

Aus der Medizinischen Kleintierklinik  
Lehrstuhl für Innere Medizin der kleinen Haustiere und Heimtiere  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Katrin Hartmann

Angefertigt unter der Leitung  
von Priv.-Doz. Dr. Andrea Fischer

**Evaluierung von  
Liquorpunktion und PCR zur klinischen Diagnose  
der Enzephalitozoonose beim Kaninchen**

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

vorgelegt von

Ariane Jaß  
aus Gräfelfing

München 2004

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

Dekan: Univ. – Prof. Dr. A. Stolle  
Referentin: Priv. – Doz. Dr. A. Fischer  
Korreferent: Univ. – Prof. Dr. K. Heinritzi

Tag der Promotion: 23. Juli 2004



Meinen Eltern und meiner Oma gewidmet

<b>I</b>	<b>EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>II</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>3</b>
<b>1.</b>	<b>Allgemeines zum Erreger .....</b>	<b>3</b>
1.1	Entdeckung und Taxonomie .....	3
1.2	Entwicklung und Morphologie .....	4
1.3	Wirtsspektrum .....	6
<b>2.</b>	<b>Epizootiologie beim Kaninchen .....</b>	<b>8</b>
2.1	Übertragung .....	8
2.2	Verbreitung und Durchseuchung .....	9
<b>3.</b>	<b>Pathologie und Organtropismus beim Kaninchen .....</b>	<b>10</b>
<b>4.</b>	<b>Immunsystem und Immunreaktion bei Enzephalitozoonose .....</b>	<b>12</b>
4.1	Bedeutung .....	12
4.2	Zelluläre Immunreaktion .....	14
4.3	Humorale Immunreaktion .....	15
4.4	Immunstatus bei chronischer Infektion .....	16
<b>5.</b>	<b>Klinik der Enzephalitozoonose beim Kaninchen .....</b>	<b>17</b>
5.1	Symptomatik beim Kaninchen .....	17
5.1.1	Symptomatik bei Befall des ZNS .....	17
5.1.2	Symptomatik bei Befall der Nieren .....	19
5.1.3	Symptomatik bei Befall der Augen .....	19
5.2	Labordiagnostische Veränderungen .....	20
<b>6.</b>	<b>E. cuniculi-Infektion bei anderen Tierarten und beim Menschen .....</b>	<b>21</b>
6.1	Vorkommen bei Nagetieren .....	21
6.2	Vorkommen bei Karnivoren .....	22
6.3	Vorkommen bei Vögeln .....	26
6.4	Vorkommen bei Primaten .....	27
6.5	Vorkommen beim Menschen .....	28
6.6	Bedeutung als Zoonose .....	29
<b>7.</b>	<b>Diagnostik .....</b>	<b>30</b>
7.1	Direkte Nachweisverfahren .....	30
7.1.1	Histologische Untersuchung .....	30
7.1.2	Nachweis der Sporen im Urin .....	31
7.1.3	Elektronenmikroskopische Untersuchung .....	34
7.1.4	Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	34
7.2	Indirekte Nachweisverfahren .....	36
7.2.1	Serologische Nachweisverfahren .....	37
7.2.2	Aktuelle Bewertung serologischer Nachweisverfahren .....	40
7.3	Möglichkeiten klinischer Diagnosestellung .....	41
<b>8.</b>	<b>Differentialdiagnosen bei neurologischer Manifestation .....</b>	<b>42</b>
8.1	Pasteurellose .....	42
8.2	Trauma .....	43
8.3	Toxoplasmose .....	44
8.4	Ohrmilben .....	45

8.5	Weitere Differentialdiagnosen.....	45
<b>9.</b>	<b>Therapie.....</b>	<b>47</b>
9.1	Bewertung verschiedener Substanzen in vitro.....	47
9.2	Anwendung verschiedener Medikamente in vivo.....	48
9.2.1	Therapie bei primärer ZNS-Manifestation.....	48
9.2.1.1	Einsatz verschiedener Antibiotika.....	48
9.2.1.2	Einsatz von Glukokortikoiden.....	49
9.2.1.3	Einsatz von Benzimidazolen.....	50
9.2.2	Therapie bei primärer Nierenmanifestation.....	52
9.2.3	Therapie bei primärer Augenmanifestation.....	52
<b>III</b>	<b>KAPITEL 1: RESULTS OF CSF ANALYSIS IN HEALTHY RABBITS AND RABBITS WITH ENCEPHALITOOZONOSIS .....</b>	<b>54</b>
<b>IV</b>	<b>KAPITEL 2: POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) FOR THE CLINICAL DIAGNOSIS OF ENCEPHALITOOZONOSIS .....</b>	<b>73</b>
<b>V</b>	<b>ALLGEMEINE DISKUSSION .....</b>	<b>97</b>
1.	Allgemeine methodische Aspekte.....	97
2.	Neurologische Untersuchung bei Kaninchen mit Enzephalitoozonose.....	98
3.	Labordiagnostische Parameter .....	103
4.	Liquorpunktion und Liquoranalyse (Kapitel 1).....	104
5.	Polymerasekettenreaktion (PCR) von Liquor- und Urin (Kapitel 2).....	110
6.	Schlussfolgerungen .....	115
<b>VI</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>116</b>
<b>VII</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>118</b>
<b>VIII</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>119</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ACVIM	American College of Veterinary Internal Medicine
AIDS	Acquired immune deficiency syndrome
ARAS	Aufsteigendes retikulär aktivierendes System
BAEP	brain auditory evoked potentials
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C <sub>1</sub> – C <sub>5</sub>	1. bis 5. Halswirbel
Ca	Calzium
ca.	zirka
CD	cluster of differentiation
CF	Komplementfixation
CIA	Carbon Immunoassay
CNS	central nervous system
CSF	cerebrospinal fluid
d. h.	das heißt
dB	Dezibel
DNA	Desoxyribunukleinsäure
rDNA	ribosomale Desoxyribunukleinsäure
dNTP	di-Nukleotiddiphosphat
DVM	Doctor of veterinary medicine
E. cuniculi	Enzephalitozoon cuniculi
e. g.	for example
EIA	Enzyme immunoassay
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ESVN	European Symposium of Veterinary Neurology
et al.	et alti
etc.	et cetera
g/l	Gramm pro Liter
GLDH	Glutamat-Dehydrogenase
GOT	Glutamatoxalacetat-Transaminase
GTTT	Guanin-Thymin-Thymin-Thymin (=Nukleotidsequenz)

HIV	Humanes Imundefizienz Virus
ID	identity
ID-Test	Itradermal-Test
IFAT	Immunfluoreszenztest
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
Ig	Immunglobulin
IIR	India ink reaction
IK-Test	Intrakutan-Test
IL	Interleukin
IP	Immunoperoxidase
ITS	Internal transcribed spacer region
KBR	Komplementbindungsreaktion
kg	Kilogramