Trächtigkeitsstadien. Die Symptome sind eine verlängerte Günstzeit, Umrindern und Unfruchtbarkeit (TREES et al., 1999).

Manche Rinder (unter 5%) werfen in mehreren aufeinanderfolgenden Trächtigkeiten (ANDERSON et al., 1995; DANNAT et al., 1995; OBENDORF et al., 1995). Die Aborte treten sporadisch, endemisch oder epidemisch in den Herden auf. Von epidemischem Werfen wird dann gesprochen, wenn 10% der trächtigen Kühe innerhalb von sechs bis acht Wochen eines Bestandes abortieren (ANDERSON et al., 1995). Auch über die Geburt prämaturer, lebensschwacher, untergewichtiger Kälber und Totgeburten wurde berichtet (GRAHAM et al., 1996; SLYTER et al., 1990). Foeten können im Uterus absterben und resorbiert, mumifiziert, oder autolytisch werden. Es können Kälber mit klinischen Symptomen geboren werden, oder aber chronisch infizierte aber klinisch unauffällige Tiere (DUBEY, 2003). Die Wahrscheinlichkeit von aufeinanderfolgenden Aborten ist jedoch geringer als aufeinanderfolgende Geburten kongenital infizierter Kälber (HEMPHILL et al., 2000a).

Die mittlere Trächtigkeitsdauer bis zum Abort betrug in einer amerikanischen Untersuchung beim Rind 5,5 Monate (ANDERSON et al., 1991). In einer niederländischen Studie ereigneten sich die Aborte am Tag 110 bis 259 nach der Insemination. Eine Häufung trat um den Tag 170 auf (MOEN et al., 1998). Das Ergebnis beider Studien ist also vergleichbar.

Die Aborte finden das ganze Jahr über statt. *N. caninum*-seropositive Kühe tragen ein höheres Risiko aufgrund *N. caninum* zu abortieren als seronegative. Jedoch sind 95% der kongenital infizierten Kälber seropositiver Kühe klinisch unauffällig. Das Alter der Mutterkuh

und die Anzahl der bereits durchlaufenen Laktationen spielt beim Abortgeschehen keine Rolle (DUBEY, 2003).

Die Milchproduktion steigt kurzfristig nach dem Abort an (WOUDA, 2000). Allerdings ist durch die verlängerte Zwischenkalbezeit eine Reduktion der Milchleistung zu beobachten (TREES et al., 1999). Zudem wird die Milchproduktion in der ersten Laktation bei seropositiven Kühen signifikant reduziert (THURMOND und HIETALA, 1997b). Weitere Erläuterungen zu Veränderungen der Milchleistung finden sich in Punkt 15.

## **7.2 Klinik der kongenital infizierten Kälber**

Klinische Symptome werden nur bei Kälbern beschrieben, die jünger als zwei Monate sind. Es werden über Sehnenkontrakturen, Exophthalmie und asymmetrisch gelegene Augen bei neugeborenen Kälbern berichtet. In den Bereich der neurologischen Symptome gehören leichte Ataxien, reduzierte Patellarreflexe, Paresen, Paralysen und Propriozeptionsverluste. Einzeltiere hatten gekrümmte Vor- und Hintergliedmaßen oder Hyperextensionen. (BARR et al., 1993; 1994b; BRYAN et al., 1994; DUBEY und LINDSAY, 1996; GUNNING et al., 1994; O'TOOLE und JEFFREY, 1987; PARISH et al., 1987). Untergewichtige Kälber werden ebenso geboren, wie lebensschwache Tiere, die nicht in der Lage sind auf zu stehen. In einem Fall lag bei einem totgeborenen Kalb eine Arthrogryposis vor. Hier konnte eine asymmetrische Ausbildung des Rückenmarks diagnostiziert werden (DUBEY et al., 1990a). Bei einem siebenmonatigen abortierten Foetus lag ein Hydrozephalus vor (DUBEY et al., 1998a). DUBEY und DE LAHUNTA (1993) führten Myositis und Deformierungen der Extremitäten auf Muskeldegenerationen zurück.

Bei diesen Berichten scheint es sich aber um Ausnahmen zu handeln, da die meisten Tiere (95%), die kongenital infiziert sind, klinisch unauffällig erscheinen (BARR et al., 1993; FIORETTI et al., 2000; PARÉ et al., 1996).

Untersuchungen in den USA führten zu der Annahme, daß es bei seropositiven Masttieren zu einer verlangsamten Gewichtszunahme kommt. Es kann durchschnittlich ein geringeres Schlachtgewicht von 7,5 kg angenommen werden. Wie es hierzu kommt, ist noch nicht geklärt (BARLING et al., 2000a; 2001b). Darauf wird in Punkt 15 näher eingegangen.

## 8. DIAGNOSTIK

Bei der Diagnostik der Neosporose spielt besonders die Abgrenzung zu differentialdiagnostisch in Betracht kommenden Erregern eine Rolle (HEMPHILL, 1999). Die entwickelten Verfahren beinhalten **indirekte** Methoden, wie Antikörper-Erkennung im Blut durch ELISA, IFAT und Agglutinations-Test oder **direkte** Methoden, wie Histologie und Immunhistochemie, In-vitro-Isolierung des Parasiten oder Auffinden von Parasiten-DNA in der PCR (DUBEY und LINDSAY, 1996; ELLIS et al., 1998; HEMPHILL, 1999). Indirekte Diagnosen von *N. caninum*-Infektionen basieren auf der Erkennung von Antikörpern, die spezifisch gegen *N. caninum*-Antigene gerichtet sind (HEMPHILL, 1999).

### 8.1 Untersuchungsmaterial

Untersucht werden sollten abortierte Foeten, die Plazenta und Seren der Muttertiere. Die Parasiten können in Serum, Gehirn, Herz, Leber, Skelettmuskulatur, Lunge und Niere der Frucht nachgewiesen werden (ANDERSON et al., 2000; BERGERON et al., 2001; OTTER et al., 1997a).

### 8.2 Serologie (indirekter Nachweis)

Diese Verfahren weisen *N. caninum*-spezifische Antikörper nach. Es kann im positiven Fall allerdings nur eine Aussage darüber gemacht werden, daß ein Kontakt des Tieres mit *N. caninum* stattgefunden hat. Klinische Erkrankungen bzw. Aborte lassen sich nicht zwangsläufig auf diesen Protozoen zurückzuführen (PFISTER, 2002). Ein negativer Test schließt eine vorausgegangene Infektion nicht vollkommen aus. Diese Problematik besteht, weil zur Zeit noch keine Kenntnisse über die Persistenz von Antikörpern vorliegen. Allerdings kann über serologische Reihenuntersuchungen die Präsenz von *N. caninum* im Bestand und somit die Empfänglichkeit des Bestandes vermutet und je nach Titer-Höhe das Risiko einer Erkrankung abgeschätzt werden (ANDERSON et al., 2000; HEMPHILL, 1999;). Auch bakteriell hergestellte rekombinante Antigene wurden zur serologischen Diagnosestellung entwickelt (LALLY et al., 1996b; LOUIE et al., 1998). Die Antigene wurden bereits in Punkt 3.8 beschrieben.

### 8.2.1 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Das Prinzip dieser Technik besteht in der Sichtbarmachung der an die Antigene bindenden Antikörper durch fluoreszierende Substrate. Es können besonders kleine, im Nanogrammbereich liegende Proteine erkannt werden (STRYER, 1988). Es besteht bei dieser Methode die Gefahr von Kreuzreaktionen (DUBEY und LINDSAY, 1996). Da Kreuzreaktionen speziell bei *N. caninum* mit *T. gondii* im IFAT gering sind, wird davon ausgegangen, daß sich die Moleküle der Oberflächenmembran von Protozoen besonders gut für die Diagnose eignen (DUBEY und LINDSAY, 1993).

Um die Sensitivität und Spezifität dieser Methode zu verbessern, wurden zahlreiche Methoden entwickelt (BJÖRKMAN et al., 1994a; OSAWA et al., 1998; PARÉ et al., 1995a; SCHARES et al., 2002a; WILLIAMS et al., 1999).

Parasitenmembranproteine wurden in Iscoms (Immunstimulierende Komplexe) eingebaut. Zuerst wurden Seren von Hunden verwendet (BJÖRKMAN et al., 1994a,b), dann von Rindern. Zuletzt gelang der Nachweis auch in Milch (BJÖRKMAN et al., 1997).

Wasserlösliche Antigene von Tachyzoitenextrakten wurden zur Bindung an Antikörper eingesetzt (GOTTSTEIN et al., 1998; PARÉ et al., 1995a). In Seren, die von Tieren stammen, die mit verwandten Protozoen (*T. gondii*, *Eimeria bovis*, *Cryptosporidium parvum*) infiziert waren, fand keine Kreuzreaktion statt (PARÉ et al., 1995a).

Als kompetitiver ELISA wird die Methode bei Einsatz von monoklonalen Antikörpern bezeichnet. Die Proteine sind gegen ein Oberflächenprotein der Neosporen gerichtet (BASZLER et al., 1996).

Ein anderer Ansatz wurde von WILLIAMS und Mitarbeitern (1997) gemacht. Sie ließen chemisch fixierte Parasiten als Reaktionspartner agieren.

LALLY und Mitarbeiter (1997) entwickelten einen ELISA, die mit rekombinanten Antigenen arbeitet. Zwei Proteine aus den dichten Granula, 33 und 36 kDa schwer, wurden geklont. Diese Antigene unterscheiden zwischen infizierten Tieren und der nicht infizierten Kontrollgruppe. Die Suche nach Kreuzreaktionen mit *T. gondii*, *S. cruzi*, *S. hominis* und *S. hirsuta* verlief negativ. Antikörper gegen diese rekombinanten Antigene konnten in Kühen nachgewiesen werden, die *N. caninum*-infizierte Foeten abortierten und in Kälbern, die von seropositiven Müttern stammen (JENKINS et al., 1997). Allerdings konnten mit Hilfe dieser Methode keine Antikörper in Foeten gefunden werden (WOUDA et al., 1997a).



### **8.2.2 Indirekter Immunfluoreszenz Test (IFAT)**

Aus Zellkulturen gewonnene *N. caninum*- Tachyzoiten werden mit dem zu testenden Serum inkubiert. Vorhandene Antikörper binden an die Tachyzoiten und können durch fluoreszierende Reagenten sichtbar gemacht werden. Der erste Test dieser Art wurde von DUBEY und Mitarbeitern (1988a) bei Hunden beschrieben. Der IFAT wird bei den serologischen Methoden am häufigsten durchgeführt und gilt als sehr spezifisch, da sehr wenig Kreuzreaktionen mit *T. gondii* vorkommen (DUBEY und LINDSAY, 1996). Er kann mit Blut, Cerebrospinalflüssigkeiten und Serum durchgeführt werden (BARR et al., 1995). Die sogenannten Cut-off-Titer, die eine positive Reaktion kennzeichnen, liegen je nach Methode und Testdurchführung zwischen 1:160 und 1:640. Deshalb ist auch ein positives Ergebnis nicht immer als absolut sicher zu betrachten (HEMPHILL, 1999; PARÉ et al., 1995b). Die gesamte Tachyzoiten-Oberfläche soll fluoreszieren, da eine apikale Fluoreszenz auch in Seren von nicht infizierten Tieren durch eine unspezifische Bindung an Serumkomponenten grundsätzlich möglich ist (DUBEY und LINDSAY, 1996). Ein weiteres Problem besteht darin, daß die Titer der Kühe nach einem Abort abfallen und auch während der Trächtigkeit beträchtlich variieren können (CONRAD et al., 1993b).

### **8.2.3 Agglutinations-Test**

Agglutinations-Tests machen sich Reaktionen zwischen Antigen und Antikörper nach der Anbindung zu nutze (PACKHAM et al., 1998; ROMAND et al., 1998). Die Antikörperbindung setzt ein korpuskuläres Antigen voraus und führt zur Verklumpung (KREUTZIG, 1994).

### **8.3 Erregernachweis (direkter Nachweis)**

Hierbei wird nach den Tachyzoiten, Gewebszysten oder charakteristischen histopathologischen Veränderungen gesucht (HEMPHILL, 1999).

### **8.3.1 Histologie**

#### **8.3.1.1 Lichtmikroskopie**

Histologische Untersuchungen mittels Lichtmikroskop werden an Geweben durchgeführt, die mit Paraformaldehyd fixiert und in Paraffin eingebettet sind. Schnitte von 3 bis 4 µm werden auf einen Objektträger aufgezogen und gefärbt (GOTTSTEIN et al., 1999). Die Methode eignet sich zur Unterscheidung zwischen Gewebssystemen von *N. caninum* und *T. gondii*. Die Gewebssysteme von *N. caninum* werden v.a. in neuronalen Zellen gefunden, wohingegen die Zysten von *T. gondii* in vielen Organen nachzuweisen sind. Das Vorhandensein einer wallartigen Umgebung deutet auf eine länger bestehende Infektion mit immunologischer Reaktion des Wirtes hin. Bei frisch oder chronisch latent infizierten Tieren liegt keine wallartige Umgebung vor (DUBEY und LINDSAY, 1996; HEMPHILL, 1999). Bei einer akuten Infektion werden die Tachyzoiten in verschiedenen Organen gefunden. Im Zentralnervensystem werden die Herde durch einen zentralen nekrotischen Fokus charakterisiert, der durch Entzündungszellen umgeben ist (HEMPHILL, 1999). Weitere Merkmale, die auf eine Neosporose hindeuten werden in Punkt 9 erwähnt.

#### **8.3.1.2 Elektronenmikroskopie**

Die Untersuchung von Gewebe im Transmissionselektronenmikroskop ermöglicht eine Unterscheidung zwischen den differentialdiagnostisch in Betracht kommenden Protozoen. Diese Technik ist zeitaufwendig. Es müssen meist mehrere Gewebeschnitte aus verschiedenen Organen untersucht werden, bis ein Parasit aufgefunden wird, weshalb diese Technik nicht zur Routine-Diagnostik geeignet ist (HEMPHILL, 1999).

### **8.3.2 Immunhistochemie**

Die Aufbereitung der Gewebe erfolgt wie bei der Histologie. Zusätzlich werden die Schnitte rehydriert und die unspezifischen Bindungsstellen mit Ziegen Serum blockiert. Anschließend werden die Schnitte mit Anti-Neospora-Kaninchen-Hyperimmunserum inkubiert (GOTTSTEIN et al., 1999; HEMPHILL et al., 1996; PATITUCCI, 1995).

Mehrere polyklonale Antiseren wurden bereits als Reagenten entwickelt. Sie wurden mit Hilfe von kultivierten Tachyzoiten hergestellt und können die Protozoen sichtbar machen (DUBEY und LINDSAY, 1996). Allerdings kam es in vielen Untersuchungen zu Kreuzreaktionen mit antigenetischen Komponenten anderer Protozoen, wie *T. gondii* oder Sarcosysten. Prinzipiell kann es zu unspezifischer Anbindung kommen. Dies hängt auch von der Art der verwendeten Gewebe, der Fixierung und dem Frischegrad der Gewebe ab (HEMPHILL, 1999). Um Kreuzreaktionen zwischen *N. caninum* und *T. gondii* zu vermeiden, wurden monoklonale Antikörper generiert, die ausschließlich mit Gewebszysten und Tachyzoiten von *N. caninum* reagieren (COLE et al., 1993). Antikörper, die mit Antigenen des apikalen Komplexes der *N. caninum*-Tachyzoiten reagierten, zeigten keine Kreuzreaktion mit *T. gondii* (BJÖRKMAN und HEMPHILL, 1998).

Auch polyklonale Antikörper, die gegen die Oberflächenproteine Nc-p36 (HEMPHILL und GOTTSTEIN, 1996) und Nc-p43 (HEMPHILL et al., 1997a) gerichtet sind, stehen heute zur Verfügung. Nc-p36 befindet sich sowohl auf den Tachyzoiten als auch den Bradyzoiten, während Nc-p43 nur auf Tachyzoiten zu finden ist. Hier sind keine Kreuzreaktionen mit *T. gondii* beobachtet worden (FUCHS et al., 1998).

### 8.3.3 Polymerase Chain Reaktion (PCR)

Mit dieser Methode können spezifische DNA-Sequenzen vervielfältigt werden. In einem geschlossenen Reaktionsgefäß findet durch Erhitzung die Trennung der Helix statt. Bei schneller Abkühlung hybridisieren zugegebene Primer mit jeweils einem Strang und bei nochmaliger Erwärmung wird der gesuchte DNA-Bereich mit Hilfe der DNA-Polymerase verlängert (STRYER, 1988).

Es muß mit exakten Temperaturen gearbeitet werden und eine Kontamination vermieden werden (ELLIS et al., 1999).

Verschiedene Sequenzen werden für die Diagnose herangezogen, z.B. die ITS1-Sequenz zwischen 5,8 S und 16 S rRNA-Genen (HOLMDAHL und MATTSON, 1996), die ITS-Sequenz zwischen 5,8 S und 18 S rRNA-Genen (PAYNE und ELLIS, 1996), die kleinen Untereinheiten der rRNA-Gensequenzen und die Hybridisierung mit *Neospora*-spezifischen Oligonukleotiden (HO et al., 1996; 1997a), ein Fragment der 14-3-3 Gene (LALLY et al., 1996a) und ein *Neospora*-spezifische DNA-Sequenz, Nc5 (KAUFMANN et al., 1996; MÜLLER et al., 1996; YAMAGE et al., 1996).

Die PCR stellt einen besonders sensible und zuverlässige Methode im Nachweis von Neosporen dar, da bereits kleinste Mengen an Parasiten-DNA zur Vervielfältigung und Diagnose ausreichen (BELL et al., 2002; GOTTSTEIN et al., 1999; HO et al., 1997b; LIDDELL et al., 1999b).

#### **8.3.4 Diagnostische In-vitro-Kultivierung**

Auf die Technik der In-vitro-Kultivierung wurde bereits in Punkt 4 eingegangen. Als problematisch stellte sich die tatsächliche Nachweisbarkeit heraus, da dies in einer Studie von CONRAD und Mitarbeitern (1993a) nur in zwei von 100 abortierten Foeten gelang. Die Kontamination mit Bakterien und das notwendige Vorhandensein von intakten Gewebssystemen wird als Grund angegeben (GOTTSTEIN et al., 1999; HEMPHILL, 1999).

#### **8.4 Tierversuch**

Da die Inokulierung von infiziertem Gewebe in Mäuse bei der Diagnostik von *T. gondii* (DUBEY und BEATTIE, 1988) erfolgreich durchgeführt wurde, wurde diese Möglichkeit auch bei der Identifikation von Neosporen eingesetzt. Die Schwierigkeiten bestehen darin, daß Mäuse keine besonders empfängliche Wirte darstellen (HEMPHILL, 1999). Die Inokulierung in andere Versuchstiere zu diagnostischen Zwecken erwies sich ebenfalls als ungeeignet, da außer Temperaturerhöhungen (GOTTSTEIN et al., 1999) keine klinische Symptomatik auftrat. Die Zeitspanne zwischen Inokulierung und Abort variiert Tierart abhängig. Die Inokulierung erfolgte in viele Tierarten, konnte sich aber nicht als Nachweismethode der Neosporose etablieren, sondern dient vor allem der Forschung nach den Krankheitszusammenhängen (BARR et al., 1993; BUXTON et al., 1997b; DUBEY et al., 1996a; LINDSAY et al., 1995b; SCHARES et al., 2001a, b).

## 9. PATHOLOGIE UND HISTOPATHOLOGIE

### 9.1 Pathologie und Histopathologie der abortierten Foeten

Infizierte und abortierte Foeten sind frisch, können aber auch mumifiziert oder im Stadium der Autolyse sein. In der Regel weisen abortierte Foeten oder Totgeburten keine typischen makroskopischen Veränderungen auf. Manchmal werden blasse bis weiße Herde in der Skelettmuskulatur und im Herz beschrieben (CONRATHS und SCHARES, 1999). Zum Nachweis eines *N. caninum*-assoziierten Abortes ist jedoch eine histologische Untersuchung des Foetus unabdingbar (REICHEL, 1996; REICHEL und DRAKE, 1996).

Histopathologisch lassen sich in Zentralnervensystem, Herz, Skelettmuskulatur und Leber degenerative und entzündliche Veränderungen feststellen (ILLANES et al., 1994; SCHOCK et al., 2000). Als charakteristisch gilt die nonsuppurative Enzephalomyelitis. Nekrosen treten seltener auf (BARR et al., 1990; OTTER et al., 1995; SAGER et al., 2001).

In einer Studie mit 82 Foeten wurden die Entzündungsreaktionen prozentual festgehalten. Es lagen Enzephalitis und Myokarditis in 100 %, Entzündung der Nebenniere in 80 %, Myositis in 72 %, Nephritis in 66 %, Hepatitis in 62%, Plazentitis in 53 % und Pneumonie in 44 % der Fälle vor (BARR et al., 1990).

Foeten, die im letzten Trächtigkeitsdrittel abortiert wurden, zeigen häufig Gliaproliferationen (DUBEY et al., 1992b). Manchmal sind Kalzifizierungen nachweisbar (BOULTON et al., 1995; DUBEY et al., 1998a). Schwerwiegende Läsionen am Myokard werden häufig durch Autolyse maskiert (DUBEY und LINDSAY, 1996; DUBEY et al., 1990e). Der Erregernachweis gelingt hauptsächlich in Gehirn, Herz und Leber. Die Tachyzoiten liegen extra- oder intrazellulär (DUBEY et al., 1992b). Gewebiszysten werden v. a. in Neuronen gefunden. Sie liegen nicht in den Entzündungsbereichen und zeigen keine zellulären Reaktionen in den angrenzenden Bereichen (OGINO et al., 1992). Es gelingt nicht bei jedem *N. caninum*-assoziierten Abort, den Erreger selbst nachzuweisen, da seine Anzahl im Gehirn sehr gering sein kann (NIETFIELD et al., 1992; OTTER et al., 1995).

Des weiteren ist mit Entzündungserscheinungen in der Skelettmuskulatur, Herz, Leber, Lunge, Niere und Plazenta zu rechnen (BARR et al., 1990; WOUDA et al., 1997b). Auch Gewebiszysten in der Skelettmuskulatur können nachgewiesen werden (PETERS et al., 2001).

Eine Studie in den Niederlanden beschäftigte sich mit der Verteilung der Parasiten in Organen von 90 abortierten Foeten, bei denen *N. caninum* als Abortursache feststand. In 91 % der Fälle waren Veränderungen in Gehirn, Herz und Leber vorhanden. In 9 % lagen sie in zwei Organen vor, wobei in allen, außer einem Fall Veränderungen im Gehirn vorlagen (BOULTON et al., 1995).

Histologische Läsionen gibt es auch in der Plazenta. Da die Plazenta aber schnell in Autolyse übergeht, spielt sie diagnostisch eine untergeordnete Rolle (WOUDA, 2000).

Bezüglich des Alters der abortierten Foeten fiel auf, daß drei bis viermonatige Foeten weniger markante Gehirnläsionen aufwiesen als ältere Früchte. Tachyzoiten konnten im Herz der drei bis viermonatigen Foeten öfter nachgewiesen werden als in den Herzen der älteren Aborte (WOUDA et al., 1997b).

## **9.2 Pathologie und Histopathologie der kongenital infizierten Kälber**

Auf die Pathologie mit Mißbildungen und neurologischen Ausfällen wurde bereits in Punkt 7.2 eingegangen.

Bei allen lebend geborenen und infizierten Kälbern war die Krankheit hauptsächlich auf das Zentralnervensystem beschränkt (DUBEY und LINDSAY, 1996). Makroskopisch sichtbare Veränderungen bestanden in Malazie (O'TOOLE und JEFFREY, 1987) und Verengungen der Wirbelsäule (BARR et al., 1991b; BRYAN et al., 1994; DUBEY et al., 1990a).

Auch bei den kongenital infizierten Kälbern ist das Charakteristikum einer Neosporose eine nonsuppurative Enzephalomyelitis. Sie geht mit einer Hyperplasie des Neurogliagewebes und Nekrose einher (siehe Abb. 6). Im Zentralnervensystem werden häufiger Gewebszysten nachgewiesen als in abortierten Foeten. Es scheint jedoch, als wären mehr Gewebszysten im Rückenmark als im Gehirn gelegen (BARR et al., 1991b). Auch bei einer adulten, natürlich infizierten Kuh konnte eine Enzephalitis diagnostiziert und der Erreger *N. caninum* aus dem Gehirn isoliert werden (SAWADA et al., 2000).

Einen besonderen Fall stellte ein vier Wochen altes Hereford Kalb dar, das zum Zeitpunkt der Geburt und bis zum Alter von zwei Wochen klinisch völlig unauffällig war. Es wurde wegen neurologischer Ausfälle euthanasiert. Es lagen Veränderungen im Zentralnervensystem und der Muskulatur vor. Eine große Anzahl von Tachyzoiten konnte in diesen Geweben gefunden werden (DUBEY et al., 1992b). Dies ist das älteste Kalb, bei dem klinisch eine Neosporose

vermutet wurde. Es ist davon auszugehen, daß die meisten Tiere mit klinischer Neosporose in den ersten Lebenswochen verenden (DUBEY und LINDSAY, 1996). Ob das Kalb kongenital infiziert war oder postnatal den Parasiten aufgenommen hat, konnte nicht mit Sicherheit festgestellt werden (DUBEY et al., 1992b).



**Abb. 6:** Zentraler Nekroseherd mit Infiltration mononukleärer Zellen im Großhirn eines abortierten Kalbes (nach JARDINE und LAST, 1993)

### 9.3 Abortpathogenese

Bei seropositiven Kühen steigt der Antikörper-Titer vier bis fünf Monate vor dem Geburtstermin an. Diese Beobachtung führt zu der Annahme, daß es sich dabei um eine wiederaufflackernde chronische Infektion handelt. Über diesen Mechanismus ist aber wenig bekannt. Es wird angenommen, daß es während der Trächtigkeit zu einer Parasitämie kommt und daraufhin der Foetus infiziert wird. Allerdings gibt es bisher nur einen Bericht, in dem *N. caninum* im Gehirn einer adulten Kühe nachgewiesen werden konnte (SAWADA et al., 2000). Es kann also über eine Aktivierung einer latenten Gewebszyste durch die immunsupprimierende Trächtigkeit spekuliert werden, ein derartiger Mechanismus konnte aber bisher nicht nachgewiesen werden.

Geht man nicht von einer latenten Infektion aus, sondern infiziert Kühe oral mit Tachyzoiten, kann der Foetus bereits vier Wochen später infiziert sein. Läsionen an der Plazenta und dem ZNS mit Enzephalitis waren hier die diagnostizierten Veränderungen. Ob die Veränderungen der Plazenta durch die Multiplikation der Parasiten oder durch die Immunantwort des Muttertieres entstehen ist nicht bekannt. Sicher ist aber, daß früh infizierte Foeten absterben (BUXTON et al., 2002; DUBEY, 2003).



## **10. DIFFERENTIALDIAGNOSTISCH RELEVANTE ERREGER**

Zu den Erregern, die differentialdiagnostisch in Frage kommen, zählen als infektiöse Auslöser Parasiten, Bakterien, Viren und Pilze. Zu nicht infektiösen Abortauslösern gehören Intoxikationen, verschiedene Medikamente und unterschiedliche physikalische Einflüsse.

### **10.1 Infektiöse Auslöser**

#### **10.1.1 Parasiten**

Im deutschsprachigen Raum liegt die Nachweisrate der durch Parasiten induzierten Aborte unter 1% (HÄSSIG et al., 1991).

##### **10.1.1.1 *Toxoplasma***

Der Lebenszyklus des Parasiten *T. gondii* läuft einwirtig oder fakultativ zweiwirtig ab. Den Endwirt stellen Katzen dar. Ist kein Zwischenwirt verfügbar, laufen geschlechtliche und ungeschlechtliche Phasen in Feliden (Hauskatzen, Wildkatzen, Ozelot) ab. Die Katzen scheiden Oozysten mit dem Kot aus, über den sich die Zwischenwirte, z. B. Säugetiere, Vögel, Reptilien, aber auch Menschen, infizieren können (ROMMEL, 2000). Toxoplasmen weisen eine ähnliche Morphologie wie *N. caninum* auf und durchlaufen die gleichen Entwicklungsstadien. Rinder werden unter natürlichen Bedingungen nicht durch *T. gondii* infiziert (DUBEY und BEATTIE, 1988). Allerdings ist *T. gondii* ein wichtiger Abortauslöser bei kleinen Wiederkäuern (LINDSAY et al., 1995b). Die Infektion erfolgt durch Aufnahme von zystenhaltigem Fleisch, von Oozysten aus Katzenkot oder durch diaplazentare Infektion. Klinisch zeigt sich die Infektion durch Aborte, Fruchtresorption, Totgeburten, Geburt lebensschwacher oder klinisch gesunder, aber infizierter Nachkommen (HERBERT, 1986). Die Infektionswege und Symptome sind mit denen von *N. caninum* vergleichbar. Außerdem sind die Oozysten beider Parasiten nicht von einander zu unterscheiden.

Zur Diagnose lassen sich zahlreiche Verfahren heranziehen, wie Tierversuch (DEROUIN et al., 1987), Sabin-Feldman-Test (SFT), Indirect hemagglutination test (IHA),

Indirect fluorescent antibody test (IFAT), Direct agglutination test (DAT), Latex agglutination test (LAT), ELISA, Immunoabsorbent agglutination assay test (IAAT) (DUBEY und BEATTIE, 1988) sowie die histologische Untersuchung (DUBEY, 1993). Jedoch sind bei den serologischen Verfahren hin und wieder Kreuzreaktionen möglich.

#### **10.1.1.2 *Hammondia***

Die Entwicklung des Erregers *H. heydorni* läuft in zwei Wirten (obligat heteroxen) ab. Der Endwirt (Hund, Fuchs oder Kojote) scheidet die Oozyste mit dem Kot aus, die in der Umwelt sporuliert. Als Zwischenwirte dienen Hauswiederkäuer, Wasserbüffel, Hunde, Meerschweinchen, Rentiere, Elche, Rehe, Affen und Kamele, die die sporulierten Oozysten aufnehmen. Im Dünndarm findet die Endodyogenie statt. In der Muskulatur bilden sich Zysten aus. Der Endwirt frißt den infizierten Zwischenwirt und in seinem Dünndarm wird die Schizogonie durchlaufen. Anschließend folgen Gamogonie und Gametogamie. Die Infektion erfolgt durch Aufnahme von sporulierten Oozysten aus der Umwelt oder orale Aufnahme infizierter Zwischenwirte (ROMMEL, 1989).

Mit *H. hammondi*, deren Endwirte Katzen darstellen, konnte keine Infektion in Rindern und Schafen ausgelöst werden (ROMMEL, 1989).

Die Klinik verläuft weitgehend symptomlos. Selten zeigt sich Durchfall und Anorexie der Nachkommen (BLAGBURN et al., 1988). *N. caninum* weist eine ähnliche Morphologie, und einen ähnlichen Entwicklungszyklus auf. Die Endwirte von *N. caninum* und *H. heydorni* sind gleich und beide weisen ein großes Spektrum an Zwischenwirten auf. Außerdem sind die Oozysten nicht voneinander zu unterscheiden (SCHARES et al., 2001b).

Die Diagnose läßt sich durch Tierversuch und Serologie mittels SFT und ELISA stellen.

#### **10.1.1.3 Weitere Parasiten**

Der Erreger *Tritrichomonas foetus* lebt auf der Schleimhautoberfläche der weiblichen und männlichen Geschlechtsorgane und vermehrt sich durch Längsteilung (Mitose) (SCHWEIGHART, 1991). Die Infektion erfolgt venerisch (LINDSAY et al., 1996b).

Klinisch zeigen sich bei der Kuh Frühaborte, bis ca. zum vierten Monat, seltener Spätaborte, Konzeptionsstörungen, Mumifikationen, Pyometra und Vaginitis. Beim Bullen

hingegen verläuft die Infektion meist symptomlos. Selten tritt eine Balanoposthitis auf (LINDSAY et al., 1996b). Mikroskopisch läßt sich der Erreger im Nativpräparat oder durch Kultivierung nachweisen. Die Proben sollten von den Geschlechtsorganen, Foeten oder Eihäuten stammen (YULE et al., 1989). Ähnlichkeiten mit *N. caninum*-Infektionen zeigen sich in den Symptomen Aborte, Konzeptionsstörungen und Mumifikationen.

*Babesia (B.). divergens, B. major, B. bovis, B. bigeminata* und *B. ovata* befallen die Erythrozyten und werden durch Zecken, in Deutschland hauptsächlich durch *Ixodes ricinus*, übertragen. Über den Speichel der Überträgerzecke dringen Sporozoiten in die Blutbahn und die Erythrozyten des Rindes ein. Durch Zweiteilung entstehen Merozoiten, die weitere Blutkörperchen befallen. Die Infektion wird in den Zecken transovariell weitergegeben oder findet durch Aufnahme von babesienhaltigen Erythrozyten statt. Im Zeckendarm entwickeln sich männliche und weibliche Gamonten, die sich zu Makro- und Mikrogameten differenzieren. Nach der Verschmelzung zur Zygote entstehen daraus Kineten. Diese befallen die Epithelzellen des Darmes und vermehren sich durch Bildung von Sporokineten, die andere Organe, v. a. das Ovar, befallen und somit auf die Nachkommen übertragen werden. Nach dem Schlüpfen der Larve dringen die Sporokineten in die Speicheldrüse ein und schließen die Sporogonie ab. Mit dem Speichel erfolgt die Infektion der Wiederkäuer durch Zeckenbiß (ROMMEL, 2000).

Klinische Erscheinungen sind Fieber, Pansenparese, Durchfall, Anämie, Ikterus, Hämoglobinurie, Aborte und Festliegen. Hier sind es die Aborte, die die Babesien-Infektion zu einer Differentialdiagnose der *N. caninum*-Infektion werden lassen.

Die Diagnose erfolgt durch Mikroskopie des gefärbten Blutaussstriches und mit KBR, ELISA, IFAT, IHAT (ROMMEL, 2000).

### **10.1.2 Bakterien**

In 13% (HÄSSIG et al., 1991) bis 33% (SCHWEIGHARDT, 1991) der untersuchten Fälle konnten bakterielle Erreger als Ursache für Aborte nachgewiesen werden.

### 10.1.2.1 *Brucella*

Die Erreger *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* und *Brucella suis* (N.N., 2001b) siedeln sich bei trächtigen Tieren hauptsächlich im Uterus an und verursachen eine Plazentitis, die die Ernährung des Foetus beeinträchtigt. Bei nicht-tragenden Tieren siedeln sich die Brucellen im Euter an. Werden die Tiere trächtig, wandern die Erreger in den Uterus und nach dem Abort zurück in das Euter (GEDEK et al., 1993).

Die Infektion erfolgt venerisch, oral über Schleimhäute, über verletzte Hautstellen durch kontaminiertes Futter, Einstreu oder Milch. Auch durch Kontakt mit infizierten Tieren, die nach einem Abort über Eihäute und Fruchtwasser massiv Erreger ausscheiden, läßt sich eine Infektion verbreiten (GEDECK et al., 1993).

Klinische Erscheinungen sind nekrotisierende Plazentitis, Aborte im letzten Drittel der Trächtigkeit, Nachgeburtshalten, Endometritis und Geburt toter oder lebensschwacher Kälber (N.N., 2001b). Nach oraler Infektion können auch bei *N. caninum* ähnliche Symptome auftreten.

Diagnostische Abklärung kann durch Mikroskopie von Abstrichpräparaten der Kotyledonen, kulturellen Erregernachweis aus Milch, Sperma, Foeten oder Nachgeburtsteilen, KBR mit Blutserum, Langsamagglutination (LA) mit Sperma, Milchserum, Blutserum, oder Abortus-Bang-Ringprobe (ABR) mit Vollmilch erfolgen (GEDEK et al., 1993).

### 10.1.2.2 *Leptospira*

Die Erreger *Leptospira (L.) pomona*, *L. grippityphosa* und *L. icterohaemorrhagiae*, *L. hardjo*, *L. saxkoebing* und *L. australis* dringen durch die Schleimhaut oder verletzte Haut in die Blutbahn ein und siedelt sich in verschiedenen Organen an. Ab dem achten Tag post infectionem treten Antikörper auf, die die Leptospiren zerstören. Trotzdem kommt es zur Schädigung der Erythrozyten. Werden sie aus dem Blut eliminiert, siedeln sie sich in den Nieren an und werden über den Harn ausgeschieden (GEDEK et al., 1993).

Die Infektion erfolgt oral über kontaminiertes Futter und Wasser. Ausscheider sind die Rinder selbst oder Nager und Füchse.

Aborte und sinkende Milchleistung treten auf (N.N., 2001e; SMITH et al., 1997). Orale Infektion, sinkende Milchleistung und Aborte erinnern an eine *N. caninum*-Infektion.

Die Diagnose kann durch Mikroagglutinationsreaktion (MAR), IFT, Hämolysetest oder durch Erregernachweis in Blut oder Milch erfolgen (GEDEK et al., 1993).

### **10.1.2.3 *Chlamydia***

Der Erreger *Chlamydia psittaci* ist weltweit verbreitet. Größere Bestände mit mangelnder Futterqualität, schlechten Haltungsbedingungen oder zu hoher Leistungsanforderungen sind am ehesten betroffen (Faktorenkrankheit). Die Chlamydien siedeln sich u. a. in der Plazenta an und vermehren sich dort. Eine Nekrose der Kotyledonen führt zum Abort. Über das Fruchtwasser werden massenhaft Erreger ausgeschieden. Nach einer Infektion scheint eine dauerhafte Immunität zu bestehen (DANNAT et al., 1998; WEBER und BAUER, 1991).

Die Infektion erfolgt durch Einatmen von erregerhaltigem Staub, durch Läuse, Milben, Zecken oder Aufnahme von kontaminiertem Futter und Wasser (GEDEK et al., 1993).

Klinisch ist u. a. mit Enzephalomyelitis, Plazentitis und Aborten im letzten Trächtigkeitsdrittel zu rechnen (WEBER et al., 1997). Ähnlichkeiten mit *N. caninum*-Infektionen bestehen in den Aborten, der oralen Infektionsmöglichkeit und der Enzephalomyelitis.

Die Diagnostik kann durch direkten Erregernachweis mittels Mikroskopie, im Tierversuch, in einer Dottersackkultur oder serologisch durch eine KBR erfolgen (GEDECK et al., 1993).

### **10.1.2.4 *Coxiella***

Der Erreger *Coxiella burnetii* siedelt sich nach einer bakteriämischen Phase im Uterus an, wo er sich durch transversale Teilung vermehrt. Es kommt zur Plazentitis und zur Infektion der Foeten (N.N., 2001i).

Die Tiere infizieren sich kongenital, diaplazentar, kutan durch Zecken (*Dermacentor reticularis*), oral durch Aufnahme kontaminierter Nachgeburten, Futter, Einstreu oder nasal durch Inhalation von erregerhaltigem Staub oder Zeckenkot (GEDEK et al., 1993).

Klinisch zeigen sich Metritis, Milchrückgang, Unfruchtbarkeit, Retentio secundinarum, Brunstlosigkeit, Geburt lebensschwacher Kälber und Aborte, hauptsächlich ab dem 6. Monat,

aber auch schon früher (WEBER et al., 1997). Die kongenitale, diaplazentare oder orale Infektion, der Milchrückgang, die Fruchtbarkeitsprobleme, Aborte und Geburt lebensschwacher Kälber können auch bei einer Infektion mit *N. caninum* auftreten.

Die Diagnose kann durch die Serologie mit KBR, Agglutinations-, Neutralisations- und Opsonintest gesichert werden. Außerdem eignen sich Ausstrichpräparate von Kotyledonen zum mikroskopischen Erregernachweis (GEDEK et al., 1993).

#### **10.1.2.5 Mykoplasma**

*Mycoplasma (M.) bovis* wird mit der Milch, dem Lochialsekret und Bindehautsekret ausgeschieden. Nach der oralen Infektion wandert der Erreger hämatogen zu den Augen, Euterlymphknoten und Gelenken. *M. bovis genitalium* befällt die Genitalschleimhaut (GEDEK et al., 1993).

Die Tiere infizieren sich galaktogen oder venerisch über die Schleimhaut. Bei Kühen treten Salpingitis, Bursitis, Endosalpingitis, Endometritis, Aborte ab dem 5. Trächtigkeitsmonat, Geburt lebensschwacher Kälber (*M. bovis genitalium*), Mastitis, Euteratrophie, Arthritis, und Konjunktivitis (*M. bovis*) auf (N.N., 2001g). Aborte und Geburt lebensschwacher Kälber treten auch bei *N. caninum*-Infektionen auf. Der Erregernachweis gelingt aus Milch, Lymphknoten, Nachgeburt und Foeten (GEDEK et al., 1993).

#### **10.1.2.6 Salmonella**

Die Erreger *Salmonella typhimurium*, *Salmonella dublin* und *Salmonella abortus bovis* werden oral aufgenommen, dringen in die Darmwand und die Lymphknoten von Caecum und Ileum ein und breiten sich aus (N.N., 2001j).

Die Erregerausscheidung erfolgt in Kot, Harn, Milch und Gebärmuttersekret. Latent infizierte Tiere stellen als Dauerausscheider das Erregerreservoir dar. Die Infektion findet oral über den Verdauungskanal durch kontaminiertes Futter oder Wasser statt (GEDEK et al., 1993).

Chronisch infizierte Tiere verwerfen im 4. bis 8. Trächtigkeitsmonat. Ähnlichkeiten mit *N. caninum*-Infektionen liegen in der oralen Infektionsmöglichkeit und den Aborten.

Bakteriologische Untersuchungen von Milch, Lochialsekret, Kot, Harn (GEDECK et al., 1993) oder Mageninhalt des Foetus untermauern die Verdachtsdiagnose (N.N., 2001j).

#### **10.1.2.7 *Listeria***

*Listeria monocytogenes* gelangt über den Verdauungskanal oder die Nasenschleimhäute in die Lymph- und Blutbahn. Der Foetus wird über die Nabelvene infiziert. Auch eine neurogene Streuung ist möglich (N.N., 2001f).

Die Infektion erfolgt oral durch Aufnahme schlecht durchsäuerter Silage oder infizierter Nachgeburtssteile. Auch eine nasale Infektion ist möglich.

Bei der Meningoenzephalitis zeigen sich Bewegungsstörungen, Herabhängen von Ohren und Zunge, Lehnen gegen Wände, Reizbarkeit, Koma und Absonderung der betroffenen Tiere. Die septikämische Form tritt vor allem bei Jungtieren mit Fieber, Saugschwäche und Tod in Erscheinung. Beim metrogenen Verlauf zeigen sich Mastitis, Metritis, und wie bei *N. caninum*-Infektionen Aborte zwischen 4. und 7. Monat, Totgeburten, Geburt lebensschwacher Kälber und Retentio secundinarum. Auch bei *N. caninum* ist eine orale Infektion über infizierte Nachgeburtssteile denkbar. Listerien können wie Neosporen aus foetalem Gehirn, Leber, Milz, Magen oder Kotyledonen isoliert werden (N.N., 2001f).

#### **10.1.2.10 Weitere Bakterien**

Des weiteren können *Escherichia coli*, *Haemophilus somnus*, *Mykobacterium (M.) bovis* und *M. paratuberculosis*, Kokken, *Pateurella multocida*, *Bacillus cereus* (DE KRUIF, 1993), *Arcanobacterium pyogenes* (GEDEK et al., 1993; LÄMMLER und HARTWIGK, 1995; N.N., 2001h) und *Campylobacter fetus venerealis* bzw. *Campylobacter fetus fetus* (GEDEK et al., 1993; N.N., 2001k) Aborte verursachen.

#### **10.1.3 Viren**

Die durch Viren verursachte Abortrate schwankt zwischen 7% und 13% (HEILFRANKE et al., 1993; LOTTHAMMER, 1991).

### 10.1.3.1 IBR-IPV-Viren

Das Bovine Herpesvirus 1 (BHV 1) wird bei der respiratorischen Form (Infektiöse Bovine Rhinotracheitis; IBR) über die Sekrete der respiratorischen Schleimhäute und das Konjunktivalsekret ausgeschieden. Durch lymphohämato gene Ausbreitung und Virämie siedelt sich das Virus in den oberen Luftwegen, der Lunge und den Konjunktiven an. Latente Infektionen können durch Streßfaktoren und Immunsuppression reaktiviert werden (FREY, 1997b).

Bei der genitalen Form (Infektiöse Pustulöse Vulvovaginitis, IPV) wird das Virus über die Sekrete der Genitalschleimhaut und Sperma ausgeschieden. Die Tiere infizieren sich bei der IBR über Maul- und Nasenschleimhäute und bei der IPV venerisch. Auch durch Insemination von kontaminiertem Sperma kann eine Rind infiziert werden (FREY, 1997a; GEDEK, 1993).

Bei beiden Formen sind wie bei *N. caninum*-Infektionen Aborte möglich. Besonders häufig tritt er drei bis acht Wochen nach Auftreten der respiratorischen Form auf (N.N., 2001d).

Die Diagnose kann durch ELISA oder NT aus Nasen- bzw. Konjunktival-, oder Vaginaltupferproben erfolgen (N.N., 2001d).

### 10.1.3.2 BVD-Virus

Das Bovine Virusdiarrhoe Virus (BVDV) wird v.a. im Nasensekret, aber auch in Urin, Sperma, Uterus-, Geburts- und Augensekreten ausgeschieden (MOENNIG, 1997). Die oronasale Infektion kann entweder durch direkten Kontakt oder über kontaminiertes Futter und Wasser stattfinden (N.N., 2001c).

Eine Infektion im ersten Trächtigkeitsdrittel führt zum Abort (BJÖRKMANN et al., 2000), wohingegen die Infektion im zweiten Drittel zur Geburt ZNS- geschädigter Kälber führt. Diese Symptome und die orale Infektionsmöglichkeiten liegen auch bei *N. caninum*-Infektionen vor. Eine Infektion kann durch ELISA oder Virusisolierung aus Zellkulturen nachgewiesen werden.



### 10.1.3.3 Weitere Viren

Des Weiteren verursachen das Rinderpest- (HARDER, 1997), Parvo-, Bluetongue-, Myxo-, Maul- und Klauenseuche- und Akabanevirus Aborte (DE KRUIF, 1993).

### 10.1.4 Pilze

Die Abortrate in Deutschland beträgt bis zu 10%. Die Aborte finden v. a. im Winter statt (SCHWEIGHART, 1991). Pilze können als Differentialdiagnose einer *N. caninum*-Infektion in Betracht kommen.

#### 10.1.4.1 *Aspergillus*

*Aspergillus fumigatus* kann direkt über den Deckakt eine Gebärmutterinfektion auslösen. (GEDEK et al., 1993).

Symptome, wie Aborte, braun verfärbte und lederartige Eihäute weisen auf eine Aspergillus-Infektion hin. Im Kopfbereich des Foetus sind hin und wieder kreisförmige Hautveränderungen zu finden (WEBER et al., 1997).

Die Diagnose kann über die histologische Untersuchung des Plazentagewebes oder kulturelle Anzucht des Pilzes aus dem Labmageninhalt des Foetus oder Plazentagewebes gestellt werden (PLAGEMANN und WEBER, 1993).

#### 10.1.4.2 *Mucorales*

*Mortierella wolfii*, *Absidia* und *Mucor* setzen sich in den Lymphknoten der Atemwege fest (PLAGEMANN und WEBER, 1993; WEBER et al., 1997). Über hämatogene Streuung bilden sich Granulome in Lunge, Leber, Niere und Magen-Darm-Trakt (GEDEK et al., 1993). Eine nekrotische Plazentitis führt zum Abort. Die Tiere infizieren sich oronasal über kontaminiertes Futter. Es treten mykotische Plazentitiden und Aborte (N.N., 2001a). Eine kulturelle Anzucht der Pilze erhärtet die Verdachtsdiagnose.

### **10.1.4.3 *Candida***

Die Erreger *Candida (C.) albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. pseudotropicalis*, *C. guilliermondii* (GEDEK et al., 1993) sind weltweit verbreitet. Die Erreger siedeln sich v. a. im Verdauungstrakt, seltener im Atmungstrakt an.

Verschimmelter Futter stellt die Hauptinfektionsquelle dar. Der Pilz wird oronasal aufgenommen. Klinische Symptome bestehen in Mastitiden, Aborten, Durchfällen und typischen weißen Belägen im oberen Verdauungstrakt. Die Diagnose erfolgt mit Hilfe der Mikroskopie von Ausstrichpräparaten veränderter Plazentome (N.N., 2001a).

## **10.2 Nicht infektiöse Auslöser**

Hierzu werden Auslöser gezählt, die zu Fehl- und Frühgeburten führen, ohne daß es sich dabei um Erreger handelt. Diese Aborte treten meist vereinzelt auf. Allerdings kann es auch zu Häufungen kommen und so eine enzootisch-infektiöses Geschehen vortäuschen. Dies ist in Herden mit den gleichen, ungünstigen und Abort begünstigenden Einflüssen möglich (DE KRUIF, 1993).

### **10.2.1 Intoxikationen**

Durch die Aufnahme von mit Schadstoffen (Chlornaphthalin, Kupfer, Arsen, Herbizide) belasteten Futtermitteln, kontaminiertem Trinkwasser oder Giftpflanzen (Eibe, Jadebaum, Rost- und Brandpilze, Mutterkorn) kann es zu Aborten kommen. Auch gefrorenes Futter kann einen Abort begünstigen (DE KRUIF, 1993).

### **10.2.2 Medikamente**

Durch die Verabreichung von Medikamenten, die Einwirkungen auf die Eierstöcke und Gebärmutter haben, können Aborte induziert werden. Auf eine Behandlung mit Östrogenen, Glukokortikoiden, Oxytozin, Prostaglandin und Xylazin (in den letzten Trächtigkeitsmonaten) sollte verzichtet werden (DE KRUIF, 1993).

### **10.2.3 Physikalische Einflüsse**

Hierzu gehören tierärztliche Manipulationen und Eingriffe, aber auch umweltbedingte Einwirkungen auf die Tiere. Beispielsweise äußere Traumata wie Stöße, Stürze und Ausrutschen sowie rektale und vaginale Untersuchungen (DE KRUIF, 1993).

Schließlich ist anzumerken, daß sich infektiöse und nicht infektiöse Abortauslöser gegenseitig verstärken können. So kann eine mäßige Keimbesiedelung im Uterus durch synergistische Einflüsse, wie alimentäre, toxische, thermische oder traumatischer Noxen, zu einer Virulenzsteigerung des Keimes führen und so zum Abort führen.

Diagnostisch sind keine entzündlichen und degenerativen Prozesse an der Plazenta festzustellen und auch keine Keime nachweisbar (DE KRUIF, 1993).

## 11. IMMUNOLOGIE

Das Auftreten einer *N. caninum*-Infektion hängt hauptsächlich vom Immunsystem des Wirtes ab. Ein adulter Organismus mit intaktem Immunsystem scheint gut mit der Infektion zurecht zu kommen, während ein Foetus mit noch unvollständig ausgebildetem Immunsystem sehr anfällig ist (HEMPHILL et al., 2000a).

### 11.1 Natürliche Immunität

Natürlich infizierte Rinder weisen eine hohe diaplazentare Übertragungsrate von 81% bis 93% auf den Foetus auf (PARÉ et al., 1996; SCHARES et al., 1998). Obwohl es keine belastbare Immunität gibt, kommt es in den meisten Fällen zur Geburt klinisch unauffälliger Kälber und nur in unter vier Prozent zu wiederholten Aborten. Dies läßt darauf schließen, daß eine partielle Immunität besteht, die gegen wiederholte *N. caninum*-induzierte Aborte gerichtet ist (ANDERSON et al., 1995; MOEN et al., 1998; WOUDA et al., 1998b).

Man geht davon aus, daß die maternale Parasitämie den Tod des Embryos oder Foetus verursacht und frei werdende Tachyzoiten in die Plazenta gelangen. So wird die Plazenta geschädigt und der Abort ausgelöst. Die Parasitämie tritt nach erstmaliger Exposition, z.B. durch Aufnahme von Oozysten auf. Bei Annahme einer lebenslangen Persistenz von *N. caninum* können Streßfaktoren das Immunsystem schwächen und so dem Parasiten eine effizientere Vermehrung möglich machen. Deshalb kann auch ein Wiederaufflackern einer bereits bestehenden Infektion eine Parasitämie auslösen (HEMPHILL, 1999).

Faktoren, die einen Einfluß auf das Auftreten der Infektion haben, sind:

- Ausbildung des foetalen Immunsystems
- Effektivität der maternalen Immunantwort
- Zeitpunkt der Parasitämie in der Trächtigkeit
- Dauer und Umfang der Parasitämie (HEMPHILL et al., 2000a)

Eine diaplazentare Übertragung während der Frühträchtigkeit führt zum Tod des Embryos oder Foetus und zeigt sich nach Resorption der Fruchtteile in Unfruchtbarkeit (BARR et al., 1991a; 1994b). Infiziert man Rinder experimentell gegen Ende der

Trächtigkeit, gebären diese kongenital infizierte, jedoch klinisch unauffällige Kälber. Infektionen in der Mitte der Trächtigkeit führen zur diaplazentaren Übertragung des Parasiten und zur Geburt toter oder infizierter Kälber (WILLIAMS et al., 2000).

Einzelne Tiere, die zu Beginn der Tragzeit infiziert werden, übertragen den Parasiten nicht auf den Foetus. Dieses Phänomen läßt darauf schließen, daß eine *N. caninum*-Übertragung zu Beginn der Trächtigkeit bei einer frisch infizierten Mutter weniger wahrscheinlich ist. Kommt es jedoch zu einer Übertragung, ist mit sehr schweren Schäden des Foetus zu rechnen, da das Immunsystem noch unvollständig ausgebildet ist. Überlebt der Foetus, besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit, daß er diaplazentar mit *N. caninum* infiziert wird (HEMPHILL et al., 2000a).

Die meisten Berichte von *N. caninum*-assoziierten Aborten beschreiben ein vermehrtes Auftreten zwischen dem fünften und siebten Monat der Trächtigkeit (ANDERSON et al., 1991; MOEN et al., 1998). Ein möglicher Grund dafür wird im Verlauf des Progesteronspiegels während der Gravidität im Zusammenhang mit der sich verändernden Zellimmunität gesehen. Der Progesteronspiegel steigt zur Mitte der Trächtigkeit an und fällt dann ab. Abortpeaks zeigen sich zu Beginn und zum Ende der Trächtigkeit bei niedrigem Progesteronlevel. Dies bedeutet, daß um die Mitte der Trächtigkeit aufgrund der schlechten Zellimmunität keine Parasitenbekämpfung stattfinden kann (INNES et al., 2001b).

Eine Studie, die sich mit den sich verändernden Antikörper-Titern beschäftigte, untersuchte Korrelationen zwischen Titern und Aborten. Tiere mit ansteigenden Titern zum Ende der Trächtigkeit hin gebären mit hoher Wahrscheinlichkeit kongenital infizierte, aber klinisch unauffällige Kälber. Kühe mit einem ansteigenden Titer um die Mitte der Trächtigkeit haben ein hohes Risiko zu abortieren. Die Höhe der Antikörper reflektiert die Parasitämie im Wirt. Um in Zukunft genauere Aussagen über ein Abortrisiko machen zu können, sollen weitere Studien über Höhe, Zeitpunkt des Auftretens und Ansteigens der Antikörper-Titer Aufschluß geben (BJÖRKMAN et al., 1999).

Im Mausmodell wurde das Auftreten einer Infektion von folgenden Faktoren abhängig gemacht:

- Mauslinie (LINDSAY et al., 1995a; LONG et al., 1998)
- Parasiten-Isolat (ATKINSON et al., 1999)
- Lebenszyklus-abhängige Struktur (McGUIRE et al., 1997)
- Dosis und Art der Inokulierung (EPERON et al., 1999)
- Immunsuppression (DREIER et al., 1999)

Diese bei Mäusen maßgeblichen Faktoren scheinen generell auf Kühe übertragbar zu sein. Eine Ausnahme stellt jedoch der erste Punkt dar, da rassespezifisch bei Rindern keine Dispositionen gesehen wurden (ANDERSON et al., 1991; 1995; BARR et al., 1991a; WOUDA et al., 1995). Allerdings muß angeführt werden, daß es sich bei den Mäuseversuchen um genetisch veränderte Tiere (Mauslinien) handelt, wohingegen die untersuchten Rinderrassen nicht genetisch verändert waren.

## 11.2 Immunantwort bei nicht-trächtigen Kühen

Adulte Rinder mit einer persistierenden *N. caninum*-Infektion entwickeln außer einer Fieberphase (DANNAT et al., 1995; INNES et al., 2001b) keine klinischen Symptome. Nicht-trächtige Tiere werden zu Studienzwecken eingesetzt, um die Immunantwort zu beobachten. Diese besteht in der Produktion *N. caninum*-spezifischer Antikörper (humorale Immunantwort), die in der Diagnostik auf eine Exposition hinweisen. Es steht noch nicht fest, inwieweit die Antikörper einen wirksamen Schutz darstellen. Jedoch scheint klar, daß sie durch Antwort auf extrazelluläre Tachyzoitenstadien einen kontrollierenden Einfluß während der Parasitämie haben. Diese Kontrolle kann aber lediglich eine untergeordnete Rolle spielen, da die Neosporen sich ausschließlich intrazellulär vermehren und extrazellulär nur kurzzeitig vorkommen (CONRAD et al., 1993b).

In einer Studie wurden Kälber oral mit Oozysten infiziert. *Neospora*-spezifische IgG1 und IgG2-Antikörper konnten innerhalb von zwei bis vier Wochen nach der Infektion im Blut von Rindern entdeckt werden. Blut- und Milzzellen sowie Zellen aus den Mesenterial-, Inguinal- und Bronchiallymphknoten reagierten zehn Wochen post infectionem mit *N. caninum*-Antigen. (DE MAREZ et al., 1999). Da hiermit die Induktion einer humoralen Immunantwort nachgewiesen ist, stellt sich die Frage nach der zellulären Immunantwort (mit Antigenen reagierende T-Lymphozyten). Letztere scheint ebenfalls eine wichtige Rolle zu spielen, da wie bereits erwähnt die Vermehrung des Parasiten intrazellulär stattfindet (QUINN et al., 2002; HEMPHILL, 1999).

In In-vitro-Studien fiel auf, daß rekombinantes  $\gamma$ -Interferon die intrazelluläre Vermehrung von *N. caninum* hemmt (INNES et al., 1995).  $\gamma$ -Interferon wirkt immunmodulatorisch, d.h. stimulierend oder supprimierend auf die Antikörperproduktion und wurde in Kühen von proliferierenden peripheren mononukleären Blutzellen produziert,

nachdem die Tiere mit *N. caninum*-Tachyzoiten infiziert wurden (LUNDÉN et al., 1998; MARKS et al., 1998).

CD4-T-Zellen (spezielle Helferzellen) wurden aus experimentell mit *N. caninum* infizierten Kälbern gewonnen und in vitro mit niedermolekularen (< 30kDa) Tachyzoiten inkubiert. Die Proliferation der CD4-Zellen wurde dadurch stimuliert. Außerdem kam es zur vermehrten Bildung von  $\gamma$ -Interferon (MARKS et al., 1998). Dieses Ergebnis bestätigt die Annahme, daß mit dem Ansteigen der CD4-Zell- und  $\gamma$ -Interferonproduktion die zelluläre Immunantwort induziert wird.

Eine Infektion mit *N. caninum* löst also sowohl die humorale als auch die zelluläre Immunantwort aus. Allerdings ist insgesamt wenig über die inhibierenden Faktoren der beiden Systeme bekannt (KHAN et al., 1997). Man weiß aber, daß Zytokine wie  $\gamma$ -Interferon bei der Bekämpfung von *T. gondii* im Organismus eine Rolle spielen. Daher kann eine Parallelität vermutet werden (HARKINS et al., 1998).

### **11.3 Immunantwort bei trächtigen Kühen**

Wegen der Problematik der Neosporose bei trächtigen Tieren ist es wichtig, bei diesen die Veränderungen im Immunsystem während einer Infektion im Verlauf einer Trächtigkeit zu studieren. So kann man die immunologischen Vorgänge besser verstehen und Möglichkeiten der Intervention suchen. Während einer Trächtigkeit ist eine Veränderung des Immunsystems nötig, um den Foetus zu tolerieren und auszutragen (RAGHUPATHY, 1997).

Interferone stellen von Leukozyten sezernierte Kommunikationsproteine dar und wirken immunregulierend. Diese Zytokine können Entzündungsprozesse verursachen, die an der Berührungsfläche zwischen Plazenta und Frucht zu einer Beschädigung führen und so die Resorption oder den Abort verursachen können. Durch die *N. caninum*-Infektion sind die Interferone zumindest in vitro erhöht. Ein Zusammenhang mit Aborten scheint denkbar (RAGHUPATHY, 1997).

In einer Schwangerschaft wird die Zytokinproduktion beim Menschen dadurch reguliert, daß foetale Trophoblastzellen das Zytokin IL-10 (Interleukin 10) sezernieren, welches am maternalen Immunsystem lokal angreift und die Produktion von  $\gamma$ -Interferon unterdrückt. IL-10 wird als Zytokinsyntheseinhibitor von Helferzellen gebildet, hemmt die T-Suppressorzellen und damit die Produktion von Interferonen. Wenn diese Vorgänge bei Rindern ebenso stattfinden, kann die Multiplikation der Parasiten vom Muttertier nicht

kontrolliert werden, weil die  $\gamma$ -Interferon-Produktion nach einer Infektion ansteigt (WEGMANN et al., 1993). Die Unterdrückung der  $\gamma$ -Interferon-Produktion eines Foetus während der Trächtigkeit kann aber ein Wiederaufflackern der chronischen Infektion begünstigen. Epidemiologische Untersuchungen haben den Verdacht erhärtet, daß ein Wiederaufflackern einer Infektion während einer Trächtigkeit mit der Infektion des Foetus einher gehen (HEMPHILL et al., 2000a).

INNES und Mitarbeiter (2001b) untersuchten Rinder auf die induzierbare Immunität. Eine Gruppe (1) stellte eine nicht infizierte Kontrollgruppe dar. Gruppe 2 wurde sechs Wochen vor der Besamung mit Tachyzoiten infiziert und ein zweites Mal um die Mitte der Trächtigkeit. Eine weitere Gruppe (3) wurde erst zur Mitte der Tragzeit infiziert. Gruppe 4 wurde nur sechs Wochen vor der Besamung infiziert. Da bei Wiederkäuern die Plazenta undurchlässig für maternale Immunglobuline ist, stellt jeder Antikörper aus dem präkolostralen Kälberserum eine vom Kalb selbst produzierte Immunantwort dar (BLACK et al., 1995). Kälber der Gruppen 1, 2 und 4 hatten keine *N. caninum*-Antikörper im präkolostralen Serum, wohingegen die Kälber der Gruppe 3 hohe Titer aufwiesen. Sie hatten also in utero Kontakt mit den Neosporen. Post mortem wurde in ZNS, Thymus und Kotyledonen dieser Kälber Parasiten-DNA per PCR identifiziert. Muttertiere der Gruppe 3 zeigten in den ersten drei Tagen post infectionem einen Temperaturanstieg und glichen sich nach neun bis zehn Tagen wieder an den Ausgangswert an. Zusammenfassend kann man sagen, daß die Rinder, die vor der Trächtigkeit infiziert wurden, eine Immunität gegen die diaplazentare Übertragung erlangten. Gruppe 2 Mütter zeigten eine signifikant reduzierte Temperaturantwort verglichen mit Gruppe 3. Dies deutet auf ein schnelles Einsetzen der zellulären Immunantwort bezüglich der Infektion um die Trächtigkeitsmitte und starkes Ansteigen der spezifischen Antikörperlevel hin. Diese Kombination verhindert einen Befall der Plazenta durch die Parasiten (BERGERON et al., 2000; McALLISTER, 2001).



## **12. THERAPIE**

Da noch keine Impfstoffe gegen Neosporose erhältlich sind, kommt der Infektionsprävention eine herausragende Bedeutung zu. In Punkt 13 wird auf die Vermeidung einer Infektion näher eingegangen.

### **12.1 Herdenmanagement**

Nachdem die Übertragung der Neosporen hauptsächlich diaplazentar von infiziertem Muttertier auf die nachfolgenden Generationen erfolgt, sollten infizierte Mütter als potentielle Überträger durch serologische Reihenuntersuchungen oder entsprechende Nachweise im Abortus ermittelt werden. Mit diesem Wissen kann die Anzahl der chronisch infizierten Tiere im Bestand langfristig reduziert werden. Zugekaufte Tiere müssen seronegativ getestet sein, um die Zahl der *N. caninum*-seropositiven Tiere im Bestand nicht zu erhöhen (THURMOND und HIETALA, 1997a; WALDNER et al., 1998).

Infizierte Tiere sollten gemerzt werden, um weitere Aborte, Geburten infizierter Kälber sowie reduzierte Fruchtbarkeit und verringerte Milchproduktion zu vermeiden (MOEN et al., 1998; PARÉ et al., 1997; WOUDA et al., 1998b).

Es ist bisher bei Rindern keine Möglichkeit bekannt, die eine postnatale Infektion mit *N. caninum* völlig ausschließt. So soll ein Impfstoff entwickelt werden, der zwar nicht die Infektion, aber die diaplazentare Übertragung auf den Foetus verhindern soll. Es sind bereits vielversprechende Ergebnisse erzielt worden (ANDRIANARIVO et al., 1999; 2000). In Punkt 14 wird auf die Impfstoffentwicklung eingegangen.

### **12.2 In-vitro-Wirksamkeit von Medikamenten**

Bisher ist wenig über die chemotherapeutischen Therapiemöglichkeiten bekannt. Vor allem die hauptsächlich betroffenen Tierarten, Rind und Hund liegen im Interesse der Forschung (GOTTSTEIN et al., 2001; HABERKORN, 1996;). Um Ansatzpunkte für anwendbare Medikamente zu bekommen, wurden verschiedene Stoffgruppen in Zellkulturen getestet. Wegen der morphologischen Ähnlichkeit zu *Toxoplasma* wurden Medikamente in

vitro getestet, die sich als wirksam gegen *T. gondii* erwiesen hatten. Die Antiparasitika Lasalocid, Monensin, Piritrexim, Pyrimethamin, Trimethoprim (LINDSAY und DUBEY, 1989c) und Artemisinin (KIM et al., 2002) verhinderten die intrazelluläre Multiplikation von *N. caninum* in der Zellkultur.

LINDSAY und Mitarbeiter (1994) berichteten über In-vitro-Wirksamkeit von Sulfonamiden, Ionophoren, Makroliden und Tetracyclinen, Dihydrofolatreduktase/Thymidylatsynthase (DHFR/TS) Inhibitoren und Malaria-Therapeutika gegen *N. caninum*-Tachyzoiten. Die höchste Wirksamkeit der 43 untersuchten Substanzen wies Clindamycin auf.

HABERKORN (1996) untersuchte Toltrazuril, ein Triazinonderivat und Ponazuril, ein neues Triazinetrionderivat. Sie beeinflussen die intrazelluläre Entwicklung der Apicomplexa und rufen Mitochondrienschwellungen und erweiterte Endoplasmatische Reticuli hervor. Der genaue Mechanismus ist nicht bekannt, es wird aber vermutet, daß die Atmungskette der parasitären Organellen beeinträchtigt wird (HACKSTEIN et al., 1995; HARDER und HABERKORN, 1989; MEHLHORN et al., 1984).

Das Antikokzidium Decoquinat, das bei Rindern und Schafen in den USA und in der Geflügelmast in Europa (ROMMEL, 2000) eingesetzt wird, ist ein Quinolin und wurde als Quinolincarboxylat in der Zellkultur auf die Wirksamkeit gegen *N. caninum*-Tachyzoiten hin untersucht. Es ist bereits in niedriger Dosierung gegen intrazelluläre Tachyzoiten wirksam. Die Atmung der Kokzidien wird durch Störung der Elektronentransporte in den Mitochondrien verhindert (FRY und WILLIAMS, 1984; LINDSAY et al., 1997). Eine geringe Wirksamkeit zeigte sich gegen extrazelluläre Tachyzoiten. Dies scheint sich durch deren niedrigere Mitochondrien-Tätigkeit begründen zu lassen oder auch durch die Verhinderung des Transportes des Antikokzidiums in die Parasiten hinein. Die Wirksamkeit gegen Bradyzoiten und Gewebszysten läßt sich noch in keinem System überprüfen (LINDSAY et al., 1992).

LINDSAY und Mitarbeiter untersuchten Pyrimethamin, Ormetoprim, Trimethoprim, Diaveridin (alles Dihydrofolatreduktase-Inhibitoren, DHFR/TS) in Kombination mit Sulfonamiden (Sulfadiazin, Sulfadimethoxin, Sulfamerazin, Sulfamethazin, Sulfamethoxazol, Sulfaquinoxalin, Sulfathiazol). Die verschiedenen Kombinationen verstärkten sich in ihren Wirkungen. Methotrexat (DHFR/TS) und Sulfonamide zeigten keine gesteigerte Wirkung (LINDSAY et al., 1996a).

Es konnte nachgewiesen werden, daß Interferon Gamma und der Tumor Nekrosis Faktor Alpha einen inhibitorischen Effekt auf die intrazelluläre Multiplikation der Neosporen in bovinen Gehirnzellen haben (YAMANE et al., 2000).

### 12.3 Erfolge bei anderen Spezies

Um die Medikamente am Tier zu erproben, wurden hauptsächlich Versuche an Labormäusen durchgeführt. Sulfadiazin im Trinkwasser experimentell infizierter Tiere verhinderte eine klinische Neosporose (LINDSAY und DUBEY, 1990b). Allerdings war eine Sulfadiazinbehandlung erfolglos, wenn schon klinische Anzeichen vorlagen. Eine Therapie mit Sulfadiazin, Pyrethamin und Clindamycin kann bei frühzeitiger Diagnose erfolgreich sein (GREENE et al., 1985; McGLENNON et al., 1990; MAYHEW et al., 1991).

Die Therapie systemischer Protozoeninfektionen ist wegen des zytotoxischen Effektes antiprotozoärer Medikamente generell als schwierig zu betrachten (COLLERY, 1996).

Einige wenige Berichte existieren über eine erfolgreiche Therapie bei Hunden. MAYHEW und Mitarbeiter (1991) berichteten über einen Wurf von drei Welpen, die serologisch und klinisch auf eine Neosporen-Infektion hinwiesen. Sie sprachen auf eine Behandlung mit Trimethoprim-Sulfadiazin und Pyrimethamin an.

Schwierig ist es, die Bradyzoiten im Gewebe zu erreichen. Eine Behandlung mit Monensin (40-120 mg/Tier/Tag) konnte keinen vollständigen Schutz vor Aborten herstellen. Bei der Therapie laktierender Tiere ist die Wartezeit auf Milch zu berücksichtigen.

Toltrazuril und Ponazuril werden erfolgreich bei Kokzidiosen des Geflügels und Säugetiere eingesetzt (HABERKORN, 1996). Im Versuch mit Mäusen wurden infizierte Tiere über das Trinkwasser mit einer 2,5%igen Lösung behandelt. Sowohl Toltrazuril als auch Ponazuril verhinderten zerebrale Veränderungen und somit klinische Erscheinungen. Eine Wirksamkeit gegen Tachyzoiten ist also wahrscheinlich (GOTTSTEIN et al., 2001).

Eine Therapie mit Sulfadoxin (15 mg/kg) und Trimetoprim (Borgal 2,5%, Fa. Hoechst) zweimal täglich über sechs Tage ließen einen komatösen adulten Hund mit Verdacht auf akute Neosporose klinisch gesunden (GÄHER, 2001).

Eine Neosporen-induzierte pyogranulomatöse Dermatitis eines adulten Hundes wurde 45 Tage mit dem Antibiotikum Clindamycin behandelt und verschwand vollständig. Clindamycin konnte vermutlich eine allgemeine Verbesserung der Neosporose-Symptomatik erreichen (DUBEY et al., 1995).

Ein zwölf Wochen alter männlicher Welpe mit Hinterhandlähmungen und reduziertem Allgemeinbefinden wurde mit Clindamycin (13,5 mg/kg) 25 Tage lang behandelt. Nach 10 Tagen besserte sich das Allgemeinbefinden. Vier Wochen lang bekam das Tier oral Sulfadiazin und Trimetoprim (31 mg/kg und 6 mg/kg). Keine Verbesserung fand bezüglich der Paresen statt, jedoch besserte sich das Allgemeinbefinden beträchtlich. Eine Therapie mit

Sulfadiazin (60 mg/kg) und Pyrimethamin (1 mg/kg) erfolgte über weitere zwei Wochen. Die Symptome blieben bestehen. Allerdings wird vermutet, daß die Therapie den Hund überleben ließ und die voran schreitende Symptomatik gestoppt hat (HAY et al., 1990).

Ein sieben Wochen alter Welpen mit Neosporen-Infektion, leichter Hinterhandparese und Propriozeptionsstörungen wurde mit Trimetoprim und Sulfadiazin (20 mg/kg und 100 mg/kg) in Kombination mit Pyrimethamin (1 mg/kg) zweimal täglich behandelt. Bereits nach 48 Stunden besserten sich die Symptome. Die Therapie wurde 14 Tage lang fort geführt und den Autoren wurde kein Rückfall bekannt (LINDSAY et al., 1996a).

Die meisten Fallberichte beschäftigen sich mit der Therapie beim Hund. Über die Therapie natürlich infizierter Rinder ist sehr wenig bekannt. Des weiteren sind die Dosierungen empirisch und sehr unterschiedlich gewählt. Vor allem die Ergebnisse der Therapie von Hunden läßt darauf hoffen, daß die Symptomatik in naher Zukunft zu stoppen und die Tiere am Leben zu halten sind. Aufgrund des wirtschaftlichen Aspektes scheint beim Rind eine kostenträchtige wochenlange Therapie nicht praktikabel. Deshalb wird die Entwicklung eines geeigneten Impfstoffes zur Infektions-, Transmissions- bzw. Abortprävention gefordert. Eine strategische Verabreichung eines kokzidioziden Wirkstoffes könnte beim Rind eine Alternative zur abortiven Neosporose sein, wenn Tiere infiziert sind aber nicht abgeschafft werden sollen. Hier müßten allerdings noch Versuche zur Prävention erfolgen, sowie Kostenberechnungen und Wartezeiten für Milch und Fleisch festgesetzt werden (HEMPHILL et al., 2000a).

### 13. INFEKTIONSPRÄVENTION

Da es bisher keine sinnvollen therapeutischen Ansätze zur Behandlung der Neosporose beim Rind gibt, liegt der Schwerpunkt der Bekämpfung in der Vermeidung einer Infektion mit *N. caninum*. Obwohl bereits viele Stoffe in vitro getestet und teilweise Erfolge bei anderen Tierspezies erreicht wurden, scheint bei Rindern in nächster Zukunft noch kein Therapieansatz erfolgsversprechend. Auch ein wirksamer Impfstoff für Rinder wird in nächster Zukunft nicht auf den Markt kommen (CONRATHS und SCHARES, 1999).

Wegen des vertikalen Hauptinfektionsweges, bei der es zur Übertragung von Tachyzoiten auf den Foetus kommt, muß bei einem Bestandsproblem eine Sanierung durch gezielte Anpaarungen mit seronegativen Kühen erfolgen. Dies stellt keinen hundertprozentigen Schutz dar, da bei infizierten Tieren zum einen nicht immer eine Serokonversion stattfindet, zum anderen der Antikörper-Titer im Verlauf einer Infektion stark schwankt und bei einer Nachweismethode mit hohem Cut-off-Titer unter Umständen als falsch negativ gilt. Vor allem bei Beständen, die Embryotransfer durchführen, sollten negative Rezipienten verwendet werden (THURMOND und HIETALA, 1995; LANDMANN et al., 2002). Seropositive Tiere sollten ausgemerzt werden. Ein Gefahrenpunkt beim Aufbau eines negativen Bestandes ist darin zu sehen, daß eine naive Herde besonders empfänglich für den Erreger und seine Auswirkungen ist (ANDERSON et al., 2000).

Trotz der großen Bedeutung der vertikalen Übertragung sollte die Gefahr der horizontalen Infektion nicht unterschätzt werden. Dieser Weg ist durch Aufnahme von Oozysten, Tachyzoiten oder Bradyzoiten beschrieben. Bisher kann eine postnatale Infektion noch nicht gänzlich vermieden werden, da noch immer nicht alle Details des Lebenszyklus des Parasiten geklärt sind. Allerdings sollte seit dem Beweis, daß der Hund einen Endwirt darstellt (McALLISTER et al., 1998a) und epidemiologische Zusammenhänge zwischen der Präsenz von Hunden (CHEADLE et al., 1999a) und der Seroprävalenz in Rinderbeständen bestehen (BARTELS et al., 1999; PARÉ et al., 1998; MAINAR-JAIME et al., 1999), verhindert werden, daß vom Hund ausgeschiedene Infektionsstadien Futter oder Wasser der Wiederkäuer kontaminieren (ANDERSON, 2000). Da auch der Fuchs und andere wildlebende Caniden als Endwirte (BARLING et al., 2000b, SIMPSON et al., 1997; SIMPSON, 2002) in Frage kommen, sollten die Futtermittel von Wiesen stammen, auf denen wenig Füchse beobachtet werden.

Außerdem müssen alle infektiösen Gewebe, wie abortierte Foeten oder Fruchthüllen, möglichst schnell aus dem Bestand entfernt werden, damit weder Hunde noch Rinder Zugang haben und diese Infektionsquellen aufnehmen können (DIJKSTRA et al., 2001a, b).

Das Futter sollte so gelagert werden, daß neben Hunden auch Nager ferngehalten werden. Es besteht die Möglichkeit, daß Kleinsäuger als Zwischen- oder Transportwirte fungieren (CONRATHS und SCHARES, 1999). Aus dem gleichen Grund sollte Geflügel keinen Zugang zu den Futtermitteln für Wiederkäuer bekommen (OULD-AMROUCHE et al., 1999).

Als wichtig zur Prävention der Neosporen-Aborte erwies sich auch die Verfütterung von einwandfreiem Futter, da Schimmel Mykotoxine enthält, die eine Immunsuppression zur Folge haben und so einen Risikofaktor darstellen (BARTELS et al., 1999).

Solange nicht alle Details im Lebenszyklus der Parasiten, der Pathogenese und Immunologie der Neosporose und alle möglichen Endwirte geklärt sind, können nicht alle Infektionsmöglichkeiten ausgeschlossen werden.

## 14. IMPFSTOFFENTWICKLUNG

Die Entschlüsselung der antigenetischen Eigenschaften von *N. caninum* dient als Grundlage für die Entwicklung eines Impfstoffes (ELLIS, 1999). In einem Versuch mit Mäusen konnte eine diaplazentare Übertragung auf die Foeten bereits erfolgreich verhindert werden. Die Muttertiere waren vor der Trächtigkeit mit *N. caninum*-Tachyzoiten-Antigen immunisiert und in der Tragzeit infiziert worden. Momentan sollen die verantwortlichen Antigene für die schützende Immunität identifiziert werden (LIDDELL et al., 1999a).

Der inhibierende Effekt der Antikörper gegen die Oberflächenproteine SAG1 und SRS2 und die Proteine der dichten Granula GRA6 und GRA7 der *N. caninum*-Tachyzoiten bei der In-vitro-Invasion der Wirtszellen stellt einen Ansatzpunkt dar (AUGUSTINE et al., 1999; HEMPHILL, 1996; NISHIKAWA et al., 2000a).

Monoklonale Antikörper gegen *N. caninum*-Tachyzoiten wurden entwickelt, um Antigene zu identifizieren, die eine Rolle während der Wirtszell-Invasion spielen und zur Impfung verwendet werden könnten. Die meisten Antigene, die durch die monoklonalen Antikörper identifiziert wurden, waren auf der Parasitenoberfläche lokalisiert. Manche Antikörper, die 70, 42 und 36 kDa-Parasitenprotein erkannten, verhinderten signifikant die Invasion der Parasiten in vitro. Die monoklonalen Antikörper, die mit 42 und 36 kDa-Proteinen reagierten, wurden durch Vacciniavirus (VV) als Nc-p43 und Nc-p36 in *E. coli* exprimiert. Diese Resultate können als erste Ansätze für die Entwicklung einer Impfung gesehen werden (NISHIKAWA et al., 2000a).

Rekombinantes Vacciniavirus, das das Oberflächenprotein von *N. caninum*-Tachyzoiten NcSAG1 oder NcSRS2 exprimiert, wurde konstruiert. Balb/c Mäuse wurden intraperitoneal infiziert und nach zwei Wochen eine Boosterimmunisierung vorgenommen. Die Mäuse wurden intraperitoneal mit lebenden Tachyzoiten infiziert und 5, 8 bzw. 26 Tage später getötet. Per PCR erfolgte die Suche nach Parasiten-DNA. Die Tiere, die mit VV/Nc-p43 immunisiert worden waren, wiesen eine negative PCR auf, positiv hingegen waren die Tiere, die mit VV/Nc-p36 immunisiert wurden. Dies läßt eine höhere Impfeffizienz von VV/Nc-43 erkennen (NISHIKAWA et al., 2001a).

Auch eine Übertragung auf die Foeten konnte so unterbunden werden. Nach Boosterung der oben genannten Vacciniaviren wurden die Mäuseweibchen zur Paarung zugelassen. Die Infektion mit Tachyzoiten erfolgte am Tag sechs bis neun der Trächtigkeit bzw. etwa vier Wochen nach der Impfung. Auch hier zeigt sich eine partielle Verhinderung

der Übertragung bei mit VV/Nc-p36 immunisierten Tieren und ein kompletter Schutz bei Mäusen, die mit VV/Nc-p43 immunisierten (NISHIKAWA et al., 2001b).

Proteine der dichten Granula, GRA2 (p29) (ELLIS et al., 2000), GRA6 (p37, NCDG2) (LIDDELL et al., 1998) und GRA7 (p33, NCDG1) (HEMPHILL et al., 1998; LALLY et al., 1997) wurden ebenso kloniert wie die Oberflächenantigene SRS2 (Nc-p43, Nc-p35) (HEMPHILL et al., 1997a; HOWE et al., 1998) und SAG1 (Nc-p29, Nc-p36) (HOWE et al., 1998; SONDA et al., 1998). Zusätzlich wurden die Gene eines 40 kDa Mikronemen-Antigen (SONDA et al., 2000), eines TRAP Homologes (NcMIC2) (LOVETT et al., 2000) und einer Serin Protease (Nc-p65) (LOUIE und CONRAD, 1999) entschlüsselt und können als Ansätze dienen, einen Impfstoff zu entwickeln.

In Studien wurde gezeigt, daß Mäuse, die mit rekombinantem Vacciniavirus (ein Orthopoxvirus) oder Hunde, die mit caninem Herpesvirus immunisiert wurden, SRS2 exprimierten und eine *N. caninum*-spezifische Immunantwort gaben, dabei aber keine klinischen Symptome entwickelten (NISHIKAWA et al., 2000b,c). Außerdem führte eine Immunisierung weiblicher Mäuse mit rekombinantem VV-SRS2 vor der Trächtigkeit zu einer signifikanten Reduktion von kongenitaler *N. caninum*-Infektion (NISHIKAWA et al., 2001b).

Versuche, Mäuse vor der Trächtigkeit mit Nc-GRA6 (rNCDG2) oder Nc-GRA7 (rNCDG1) zu immunisieren und dann mit *N. caninum* zu infizieren, führten nur zu einem partiellen Schutz vor der Übertragung der Infektion von der Mutter auf den Foetus. Zur Zeit laufen Studien, die sich mit der direkten Injektion von Plasmid-DNA beschäftigen. Die DNA exprimiert Nc-GRA6 und Nc-GRA7, um ein höheres Maß an Schutz zu erreichen (JENKINS, 2001).

Es gibt einige Ansätze zur Herstellung eines Impfstoffes, der zwar nicht die Infektion, jedoch die Übertragung auf den Foetus verhindert. Allerdings gibt es bisher noch keinen bei Rindern zugelassenen Impfstoff (ANDRIANARIVO et al., 1999; 2000).



## 15. WIRTSCHAFTLICHE AUSWIRKUNGEN

Die wirtschaftlichen Auswirkungen der durch *N. caninum* verursachten Erscheinungen sind beträchtlich. Sie setzen sich zusammen aus den Aborten, Totgeburten, schlechter Fruchtbarkeit, reduzierter Milchproduktion, Schlachtungen, reduziertem Wert der Zuchttiere, langsamere Gewichtszunahmen und höheren Behandlungskosten in der Mast (BARLING et al., 2000a; DUBEY, 1999c; TREES et al., 1996; 1999).

In Großbritannien werden 12,5% (DAVISON et al., 1999d), in Italien 24,4% (MAGNINO et al., 1999) und in den USA 40% (DUBEY und ROMMEL, 1992) der Aborte auf Neosporen zurückgeführt. Insgesamt wird das Abortrisiko seropositiver Tiere 3,4 bis 7,0 mal höher eingeschätzt als das seronegativer Kühe (DAVISON et al., 1999d; MOEN et al., 1998; THURMOND et al., 1997; THURMOND und HIETALA, 1997a).

Über Totgeburten und erhöhte Neugeborenensterblichkeit gibt es nur einzelne Berichte (O'TOOLE und JEFFREY, 1987; TREES et al., 1999). Deshalb können keine Angaben zu den kommerziellen Einbußen gemacht werden.

Bis vor kurzem wurde davon ausgegangen, daß sich die Neosporose erst ab dem dritten Trächtigkeitsmonat auf das Fortbestehen der Trächtigkeit negativ auswirkt (DUBEY, 1999b). Jedoch ist der frühe Embryonentot, der sich durch Umrindern, verlängerte Zwischenkalbezeiten oder Unfruchtbarkeit zeigt, nachgewiesen. Nach einer Infektion von sechs Kühen neun Wochen nach der Insemination starben fünf Foeten ab. Die Untersuchungen und Verläufe wurden per Ultraschall verfolgt (TREES et al., 1999). Es muß allerdings auch bedacht werden, daß embryonalen Verluste nicht zwangsläufig als Krankheitssymptome zu werten sind. Verluste von 20-40% können in gesunden Herden auftreten und als physiologisches Regulativ betrachtet werden (STOLLA, 1985).

In England ist schlechte Fruchtbarkeit der Hauptgrund für die Schlachtung von Kühen. Die Milchproduktion steigt aber mit dem Alter der Kuh an, so daß eine Schlachtung vor der vierten Laktation aus wirtschaftlichen Gründen vermieden werden sollte (ESSLEMONT und KOSSAIBATI, 1997).

Verlängerte Zwischenkalbezeiten führen über die Jahre zu einer geringeren Anzahl an Laktationen. Ein Abort verlängert die Laktation, was letztendlich in einer reduzierten Gesamtmilchmenge resultiert (TREES et al., 1999).

In den USA wurden doppelt so viele seropositive Kühe wegen reduzierter Milchproduktion geschlachtet als seronegative (THURMOND und HIETALA, 1996).

Der Einfluß der Neosporen auf die Milchproduktion ist komplex und noch nicht völlig geklärt. Ein Autor beschrieb einen kurzfristigen Anstieg der Milchproduktion nach einem Abort (WOUDA, 2000). Andere Betrachter berichten über einen Abfall bezogen auf die Gesamtleistung (HOBSON et al., 2002). In der ersten Laktation produziert ein *N. caninum*-seropositives Tier um 4% weniger Milch als ein seronegatives Rind (THURMOND und HIETALA, 1997b).

Die reduzierte Milchleistung in der ersten Laktation bei seropositiven Tieren bedeutet vermutlich den größten ökonomischen Schaden, wenn man die hohe Anzahl der seropositiven Tiere und ihre frühe Schlachtung zugrunde legt (THURMOND und HIETALA, 1996; 1997b; TREES et al., 1999). In einer Studie wurden kürzlich 565 Kühe auf ihre Milchleistung untersucht. Bei 130 (23%) als seropositiv und 435 (77%) als seronegativ eingestuften Tieren erfolgte die Milchmessung über einen Zeitraum von 305 Tagen. Seropositive Rinder produzierten im Durchschnitt 2,8 Liter pro Tag weniger als seronegative. Pro Jahr entspricht diese Menge bei einer angenommenen durchschnittlichen Laktationslänge von 305 Tagen 854 Liter pro Kuh. Ein Verlust von 800 Litern stellt bei einem Milchwert von 16 US Dollar pro 100 Liter einen Verlust von 128 US Dollar pro Kuh dar. Die Ursache der verringerten Milchproduktion wird in den Schäden der befallenen Organsystemen der infizierten Kühe gesehen (HERNANDEZ et al., 2001).

Sind Muttertiere infiziert, ist die Wahrscheinlichkeit, daß die Infektion auf die folgenden Generationen weiter gegeben wird, sehr hoch. Die Nachkommen geben den Parasiten wiederum an ihren Nachwuchs weiter. Zudem ist eine lebenslange Infektion sehr wahrscheinlich (ANDERSON et al., 1997; BJÖRKMAN et al., 1996). Werden die Tiere geschlachtet, entsteht ein wirtschaftlicher Schaden, da der Schlachtwert 2,5 mal geringer ist, als der Wert eines gleichwertigen Tieres, das zur Erhaltung der Bestandsgröße gekauft werden muß (ESSLEMONT und KOSSAIBATI, 1997). Vor allem betroffen sind Zuchten, die Herden mit hohem genetischen Wert besitzen.

BARLING und Mitarbeiter (2000a) verfolgten das Wachstum von 1009 Stieren in 92 Herden in Texas. 131 Tiere waren *N. caninum* seropositiv, 878 seronegativ. 13 dieser 131 Tiere (9,9%) mußten wegen Krankheiten behandelt werden, während es bei den seronegativen 129 von 878 (14,7%) waren. Zwei von 131 (1,5%) seropositiven und neun von 878 (1,0%) seronegativen wurden als Kümmerer vorzeitig geschlachtet. Es konnten signifikante Unterschiede bezüglich der Behandlungskosten festgestellt werden. Die Therapiekosten der seronegativen Tiere lagen bei 16,14 US Dollar/ Tier (115 Kälber) bzw. bei 26,78 US Dollar/ Tier (elf Kälber) bei den seropositiven. Seropositive Tiere hatten auch geringere tägliche

Zunahmen (0,05 kg/ Tag) und ein niedrigeres Schlachtgewicht (7,5 kg) verglichen mit den seronegative Bullen. Dafür kann ein Verlust von 14,24 US Dollar pro Tier angenommen werden. Insgesamt kann in dieser Studie pro seronegativem Kalb ein Verlust von 15,62 US Dollar angesetzt werden.

Kürzlich wurde untersucht, ob die reduzierten täglichen Zunahmen bei den Masttieren von 0,05 kg auf verringerte Futteraufnahme oder die Futtermittelverwertung zurückzuführen ist. Es konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der während der Studie aufgenommenen Futtermenge festgestellt werden. Jedoch muß ein seropositiver Jungbulle im Vergleich mit einem seronegativen 2,16 kg Futter mehr aufnehmen, um ein Kilogramm zuzunehmen. Somit ist die Futtermittelverwertung von *N. caninum* seropositiven Bullen reduziert (BARLING et al., 2001b).

CHI und Mitarbeiter (2002) berechneten die jährlichen Produktionsverluste und Behandlungskosten einer infizierten, 50 Kühe zählenden Herde auf 2304 US Dollar.

## 16. DISKUSSION

Die Neosporose stellt eine, erst seit kurzem in den Blickpunkt geratene Parasitose mit einer Reihe von ungeklärten Punkten dar. Die Klassifizierung wird sehr kontrovers diskutiert. Intra vitam ist nur eine Verdachtsdiagnose möglich, die definitive Bestätigung kann erst post mortem erfolgen. Die Infektiosität der *Neospora*-Stadien in der Umwelt ist ebenfalls unklar. Und nicht zuletzt stellt sich die Frage nach dem zoonotischen Potential durch Fleischverzehr und Kontamination mit Abortmaterial und Hundekot.

Die Deklaration von *N. caninum* als eigene Art durch DUBEY und Mitarbeiter (1988a) ist bis zum heutigen Tag umstritten. Diese These erhielt Unterstützung von McALLISTER und Mitarbeiter, die den Hund als Endwirt identifizierten (McALLISTER, 2000; McALLISTER et al., 1998a). In den darauffolgenden Jahren traten durch weitergehende Untersuchungen allerdings Zweifel an der Klassifizierung auf (MEHLHORN und HEYDORN, 2000).

Das Protozoon *N. caninum* ist bezüglich Morphologie, Lebenszyklus und Übertragbarkeit auf Foeten *T. gondii* ähnlich (HEMPHILL, 1999). Antigenetisch besteht ein Unterschied von vier Nukleotiden in der rRNA (MARSH et al., 1995). *H. heydorni* ist ebenfalls nahe verwandt mit *N. caninum* (ELLIS et al., 1999; MUGRIDGE et al., 1999). Beide Arten haben zudem den gleichen Endwirt, den Hund. Darüber hinaus sind ihre Oozysten morphologisch nicht voneinander zu unterscheiden (McALLISTER et al., 1998a; SCHARES et al., 2001b). Deshalb scheint also ein näherer Verwandtschaftsgrad zwischen *N. caninum* und *H. heydorni* zu bestehen als zwischen *N. caninum* und *T. gondii* (ELLIS et al., 1999; MUGRIDGE et al., 1999).

*H. hammondi* weist hingegen eine enge antigenetische Beziehung zu *T. gondii* auf. Beide Arten benötigen außerdem felide Endwirte (DUBEY, 1993; ELLIS et al., 1999; MUGRIDGE et al., 1999). Die seit Jahren kontrovers diskutierte phylogenetische Einteilung der Kokzidien wirft die Frage auf, ob *N. caninum* eine Linie von *T. gondii* ist, oder aber identisch mit *H. heydorni* ist.

Die Zuordnung von Oozysten erweist sich wegen ihrer morphologischen Identität als schwierig. Früher durchgeführte Studien müssen heute kritisch betrachtet werden, da nicht auszuschließen ist, daß Oozysten verschiedener Protozoenarten fälschlicherweise einer Art zugeordnet wurden (SCHARES et al., 2001b).

Eine experimentelle Infektion von Schafen zuerst mit *T. gondii* und darauffolgend mit *N. caninum*, ergab, daß die vorausgehende *Toxoplasma*-Infektion keine Immunität gegen *N. caninum* bewirkte. Auch eine *Toxoplasma*-Impfung bot keinen Schutz vor Infektion und foetalem Fruchttod durch *N. caninum*. Dies läßt darauf schließen, daß *N. caninum* keine Linie von *T. gondii* darstellt (INNES et al., 2001a).

Um eine endgültige Einteilung und Klassifizierung von *Neospora*, *Toxoplasma* und *Hammondia* vornehmen zu können, sollte eine retrospektive Überprüfung von Studien, die eventuell fälschlicherweise mit verschiedenartigen Kokzidienoozysten stattfanden, mit neuen antigenetischen Methoden durchgeführt werden, soweit Material sichergestellt wurde (SCHARES et al., 2001b). Des weiteren müssen alle Proteine des apikalen Komplexes aller bekannten Kokzidien identifiziert und katalogisiert werden, da sie aufgrund ihrer Konservierung während der Evolution Hinweise auf die Entwicklungsfolge geben können (TOMLEY und SOLDATI, 2001). Ebenso müssen die kompletten Lebenszyklen und Infektionswege von *N. caninum* und *H. heydorni* beschrieben werden (MUGRIDGE et al., 1999). Molekulargenetische Untersuchungen von einem Isolat von *N. caninum* und zwei unterschiedlichen Isolaten, die als *H. heydorni* angesehen wurden, zeigten, daß es sich bei *N. caninum* und *H. heydorni* um zwei verschiedene, jedoch sehr nah verwandte Spezies handelt (ELLIS et al., 1999; MUGRIDGE et al., 1999).

Die Diagnose der Neosporose ist intra vitam nicht möglich (SAGER et al., 2001). Da es eine Reihe von in Frage kommenden Differentialdiagnosen gibt und der Verdacht einer Infektion am lebenden Tier abgeschätzt werden soll, bleibt nur die serologische Untersuchung der auffälligen Tiere. Hohe *N. caninum*-Antikörpertiter besagen allerdings nicht, daß ein Abort zwangsläufig durch Neosporen ausgelöst wurde. Der Titer gibt in diesem Fall nur an, daß ein Kontakt zwischen Neosporen und dem Tier stattgefunden hat. Allerdings ist die Wahrscheinlichkeit bei einem sehr hohen Titer groß, daß ein Abort durch den Parasiten bedingt oder begünstigt wurde. Auch ein Zusammenwirken mehrerer auslösender Faktoren ist möglich. Ist der Titer negativ, kann eine Infektion zwar nicht ganz ausgeschlossen werden, aber die Wahrscheinlichkeit eines erfolgten Neosporen-Abortes ist eher gering. Allerdings weiß man noch zu wenig darüber, wann nach einer Infektion eine Serokonversion stattfindet. Zudem gibt es Endwirte, die obwohl sie Oozysten ausscheiden, keinen Antikörper-Titer haben (McALLISTER et al., 1998a). Hier gibt es also noch Klärungsbedarf. Die Aussagen über die Höhen der Cut-off-Titer sind in der Literatur uneinheitlich. Die verschiedenen Angaben kommen durch unterschiedliche Laborbedingungen und Testverfahren zustande, die eine

Vereinheitlichung der Ergebnisse erschweren (CONRAD et al., 1993b; DUBEY et al., 1996a; TREES et al., 1994).

Die Tatsache, daß der Hund den Endwirt von *N. caninum* darstellt und Oozysten ausscheidet (McALLISTER et al., 1998a), sollte den Landwirten bewußt machen, daß eine Infektionsgefahr vom eventuell vorhandenen Hofhund ausgeht (TREES et al., 1998), zumal nachgewiesen wurde, daß epidemiologische Zusammenhänge zwischen der Präsenz von Hunden und der Seroprävalenz in Rinderbeständen bestehen (BARTELS et al., 1999; PARÉ et al., 1998). Neosporen haben, wenn ein infizierter Hund auf einem Hof gehalten wird, ideale Bedingungen, sich immer weiter zu verbreiten und immer neue Rinder zu infizieren. Durch Kontakt mit infiziertem Abortmaterial und Ausscheiden von Oozysten besteht ein idealer Lebenszyklus für die Parasiten. Deshalb sollten Hunde auf jeden Fall von Futter und Wasser der Rinder ferngehalten werden. Auch das Verfüttern von Gras, das von Wiesen stammt, auf denen viele Menschen ihre Hunde spazieren führen, ist problematisch. Die Infektionsprophylaxe spielt deshalb eine gewichtige Rolle, da zur Zeit keine Impf- und Therapiemöglichkeit besteht.

Obwohl dem Fuchs bisher kein Ausscheiden von Oozysten nachgewiesen werden konnte (SCHARES et al., 2002b), besteht doch eine Seroprävalenz (BARLING et al., 2000b; SCHARES et al., 2001c) und der begründete Verdacht, daß sie als Endwirte dienen können. Deshalb sollten auch von Wiesen in Waldnähe, auf denen viele Füchse leben, kein Futter gewonnen werden (SIMPSON, 2002). Des weiteren wäre eine Aufklärungskampagne der Hundebesitzer angebracht, die klar stellt, daß Hundekot zu Aborten und Verlusten in der Landwirtschaft führt und an die Vernunft der Halter appelliert, die Hunde ihren Kot nicht auf Futterwiesen absetzen zu lassen.

Während die Bedeutung von Toxoplasmen als Zoonoseerreger hinreichend aufgeklärt ist, ist die Diskussion, soweit es *N. caninum* angeht, noch nicht endgültig abgeschlossen. Bei der Toxoplasmen-Infektion des Menschen kann eine diaplazentare Übertragung auf den Foetus erfolgen, was irreversible Schädigungen der Frucht sowie Tod- und Frühgeburten auslösen kann (DUBEY, 1993; LINDSAY et al., 1996c). Auch bei kleinen Wiederkäuern sind Aborte durch Toxoplasmen beschrieben (BUXTON, 1998; DUBEY, 1993). Aufgrund der engen morphologischen und phylogenetischen Verwandtschaft von *T. gondii* mit *N. caninum* stellt sich die Frage nach dem zoonotischen Potential der Neosporen.

Da der orale Übertragungsweg von Toxoplasmen durch den Verzehr zystenhaltigen Fleisches bekannt ist (DUBEY, 1993), wurde *N. caninum* auf das Bestehen eines analogen Infektionsweges untersucht. Die mittels PCR ermittelte DNA-Prävalenz im Fleisch bei 100

Schlachtkühen lag bei 2%, die mittels ELISA festgestellte Seroprävalenz bei 7%. Die Differenz mag sich aus dem Vorliegen „älterer“ Infektionen erklären, bei denen der Parasit selbst zum Untersuchungszeitpunkt bereits eliminiert war (WYSS et al., 2000). Unabhängig davon zeigt sich hiermit, daß der Mensch durch den Umgang mit Rindfleisch und den Verzehr mit *N. caninum* in Kontakt kommen kann.

Nach heutigem Wissensstand wird *N. caninum* ein zoonotisches Potential aber abgesprochen (DUBEY, 1999a; GRAHAM et al., 1999; WYSS et al., 2000). Zwar konnten Rhesusaffen und ihre Foeten experimentell mittels einer hoch konzentrierten, intramuskulär, intravenös oder intrauterin verabreichten Tachyzoiten-Suspension infiziert werden (BARR et al., 1994a; HO et al., 1997b), unter natürlichen Umständen jedoch ist ein derart hoher Infektionsdruck nicht zu erwarten. Dementsprechend wurden bisher keine natürlichen Infektionen bei Affen nachgewiesen (BARR et al., 1994a; HO et al., 1997b).

Obwohl es keine Angaben über die Überlebensfähigkeit von Gewebszysten im Fleisch bei Hitze gibt, sollte Verzicht auf Verzehr von rohem oder ungenügend gekochtem oder gebratenem Rindfleisch geübt werden, um eine Ingestion mit lebensfähigen Gewebszysten zu vermeiden. Hygiene sollte für Menschen, die mit neugeborenen Kälbern, Nachgeburten oder Foeten in Berührung kommen, insbesondere vor der Nahrungsaufnahme, oberstes Gebot sein. Da eine Toxoplasmose-Infektion durch Oozysten aus trockenem Katzenkot möglich ist, sollte man Vorsicht im Umgang mit Kot aller für *N. caninum* als Wirt in Frage kommender Tiere (z.B. Hund, Nager, Fuchs) walten lassen.

Im Unterschied zu Aborten und Totgeburten bei Rindern (BOULTON et al., 1995; BUXTON, 1997a; DUBEY und ROMMEL, 1992; FONDEVILA et al., 1998), Ziegen (DUBEY et al., 1992a), Hunden (DUBEY und LINDSAY, 1989b) wurden an menschlichen Aborten keine Hinweise auf einen Neosporenbefall gefunden (PETERSEN et al., 1999). Allerdings läßt sich während einer Schwangerschaft sowie bei alten und kranken Menschen bzw. bei bestehender Immundefizienz das Risiko einer *N. caninum*-Infektion bei entsprechend hohem Infektionsdruck nicht ganz ausschließen.

Zudem muß die Möglichkeit der Entwicklung einer humanspezifischen Variante von *N. caninum* – wie im Falle von *N. hughesi* beim Pferd – in Betracht gezogen werden. Deshalb sollten von Menschen, die ein höheres Infektionsrisiko tragen, die gleichen Vorsichtsmaßnahmen getroffen werden, die auch zum Schutz vor einem Toxoplasmenbefall empfohlen werden.

## 17. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die vielen Einzelberichte über *N. caninum* zu bündeln und übersichtlich darzustellen. Insbesondere wird die Bedeutung des Parasiten als Aborterreger beim Rind beschrieben.

Das *Toxoplasma*-ähnliche, beim Hund auftretende Protozoon wurde 1988 als *N. caninum* in die mikrobiologische Nomenklatur aufgenommen. Seither konnte bei 17 unterschiedlichen Tierarten in über 40 Ländern das Vorkommen von *N. caninum* nachgewiesen werden. Es wurden 26 verschiedene Isolate beschrieben. Als weitere Art wurde beim Pferd *N. hughesi* identifiziert, wovon bisher drei Isolate bekannt sind.

Phylogenetische Untersuchungen weisen je nach Methodik sehr unterschiedliche Ergebnisse auf. Vor allem die Verwandtschaftsverhältnisse von *Neospora*, *Toxoplasma* und *Hammondia* werden widersprüchlich diskutiert. Ein Konsens besteht jedoch über die Zugehörigkeit von *N. caninum* zum Stamm der Apicomplexa, Klasse der Sporozoea, Subklasse der Coccidia, Ordnung der Eucoccidia und Unterordnung der Eimeriina.

Der Lebenszyklus von *N. caninum* entspricht dem der Apicomplexa mit ihren Stadien der Sporogonie, Schizogonie und Gamogonie. Der Entwicklungszyklus erfordert Zwischen- und Endwirte. Die Frage nach möglichen Zwischen- und Endwirten, Überleben der Oozysten in der Umwelt und Infektiosität bedarf noch der vollständigen Klärung.

Die Identifikation des Endwirts Hund gelang 1998. Weitere Caniden werden ebenfalls als mögliche Endwirte in Betracht gezogen, die Ausscheidung von *N. caninum*-Oozysten nach experimenteller Infektion konnte aber noch nicht belegt werden. Eine Unterscheidung der *N. caninum*-Oozysten und der Oozysten anderer Eimeriinae wird als sehr schwierig angesehen.

Die Übertragung des Parasiten kann vertikal durch eine Übertragung von Tachyzoiten auf den Foetus oder horizontal über die Aufnahme von Oozysten, Tachyzoiten oder bradyzoitenhaltigem Gewebe erfolgen.

Klinische Symptome der Neosporose beim Rind sind Fruchtbarkeitsstörungen und Aborte. Die Aborte können in einem Bestand sporadisch, endemisch oder epidemisch auftreten, wobei keine jahreszeitliche Häufung feststellbar ist. Meist kommt es nach der Infektion der Mutterkuh und einem einmaligen Abort in den nachfolgenden Trächtigkeiten zum Austragen infizierter, aber klinisch unauffälliger Kälber. Aber auch Mehrfachaborte und Geburten toter oder mißgebildeter Feten sind möglich. Die Häufung von Aborten scheint von den Überlebensbedingungen der Oozysten in der Umwelt abzuhängen. Sind die Muttertiere



chronisch infiziert, spielt das eigene Immunsystem im Hinblick auf Übertragung und Abortwahrscheinlichkeit eine große Rolle.

Zur endgültigen Diagnose der Neosporose reichen serologische Methoden nicht aus. Es muß stets eine histopathologische Untersuchung post mortem erfolgen, die Neosporen-Stadien im Gewebe nachweist. Die Identifikation von *N. caninum* als Aborterreger beim Rind wird durch die Vielzahl der differentialdiagnostisch in Frage kommenden Erreger erschwert. Darüber hinaus wird die histopathologische Diagnostik durch die häufig vorliegende Autolyse von eingesandtem Material beeinträchtigt oder unmöglich gemacht.

Immunologische Studien an trächtigen und nicht-trächtigen, infizierten Rindern und In-vitro-Kultivierung sollen Aufschluß über das Verhalten des Parasiten sowie die zelluläre und humorale Abwehr der Wirte geben, um Interventionsmöglichkeiten zu finden. Die Erforschung der antigenetischen Eigenschaften der Neosporen eröffnet die Aussicht, in nächster Zukunft einen Impfstoff herzustellen, der zwar nicht das Muttertier vor einer Infektion schützt, aber eine Übertragung auf den Foetus und dessen Tod verhindert. Das nächste Ziel besteht in der Verhinderung einer horizontalen Infektion.

Heute steht für Problembestände eine allgemeine Infektionsprävention im Vordergrund. Das Verfüttern eventuell kontaminierten Futters und Wassers soll verhindert, infektiöses Material schnell aus dem Bestand entfernt, und serologische und histopathologische Untersuchungen durchgeführt werden.

Die wirtschaftlichen Auswirkungen der Infektion mit *N. caninum* durch verminderte Fruchtbarkeit, reduzierte Milchleistung und Leistungseinbußen in der Mast sowie Aborte und höhere Behandlungskosten sind beträchtlich. Genaue Angaben über die Höhe des Schadens können zur Zeit noch nicht gemacht werden.

Ein zoonotisches Potential wird den Neosporen nach heutigem Wissenstand abgesprochen. Zwar war es möglich, Rhesusaffen experimentell mit hohen Tachyzoitendosen zu infizieren, aber eine natürliche Infektion wurde bisher nicht beschrieben. Auch die Untersuchungen an menschlichen Aborten ergaben keine Hinweise auf einen Neosporenbefall.

## 18. SUMMARY

### **Neospora caninum – a causal agent of abortion in cows**

The present study gives an overview of the current knowledge of *N. caninum*, particularly concerning the incidence of abortions in cattle populations infected by this parasite.

In 1988 the *Toxoplasma*-like protozoon found in dogs was named *N. caninum*. In more than 40 countries *N. caninum* has been diagnosed since that time and about 17 different species were found to host infections by *N. caninum*. There are reports about 26 isolates. A different species, *N. hughesi*, was found to infect horses. Three different isolates of this species were described.

There are conflicting reports about the exact phylogenetic classification of *N. caninum*. Especially the taxonomical relationship between *Neospora*, *Toxoplasma* and *Hammondia* is still being discussed controversially. It is generally accepted that *N. caninum* belongs to the phylum of Apicomplexa, the class of Sporozoa, the subclass of Coccidia, the order of Eucoccidia and the suborder of Eimeriina.

During its life cycle *N. caninum* passes through various phases like sporogony, schizogony and gamogony. Definitive and intermediate hosts are needed for parasite's development. To date not every detail of the parasite's life has been investigated.

Numerous investigations took place up until 1998 when it became obvious that the dog is a definitive host of *N. caninum*. Currently there is no evidence that other canids may also function as definitive hosts. It is difficult to distinguish oocysts of *N. caninum* from those of other eimerian species.

*N. caninum* is transmitted either vertically from a cow to its fetus by tachyzoites or horizontally by ingesting oocysts, tachyzoites or bradyzoites.

Reduced fertility and abortions are severe problems caused by neosporosis in cattle populations. Abortions can occur sporadically, endemically or epidemically. Concerning the season in which abortions take place a connection to climatic conditions favouring the survival of oocysts in the environment was suggested. But nevertheless *N. caninum* induced abortions can happen during the whole of the year.

After the infection of a cow by *N. caninum* its first pregnancy probably results in abortion. During the following pregnancies the fetus of the same cow is likely to become

infected, too, but abortion is improbable. The resulting calf is infected chronically and also gives birth to infected offsprings. Only in exceptional circumstances may abortion occur again during the second or third pregnancy of the same cow. Sometimes stillbirths or malformations occur. The individual immune system of a cow chronically infected by *N. caninum* plays an important role for the transmission of the fetus and for the probability of abortion.

Serological diagnoses of infections by *N. caninum* have to be confirmed by histopathological examinations to ensure that symptoms observed were really caused by this parasite. But former investigations demonstrate that the confirmation of diagnosis is difficult, especially if tissues dispatched are in bad condition.

Immunological studies have been initiated to learn more about the parasitic activities of *N. caninum* and the host-parasite interaction. There is a chance to develop a vaccine to avoid the transplacental transmission of the parasite. The next step is the prevention of the horizontal infection.

In general prevention from infection is of great importance in herds with infertility and abortions. Feeding with contaminated food and water should be avoided. Furthermore placentas potentially infected and stillborn calves should be removed. Affected herds should be examined serologically and histopathologically.

Economic losses caused by infections by *N. caninum* result from reduced fertility, reduced milk production, lower average daily weight gain as well as from abortion. But up to now the severity of economical losses can not be quantified exactly, because aborted fetuses are not examined routinely.

There is no zoonotic potential of *N. caninum*. Although it was possible to infect monkeys with a high dose of tachyzoites, there has been no natural infection seen up to now. And no indicate of *N. caninum* infections in aborted human fetuses were found.

## 19. LITERATURVERZEICHNIS

- Abbitt, B.;** Craig, T.M.; Jones, L.P.; Huey, R.L.; Eugster, A.K. (1993):  
Protozoal abortion in a herd of cattle concurrently infected with *Hammondia pardalis*.  
J. Am. Vet. Med. Assoc. 203, 444-448
- Agerholm, J.S. und Barr, B.C.** (1994):  
Bovine Abortions Associated with *Neospora* in Denmark.  
Acta vet. scand. 35, 461-464
- Agerholm, J.S.;** Willadsen, C.M.; Nielsen, T.K.; Giese, S.B.; Holm, E.; Jensen, L.; Agger, J.F. (1997):  
Diagnostic Studies of Abortion in Danish Dairy Herds.  
J. Vet. Med. A. 44, 551-558
- Ahn, H.J.;** Song, K.J.; Son, E.S.; Shin, J.C.; Nam, H.W. (2001):  
Protease Activity and Host Cell Binding of the 42-kDa Rhopty Protein from *Toxoplasma gondii* after Secretion.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 287, 630-635
- Ahne, W.** (2000):  
Systematische Zoologie  
In: Zoologie. 1. Auflage: 169-303  
Schattauer Verlag Stuttgart, New York
- Alves, D.;** McEwen, B.; Hazlett, M.; Maxie, G.; Anderson, N. (1996):  
Trends in bovine abortions submitted to the Ontario Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, 1993-1995.  
Can. Vet. J. 37, 287-288
- Anderson, B.C.** (2000):  
Contamination of feedstuffs caused by farm dogs.  
J. Am. Vet. Med. Assoc. 217, 1294
- Anderson, M.L.;** Blanchard, P.C.; Barr, B.C.; Dubey, J.P.; Hoffmann, R.L.; Conrad, P.A. (1991):  
*Neospora*-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle.  
J. Am. Vet. Med. Assoc. 198, 241-244
- Anderson, M.L.;** Palmer, C.W.; Thurmond, M.C.; Picanso, J.P.; Blanchard, P.C.; Breitmeyer, R.E.; Layton, A.W.; McAllister, M.; Daft, B.; Kinde, H.; Read, D.H.; Dubey, J.P.; Conrad, P.A.; Barr, B.C. (1995):  
Evaluation of abortions in cattle attributable to neosporosis in selected dairy herds in California.  
J. Am. Vet. Med. Assoc. 207, 1206-1210

**Anderson, M.L.;** Reynolds, J.P.; Rowe, J.D.; Sverlow, K.W.; Packham, A.E.; Barr, B.C.; Conrad, P.A. (1997):

Evidence of vertical transmission of *Neospora* sp. infection in dairy cattle.

J. Am. Vet. Med. Assoc. 210, 1169-1172

**Anderson, M.L.;** Andrianarivo, A.G.; Conrad, P.A. (2000):

Neosporosis in cattle.

Anim. Reprod. Sci. 60-61, 417-431

**Andrianarivo, A.G.;** Choromanski, L.; McDonough, S.P.; Packham, A.E.; Conrad, P.A. (1999):

Immunogenicity of a killed whole *Neospora caninum* tachyzoite preparation formulated with different adjuvants.

Int. J. Parasitol. 29, 1613-1625

**Andrianarivo, A.G.;** Rowe, J.D.; Barr, B.C.; Anderson, M.L.; Packham, A.E.; Sverlow, K.W.; Choromanski, L.; Loui, C.; Grace, A.; Conrad, P.A. (2000):

A POLYGEN™-adjuvant killed *Neospora caninum* tachyzoite preparation failed to prevent foetal infection in pregnant cattle following i.v./i.m. experimental tachyzoite challenge.

Int. J. Parasitol. 30, 985-990

**Atkinson, R.;** Harper, P.A.W.; Ryce, C.; Morrison, D.A.; Ellis, J.T. (1999):

Comparison of the biological characteristics of two isolates of *Neospora caninum*.

Parasitology 118, 363-370

**Atkinson, R.;** Harper, P.A.W.; Reichel, M.P.; Ellis, J.T. (2000):

Progress in the Serodiagnosis of *Neospora caninum* Infections of Cattle.

Parasitol. Today 16, 110-114

**Atkinson, R.;** Ryce, C.; Miller, C.M.D.; Balu, S.; Harper, P.A.W.; Ellis, J.T. (2001):

Isolation of *Neospora caninum* genes detected during a chronic murine infection.

Int. J. Parasitol. 31, 67-71

**Augustine, P.C.;** Jenkins, M.C.; Dubey, J.P. (1999):

Effect of polyclonal antisera developed against dense granule-associated *Neospora caninum* protein on cell invasion and development in vitro by *Neospora caninum* tachyzoites.

Parasitology 119, 441-445

**Bacsadi, A.;** Bajmócy, E.; Matiz, K.; Kiss, I. (2001):

Bovine Abortion associated with *Neospora caninum* in Hungary.

Acta Vet. Hung. 49, 185-189

**Baker, D.G.;** Morishita, T.Y.; Brooks, D.L.; Shen, S.K.; Lindsay, D.S.; Dubey, J.P. (1995):

Experimental oral inoculations in birds to evaluate potential definitive host of *Neospora caninum*.

J. Parasitol., 81, 783-785

**Bannister, L.H. und Dluzewski, A.R. (1990):**

The ultrastructure of red cell invasion in malaria infections: a review.

Blood Cell 16, 257-292

- Barber, J.S.; Trees, A.J.; Owen, M.; Tennant, B. (1993):**  
Isolation of *Neospora caninum* from a British dog.  
Vet. Rec. 20, 531-532
- Barber, J.S.; Holmdahl, O.J.M.; Owen, M.R.; Guy, F.; Uggla, A. (1995):**  
Characterization of the first European isolate of *Neospora caninum* (Dubey, Carpenter, Speer, Topper and Uggla).  
Parasitology 111, 563-568
- Barber, J.S.; Gasser, R.B.; Reichel, M.P.; McMillan, D.; Trees, A.J. (1997):**  
Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in different canid populations.  
J. Parasitol. 83, 1056-1058
- Barber, J.S. und Trees, A.J. (1998):**  
Naturally occurring vertical transmission of *Neospora caninum* in dogs.  
Int. J. Parasitol. 28, 57-64
- Barling, K.S.; McNeill, J.W.; Thompson, J.A.; Paschal, J.C.; McCollum, F.T.; Graig, T.M.; Adams, L.G. (2000a):**  
Association of serologic status for *Neospora caninum* with postweaning weight gain and carcass measurements in beef calves.  
J. Am. Vet. Med. Assoc. 217, 1356-1360
- Barling, K.S.; Sherman, M.; Peterson, M.J.; Thompson, J.A.; McNeill, J.W.; Craig, T.M.; Adams, L.G. (2000b):**  
Spatial associations among density of cattle, abundance of wild canids, and seroprevalence, to *Neospora caninum* in a population of beef calves.  
J. Am. Vet. Med. Assoc. 217, 1361-1365
- Barling, K.S.; McNeill, J.W.; Paschal, J.C.; McCollum, F.T.; Craig, T.M.; Adams, L.G.; Thompson, J.A. (2001a):**  
Ranch-management factors associated with antibody seropositivity for *Neospora caninum* in consignments of beef calves in Texas, USA.  
Prev. Vet. Med. 52, 53-61
- Barling, K.S.; Lunt, D.K.; Snowden, K.F.; Thompsen, J.A. (2001b):**  
Association of serologic status for *Neospora caninum* and postweaning feed efficiency in beef steers.  
J. Am. Vet. Med. Assoc. 219, 1259-1262
- Barr, B.C.; Anderson, M.L.; Blanchard, P.C.; Daft, B.M.; Kinde, H.; Conrad, P.A. (1990):**  
Bovine Fetal Encephalitis and Myocarditis Associated with Protozoal Infections.  
Vet. Pathol. 27, 354-361
- Barr, B.C.; Anderson, M.L.; Dubey, J.P.; Conrad, P.A. (1991a):**  
*Neospora*-like Protozoal Infections Associated with Bovine Abortions.  
Vet. Pathol. 28, 110-116
- Barr, B.C.; Conrad, P.A.; Dubey, J.P.; Anderson, M.L. (1991b):**  
*Neospora*-like encephalomyelitis in a calf: pathology, ultrastructure and immunoreactivity.  
J. Vet. Diagn. Invest. 3, 39-46

- 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
- Barr, B.C.; Conrad, P.A.; Sverlow, K.W.; Tarantal, A.F.; Hendrickx, A.G. (1994a):**  
Experimental Fetal and Transplacental *Neospora* Infection in the Nonhuman Primate.  
Lab. Inv. 71, 236-242
- Barr, B.C.; Rowe, J.D.; Sverlow, K.W.; BonDurant, R.H.; Ardans, A.A.; Oliver, M.N.; Conrad, P.A. (1994b):**  
Experimental reproduction of bovine fetal *Neospora* infection and death with a bovine *Neospora* isolate.  
J. Vet. Diagn. Invest. 6, 207-215
- Barr, B.C.; Anderson, M.L.; Sverlow, K.W.; Conrad, P.A. (1995):**  
Diagnosis of bovine fetal Neosporosis infection with an indirect fluorescent antibody test.  
Vet. Rec. 137, 611-613
- Barta, J.R.; Jenkins, M.C.; Danforth, H.D. (1991):**  
Evolutionary Relationship of Avian *Eimeria* Species among Other Apicomplexan Protozoa: Monophyly of the Apicomplexa is Supported.  
Mol. Biol. Evol. 8, 345-355
- Barta, J.R. und Dubey, J.P. (1992):**  
Characterization of anti-*Neospora caninum* hyperimmune rabbit serum by Western blot analysis and immunoelectron microscopy.  
Parasitol. Res. 78, 689-694
- Barta, J.R.; Martin, D.S.; Liberator, P.A.; Dashkevicz, M.; Anderson, J.W.; Feighner, S.D.; Elbrecht, A.; Perkins-Barrow, A.; Jenkins, M.C.; Danforth, H.D.; Ruff, M.D.; Profous-Juchelka, H. (1997):**  
Phylogenetic relationship among eight *Eimeria* species infecting domestic fowl inferred using complete small subunit ribosomal DNA sequences.  
J. Parasitol. 83, 262-271
- Bartels, C.J.M.; Wouda, W.; Schukken, Y.H. (1999):**  
Risk for *Neospora caninum*-associated abortion storms in dairy herds in the Netherlands (1995 to 1997).  
Theriogenology 52, 247-257
- Basso, W.; Venturini, L.; Venturini, M.C. (2001):**  
First isolation of *Neospora caninum* from the feces of a naturally infected dog.  
Parasitol. 87, 612-618
- Baszler, J.R.; Knowles, D.P.; Dubey, J.P.; Gay, J.M.; Mathison, B.A.; McElwain, T.F. (1996):**  
Serological Diagnosis of Bovine Neosporosis by *Neospora caninum* Monoclonal Antibody-Based Competitive Inhibition Enzyme-Linked Immunosorbant Assay.  
J. Clin. Microbiol. 34, 1423-1428

- Beckers, C.J.; Dubremetz, J.F.; Mercereau, P.O.; Joiner, K.A. (1994):**  
The *Toxoplasma gondii* rhoptry protein ROP2 is inserted into the parasitophorous vacuole membrane, surrounding the intracellular parasite, and is exposed to the host cell cytoplasm.  
J. Cell. Biol 127, 947-961
- Beckers, C.J.; Wakefield, T.; Joiner, K.A. (1997):**  
The expression of *Toxoplasma* proteins in *Neospora caninum* and the identification of a gene encoding a novel rhoptry protein.  
Mol. Biochem. Parasitol. 89, 209-223
- Beech, J. und Dodd, D.C. (1974):**  
*Toxoplasma*-like Encephalomyelitis in the Horse.  
Vet. Pathol. 11, 87-96
- Bell, A.S.; Ranford, C.; Lisa, C. (2002):**  
Real-time quantitative PCR in parasitology.  
Trends Parasitol. 18, 337-342
- Bergeron, N.; Fecteau, G.; Paré, J.; Martineau, R.; Villeneuve, A. (2000):**  
Vertical and horizontal transmission of *Neospora caninum* in dairy herds in Québec.  
Can. Vet. J. 41, 464-469
- Bergeron, N.; Girard, C.; Raré, J.; Fecteau, G.; Robinson, J.; Baillargeon, P. (2001):**  
Rare detection of *Neospora caninum* in placentas from seropositive dams giving birth to full-term calves.  
J. Vet. Diagn. Invest. 13, 173-175
- Bildfell, R.; Davidson, J.; Dubey, J.P. (1994):**  
Neospora-induced protozoal bovine abortion in Prince Edward Island.  
Can. Vet. J. 35, 122
- Bjerkås, I.; Mohn, S.F.; Presthus, J. (1984):**  
Unidentified cyst-forming Sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs.  
Z. Parasitenk. 70, 271-274
- Bjerkås, I. und Landsverk, T. (1986):**  
Identification of *Toxoplasma gondii* and encephalitozoon cuniculi by immunoperoxidase techniques and electron microscopy, in stored, formalin-fixed, paraffin-embedded tissue.  
Acta vet. scand. 27, 11-22
- Bjerkås, I. und Presthus, J. (1988):**  
Immuno-histochemical and ultrastructural characteristics of a cyst-forming sporozoon associated with encephalomyelitis and myositis in dogs.  
Acta Path. Microbiol. Immunol. Scand. 96, 445-454
- Bjerkås, I. und Presthus, J. (1989):**  
The neuropathologie in toxoplasmosis-like infection caused by a newly recognized cyst-forming sporozoon in dogs.  
Acta Path. Microbiol. Immunol. Scand. 97, 459-468



- Bjerkås, I.** und Dubey, J.P. (1991):  
Evidence that *Neospora caninum* is Identical to the *Toxoplasma*-like Parasite of Norwegian Dogs.  
Acta vet. scand. 32, 407-410
- Bjerkås, I.**; Jenkins, M.C.; Dubey, J.P. (1994):  
Identification and Characterization of *Neospora caninum* Tachyzoite Antigens Useful for Diagnosis of Neosporosis.  
Clin. Diagn. Lab. Immunol. 1, 214-221
- Björkman, C.**; Lundén, A.; Holmdahl, J.; Barber, J.; Trees, A.J.; Uggla, A. (1994a):  
*Neospora caninum* in Dogs: detection of antibodies by ELISA using an iscom antigen.  
Parasite Immunol. 16, 643-648
- Björkman, C.**; Lundén, A.; Uggla, A. (1994b):  
Prevalence of Antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in Swedish Dogs.  
Acta vet. scand. 35, 445-447
- Björkman, C.**; Johansson, O.; Stenlund, S.; Holmdahl, O.J.M.; Uggla, A. (1996):  
*Neospora* species infection in a herd of dairy cattle.  
J. Am. Vet. Med. Assoc. 208, 1441-1444
- Björkman, C.**; Holmdahl, O.J.M.; Uggla, A. (1997):  
An indirect enzyme-linked immunoassay (ELISA) for demonstration of antibodies to *Neospora caninum* in serum and milk of cattle.  
Vet. Parasitol. 68, 251-260
- Björkman, C.** und Hemphill, A. (1998):  
Characterization of *Neospora caninum* iscom antigens using monoclonal antibodies.  
Parasite Immunol. 20, 73-80
- Björkman, C.**; Näslund, K.; Stenlund, S.; Maley, S.W.; Buxton, D.; Uggla, A. (1999):  
An IgG avidity ELISA to discriminate between recent and chronic *Neospora caninum* infection.  
J. Vet. Diagn. Invest. 11, 41-44
- Björkman, C.** und Uggla, A. (1999):  
Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection.  
Int. J. Parasitol. 29, 1497-1507
- Björkman, C.**; Alenius, S.; Emanuelsson, U.; Uggla, A. (2000):  
*Neospora caninum* and Bovine Virus Diarrhoea Virus Infections in Swedish Dairy Cows in Relation to Abortion.  
Vet. J. 159, 201-206
- Black, J.**; Francis, M.J.; Nicholls, M.J. (1995):  
Protecting young domesticated animals from infectious disease.  
Vet. Annu. 25, 46-61

- Blagburn**, B.L.; Lindsay, D.S.; Swango, L.J.; Pidgeon, G.L.; Braund, K.G. (1988):  
Further characterization of the biology of *H. heydorni*.  
Vet. Parasitol. 27, 193-198
- Boothroyd**, J.C.; Hehl, A.; Knoll, L.J.; Manger, I.D. (1998):  
The surface of *Toxoplasma*: more and less.  
Int. J. Parasitol. 28, 3-9
- Boulton**, J.G.; Gill, P.A.; Cook, R.W.; Fraser, G.C.; Harper, P.A.W.; Dubey, J.P. (1995):  
Bovine *Neospora* abortion in north-eastern New South Wales.  
Aust. Vet. J. 72, 119-120
- Brindley**, P.J.; Gazzinelli, R.T.; Denkers, E.Y.; Davis, S.W.; Dubey, J.P.; Belfort, R.;  
Martins, M.C.; Silveira, C.; Jamra, L.; Waters, A.P.; Sher, A. (1993):  
Differentiation of *Toxoplasma gondii* from closely related coccidia by riboprint analysis and a  
surface antigen gene polymerase chain reaction.  
Am. J. Trop. Med. Hyg. 48, 447-456
- Bryan**, L.A.; Gajadhar, A.A.; Dubey, J.P.; Haines, D.M. (1994):  
Bovine neonatal encephalomyelitis associated with a *Neospora* sp. protozoan.  
Can. Vet. J. 35, 111-113
- Buxton**, D. (1998):  
Protozoan infections (*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis* spp.) in sheep  
and goats: recent advances.  
Vet. Res. 29, 289-310
- Buxton**, D.; Caldow, G.L.; Maley, S.W.; Marks, J.; Innes, E.A. (1997a):  
Neosporosis and bovine abortion in Scotland.  
Vet. Rec. 141, 649-651
- Buxton**, D.; Maley, S.W.; Thomson, K.M.; Trees, A.J.; Innes, E.A. (1997b):  
Experimental Infection of Non-pregnant and Pregnant Sheep with *Neospora caninum*.  
J. Comp. Path. 117, 1-16
- Buxton**, D.; Maley, S.W.; Pastoret, P.P.; Brochier, B.; Innes, E.A. (1997c):  
Examination of red foxes (*Vulpes vulpes*) from Belgium for antibody to *Neospora caninum*  
and *Toxoplasma gondii*.  
Vet. Rec. 141, 308-309
- Buxton**, D.; McAllister, M.M.; Dubey, J.P. (2002):  
The comparative pathogenesis of neosporosis.  
Trends Parasitol. 18, 546-552
- Cabaj**, W.; Choromanski, L.; Rodgers, S.; Moskwa, B.; Malczewski, A. (2000):  
*Neospora* infections in aborting dairy cows in Poland.  
Acta Parasitologica 45, 113-114

**Campero**, C.M.; Anderson, M.L.; Conosciuto, G.; Odriozola, H.; Bretschneider, G.; Poso, M.A. (1998):

*Neospora caninum*-associated abortion in a dairy herd in Argentina.

Vet. Rec. 143, 228-229

**Canada**, N.; Meireles, C.S.; Rocha, A. (2002):

First Portuguese isolate of *Neospora caninum* from an aborted fetus from a dairy herd with endemic neosporosis.

Parasitol. 110, 11-15

**Cesbron-Delauw**, M.F. (1994):

Dense granule organelles of *Toxoplasma gondii*: their role in the host-parasite relationship.

Parasitol. Today 10, 293-296

**Cheadle**, M.A.; Lindsay, D.S.; Blagburn, B.L. (1999a):

Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs.

Vet. Parasitol. 85, 325-330

**Cheadle**, M.A.; Lindsay, D.S.; Rowe, S.; Dykstra, C.C.; Williams, M.A.; Spencer, J.A.; Toivio-Kinnucan, M.A.; Lenz, S.D.; Newton, M.A.; Rolsma, M.D.; Blagburn, B.L. (1999b):  
Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in horses.

Int. J. Parasitol. 29, 1537-1543

**Cheadle**, M.A.; Rowe, S.; Dykstra, C.C. (1999c):

Seroprevalence of *Neospora* sp. in Alabama horses and isolation and biological characterization of *Neospora* from naturally infected horse.

Int. J. Parasitol. 29, 1544-1546

**Chi**, J.; VanLeeuwen, J.; Weersink, A.; Keefe, G. (2002):

Direct production losses and treatment costs from bovine viral diarrhoea virus, bovine leukosis virus, *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis, and *Neospora caninum*.

Prev. Vet. Med. 55, 137

**Cole**, R.A.; Lindsay, D.S.; Dubey, J.P.; Blagburn, B.L. (1993):

Detection of *Neospora caninum* in tissue sections using a murine monoclonal antibody.

J. Vet. Diagn. Invest. 5, 579-584

**Cole**, R.A.; Lindsay, D.S.; Blagburn, B.L.; Dubey, J.P. (1995):

Vertical transmission of *Neospora caninum* in mice.

J. Parasitol. 81, 730-732

**Collery**, P.M. (1995a):

*Neospora* encephalomyelitis in a calf.

Vet. Rec. 2, 52

**Collery**, P.M. (1995b):

*Neospora* abortion in cattle in Ireland.

Vet. Rec. 136, 595

- Collery, P. M.** (1996):  
Neosporosis in domestic animals.  
Irish Vet. J. inc. Irish Vet. Times 49, 152-156
- Collery, P.M.; Bradley, J.; Fagan, J.; Jones, P.; Redehan, E.; Weavers, E.** (1996):  
Causes of Perinatal Calf Mortality in the Republic of Ireland.  
Irish Vet. J. inc. Irish Vet. Times 49, 491-496
- Conrad, P.A.; Barr, B.C.; Sverlow, K.W.; Anderson, M.; Daft, B.; Kinde, H.; Dubey, J.P.; Munson, L.; Ardans, A.** (1993a):  
In vitro isolation and characterization of a *Neospora* sp. from aborted bovine foetuses.  
Parasitology 106, 239-249
- Conrad, P.A., Sverlow, K.; Anderson, M.; Rowe, J.; BonDurant, R.; Tuter, G.; Breitmayer, R.; Palmer, C.; Thurmond, M.; Ardans, A.; Dubea, J.P.; Dunamel, G.; Barr, B.** (1993b):  
Detection of serum antibody responses in cattle with natural or experimental *Neospora* infections.  
J. Vet. Diagn. Invest. 5, 572-578
- Conraths, F.J.; Bauer, C.; Becker, W.** (1996):  
Nachweis von Antikörpern gegen *Neospora caninum* bei Kühen in hessischen Betrieben mit Abort- und Fruchtbarkeitsproblemen.  
Dtsch. tierärztl. Wschr. 103, 221-224
- Conraths, F.J. und Schares, G.** (1999):  
Diagnostik und Epidemiologie *Neospora caninum*-assoziierter Aborte beim Rind.  
Tierärztl. Prax. 27 (G), 145-153
- Conraths, F.J. und Schares, G.** (2000):  
*Neospora caninum*:1-5  
<http://www.dainet.de/bfav/organisation/ifed/krankheiten/neospora1.html/>  
1.11.2001
- Corbellini, L.G.; Colodel, E.M.; Driemeier, D.** (2001):  
Granulomatous encephalitis in a neurologically impaired goat kid associated with degeneration of *Neospora caninum* tissue cysts.  
J. Vet. Diagn. Invest. 13, 416-419
- Corbellini, L.G.; Driemeier, D.; Cruz, C.F.E.; Gondim, L.F.P.; Wald, V.** (2002):  
Neosporosis as a cause of abortion in dairy cattle in Rio Grande do Sul, southern Brazil.  
Vet. Parasitol. 103, 195-202
- Cox, F.E.G.** (1994):  
The evolutionary expansion of the Sporozoa.  
Int. J. Parasitol. 24, 1301-1316
- Cuddon, P.; Lin, D.S.; Bowman, D.D.; Lindsay, D.S.; Miller, T.K.; Duncan, I.D.; DeLahunta, A.; Cummings, J.; Suter, M.; Cooper, B.; King, J.M.; Dubey, J.P.** (1992):  
*Neospora caninum* Infection in English Springer Spaniel Littermates.  
J. Vet. Intern. Med. 6, 325-332

**Current**, W.L.; Upton, S.J.; Long, P.L. (1990):

Taxonomy and live cycles.

In: Coccidiosis of man and domestic animals. 1. Edition: 1-16

Boca Raton, Fl: CRC Press, Long, P.L. (Ed.)

**Daft**, B.M.; Barr, B.C.; Collins, N.; Sverlow, K. (1996):

*Neospora* encephalomyelitis and polyradiculoneuritis in an aged mare with Cushing's disease.

Equine Vet. J. 28, 240-243

**Dannat**, L.; Guy, F.; Trees, A.J. (1995):

Abortion due to *Neospora* species in a dairy herd.

Vet. Rec. 137, 566-567

**Dannatt**, L.; Daniel, R.G.; Griffith, P.C.; Dawson, M. (1998):

Investigation of possible role for chlamydia in a new disease syndrome in dairy cattle.

Vet. Rec. 143, 691-693

**Davison**, H.C.; Trees, A.J.; Guj, F.; Otter, A.; Simpson, V.R.; Jeffrey, M. (1997):

Isolation of bovine *Neospora* in Britain.

Vet. Rec. 141, 607

**Davison**, H. C.; French, N.P.; Trees, A.J. (1999a):

Herd-specific and age-specific seroprevalence of *Neospora caninum* in 14 British dairy herds.

Vet. Rec. 144, 547-550

**Davison**, H.C.; Guy, F.; Trees, A.J.; Ryce, C.; Ellis, J.T.; Otter, A.; Jeffrey, M.; Simpson, V.R.; Holt, J.J. (1999b):

In vitro isolation of *Neospora caninum* from a stillborn calf in the UK.

Res. Vet. Sci. 67, 103-105

**Davison**, H.C.; Otter, A.; Trees, A.J. (1999c):

Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infections in dairy cattle.

Int. J. Parasitol. 29, 1683-1689

**Davison**, H.C.; Otter, A.; Trees, A.J. (1999d):

Significance of *Neospora caninum* in British dairy cattle determined by estimation of seroprevalence in normally calving cattle and aborting cattle.

Int. J. Parasitol. 29, 1189-1194

**De Kruif**, A. (1993):

Störungen der Graviditätsdauer.

In: Tiergeburtshilfe, 4. Auflage: 190-212

Paul Parey Verlag, Berlin und Hamburg, Grunert, E. und Arbeiter, K. (Hrsg.)

**De Marez**, T.; Liddell, S.; Dubey, J.P.; Jenkins, M.C.; Gasbarre, L. (1999):

Oral infection of calves with *Neospora caninum* oocysts from dogs: humoral and cellular responses.

Int. J. Parasitol. 29, 1647-1657

**De Meerschmann, F.;** Speybroeck, N.; Berkvens, D.; Rettigner, C.; Focant, C.; Leclipteux, T.; Cassart, D.; Losson, B. (2002):  
Fetal Infection with *Neospora caninum* in dairy and beef cattle in Belgium.  
Theriogenology 58, 933-945

**Derouin, F.;** Mazon, M.C.; Garin, Y.J.F. (1987):  
Comparative study of tissue culture and mouse inoculation methods for demonstration of *Toxoplasma gondii*.  
J. Clin. Microbiol. 25, 1597-1600

**Désilets, A.;** Julien, L.; Moller, K.; Higgins, R. (1998):  
Isolation of a nicotinamid-adenine dinucleotide (NAD)-dependent *Pasteurella haemolytica*-like organism from the placenta of an aborted cow.  
Can. Vet. J. 39, 507

**Dijkstra, T.;** Barkema, H.W.; Eysker, M.; Wouda, W. (2001a):  
Evidence of post-natal transmission of *Neospora caninum* in Dutch dairy herds.  
Int. J. Parasitol. 31, 209-215

**Dijkstra, T.;** Eysker, M.; Schares, G.; Conraths, F.J.; Wouda, W.; Barkema, H.W. (2001b):  
Dogs shed *Neospora caninum* oocysts after ingestion of naturally infected bovine placenta but not after ingestion of colostrum spiked with *Neospora caninum* tachyzoites.  
Int. J. Parasitol. 31, 747-752

**Dijkstra, T.;** Barkema, H.W.; Björkman, C.; Wouda, W. (2002):  
A high rate of seroconversion for *Neospora caninum* in a dairy herd without an obvious increased incidence of abortions.  
Vet. Parasitol. 109, 203-211

**Dreier, K.J.;** Stewarter, L.W.; Kerlin, R.L.; Ritter, D.M.; Brake, D.A. (1999):  
Phenotypic characterization of a *Neospora caninum* temperature-sensitive strain in normal and immunodeficient mice.  
Int. J. Parasitol. 29, 1627-1634

**Dubey, J.P.** (1977):  
*Toxoplasma, Besnoitia, Sarcocystis* and other tissue cyst-forming coccidia of men and animals.  
In: Parasitic Protozoa, Volume III, 1. Edition: 101-108  
Academic Press, New York, Kreier, J.P. (Ed.)

**Dubey, J.P.** (1993):  
*Toxoplasma, Neospora, Sarcocystis*, and Other Tissue Cyst-Forming Coccidia of Humans and Animals.  
In: Parasitic Protozoa, Volume VI, 2. Edition: 1-158  
Academic Press, New York, Kreier, J.P. (Ed.)

**Dubey J.P.** (1999a):  
Recent advances in *Neospora* and Neosporosis.  
Vet. Parasitol. 84, 349-367

- Dubey, J.P. (1999b):**  
Neosporosis-the first decade of research.  
Int. J. Parasitol. 29, 1485-1488
- Dubey, J.P. (1999c):**  
Neosporosis in cattle: biology and economic impact.  
J. Am. Vet. Med. Assoc. 214, 1160-1163
- Dubey, J.P. (2003):**  
Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals.  
Korean J. Parasitol. 41, 1-16
- Dubey, J.P. und Beattie, C.P. (1988):**  
Toxoplasmosis in cattle (*Bos taurus*).  
In: Toxoplasmosis of animals and man. 1. Edition, 30-33, 107-115, 220  
Boca Raton, Fl: CRC Press
- Dubey, J.P.; Carpenter, J.L.; Speer, C.A.; Topper, M.J.; Uggla, A. (1988a):**  
Newly recognized fatal protozoan disease of dogs.  
J. Am. Vet. Med. Assoc. 192, 1269-1285
- Dubey, J.P.; Hattel, A.L.; Lindsay, D.S.; Topper, M.J. (1988b):**  
Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: Isolation of the causative agent and experimental transmission.  
J. Am. Vet. Med. Assoc. 193, 1259-1263
- Dubey, J.P. und Lindsay, D.S. (1989a):**  
Transplacental *Neospora caninum* infection in cats.  
J. Parasitol. 75, 765-771
- Dubey, J.P. und Lindsay, D.S. (1989b):**  
Transplacental *Neospora caninum* infection in dogs.  
Am. J. Vet. Res. 50, 1578-1579
- Dubey, J.P. und Porterfield, M.L. (1990):**  
*Neospora caninum* (Apicomplexa) in an Aborted Equine Fetus.  
J. Parasitol. 76, 732-734
- Dubey, J.P.; Hartley, W.J.; Lindsay, D.S. (1990a):**  
Congenital *Neospora caninum* infection in a calf with spinal cord anomaly.  
J. Am. Vet. Med. Assoc. 197, 1043-1044
- Dubey, J.P.; Hartley, W.J.; Lindsay, D.S.; Toppert, M.J. (1990b):**  
Fatal Congenital *Neospora caninum* Infection in a Lamb.  
J. Parasitol. 76, 127-130
- Dubey, J.P.; Koestner, A.; Piper, R. C. (1990c):**  
Repeated transplacental transmission of *Neospora caninum* in dogs.  
J. Am. Vet. Med. Assoc. 197, 857-860

- Dubey, J.P.; Lindsay, D.S.; Lipscomb, T.P. (1990d):**  
Neosporosis in Cats.  
Vet. Pathol. 27, 335-339
- Dubey, J.P.; Miller, S.; Lindsay, D.S.; Topper, M.J. (1990e):**  
*Neospora caninum*-associated myocarditis and encephalitis in an aborted calf.  
J. Vet. Diagn. Invest. 2, 66-69
- Dubey, J.P. und Rommel, M. (1992):**  
Durch Protozoen bedingte Aborte bei landwirtschaftlichen Nutztieren.  
Dtsch. tierärztl. Wschr. 99, 355-362
- Dubey, J.P.; Acland, H.M.; Hamir, A.N. (1992a):**  
*Neospora caninum* (Apicomplexa) in a Stillborn Goat.  
J. Parasitol. 78, 532-534
- Dubey, J.P.; Janovitz, E.B.; Skowronek, A.J. (1992b):**  
Clinical neosporosis in a 4-week-old Hereford calf.  
Vet. Parasitol. 43, 137-141
- Dubey, J.P.; Lindsay, D.S.; Anderson, M.L.; Davis, S.W.; Shen, S.K. (1992c):**  
Induced transplacental transmission of *Neospora caninum* in cattle.  
J. Am. Vet. Med. Assoc. 201, 709-713
- Dubey, J.P. und DeLahunta, A. (1993):**  
Neosporosis associated congenital limb deformities in a calf.  
Appl. Parasitol. 34, 229-233
- Dubey, J.P. und Lindsay, D. S. (1993):**  
Neosporosis.  
Parasitol. Today 9, 452-458
- Dubey, J.P.; Hamir, A.N.; Shen, S.K.; Thulliez, P.; Rupprecht, C.E. (1993):**  
Experimental *Toxoplasma gondii* infection in raccoons (*Procyon lotor*).  
J. Parasitol. 79, 548-552
- Dubey, J.P.; Metzger, F.L.; Hattel, A.L.; Lindsay, D.S.; Fritz, D.L. (1995):**  
Canine Cutaneous Neosporosis: Clinical Improvement with Clindamycin.  
Vet. Dermatology 6, 37- 43
- Dubey, J. P. und Lindsay, D.S. (1996):**  
A review of *Neospora caninum* and neosporosis.  
Vet. Parasitol. 67, 1-59
- Dubey, J.P.; Lindsay, D.S.; Adams, D.S.; Gay, J.M.; Baszler, T.V.; Blagburn, B.L.; Thulliez, P. (1996a):**  
Serologic responses of cattle and other animals infected with *Neospora caninum*.  
Am. J. Vet. Res. 57, 329-336



- Dubey, J.P.;** Rigoulet, J.; Lagourette, P.; George, C.; Longeart, L.; LeNet, J.L. (1996b):  
Fatal transplacental neosporosis in a deer (*Cervus eldi siamensis*).  
J. Parasitol. 82, 338-339
- Dubey, J.P.;** Abbitt, B.; Topper, M.J.; Edwards, J.F. (1998a):  
Hydrocephalus Associated with *Neospora caninum* Infection in an Aborted Bovine Fetus.  
J. Comp. Path. 118, 169-173
- Dubey, J.P.;** Dorough, K.R.; Jenkins, M.C. (1998b):  
Canine neosporosis: clinical signs, diagnosis, treatment and isolation of *Neospora caninum* in mice and cell culture.  
Int. J. Parasitol. 28, 1293-1304
- Dubey, J.P.;** Hollis, K.; Romand, S.; Thulliez, P.; Kwok, O.C.H.; Hungerford, L.; Anchor, C.; Etter, D. (1999a):  
High prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*).  
Int. J. Parasitol. 29, 1709-1711
- Dubey, J.P.;** Venturini, M.C.; Venturini, L.; McKinney, J.; Pecoraro, M. (1999b):  
Prevalence of antibodies to *Sarcocystis neurona*, *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in horses from Argentina.  
Vet. Parasitol. 86, 59-62
- Dubey, J.P.;** Romand, S.; Thulliez, P.; Kwok, O.C.H.; Shen, S.K.; Gamble, H.R. (1999c):  
Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in horses in North America.  
J. Parasitol. 85, 968-969
- Dubey, J.P.;** Kerber, C.E.; Ganstrom, D.E. (1999d):  
Serologic prevalence of *Sarcocystis neurona*, *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in Brazil.  
J. Am. Vet. Med. Assoc. 15, 970-972
- Dubremetz, J.F.;** Achbarou, A.; Bermudes, D.; Joiner, K.A. (1993):  
Kinetics and pattern of organelle exocytosis during *Toxoplasma gondii* host-cell interaction.  
Parasitol. Today 79, 401-408
- Dubremetz, J.F. und McKerrow, J.H.** (1995):  
Invasion mechanisms.  
In: Biochemistry and Molecular Biology of Parasites, 1. Edition: 307-322  
Academic Press, New York, Marr, J.J., Müller, M. (Ed.)
- Duivenvoorden, J. und Lusion, P.** (1995):  
*Neospora* abortions in eastern Ontario dairy herds.  
Can. Vet. J. 36, 623
- Dyer, R.M.;** Jenkins, M.C.; Kwok, O.C.H.; Douglas, L.W.; Dubey, J.P. (2000):  
Serologic survey of *Neospora caninum* infection in a closed dairy cattle herd in Maryland: risk of serologic reactivity by production groups.  
Vet. Parasitol. 90, 171-181

**Edelhofer, R.** (2001):

Neosporose

2. Alpacher Tagung der Österreichischen Gesellschaft für Tierärzte

**Ellis, J.T.** (1999):

Gene discovery and prospects for Vaccination against *N. caninum*.

Proceedings COST-Action 820 Workshop on „Vaccines against animal coccidiosis“.

Interlaken, Switzerland, Gottstein, B. und Hemphill, A. (Ed.)

**Ellis, J.T.; Luton, K.; Baverstock, P.R.; Brindley, P.J.; Nimmo, K.A.; Johnson, A.M.** (1994):

The Phylogeny of *Neospora caninum*.

Mol. Biochem. Parasitol. 64, 303-311

**Ellis, J.T.; Luton, K.; Baverstock, P.R.; Whitworth, G.; Tenter, A.M.; Johnson, A.M.** (1995):

Phylogenetic relationship between *Toxoplasma* and *Sarcocystis* deduced from a comparison of 18S rRNA sequences.

Parasitology 110, 521-528

**Ellis, J.T.; Amoyal, G.; Ryce, C.; Harper, P.A.W.; Clough, K.A.; Homan, W.L.; Brindley, P.J.** (1998):

Comparison of the large subunit ribosomal DNA of *Neospora* and *Toxoplasma* and development of a new genetic marker for their differentiation based on the D2 domain.

Mol. Cell. Probes 12, 1-13

**Ellis, J.T.; McMillan, D.; Ryce, C.; Payne, S.; Atkinson, R.; Harper, P.A.W.** (1999):

Development of a single tube nested polymerase chain reaction assay for the detection of *Neospora caninum* DNA.

Int. J. Parasitol. 29, 1589-1596

**Ellis, J.T.; Ryce, C.; Atkinson, R.; Balu, S.; Jones, P.; Harper, P.A.W.** (2000):

Isolation, characterization and expression of a GRA2 homologue from *Neospora caninum*.

Parasitology, 120, 383-390

**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

**Escalante, A.A. und Ayala, F.J.** (1995):

Evolutionary origin of *Plasmodium* and other Apicomplexa based on rRNA genes.

Proceedings of the National Academy of Sciences USA 92, 5793-5797

**Esslemont, R.J. und Kossaibati, M.A.** (1997):

Culling of 50 dairy herds in England.

Vet. Rec. 40, 36-39

**Ferroglio, E. und Rossi, L.** (2001):

Prevalence of *Neospora caninum* antibodies in wild ruminants from Italian Alps.

Vet. Rec. 148, 754-755

**Fioretti**, D.P.; Rosignoli, L.; Ricci, G.; Moretti, A.; Pasquali, P.; Polidori, G.A. (2000):  
*Neospora caninum* Infection in a Clinically Healthy Calf: Parasitological Study and Serological Follow-up.  
J. Vet. Med. B 47, 47-53

**Fischer**, H.G.; Stachelhaus, S.; Sohm, M.; Meyer, H.E.; Reichmann, G. (1998):  
GRA7, an excretory 29 kDa *Toxoplasma gondii* dense granule antigen released by infected host cells.  
Mol. Biochem. Parasitol. 91, 251-262

**Fondevila**, D.; Anor, S.; Pumarola, M.; Dubey, J.P. (1998):  
*Neospora caninum* identification in an aborted bovine fetus in Spain.  
Vet. Parasitol. 77, 187-189

**French**, N.P.; Clancy, D.; Davison, H.C.; Trees, A.J. (1999):  
Mathematical models of *Neospora caninum* infection in dairy cattle: transmission and options for control.  
Int. J. Parasitol. 29, 1691-1704

**Frenkel**, J.K.; Mehlhorn, H.; Heydorn, A.O. (1987):  
Beyond the oocyst: over the molehills and mountains of coccidialand.  
Parasitol. Today 3, 250-252

**Frey**, H.R. (1997a):  
Infektiöse Pustulöse Vulvovaginitis.  
In: Virusinfektionen einheimischer Haussäugetiere. 1. Auflage: 33-34  
Ferdinand Enke Verlag Stuttgart, Liess, B. (Hrsg.)

**Frey**, H.R. (1997b):  
Infektiöse Bovine Rhinotracheitis.  
In: Virusinfektionen einheimischer Haussäugetiere. 1. Auflage: 38-40  
Ferdinand Enke Verlag Stuttgart, Liess, B. (Hrsg.)

**Fry**, M. und Williams, R.B. (1984):  
Effects of decoquinat and clopidol on electron transport in mitochondria of *Eimeria tenella*.  
Biochem. Pharmacol. 33, 229-240

**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

**Gäher**, M. (2001):  
Reversibles Koma durch *Neospora*-Infestation?  
Prakt. Tierarzt 82, 88-93

- Galinski, M.R.** und **Barnwell, J.W.** (1996):  
*Plasmodium vivax*: merozoites, invasion of reticulocytes and considerations for malaria vaccine development.  
 Parasitol. Today 12, 20-28
- Gedek, B.**; **Kaaden, O.R.**; **Mahnel, H.**; **Mayr, A.** (1993):  
 Spezielle Bakteriologie und Mykologie.  
 In: Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. 6. Auflage: 536-870  
 Ferdinand Enke Verlag Stuttgart, Mayr, A. (Hrsg.)
- Gondim, L.F.P.**; **Sartor, I.F.**; **Hasegawa, M.**; **Yamane, I.** (1999a):  
 Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in Bahia, Brazil.  
 Vet. Parasitol. 86, 71-75
- Gondim, L.F.P.**; **Sartor, I.F.**; **Monteiro, L.A.**; **Haritani, M.** (1999b):  
*Neospora caninum* infection in an aborted bovine foetus in Brazil.  
 N. Z. Vet. J. 47, 35
- Gondim, L.F.P.**; **Saeki, H.**; **Onaga, H.**; **Haritani, M.**; **Yamane, I.** (1999c):  
 Maintenance of *Neospora caninum* tachyzoites using Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*).  
 N. Z. Vet. J. 47, 36
- Gondim, L.F.P.**; **Pinheiro, A.M.**; **Santos, P.O.M.**; **Jesus, E.E.V.**; **Ribeiro, M.B.**; **Fernandes, H.S.**; **Almeida, M.A.O.**; **Freire, S.M.**; **Meyer, R.**; **McAllister, M.M.** (2001):  
 Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected dog, and production of encysted bradyzoites in gerbils.  
 Vet. Parasitol. 101, 1-7
- Gondim, L.F.P.**; **Gao, L.**; **McAllister, M.M.** (2002):  
 Improved production of *Neospora caninum* oocysts, cyclical oral transmission between dogs and cattle, and in vitro isolation from oocysts.  
 J. Parasitol. 88, 1159-1163
- González, L.**; **Buxton, D.**; **Atxaerandio, R.**; **Aduriz, G.**; **Maley, S.**; **Marco, J.C.**; **Cuervo, L.A.** (2000):  
 Bovine abortion associated with *Neospora caninum* in northern Spain.  
 Vet. Rec. 144, 145-150
- Gottstein, B.**; **Hentrich, B.**; **Wyss, R.**; **Thür, B.**; **Busato, A.**; **Stärk, K.D.C.**; **Müller, N.** (1998):  
 Molecular and immundiagnostic investigations on bovine neosporosis in Switzerland.  
 Int. J. Parasitol. 28, 679-691
- Gottstein, B.**; **Hentrich, B.**; **Wyss, R.**; **Thür, B.**; **Bruckner, L.**; **Müller, N.**; **Kaufmann, H.**; **Waldvogel, A.** (1999):  
 Molekular- und immundiagnostische Untersuchungen zur bovinen Neosporose in der Schweiz.  
 Schweiz. Arch. Tierheilk. 141, 59-68

- Gottstein, B.;** Eperon, S.; Dai, W.J.; Cannas, A.; Hemphill, A.; Greif, G. (2001):  
Efficiency of toltrazuril and ponazuril against experimental *Neospora caninum* infection in mice.  
Parasitol. Res. 87, 43-48
- Graham, D.A.;** Smith, J.A.; McLaren, I.E.; Ellis, W.A. (1996):  
Stillbirth/perinatal weak calf syndrome: serological examination for evidence of *Neospora caninum* infection.  
Vet. Rec. 139, 523-524
- Graham, D.A.;** Calvert, V.; Whyte, M.; Marks, J. (1999):  
Absence of serological evidence for human *Neospora caninum* infection.  
Vet. Rec. 144, 672-673
- Gray, M.L.;** Harmon, B.G.; Sales, L.; Dubey, J.P. (1996):  
Visceral neosporosis in a 10-year-old horse.  
J. Vet. Diagn. Invest. 8, 130-133
- Greene, C.E.;** Cook, J.R.; Mahaffey, E.A. (1985):  
Clindamycin for treatment of *Toxoplasma* polymyositis in a dog.  
J. Am. Vet. Med. Assoc. 187, 631-634
- Grimwood, J. und Smith, J.E.** (1992):  
*Toxoplasma gondii*: the role of a 30 kDa surface protein in host cell invasion.  
Exp. Parasitol. 74, 106-111
- Gunning, R.F.;** Gumbrell, R.C.; Jeffrey, M. (1994):  
*Neospora* infection and congenital ataxia in calves.  
Vet. Rec. 134, 558
- Guo, Z.G. und Johnson, A.M.** (1995):  
Genetic comparison of *Neospora caninum* with *Toxoplasma* and *Sarcocystis* by random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction.  
Parasitol. Res. 81, 365-370
- Gupta, G.D.;** Lakritz, J.; Kim, J.H.; Kim, D.Y.; Kim, J.K.; Marsh, A.E. (2002):  
Seroprevalence of *Neospora*, *Toxoplasma gondii* and *Sarcocystis* neurona antibodies in horses from Jeju Island, South Korea.  
Vet. Parasitol. 106, 193-201
- Gutell, R.R.;** Larsen, N.; Woese, C.R. (1994):  
Lessons from an evolving rRNA: 16S and 23S rRNA structures from a comparative perspective.  
Microbiol. Rev. 58, 10-26
- Haberkorn, A.** (1996):  
Chemotherapy of human and animal coccidiosis; state and perspectives.  
Parasitol. Res. 82, 193-199

- Hackstein**, J.H.P.; Mackenstedt, U.; Mehlhorn, H.; Meijerink, J.P.P.; Schubert, H.; Leunissen, J.A.M. (1995):  
Parasitic apicomplexans harbor a chlorophyll a-D1 complex, the potential target for therapeutics triazines.  
Parasitol. Res. 81, 207-216
- Hässig**, M.; Eggenberger, E.; Künzle, S.; Rüschi, P. (1991):  
Überprüfung der Bestandesberatung in Betrieben mit gehäuftem Verwerfen beim Rind.  
Schweiz. Arch. Tierheilk. 142, 55-64
- Harder**, H. und Haberkorn, A. (1989):  
Possible mode of action of toltrazuril: studies on two *Eimeria* species and mammalian and *Ascaris suum* enzymes.  
Parasitol. Res. 76, 8-12
- Harder**, T.C. (1997):  
Rinderpest.  
In: Virusinfektionen einheimischer Haussäugetiere. 1. Auflage: 26-28  
Ferdinand Enke Verlag Stuttgart, Liess, B. (Hrsg.)
- Harkins**, D.; Clements, D.N.; Maley, S.; Marks, J.; Wright, S.; Esteban, I.; Innes, E.A.; Buxton, D. (1998):  
Western Blot Analysis of the IgG Responses of Ruminants Infected with *Neospora caninum* and with *Toxoplasma gondii*.  
J. Comp. Path. 119, 45-55
- Harmelin**, A.; Dubey, J.P.; Perl, S.; Nyska, A.; Jakobson, B.; Shpigel, N.; Orgad, U. (1995a):  
Neosporosis- another cause of bovine abortions in Israel.  
Isr. J. Vet. Med. 50, 55-56
- Harmelin**, A.; Perl, S.; Nyska, A.; Jakobson, B.; Shpigel, N.; Orgad, U.; Dubey, J.P. (1995b):  
Neosporosis-associated bovine abortion in Israel.  
Vet. Rec. 136, 80
- Hartley**, W.J. und Blackmore, W.J. (1974):  
An Unidentified Sporozoan Encephalomyelitis in Sheep.  
Vet. Path. 11, 1-12
- Hattel**, A.L.; Castro, M.D.; Gummo, J.D.; Weinstock, D.; Reed, J.A.; Dubey, J.P. (1998):  
Neosporosis-associated bovine abortion in Pennsylvania.  
Vet. Parasitol. 74, 307-313
- Hay**, W.H.; Shell, L.G.; Lindsay, D.S.; Dubey, J.P. (1990):  
Diagnosis and treatment of *Neospora caninum* infection in a dog.  
J. Am. Vet. Med. Assoc. 197, 87-89
- Heil-Franke**, G.; Plagemann, O.; Singer, H. (1993):  
Virologische und bakteriologische Untersuchungsergebnisse von abortierten Rinderfeten aus Nordbayern.  
Tierärztl. Umschau 48, 16-20

- Helman, R.G.;** Stair, E.L.; Lehenbauer, T.W.; Rodgers, S.; Saliki, J.T. (1998):  
Neosporal abortion in Oklahoma cattle with emphasis on the distribution of brain lesions in aborted fetuses.  
J. Vet. Diagn. Invest. 10, 292-295
- Helmick, B.;** Otter, A.; McGarry, J.; Buxton, D. (2002):  
Serological investigation of aborted sheep and pigs for infection by *Neospora caninum*.  
Res. Vet. Sci. 73, 187
- Hemphill, A.** (1996):  
Subcellular localisation and functional characterization of Nc-p43, a major *Neospora caninum* tachyzoite surface protein.  
Infect. Immun. 64, 4279-4287
- Hemphill, A.** (1999):  
The Host-Parasite relationship in Neosporosis.  
Adv. Parasitol. 43, 47-104
- Hemphill, A. und** Gottstein, B. (1996):  
Identification of a major surface protein on *Neospora caninum* tachyzoites.  
Parasitol. Res. 82, 497-504
- Hemphill, A.;** Gottstein, B.; Kaufmann, H. (1996):  
Adhesion and invasion of bovine endothelial cells by *Neospora caninum*.  
Parasitology 112, 183-197
- Hemphill, A.;** Felleisen, R.; Connolly, B.; Gottstein, B.; Hentrich, B.; Müller, N. (1997a):  
Characterization of a cDNA-clone encoding Nc-p43, a major *Neospora caninum* tachyzoite surface protein.  
Parasitology 115, 581-590
- Hemphill, A.;** Fuchs, N.; Sonda, S.; Gottstein, B.; Hentrich, B. (1997b):  
Identification and partial characterization of a 36 kDa surface protein on *Neospora caninum* tachyzoites.  
Parasitology 115, 371-380
- Hemphill, A.;** Gajeendran, N.; Sonda, S.; Fuchs, N.; Gottstein, B.; Hentrich, B.; Jenkins, M. (1998):  
Identification and characterisation of a dense granule-associated protein in *Neospora caninum* tachyzoites.  
Int. J. Parasitol. 28, 429-438
- Hemphill, A.;** Fuchs, N.; Sonda, S.; Hehl, A. (1999):  
The antigenic composition of *Neospora caninum*.  
Int. J. Parasitol. 29, 1175-1188
- Hemphill, A.;** Gottstein, B.; Conraths, F.J.; De Meerschmann, F.; Ellis, J.T.; Innes, E.A.; McAllister, M.M.; Ortega-Mora, L.M.; Tenter, A.M.; Trees, A.J.; Uggla, A.; Williams, D.J.L.; Wouda, W. (2000a):  
A European perspective on *Neospora caninum*.  
Int. J. Parasitol. 30, 877-924

- Hemphill, A.;** Müller, N.; Sager, H.; Gottstein, B. (2000b):  
*Neospora caninum* und Neosporose - Grundlagenforschung am Institut für Parasitologie und mögliche Anwendungen.  
Schweiz. Arch. Tierheilk. 142, 257-261
- Herbert, I.V.** (1986):  
Sarcocystis and Toxoplasmosis in goats.  
Goat. Vet. Soc. J. 7, 26-31
- Hernandez, J.;** Risco, C.; Donovan, A. (2001):  
Association between exposure to *Neospora caninum* and milk production in dairy cows.  
J. Am. Vet. Med. Assoc. 219, 632-635
- Heydorn, A.O.** und Mehlhorn, H. (2001):  
Further remarks on *Hammondia hammondi* and the taxonomic importance of obligate heteroxeny.  
Parasitol. Res. 87, 573-577
- Hickson, R.E.;** Simon, C.; Cooper, A.; Spicer, G.S.; Sullivan, J.; Penny, D. (1996):  
Conserved sequence motifs, alignment, and secondary structure for the third domain of animals 12S rRNA.  
Mol. Biol. Evol. 13, 150-169
- Hietala, S.K.** und Thurmond, M.C. (1999):  
Postnatal *Neospora caninum* transmission and transient serologic responses in two dairies.  
Int. J. Parasitol. 29, 1669-1676
- Hillis, D.M.** und Dixon, M.T. (1991):  
Ribosomal DNA: Molecular evolution and Phylogenetic inference.  
Quart. Rev. Biol. 66, 411-446
- Ho, M.S.Y.;** Barr, B.C.; Marsh, A.E.; Anderson, M.L.; Rowe, J.D.; Tarantal, A.F.; Hendrickx, A.G.; Sverlow, K.; Dubey, J.P.; Conrad, P.A. (1996):  
Identification of Bovine *Neospora* Parasites by PCR Amplification and Specific Small-Subunit rRNA Sequence Probe Hybridization.  
J. Clin. Microbiol. 34, 1203-1208
- Ho, M.S.Y.;** Barr, B.C.; Rowe, J.D.; Anderson, M.L.; Sverlow, K.W.; Packham, A.; Marsh, A.E.; Conrad, P.A. (1997a):  
Detection of *Neospora* sp. from infected bovine tissues by PCR and probe hybridization.  
J. Parasitol. 83, 508-514
- Ho, M.S.Y.;** Barr, B.C.; Tarantal, A.F.; Lai, L.T.Y.; Hendrickx, A.G.; Marsh, A.E.; Sverlow, K.W.; Packham, A.E.; Conrad, P.A. (1997b):  
Detection of *Neospora* from Tissues of Experimentally Infected Rhesus Macaques by PCR and Specific DNA Probe Hybridization.  
J. Clin. Microbiol. 35, 1740-1745
- Hobson, J.C.;** Duffield, T.F.; Kelton, D.; Lissemore, K.; Hietala, S.K. (2002):  
*Neospora caninum* serostatus and milk production of Holstein cattle.  
J. Am. Vet. Med. Assoc. 221, 1160-1164



- Holder, A.A.** (1994):  
Proteins on the surface of malaria parasite and cell invasion.  
*Parasitology* 108, 5-18
- Holmdahl, O.J.M.; Björkman, C.; Uggla, A.** (1995):  
A Case of *Neospora* Associated Bovine Abortion in Sweden.  
*Acta vet. scand.* 36, 279-281
- Holmdahl, O.J.M. und Mattson, J.G.** (1996):  
Rapid and sensitive identification of *Neospora caninum* by in vitro amplification of the internal transcribed spacer 1.  
*Parasitology* 112, 177-182
- Holmdahl, O.J.M.; Björkman, C.; Stenlund, S.; Uggla, A.; Dubey, J.P.** (1997):  
Bovine *Neospora* and *Neospora caninum*: One and the Same.  
*Parasitol. Today* 13, 40-41
- Homan, W.L.; Limper, L.; Verlaan, M.; Borst, A.; Vercamen, M.; van Knapen, F.** (1997):  
Comparison of the internal transcribed spacer, ITS 1, from *Toxoplasma gondii* isolates and *Neospora caninum*.  
*Parasitol. Res.* 83, 285-289
- Hornok, S.; Näslund, K.; Hajtós, I.; Tanyi, J.; Tekes, L.; Varga, I.; Uggla, A.; Björkman, C.** (1998):  
Detection of antibodies to *Neospora caninum* in bovine postabortion blood samples from Hungary.  
*Acta Vet. Hung.* 46, 431-436
- Howe, D.K.; Mercier, C.; Messina, M.; Sibley, L.D.** (1997):  
Expression of *Toxoplasma gondii* genes in the closely-related apicomplexan parasite *Neospora caninum*.  
*Mol. Biochem. Parasitol.* 86, 29-36
- Howe, D.K. und Sibley, L.D.** (1997):  
Development of Molecular Genetics for *Neospora caninum*: A Complementary System to *Toxoplasma gondii*.  
*Methods* 13, 123-133
- Howe, D.K.; Crawford, A.C.; Lindsay, D.; Sibley, L.D.** (1998):  
The p29 and p35 immunodominant antigens of *Neospora caninum* tachyzoites are homologous of the family of surface antigens of *Toxoplasma gondii*.  
*Infect. Immun.* 66, 5322-5328
- Howe, D.K. und Sibley, L.D.** (1999):  
Comparison of the major antigens of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*.  
*Int. J. Parasitol.* 29, 1489-1496
- Huong, L.T.T.; Ljungström, B.L.; Uggla, A.; Björkman, C.** (1998):  
Prevalance of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in cattle and water buffaloes in southern Vietnam.  
*Vet. Parasitol.* 75, 53-57

- Illanes, O.; Moore, A.; Pringle, J.; Saindon, A. (1994):**  
*Neospora*-induced congenital myelitis and polyradiculoneuritis in a one-month-old Holstein calf.  
Can. Vet. J. 35, 653-654
- Innes, E.A.; Panton, W.R.; Marks, J.; Trees, A.J.; Holmdahl, J.; Buxton, D. (1995):**  
Interferon gamma inhibits the intracellular multiplication of *Neospora caninum* as shown by incorporation of 3H Uracil.  
J. Comp. Path. 113, 95-100
- Innes, E.A.; Lundén, A.; Esteban, I.; Marks, J.; Maley, S.; Wright, S.; Rae, A.; Harkins, D.; Vermeulen, A.; McKendrick, I.J.; Buxton, D. (2001a):**  
A previous infection with *Toxoplasma gondii* does not protect against a challenge with *Neospora caninum* in pregnant sheep.  
Parasite Immunol. 23, 121-132
- Innes, E.A.; Wright, S.E.; Maley, S.; Rae, A.; Schock, A.; Kirvar, E.; Bartley, P.; Hamilton, C.; Carey, I.M.; Buxton, D. (2001b):**  
Protection against vertical transmission in bovine neosporosis.  
Int. J. Parasitol., 31, 1523-1534
- Jardine, J.E. (1996):**  
The ultrastructure of bradyzoites and tissue cysts of *Neospora caninum* in dogs: absence of distinguishing morphological features between parasites of canine and bovine origin.  
Vet. Parasitol. 62, 231-240
- Jardine, J.E. und Last, R.D. (1993):**  
*Neospora caninum* in aborted twin calves.  
J. South. Afr. Vet. Assoc. 64, 101-102
- Jardine, J.E. und Wells, B.H. (1995):**  
Bovine neosporosis in Zimbabwe.  
Vet. Rec. 137, 223
- Jenkins, M.C.; Wouda, W.; Dubey, J.P. (1997):**  
Serological Response over Time to Recombinant *Neospora caninum* Antigens in Cattle after a Neosporosis-Induced Abortion.  
Clin. Diagn. Lab. Immunol. 4, 270-274
- Jenkins M.C. (2001):**  
Advances and prospects for subunit vaccines against protozoa of veterinary importance.  
Vet. Parasitol. 101, 291-310
- Jensen, A.M.; Björkman, C.; Kjeldsen, A.M.; Wedderkopp, A.; Willadsen, C.; Uggla, A.; Lind, P. (1999):**  
Associations of *Neospora caninum* seropositivity with gestation number and pregnancy outcome in Danish herds.  
Prev. Vet. Med. 40, 151-163

- Jolley**, W.R.; McAllister, M.M.; McGuire, A.M.; Willis, R.A. (1999):  
Repetitive abortion in *Neospora*-infected ewes.  
Vet. Parasitol. 82, 251-257
- Kasper**, L.H. und Minneo J.R. (1994):  
Attachment and invasion of host cells by *Toxoplasma gondii*.  
Parasitol. Today 10, 5-18
- 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 hybridization and PCR.  
Mol. Cell. Probes 10, 289-297
- Khan**, I.A.; Schwartzman, J.D.; Fonseka, S.; Kasper, L.H. (1997):  
*Neospora caninum*: Role for Immune Cytokines in Host Immunity.  
Exp. Parasitol. 85, 24-34
- Kim**, J.H.; Sohn, H.J.; Hwang W.S.; Hwang E.K.; Jean Y.H.; Yamane, I.; Kim D.Y. (2000):  
In vitro isolation and characterisation of bovine *Neospora caninum* in Korea.  
Vet. Parasitol. 90, 147-154
- Kim**, J.H.; Lee, J.K.; Hwang, E.K.; Kim, D.Y. (2002):  
Prevalence of Antibodies to *Neospora caninum* in Korean Native Beef Cattle.  
J. Vet. Med. Sci. 64, 941-943
- Kim**, J.T.; Park, J.Y.; Seo, H.S.; Oh, H.G.; Noh, J.W.; Kim, J.H.; Kim, D.Y.; Youn, H.J. (2002):  
In vitro antiprotozoal effects of artemisinin on *Neospora caninum*.  
Vet. Parasitol. 103, 53-63
- Kjer**, K.M. (1995):  
Use of rRNA secondary structure in phylogenetic studies to identify homologous positions: an example of alignment and data presentations from frogs.  
Mol. Phylogenet. Evol. 4, 314-330
- Köhler**, S.; Delwiche, C.F.; Denny, P.W.; Tilney, L.G.; Webster, P.; Wilson, R.J.M.; Palmer, J.D.; Roos, D.S. (1997):  
A Plastid of Probable Green Algal Origin in Apicomplexan Parasites.  
Science 275, 1485-1489
- Kogut**, M.H. (1990):  
Host specificity of the coccidia.  
In: Coccidiosis of man and domestic animals. 1. Edition: 43-62  
Boca Raton, Fl: CRC Press, Long, P.L. (Ed.)
- Kreutzig**, T. (1994):  
Immunchemie.  
In: Biochemie. 8. Auflage: 267-291  
Jungjohann Verlag mbH, Neckarsulm, Stuttgart

- Lämmler**, C. und Hartwigk, H. (1995):  
*Actinomyces pyogenes* und *Arcanobacterium haemolyticum*.  
 In: Handbuch der bakteriellen Infektionskrankheiten bei Tieren. Band II, 3. Auflage: S.196-240  
 Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart
- Lally**, N.; Jenkins, M.C.; Dubey, J.P. (1996a):  
 Development of a Polymerase chain reaction assay for the diagnosis of neosporosis using the *Neospora caninum* 14-3-3 gene.  
 Mol. Biochem. Parasitol. 75, 169-178
- Lally**, N.; Jenkins, M.C.; Dubey, J.P. (1996b):  
 Evaluation of Two *Neospora caninum* Recombinant Antigens for Use in an Enzyme-Linked Immunosorbant Assay for the Diagnosis of Bovine Neosporosis.  
 Clin. Diagn. Lab. Immunol. 3, 275-279
- Lally**, N.; Jenkins, M.; Liddell, S.; Dubey, J.P. (1997):  
 A dense granule protein (NCDG1) gene from *Neospora caninum*.  
 Mol. Biochem. Parasitol. 87, 239-243
- Landmann**, J.K.; Jillella, D.; O'Donoghue, P.J.; McGowan, M.R. (2002):  
 Confirmation of the prevention of vertical transmission of *Neospora caninum* in cattle by the use of embryo transfer.  
 Aust. Vet. J. 80, 502-503
- Lathe**, C.L. (1994):  
*Neospora caninum* in British dogs.  
 Vet. Rec. 134, 14
- Lerliche**, M.A. und Dubremetz, J.F. (1991):  
 Characterization of the protein contents of rhoptries and dense granules of *Toxoplasma gondii* tachyzoiten by subcellular fractionation and monoclonal antibodies.  
 Mol. Biochem. Parasitol. 45, 249-260
- Levine**, N.D. (1977):  
 Taxonomy of *Toxoplasma*.  
 J. Protozool. 24, 36-41
- Levine**, N.D. (1985):  
 Phylum II. Apicomplexa Levine, 1970.  
 In: An illustrated guide to the Protozoa, 1. Edition: 322-374  
 Society of Protozoologists, Lawrence, Kans, Lee, J.J., Hutner, S.H., Bovee, E.C. (Ed.)
- Levine**, N.D. (1988):  
 The protozoan phylum Apicomplexa.  
 Band II, 1-154  
 CRC Press, Boca Raton, Fla.

- Liddell, S.;** Lally, N.C.; Jenkins, M.C.; Dubey, J.P. (1998):  
Isolation of the cDNA encoding a dense granule associated antigen (NCDG2) of *Neospora caninum*.  
Mol. Biochem. Parasitol. 93, 153-158
- Liddell, S.;** Jenkins, M.C.; Collica, C.M.; Dubey, J.P. (1999a):  
Prevention of vertical transfer of *Neospora caninum* in BALB/c mice by vaccination.  
J. Parasitol. 85, 1072-1075
- Liddell, S.;** Jenkins, M.C.; Dubey, J.P. (1999b):  
A competitive PCR assay for quantitative detection of *Neospora caninum*.  
Int. J. Parasitol. 29, 1583-1587
- Lindsay, D.S.** (2001):  
Neosporosis: an emerging protozoal disease of horses.  
Equine Vet. J. 33, 116-118
- Lindsay, D.S. und Dubey, J.P.** (1989a):  
Evaluation of Anti-coccidial Drugs' Inhibition of *Neospora caninum* Development in Cell Cultures.  
J. Parasitol. 75, 990-992
- Lindsay, D.S. und Dubey, J.P.** (1989b):  
Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections.  
Am. J. Vet. Res. 50, 1981-1983
- Lindsay, D.S. und Dubey, J.P.** (1989c):  
*Neospora caninum* (protozoa: Apicomplexa) infections in mice.  
J. Parasitol. 75, 772-779
- Lindsay, D.S. und Dubey, J.P.** (1990a):  
Infections in mice with tachyzoites and bradyzoites of *Neospora caninum* (protozoa: apicomplexa).  
J. Parasitol. 76, 410-413
- Lindsay, D.S. und Dubey, J.P.** (1990b):  
Effects of sulfadiazine and amprolium on *Neospora caninum* (protozoa: apicomplexa) infections in mice.  
J. Parasitol. 76, 177-179
- Lindsay, D.S. und Dubey, J.P.** (1990c):  
*Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa) infection in rats.  
Can. J. Zool. 68, 1595-1598
- Lindsay, D.S.;** Dubey, J.P.; Blagburn, B.L. (1991):  
Characterization of a *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa) isolate (NC-3) in mice.  
J. Alabama Acad. Sci. 62, 1-8
- Lindsay, D.S.;** Blagburn, B.L.; Dubey, J.P. (1992):  
Factors affecting the survival of *Neospora caninum* bradyzoites in murine tissues.  
J. Parasitol. 78, 70-72

- Lindsay, D.S.; Speer, C.A.; Toivio-Kinnucan, M.A.; Dubey, J.P.; Blagburn, B.L. (1993):**  
Use of infected cultured cells to compare ultrastructural features of *Neospora caninum* from dogs and *Toxoplasma gondii*.  
Am. J. Vet. Res. 54, 103-106
- Lindsay, D.S.; Rippey, N.S.; Cole, R.A.; Parsons, L.C.; Dubey, J.P.; Tidwell, R.R.; Blagburn, B.L. (1994):**  
Examination of the activities of 43 chemotherapeutic agents against *Neospora caninum* tachyzoites in cultured cells.  
Am. J. Vet. Res. 55, 976-981
- Lindsay, D.S.; Lenz, S.D.; Cole, R.A. (1995a):**  
Mouse model for central nervous system *Neospora caninum* infections.  
J. Parasitol. 85, 64-67
- Lindsay, D.S.; Rippey, N.S.; Powe, T.A.; Sartin, E.A.; Dubey, J.P.; Blagburn, B.L. (1995b):**  
Abortions, fetal death, and stillbirths in pregnant pygmy goats inoculated with tachyzoites of *Neospora caninum*.  
Am. J. Vet. Res. 56, 1176-1180
- Lindsay, D.S.; Butler, J.M.; Rippey, N.S.; Blagburn, B.L. (1996a):**  
Demonstration of synergistic effects of sulfonamides and dihydrofolate reductase/thymidylate synthase inhibitors against *Neospora caninum* tachyzoites in cultured cells, and characterization of mutants resistant to pyrimethamine.  
Am. J. Vet. Res. 57, 68-71
- Lindsay, D.S.; Dubey, J.P.; Blagburn, B.L. (1996b):**  
Finding the cause of parasite-induced abortions in cattle.  
Vet. Medicine 91, 64-71
- Lindsay, D.S.; Kelly, E.J.; McKown, R.D.; Stein, F.J.; Plozer, J.; Herman, J.; Blagburn, B.L.; Dubey, J.P. (1996c):**  
Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* Antibodies in Coyotes (*Canis latrans*) and Experimental Infections of Cojotes with *Neospora caninum*.  
J. Parasitol. 82, 657-659
- Lindsay, D.S.; Steinberg, H.; Dubielzig, R.R.; Semrad, S.D.; Konkle, D.M.; Miller, P.E.; Blagburn, B.L. (1996d):**  
Central nervous system neosporosis in a foal.  
J. Vet. Diagn. Invest. 8, 507-510
- Lindsay, D.S.; Butler, J.M.; Blagburn, B.L. (1997):**  
Efficacy of decoquinate against *Neospora caninum* tachyzoites in cell cultures.  
Vet. Parasitol. 68, 35-40
- Lindsay, D.S.; Upton, S.U.; Dubey, J.P. (1999):**  
A structural study of *Neospora caninum* oocyst.  
Int. J. Parasitol. 29, 1521-1523

- Lindsay, D.S.; Little, S.E.; Davidson, W.R. (2002):**  
Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in white-tailed deer, *Odocoileus virginianus*, from the southeastern United States.  
J. Parasitol. 88, 415-417
- Löschenberger, K.; Rössel, C.; Edelhofer, R.; Suchy, A.; Prosl, H. (2000):**  
Diagnose von *Neospora caninum* beim Hund anhand eines Fallbeispiels.  
Tierärztl. Prax. 28 (K), 390-394
- Long, M.T. und Baszler, T.V. (1997):**  
Fetal loss in Balb/c mice infected with *Neospora caninum*.  
J. Parasitol. 83, 508-514
- Long, M.; Baszler, T.V.; Mathison, B.A. (1998):**  
Comparison of intra cerebral parasite load, lesions development and systemic cytokines in mouse strains infected with *Neospora caninum*.  
J. Parasitol. 84, 316-320
- Lotthammer, K.H. (1991):**  
BVD-Aborte in den Sommermonaten.  
Verhandlungsber. 19. Kongreß der DVG, Bad Nauheim, 115-123
- Louie, K.; Sverlow, K.W.; Barr, B.C.; Anderson, M.L.; Conrad, P.A. (1998):**  
Cloning and Characterization of Two Recombinant *Neospora* Fragments and Their Use in Serodiagnosis of Bovine Neosporosis.  
Clin. Diagn. Lab. Immunol. Nov, 692-699
- Louie, K. und Conrad, P.A. (1999):**  
Characterization of a cDNA encoding a subtilisin-like serin protease (Nc-p65) of *Neospora caninum*.  
Mol. Biochem. Parasitol. 103, 211-223
- Lovett, J.L.; Howe, D.K.; Sibley, L.D. (2000):**  
Molecular characterization of thrombospondin-related anonymous protein homologue in *Neospora caninum*.  
Mol. Biochem. Parasitol. 107, 33-43
- Lundén, A.; Marks, J.; Maley, S.W.; Innes, E.A. (1998):**  
Cellular immune responses in cattle experimentally infected with *Neospora caninum*.  
Parasite Immunol. 20, 519-526
- Luton, K.; Gleeson, M.; Johnson, A.M. (1995):**  
rRNA gene sequence heterogeneity among *Toxoplasma gondii* strains.  
Parasitol. Res. 81, 310-315
- Magnino, S.; Vigo, P.G.; Fabbi, M.; Colombo, M.; Bandi, C.; Genchi, C. (1999):**  
Isolation of bovine *Neospora* from a newborn calf in Italy.  
Vet. Rec. 144, 456

- Mainar-Jaime**, R. C.; Thurmond, M.C.; Berzal-Herranz, B.; Hietala, S.K. (1999): Seroprevalence of *Neospora caninum* and abortion in dairy cows in northern Spain. Vet. Rec. 145, 72-75
- Marks**, J.; Lundén, A.; Harkins, D.; Innes, E. (1998): Identification of *Neospora* antigens recognized by CD4+T cells and immune sera from experimentally infected cattle. Parasite Immunol. 20, 303-309
- Marsh**, A.E.; Barr, B.C.; Sverlow, K.; Ho, M.; Dubey, J.P. Conrad, P.A. (1995): Sequences analysis and comparison of ribosomal DNA from bovine *Neospora* to similar coccidial parasites. J. Parasitol. 81, 530-535
- Marsh**, A.E.; Barr, B.C.; Madigan, J.; Lakritz, J.; Nordhausen, R.; Conrad, P.A. (1996): Neosporosis as a cause of equine protozoal myeloencephalitis. J. Am. Vet. Med. Assoc. 209, 1907-1913
- Marsh**, A.E.; Barr, B.C.; Packham, A.E.; Conrad, P.A. (1998): Description of a new *Neospora* species (Protozoa: Apicomplexa: Sarcocystidae). J. Parasitol. 84, 983-991
- Marsh**, A.E.; Howe, D.K.; Wang, G.; Barr, B.C.; Cannon, N.; Conrad, P.A. (1999): Differentiation of *Neospora hughesi* from *Neospora caninum* based on their immunodominant surface antigen, SAG1 and SRS2. Int. J. Parasitol. 29, 1575-1582
- Mayhew**, I.G.; Smith, K.C.; Dubey, J.P.; Gatward, L.V.; McGlennon, N.J. (1991): Treatment of encephalomyelitis due to *Neospora caninum* in a litter of puppies. J. Small. Anim. Pract. 32, 609-612
- McAllister**, M.M. (2000): *Neospora caninum*: its oocysts and its identity: an opinion Parasitol. Res. 86, 860
- McAllister**, M.M. (2001): Do cows protect fetuses from *Neospora caninum* transmission? Trends Parasitol. 17, 6
- McAllister**, M.M.; Huffman, E.M.; Hietala, S.K.; Conrad, P.A.; Anderson, M.L.; Salman, M.D. (1996a): Evidence suggesting a point source exposure in an outbreak of bovine abortion due to neosporosis. J. Vet. Diagn. Invest. 8, 355-357
- McAllister**, M.M.; McGuire, A.M.; Jolley, W.R.; Lindsay, D.S.; Trees, A.J.; Stobart, R.H. (1996b): Experimental Neosporosis in Pregnant Ewes and Their Offspring. Vet. Pathol. 33, 647-655



- McAllister, M.M.; Parmley, S.F.; Weiss, V.J.; McGuire, A.M. (1996c):**  
An immunohistochemical method for detecting bradyzoite antigen (BAG 5) in *Toxoplasma gondii*-infected tissue crossreacts with a *Neospora caninum* bradyzoite antigen.  
J. Parasitol. 82, 354-355
- McAllister, M.M.; Dubey, J.P.; Lindsay, D.S.; Jolley, W.R.; Wills, R.A.; McGuire, A.M. (1998a):**  
Dogs are the definitive hosts of *Neospora caninum*.  
Int. J. Parasitol. 28, 1473-1478
- McAllister, M.M.; Jolley, W.R.; Wills, R.; Lindsay, D.S.; McGuire, A.M.; Tranas, J.D. (1998b):**  
Oral inoculation of cats with tissue cysts of *Neospora caninum*.  
Am. J. Vet. Res. 59, 441-444
- McAllister, M.M.; Wills, R.A.; McGuire, A.M.; Jolley, W.R.; Tranas, J.D.; Williams, E.S.; Lindsay, D.S.; Björkman, C.; Belden, E.L. (1999):**  
Ingestion of *Neospora caninum* tissue cysts by *Mustela* species.  
Int. J. Parasitol. 29, 1531-1536
- McAllister, M.M.; Björkman, C.; Anderson-Sprecher, R.; Rogers, D.G. (2000):**  
Evidence of point-source exposure to *Neospora caninum* and protective immunity in a herd of beef cows.  
J. Am. Vet. Med. Assoc. 217, 881-887
- McGlennon, N.J.; Jefferies, A.R.; Casas, C. (1990):**  
Polyradiculoneuritis and polymyositis due to a *Toxoplasma*-like protozoan: diagnosis and treatment.  
J. Small. Anim. Pract. 31, 102-104
- McGuire, A.M.; McAllister, M.M.; Jolley, W.R.; Anderson-Sprecher, R.C. (1997):**  
A protocol for the production of *Neospora caninum* tissue cysts in mice.  
J. Parasitol. 83, 647-651
- McGuire, A.M.; McAllister, M.; Wills, R.A.; Tranas, J.D. (1999):**  
Experimental inoculation of domestic pigeons (*Columbia livia*) and zebra finches (*Poephila guttata*) with *Neospora caninum* tachyzoites.  
Int. J. Parasitol. 29, 1525-1529
- McIntosh, D.W. und Haines, D.M. (1994):**  
*Neospora* infection in an aborted fetus in British Columbia.  
Can. Vet. J. 35, 114-115
- McNamée, P. und Jeffrey, M. (1994):**  
*Neospora*-associated bovine abortion in Northern Ireland.  
Vet. Rec. 134, 48
- McNamée, P.T.; Trees, A.J.; Guy, F.; Moffet, D.; Kilpatrick, D. (1996):**  
Diagnosis and prevalence of neosporosis in cattle in Northern Ireland.  
Vet. Rec. 138, 419-420

- Medlin, L.;** Elwood, H.J.; Stickel, S.; Sogin, M.L. (1988):  
The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions.  
*Gene* 71, 491-499
- Mehlhorn, H.;** Ortmann-Falkenstein, G.; Haberkorn, A. (1984):  
The effects of sym. triacinones on developmental stages of *Eimeria tenella*, *Eimeria maxima*  
and *Eimeria acervulina*: a light and electron microscopical study.  
*Z. Parasitenk.* 70, 173-182
- Mehlhorn, H. und Heydorn, A.O.** (2000):  
*Neospora caninum*: Is it really different from *Hammondia heydorni* or is it a strain of  
*Toxoplasma gondii*? An opinion.  
*Parasitol. Res.* 86, 169-178
- Miller, C.M.D.;** Quinn, H.E.; Windsor, P.A.; Ellis, J.T. (2002):  
Characterization of the first Australian isolate of *Neospora caninum* from cattle.  
*Aust. Vet. J.* 80, 620-625
- Moen, A.R.;** Wouda, W.; Mul, M.F.; Graat, E.A.M.; van Werfen, T. (1998):  
Increased risk of abortion following *Neospora caninum* abortion outbreaks: a retrospective  
and prospective cohort study in four dairy herds.  
*Theriogenology* 49, 1301-1309
- Moennig, V.** (1997):  
Bovine Virusdiarrhoe.  
In: *Virusinfektionen einheimischer Haussäugetiere*. 1. Auflage: 41-44  
Ferdinand Enke Verlag Stuttgart, Liess, B. (Hrsg.)
- Moore, D.P.;** Campero, C.M.; Odeon, A.C.; Posso, M.A. (2002):  
Seroepidemiology of beef and dairy herds and fetal study of *Neospora caninum* in Argentina.  
*Vet. Parasitol.* 107, 303-316
- Morales, E.S.;** Trigo, F.J.; Ibarra, F.V.; Puente, E.C.; Santacruz, M. (2001):  
Seroprevalence study of bovine neosporosis in Mexico.  
*J. Vet. Diagn. Invest.* 13, 413-415
- Morrison, D.A.** (1996):  
Phylogenetic tree-building.  
*Int. J. Parasitol.* 26, 589-617
- Morrison, D.A. und Ellis, J.T.** (1997):  
Effects of Nucleotide Sequence Alignment on Phylogeny Estimation: A Case Study of rDNAs  
of Apicomplexa.  
*Mol. Biol. Evol.* 14, 428-441
- 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

**Mugridge**, N.B.; Morrison, D.A.; Heckerroth, A.R.; Johnson, A.M.; Tenter, A.M. (1999):  
Phylogenetic analysis based on full-length large subunit ribosomal RNA gene sequence comparison reveals that *Neospora caninum* is more closely related to *Hammondia heydorni* than *Toxoplasma gondii*.  
Int. J. Parasitol. 29, 1545-1556

**Muse**, S.V. (1995):  
Evolutionary analyses of DNA sequences subject to constraints on secondary structure.  
Genetics 139, 1429-1439

**Naguleswaran**, A.; Cannas, A.; Keller, N.; Vonlaufen, N.; Schares, G.; Conraths, F.J.; Björkman, C.; Hemphill, A. (2001):  
*Neospora caninum* Microneme Protein NcMIC3: Secretion, Subcellular Localization, and Functional Involvement in Host Cell Interaction.  
Infect. Immun. 69, 6483-6494

**Nietfeld**, J.C.; Dubey, J.P.; Anderson, M.L.; Libal, M.C.; Yaeger, M.Y.; Neiger, R.D. (1992):  
*Neospora*-like protozoan infection as a cause of abortion in dairy cattle.  
J. Vet. Diagn. Invest. 4, 223-226

**Nishikawa**, Y.; Xuan, X.; Nagasawa, H.; Igarashi, I.; Fujisaki, K.; Otsuka, H.; Mikami, T. (2000a):  
Monoclonal antibody inhibition of *Neospora caninum* tachyzoite invasion into host cells.  
Int. J. Parasitol. 30, 51-58

**Nishikawa**, Y.; Kousaka, Y.; Fukumoto, S.; Xuan, X.; Nagasawa, H.; Igarashi, I.; Fujisaki, K.; Otsuka, H.; Mikami, T. (2000b):  
Delivery of *Neospora caninum* surface protein, NcSRS2 (Nc-p43), to mouse using recombinant vaccinia virus.  
Parasitol. Res. 86, 934-939

**Nishikawa**, Y.; Ikeda, H.; Fukumoto, S.; Xuan, X.; Nagasawa, H.; Otsuka, H.; Mikami, T. (2000c):  
Immunisation of dogs with a canine herpesvirus vector expressing *Neospora caninum* surface protein, NcSRS2.  
Int. J. Parasitol., 30, 1167-1171

**Nishikawa**, Y.; Inoue, N.; Xuan, X.; Nagasawa, H.; Igarashi, I.; Fujisaki, K.; Otsuka, H.; Mikami, T. (2001a):  
Protective efficacy of vaccination by recombinant vaccinia virus against *Neospora caninum* infection.  
Vaccine 19, 1381-1390

**Nishikawa**, Y.; Inoue, N.; Xuan, X.; Nagasawa, H.; Igarashi, I.; Fujisaki, K.; Otsuka, H.; Mikami, T. (2001b):  
Prevention of vertical transmission of *Neospora caninum* in BALB/c mice recombinant vaccinia virus carrying NcSRS2 gene.  
Vaccine 19, 1710-1716

**Nishikawa, Y.;** Tragoolpua, K.; Makala, L.; Xuan, X.; Nagasawa, H. (2002):  
*Neospora caninum* NcSRS2 is a transmembrane protein that contains a  
glycosylphosphatidylinositol anchor in insect cells.  
Vet. Parasitol. 109, 191-201

**N.N. (2001a):**  
Abort, Pilze  
<http://www.vet.med.fu-berlin.de/tiergeburt/strobruce.html/>  
22.11.2001

**N.N. (2001b):**  
Brucellose beim Rind  
<http://www.vet.med.fu-berlin.de/tiergeburt/strobruce.html/>  
22.11.2001

**N.N. (2001c):**  
BVD/MD  
<http://www.vet.med.fu-berlin.de/tiergeburt/strobruce.html/>  
22.11.2001

**N.N. (2001d):**  
IBR-IPV  
<http://www.vet.med.fu-berlin.de/tiergeburt/strobruce.html/>  
22.11.2001

**N.N. (2001e):**  
Leptospirose beim Rind  
<http://www.vet.med.fu-berlin.de/tiergeburt/strobruce.html/>  
22.11.2001

**N.N. (2001f):**  
Listeriose  
<http://www.vet.med.fu-berlin.de/tiergeburt/strobruce.html/>  
22.11.2001

**N.N. (2001g):**  
Mykoplasmen beim Rind  
<http://www.vet.med.fu-berlin.de/tiergeburt/strobruce.html/>  
22.11.2001

**N.N. (2001h):**  
Pyogenes-Abort  
<http://www.vet.med.fu-berlin.de/tiergeburt/strobruce.html/>  
22.11.2001

**N.N. (2001i):**  
Rickettsiose, Q-Fieber  
<http://www.vet.med.fu-berlin.de/tiergeburt/strobruce.html/>  
22.11.2001

- N.N.** (2001j):  
Salmonellen  
<http://www.vet.med.fu-berlin.de/tiergeburt/strobruce.html/>  
22.11.2001
- N.N.** (2001k):  
Vibrionenseuche beim Rind  
<http://www.vet.med.fu-berlin.de/tiergeburt/strobruce.html/>  
22.11.2001
- Obendorf, D.L.; Murray, N.; Veldhuis, G.; Munday, B.L.; Dubey, J.P.** (1995):  
Abortion caused by Neosporosis in cattle.  
*Aust. Vet. J.* 72, 117-120
- Ogino, H.; Watanabe, E.; Watanabe, S.; Agawa, H.; Narita, M.; Haritani, M.; Kawashima, K.** (1992):  
Neosporosis in an Aborted Fetus and Newborn Calf.  
*J. Comp. Path.* 107, 231-237
- Ooi, H.K.; Huang, C.C.; Yang, C.H.; Lee, S.H.** (2000):  
Serological survey and first finding of *Neospora caninum* in Taiwan, and the detection of its antibodies in various body fluids of cattle.  
*Vet. Parasitol.* 90, 47 – 55
- Osawa, T.; Wastling, J.; Maley, S.; Buxton, D.; Innes, E.A.** (1998):  
A multiple antigen ELISA to detect *Neospora*-specific antibodies in bovine sera, bovine foetal fluids, ovine and caprine sera.  
*Vet. Parasitol.* 79, 19-34
- O'Toole, D. und Jeffrey, M.** (1987):  
Congenital sporozoan encephalomyelitis in a calf.  
*Vet. Rec.* 121, 563-566
- Otter, A.; Griffith, I.B.; Jeffrey, M.** (1993):  
Bovine *Neospora caninum* abortion in the UK.  
*Vet. Rec.* 133, 375
- Otter, A.; Jeffrey, M.; Griffith, I.B.; Dubey, J.P.** (1995):  
A survey of the incidence of *Neospora caninum* infection in aborted and stillborn bovine fetuses in England and Wales.  
*Vet. Rec.* 136, 602-606
- Otter, A.; Jeffrey, M.; Scholes, S.F.E.; Helmick, B.; Wilesmith, J.W.; Trees, A.J.** (1997a):  
Comparison of histology with maternal and fetal serology for the diagnosis of abortion due to bovine neosporosis.  
*Vet. Rec.* 141, 487-489
- Otter, A.; Wilson, B.W.; Scholes, S.F.E.; Jeffrey, M.; Helmick, B.; Trees, A.J.** (1997b):  
Results of a survey to determine whether *Neospora* is a significant cause of ovine abortion in England and Wales.  
*Vet. Rec.* 140, 175-177

- Ould-Amrouche**, A.; Klein, F.; Osdoit, C.; Mohammed, H.O.; Touratier, A.; Sanaa, M.; Mialot, J.P. (1999):  
Estimation of *Neospora caninum* seroprevalance in dairy cattle from Normandy, France.  
Vet. Res. 30, 531-538
- Packham**, A.E.; Sverlow, K.W.; Conrad, P.A.; Loomis, E.F.; Rowe, J.D.; Anderson, M.L.; Marsh, A.E.; Cray, C.; Barr, B.C. (1998):  
A Modified Agglutination Test for *Neospora caninum*: Development, Optimazation and Comparison to the Indirect Fluorescent-Antibody Test and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.  
Clin. Diagn. Lab. Immunol. 5, 467-473
- Paré**, J.; Thurmond, M.C.; Hietala, S.K. (1994):  
Congenital *Neospora* infection in dairy cattle.  
Vet. Rec. 134, 531-532
- Paré**, J.; Hietala, S.K.; Thurmond, M.C. (1995a):  
An enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA) for serological diagnosis of *Neospora* sp. infections in cattle.  
J. Vet. Diagn. Invest. 7, 352-359
- Paré**, J.; Hietala, S.K.; Thurmond, M.C. (1995b):  
Interpretation of an indirect fluorescent antibody test for diagnosis of *Neospora* sp. infection in cattle.  
J. Vet. Diagn. Invest. 7, 273-275
- Paré**, J.; Thurmond, M.C.; Hietala, S.K. (1996):  
Congenital *Neospora caninum* Infection in Dairy Cattle and Associated CalfhooD Mortality.  
Can. J. Vet. Res. 60, 133-139
- Paré**, J.; Thurmond, M.C.; Hietala, S.K. (1997):  
*Neospora caninum* antibodies in cows during pregnancy as a predictor of congenital infection and abortion.  
J. Parasitol. 83, 82-87
- Paré**, J.; Fecteau, G.; Fortin, M.; Marsolais, G. (1998):  
Seroepidemic study of *Neospora caninum* in dairy herds.  
J. Am. Vet. Med. Assoc. 213, 1595-1598
- Parish**, S.M.; Maag-Miller, L.; Besser, T.E.; Weidner, J.P.; McElwain, T.; Knowles, D.P. (1987):  
Myelitis associated with protozoal infection in newborn calves.  
J. Am. Vet. Med. Assoc. 191, 1599-1600
- Patitucci**, A.N. (1995):  
The use of immunohistochemistry for the diagnosis of neosporosis in cattle and dogs.  
N. Z. Vet. J. 43, 124
- Patitucci**, A.N.; Charleston, W.A.G.; Alley, M.R.; O'Connor, R.J.; Pomroy, W.E. (1999):  
Serological study of a dairy herd with a recent history of *Neospora* abortion.  
N. Z. Vet. J. 47, 28-30

- Payne, S.** und Ellis, J. (1996):  
Detection of *Neospora caninum* DNA by the polymerase chain reaction.  
Int. J. Parasitol. 26, 347-351
- Perez, E.;** Gonzales, O.; Dolz, G.; Morales, J.A.; Barr, B.; Conrad, P.A. (1998):  
First report of bovine neosporosis in dairy cattle in Costa Rica.  
Vet. Rec. 142, 520-521
- Perl, S.;** Sheikat, N.; Yakobson, B.; Zacharin, Y.; Heines, D. (1997):  
*Neospora caninum* abortion in cattle: histopathology and immunohistochemistry.  
Isr. J. Vet. Med. 52, 155
- Peters, M.;** Lutttkefels, E.; Heckerroth, A.R.; Schares, G. (2000):  
Canine neosporosis: clinical and pathological findings and first isolation of *Neospora caninum* in Germany.  
Parasitol. Res. 86, 1-7
- Peters, M.;** Lütkefels, E.; Heckerroth, A.R.; Schares, G. (2001):  
Immunohistochemical and ultrastructural evidence for *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dogs and cattle.  
Int. J. Parasitol. 31, 1144-1148
- Petersen, E.;** Lebech, M.; Jensen, L.; Lind, P.; Rask, M.; Bagger, P.; Björkman, C.; Uggla, A. (1999):  
*Neospora caninum* infection and repeated abortions in humans.  
Emerg. Inf. Dis. 5, 278-280
- Pfeiffer, D.U.;** Williamson, N.B.; Reichel, M.P.; Wichtel, J.J.; Teague, W.R. (2002):  
A longitudinal study of *Neospora caninum* infection on a dairy farm in New Zealand.  
Prev. Vet. Med. 54, 11-24
- Pfister, K.** (2002):  
Die Neosporose des Rindes.  
Vet-MedReport Sonderausgabe V3/26, 10-11
- Pitel, P.H.;** Pronost, S.; Romand, S.; Thulliez, P.; Fortier, G.; Ballet, J.J. (2001):  
Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in horses in France.  
Equine Vet. J. 33, 205-207
- Plagemann, O.** und Weber, A. (1993):  
Der Schimmelpilz „*Mortierella wolfii*“ als Ursache von sporadischen Aborten beim Rind.  
Tierärztl. Umschau 48, 559-563
- Poli, A.;** Mancianti, F.; Carli, M.A.; Stroschio, M.C.; Kramer, L. (1998):  
*Neospora caninum* infection in a Bernese cattle dog from Italy.  
Vet. Parasitol. 78, 79-85
- Quinn, H.;** Ellis, J.; Smith, N. (2002):  
*Neospora caninum*: a cause of immune-mediated failure of pregnancy?  
Trends Parasitol. 18, 391

- Quintanilla-Gozaló, A.;** Pereira-Bueno, J.; Tabarés, E.; Innes, E.A.; Gonzalés-Paniello, R.; Ortega-Mora, L.M. (1999):  
Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dairy and beef cattle in Spain.  
Int. J. Parasitol. 29, 1201-1208
- Raghupathy, R.** (1997):  
Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy.  
Immunol. Today 18, 478-82
- Reichel, M.P.** (1998):  
Prevalence of *Neospora* antibodies in New Zealand dairy cattle and dogs.  
N. Z. Vet. J. 46, 38
- Reichel, M.P.** (2000):  
*Neospora caninum* infections in Australia and New Zealand.  
Aus. Vet. J. 78, 258-261
- Reichel, M.P. und Drake, J.M.** (1996):  
The diagnosis of *Neospora* abortions in Cattle.  
N. Z. Vet. J. 44 , 151-154
- Romand, S.;** Thulliez, P.; Dubey, J.P. (1998):  
Direct agglutination test for serologic diagnosis of *Neospora caninum* infection.  
Parasitol. Res. 60, 50-53
- Romero, J.J.;** Perez, E.; Dolz, G.; Frankena, K. (2002):  
Factors associated with *Neospora caninum* serostatus in cattle of 20 specialized Costa Rican dairy herds.  
Prev. Vet. Med. 53, 263-273
- Rommel, M.** (1989):  
Recent advances in the knowledge of the biology of the cyst-forming coccidia.  
Angew. Parasit. 30, 173-183
- Rommel, M.** (2000):  
Protozoeninfektionen der Wiederkäuer  
In: Veterinärmedizinische Parasitologie. 5. Auflage, 121-191  
Verlag Paul Parey Berlin und Hamburg, Boch, J. und Supperer, R. (Hrsg.)
- Rühlmann, D.;** Podell, M.; Oglesbee, M.; Dubey, J.P. (1995):  
Canine neosporosis: A case report and literature review.  
J. Am. Anim. Hosp. Assoc. 31, 174-183
- Sager, H.;** Fischer, I.; Furrer, K.; Strasser, M.; Waldvogel, A.; Boerlin, P.; Audigé, L.; Gottstein, B. (2001):  
A Swiss-control study to assess *Neospora caninum*-associated bovine abortions by PCR, histopathology and Serology.  
Vet. Parasitol. 102, 1-15



- Sanderson, M.W.; Gay, J.M.; Baszler, T.V. (2000):**  
*Neospora caninum* seroprevalence and associated risk factors in beef cattle in the northwestern United States.  
 Vet. Parasitol. 90, 15-24
- Sawada, M.; Park, C.H.; Morita, T.; Shimada, A.; Umemura, T.; Haritani, M. (1997):**  
 Pathological Findings of Nude Mice Inoculated with Bovine *Neospora*.  
 J. Vet. Med. Sci. 59, 947-948
- Sawada, M.; Park, C.H.; Kondo, H.; Morita, T.; Shimada, A.; Yamane, I.; Umemura, T. (1998):**  
 Serological Survey of Antibody to *Neospora caninum* in Japanese Dogs.  
 J. Vet. Med. Sci. 60, 853-854
- Sawada, M.; Kondo, H.; Tomioka, Y.; Park, C.H.; Morita, T.; Shimada, A.; Umemura, T. (2000):**  
 Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected adult dairy cow.  
 Vet. Parasitol. 90, 247-252
- Schares, G.; Peters, M.; Wurm, R; Tackmann, K.; Henning, K.; Conraths, F.J. (1997):**  
*Neospora caninum* verursacht Aborte in einem Rinderbestand in Nordrhein-Westfalen.  
 Dtsch. tierärztl. Wschr. 104, 189-228
- Schares, G.; Peters, M.; Wurm, R.; Bärwald, A.; Conraths, F.J. (1998):**  
 The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analysed by serological techniques.  
 Vet. Parasitol. 80, 87-98
- Schares, G.; Conraths, F.J.; Reichel, M.P. (1999):**  
 Bovine Neosporosis: comparison of serological methods using outbreak sera from a dairy herd in New Zealand.  
 Int. J. Parasitol. 29, 1659-1667
- Schares, G.; Heydorn, A.O.; Cüppers, A.; Conraths, F.J.; Mehlhorn, H. (2001a):**  
 Cyclic transmission of *Neospora caninum*: serological findings in dogs shedding oocysts.  
 Parasitol. Res. 87, 873-877
- Schares, G.; Heydorn, A.O.; Cüppers, A.; Conraths, F.J.; Mehlhorn, H. (2001b):**  
*Hammondia heydorni*-like oocysts shed by a naturally infected dog and *Neospora caninum* NC-1 cannot be distinguished.  
 Parasitol. Res. 87, 808-816
- Schares, G.; Wenzel, U.; Müller, T.; Conraths, F.J. (2001c):**  
 Serological evidence for naturally occurring transmission of *Neospora caninum* among foxes (*vulpes vulpes*).  
 Int. J. Parasitol. 31, 418-423

**Schares, G.**; Bärwald, A.; Staubach, C.; Sondgen, P.; Rauser, M.; Schröder, R.; Peters, M.; Wurm, R.; Selhorst, T.; Conraths, F.J. (2002a):  
p38-avidity-ELISA: examination of herds experiencing epidemic or endemic *Neospora caninum*- associated bovine abortion.  
Vet. Parasitol. 106, 293-305

**Schares, G.**; Heydorn, A.O.; Cüppers, A.; Mehlhorn, H.; Geue, L.; Peters, M.; Conraths, F.J. (2002b):  
In contrast to dogs, red foxes (*Vulpes vulpes*) did not shed *Neospora caninum* upon feeding of intermediate host tissues.  
Parasitol. Res. 88, 44-52

**Schock, A.**; Buxton, D.; Spence, J.A.; Low, J.C.; Baird, A. (2000):  
Histopathological survey of aborted fetuses in Scotland with special reference to *Neospora caninum*.  
Vet. Rec. 147, 687-688

**Schock, A.**; Innes, E.A.; Yamane, I.; Latham, S.M.; Wastling, J.M. (2001):  
Genetic and biological diversity among isolates of *Neospora caninum*.  
Parasitology 123, 13-23

**Scholtyssek, E.** (1973):  
Die Deutung von Endodyogenie und Schizogonie bei Coccidien und anderen Sporozoen.  
Z. Parasitenk. 42, 87-104

**Scholtyssek, E.**; Mehlhorn, H.; Müller, B.E.G. (1973):  
Identifikation von Merozoiten der vier cystenbildenden Coccidien (*Sarcocystis*, *Toxoplasma*, *Besnoitia*, *Frankelia*) auf Grund feinstruktureller Kriterien.  
Z. Parasitenk. 42, 185-206

**Schweighardt, H.** (1991):  
Spezifische Abortursachen bei Rind und Schaf unter besonderer Berücksichtigung der mikrobiellen Erreger (Protozoen, Bakterien, Pilze).  
Wien. Tierärztl. Msch. 78, 2-6

**Shivaprasad, H.L.**; Ely, R.; Dubey, J.P. (1989):  
A *Neospora*-like Protozoon Found in an Aborted Bovine Placenta.  
Vet. Parasitol. 34, 145-148

**Simpson, V.R.** (2002):  
Wild animals as reservoirs of infectious diseases in the UK.  
Vet. J. 163, 128-146

**Simpson, V.R.**; Monies, R.J.; Riley, P.; Cromey, D.S. (1997):  
Foxes and neosporosis.  
Vet. Rec. 141, 503

**Slyter, F.J.**; Zimmer, G.M.; Wouda, W. (1990):  
Weak calf syndrome.  
Vet. Rec. 127, 355

**Smith, C.R.;** McGowan, M.R.; Clintstock, C.S.; Corney, B.G.; Ketterer, P.J.; Smythe, L.; Ward, W. (1997):  
Experimental *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo infection of pregnant cattle.  
Aust. Vet. J. 75, 822-826

**Smith, D.D.** (1981):  
The Sarcocystidae: *Sarcocystis*, *Frenkelia*, *Toxoplasma*, *Besnoitia*, *Hammondia*, and *Cystoisospora*.  
J. Protozool. 28, 262-266

**Sogin, M.L.** (1989):  
Evolution of Eukaryotic Mikroorganisms and Their Small Subunit Ribosomal RNAs.  
Amer. Zool. 29, 487-499

**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.  
Mol. Biochem. Parasitol. 97, 97-108

**Sonda, S.;** Fuchs, N.; Gottstein, B.; Hemphill, A. (2000):  
Molecular characterization of a novel microneme antigen in *Neospora caninum*.  
Mol. Biochem. Parasitol. 108, 39-51

**Speer, C.A. und** Dubey, J.P. (1989):  
Ultrastructure of Tachyzoites, Bradyzoites and Tissue Cysts of *Neospora caninum*.  
J. Parasitol. 36, 458-463

**Speer, C.A.;** Dubey, J.P.; McAllister, M.M.; Blixt, J.A. (1999):  
Comparative ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites, and tissue cysts of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*.  
Int. J. Parasitol. 29, 1509-1519

**Stenlund, S.;** Björkman, C.; Holmdahl, O.J.M.; Kindahl, H.; Ugglå, A. (1997):  
Characterization of a Swedish bovine isolate of *Neospora caninum*.  
Parasitol. Res. 83, 214-219

**Stolla, R.** (1985):  
Die embryonale Mortalität als biologisches Regulativ.  
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 98, 197-202

**Stryer, L.** (1988):  
Molekulare Immunologie  
In: Biochemie. 4. Auflage: 925-956  
Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, Oxford

**Sulzer, A.J.;** Scholtyseck, E.; Callaway, C.; Smith, M.T.; Huber, T.W. (1979):  
Diagnosis of Toxoplasmosis by Electron Microscopic Fine-structural Analysis.  
Am. J. Clin. Pathol. 72, 225-229

**Sundermann, C.A.**; Estridge, B.H.; Branton, M.S.; Bridgman, C.R.; Lindsay, D.S. (1997): Immunohistochemical diagnosis of *Toxoplasma gondii*: potential for cross-reactivity with *Neospora caninum*.

J. Parasitol. 83, 440-443

**Sundermann, C.A.** und Estridge, B.H. (1999):

Growth of and competition between *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in vitro.

Int. J. Parasitol. 29, 1725-1732

**Suteeraparp, P.**; Pholpark, S.; Pholpark, M.; Charoenchai, A.; Chompoochan, T.; Yamane; I.; Kashiwazaki, Y. (1999):

Seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* and abortion in dairy cattle from central Thailand.

Vet. Parasitol. 86, 49-57

**Tenter, A.M.** und Johnson, A.M. (1997):

Phylogeny of the Tissue Cyst-forming Coccidia.

Adv. Parasitol. 39, 70-139

**Thilsted, J.P.** und Dubey, J.P. (1989):

Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle.

J. Vet. Diagn. Invest. 1, 205-209

**Thompson, G.**; Canada, N.; do Carmo Topa, M.; Silva, E.; Vaz, F.; Rocha, A. (2001):

First confirmed case of *Neospora caninum*-associated abortion outbreak in Portugal.

Reprod. Domest. Anim. 36, 309-312

**Thornton, R.N.**; Gajadhar, A.; Evans, J. (1994):

*Neospora* abortion epidemic in a dairy herd.

N. Z. Vet. J. 42, 190-191

**Thurmond, M.C.**; Anderson, M.L.; Blanchard, P.C. (1995):

Secular and seasonal trends of *Neospora* abortion in California dairy cows.

J. Parasitol. 81, 364-367

**Thurmond, M.C.** und Hietala, S.K. (1995):

Strategies to control *Neospora* infection in cattle.

Bov. Pract. 29, 60-63

**Thurmond, M.C.** und Hietala, S.K. (1996):

Culling associated with *Neospora caninum* infection in dairy cows.

Am. J. Vet. Res. 57, 1559-1562

**Thurmond, M.C.**; Hietala, S.K.; Blanchard, P.C. (1997):

Herd-based diagnosis of *Neospora caninum*-induced endemic and epidemic abortion in cows and evidence for congenital and postnatal transmission.

J. Vet. Diagn. Invest. 9, 44-49

- Thurmond, M.C. und Hietala, S: K. (1997a):**  
Effect of congenitally acquired *Neospora caninum* infection on risk of abortion and subsequent abortions in dairy cattle.  
Am. J. Vet. Res. 58, 1381-1385
- Thurmond, M.C. und Hietala, S.K. (1997b):**  
Effect of *Neospora caninum* infection on milk production in first-lactation dairy cows.  
J. Am. Vet. Med. Assoc. 210, 672-674
- Thurmond, M.C. und Hietala, S.K. (1999):**  
*Neospora caninum* infection and abortion in cattle.  
In: Current Veterinary Therapy 4, Food Animal Practice, 1. Edition: 425-431  
Practice, Saunders, Philadelphia, PA, Smith, H. (Ed.)
- Tomley F.M. und Soldati, D.S. (2001):**  
Mix and match modules: structure and function of microneme proteins in apicomplexan parasites.  
Trends Parasitol. 17, 81-88
- Trees, A.J.; Guy, F.; Low, J.C.; Roberts, L.; Buxton, D.; Dubey, J.P. (1994):**  
Serological evidence implicating *Neospora* species as a cause of abortion in British cattle.  
Vet. Rec. 134, 405-407
- Trees, A.J.; Davison, H.C.; Williams, D.J.L.; Otter, A.; Bellworthy, S.J. (1996):**  
Neosporosis project.  
Vet. Rec. 139, 299
- Trees, A.J.; Davison, H.C.; Otter, A. (1998):**  
Bovine abortion, *Neospora caninum* and dogs.  
Vet. Rec. 143, 343
- Trees, A.J.; Davison, H.C.; Innes, E.A.; Wastling, J.M. (1999):**  
Towards evaluating the economic impact of bovine neosporosis.  
Int. J. Parasitol. 29, 1195-1200
- Trees, A.J. und Williams, D.J.L. (2000):**  
Neosporosis in the United Kingdom.  
Int. J. Parasitol. 30, 891-893
- Trees, A.J.; McAllister, M.; Guy, C.; McGarry, J.; Smith, R.; Williams, D. (2002):**  
*Neospora caninum*: oocyst challenge of pregnant cows.  
Vet. Parasitol. 109, 147
- Ugglä, A.; Stenlund, S.; Holmdahl, O.J.M.; Jakubek, E.B.; Thebo, P.; Björkman, C. (1998):**  
Oral *Neospora caninum* inoculation of neonatal calves.  
Int. J. Parasitol. 28, 1467-1472
- Venturini, M.C.; Venturini, L.; Bacigalupe, D.; Machuca, M.; Echaide, I.; Basso, W.; Unzaga, J.M.; Di Lorenzo, C.; Guglielmone, A.; Jenkins, M.C.; Dubey, J.P. (1999):**  
*Neospora caninum* infections in bovine fetuses and dairy cows with abortions in Argentina.  
Int. J. Parasitol. 29, 1705-1708

**Vivier, E.** und Desportes, I. (1990):

Phylum Apicomplexa

In: Handbook of Protoctista, 1. Edition: 549-573

Jones & Bartlett, Boston, Mass, Margulis, L., Corliss, J.O., Melkonian, M., Chapman, D.J. (Ed.)

**Waldner, C.L.;** Janzen, E.D.; Ribble, C.S. (1998):

Determination of the association between *Neospora caninum* infection and reproductive performance in beef herds.

J. Am. Vet. Med. Assoc. 213, 685-690

**Waldner, C.L.;** Janzen, E.D.; Henderson, J.; Haines, D.M. (1999):

Outbreak of abortion associated with *Neospora caninum* infection in a beef herd.

J. Am. Vet. Med. Assoc. 215, 1485-1490

**Walsh, C.B.;** Duncan, R.B.; Zajac, A.M.; Blagburn, B.L.; Lindsay, D.S. (2000):

*Neospora hughesi*: Experimental infections in mice, gerbils and dogs.

Vet. Parasitol. 98, 119-129

**Walsh, C.P.;** Vemulapalli, R.; Sriranganathan, N.; Zajac, A.M.; Jenkins, M.C.; Lindsay, D.S. (2001):

Molecular comparison of the dense granule proteins GRA6 and GRA7 of *Neospora hughesi* and *Neospora caninum*.

Int. J. Parasitol. 31, 253-258

**Weber, A.** und Bauer, K. (1991):

Fruchtbarkeitsprobleme: Auf Infektionen achten.

Tierzüchter 43, 400-401

**Weber, A.;** Roth, M.; Ewringmann, T.; Keller, B. (1997):

Aborte beim Rind - mikrobiologische Befunde.

Prakt. Tierarzt 78, 672-679

**Weber, A.;** Zetzmann, K.; Ewringmann, T. (2000):

Vorkommen von Antikörpern gegen *Neospora caninum* bei Kühen in nordbayerischen Beständen mit Abortproblemen.

Tierärztl. Umschau 55, 28-29

**Wegmann, T.G.;** Hui, L.; Guilbert, L.; Mosmann, T.R. (1993):

Bidirectional cytokine interactions in the maternal-foetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon?

Immunol. Today 14, 353-356

**Weiss, L.M.;** Yan, F.M.; Halonen, S.; McAllister, M.M.; Yi, W.Z. (1999):

The in vitro development of *Neospora caninum* bradyzoites.

Int. J. Parasitol. 29, 1713-1723

**Williams, D.J.L.;** McGarry, J.; Guy, F.; Barber, J.; Trees, A.J. (1997):

Novel ELISA for detection of *Neospora*-specific antibodies in cattle.

Vet. Rec. 140, 328-331

- Williams, D.J.L.; Davison, H.C.; Helmick, B.; McGarry, J.; Guy, F.; Otter, A.; Trees, A.J.** (1999):  
Evaluation of a commercial ELISA for detecting serum antibody to *Neospora caninum* in cattle.  
Vet. Rec. 145, 571-575
- Williams, D.J.L.; Guy, C.S.; McGarry, J.W.; Guy, F.; Tasker, L.; Smith, R.F.; MacEachern, K.; Cripps, P.J.; Kelly, D.F.; Trees, A.J.** (2000):  
*Neospora caninum*-associated abortion in cattle: the time of experimentally-induced parasitaemia during gestation determines foetal survival.  
Parasitology 121, 347-358
- Williams, J.H.; Espie, I.; van Wilpe, E.; Matthee, A.** (2002):  
Neosporosis in a white rhinoceros (*Ceratotherium simum*) calf.  
J. S. Afr. Vet. Assoc. 73, 38-43
- Woods, L.W.; Anderson, M.L.; Swift, P.K.; Sverlow, K.W.** (1994):  
Systemic neosporosis in a California black-tailed deer (*Odocoileus hemionus columbianus*).  
J. Vet. Diagn. Invest. 6, 508-510
- Wouda, W.** (2000):  
Diagnosis and epidemiology of bovine neosporosis: a review.  
Vet. Quart. 22, 71-4
- Wouda, W.; de Gee, A.L.M.; Moen, A.R.; Van Knapen, F.** (1995):  
Laboratory experiences with bovine *Neospora* abortion in Dutch dairy herds.  
Proc. Symp. *Neospora* Abortus Bij Het Rund, 3-9
- Wouda, W.; Dubey, J.P.; Jenkins, M.C.** (1997a):  
Serological Diagnosis of Bovine Fetal Neosporosis.  
J. Parasitol. 83, 545-547
- Wouda, W.; Moen, A.R.; Visser, I.J.R.; van Knapen, F.** (1997b):  
Bovine fetal neosporosis: a comparison of epizootic and sporadic abortion cases and different age classes with regard to lesion severity and immunohistochemical identification of organisms in brain, heart, and liver.  
J. Vet. Diagn. Invest. 9, 180-185
- Wouda, W.; Brinkhof, J.; van Maanen, C.; de Gee, A.L.W.; Moen, A.R.** (1998a):  
Serodiagnosis of Neosporosis in Individual Cows and Dairy Herds: A Comparative Study of Three Enzyme-Linked Immunosorbant Assays.  
Clin. Diagn. Lab. Immunol. 5, 711-716
- Wouda, W.; Moen, A.R.; Schukken, Y.H.** (1998b):  
Abortion risk of cows after a *Neospora caninum* epidemic.  
Theriogenology 49, 1311-1316
- Wouda, W.; Bartels, C.J.M.; Moen, A.R.** (1999a):  
Characteristics of *Neospora caninum*-associated abortion storms in dairy herds in the Netherlands (1995-1997).  
Theriogenology 52, 233-245

- Wouda, W.;** Dijkstra, T.; Kramer, A.M.H.; van Manen, C.; Brinkhof, J.M.A. (1999b):  
Seroepidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninum* infections in dogs and cattle.  
Int. J. Parasitol. 29, 1677-1682
- Wyss, R.;** Sager, H.; Müller, N.; Inderbitzin, F.; König, M.; Audigé, L.; Gottstein, B. (2000):  
Untersuchungen zum Vorkommen von *Toxoplasma gondii* und *Neospora caninum* unter fleischhygienischen Aspekten.  
Schweiz. Arch. Tierheilk. 142, 95-108
- Yaeger, M.J.;** Shawd-Wessels, S.; Leslie-Stehen, P. (1994):  
*Neospora* abortion storm in a midwestern dairy.  
J. Vet. Diagn. Invest. 6, 506-508
- 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
- Yamane, I.;** Kohuho, T.; Shimura, K.; Eto, M.; Haritani, M.; Ouchi, Y.; Sverlow, K.W.; Conrad, P.A. (1996):  
In vitro isolation of a bovine *Neospora* in Japan.  
Vet. Rec. 138, 652
- Yamane, I.;** Kokuho, T.; Shimura, K.; Eto, M.; Shibahara, T.; Haritani, M.(1997):  
In vitro isolation and characterisation of a bovine *Neospora* species in Japan.  
Res. Vet. Sci. 63, 77-80.
- Yamane, I.;** Kitani, H.; Kokuho, T.; Shibahara, T.; Haritani, M.; Hamaoka, T.; Shimizu, S.; Koiwai, M.; Shimura, K.; Yokomizo, Y. (2000):  
The inhibitory effect of Interferon Gamma and Tumor necrosis Factor Alpha on Intracellular Multiplication of *Neospora caninum* in Primary Bovine Brain Cells.  
J. Vet. Med. Sci. 62, 347-351
- Yule, A. und Bauer, K. (1989):**  
Bovine Trichomoniasis.  
Parasitol. Today 5, 373-377



## **Danksagung**

Herrn Professor Dr. R. Stolla danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas, für seine freundliche jederzeit gewährte Unterstützung und für die Betreuung bei der Durchführung und Korrektur dieser Arbeit.

Bei Herrn Professor Dr. K. Pfister bedanke ich mich für die Durchsicht und Korrektur der Literaturstudie.

Bedanken möchte ich mich auch besonders bei Frau Dr. Susanne Seidl für ihr Engagement, für konstruktive Vorschläge und die sehr sorgfältige Durchsicht des Manuskripts.

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik, die mich in irgendeiner Weise bei der Durchführung dieser Arbeit unterstützt haben.

Bei meinen Freunden möchte ich mich bedanken für die aufmunternden Worte und wertvollen Ratschläge, die mir stets weitergeholfen haben.

Mein besonderer Dank geht an jene, die mir den Computer, das unbekannte Wesen, näher gebracht haben.

Der größte Dank gilt meiner Familie. Ohne ihre finanzielle und moralische Unterstützung wäre weder das Studium noch diese Arbeit möglich gewesen.

## Lebenslauf

Name: Astrid Katja Mayr

Geburtsdatum: 03.02.1975

Geburtsort: Augsburg

Eltern: Gottfried Mayr  
Inge Mayr, geb. Himbacher

Bruder: Harald Mayr

Schulbildung: 1981 – 1985 Grundschule Westheim  
1985 – 1994 Gymnasium  
A. B. von Stettensches Institut  
Augsburg  
1994 – 2000 Studium der Tiermedizin an der  
Ludwigs-Maximilians-Universität  
München

Approbation: 12.10.2000

Januar 2001-  
Oktober 2003 Dissertation an der Gynäkologischen und  
Ambulatorischen Tierklinik der LMU München

Praktische Tätigkeit: Praxis Jörg Schwabe, Wertingen  
Praxis Johann Schön, Betzigau  
Dr. Michael Bartmann, Sulzberg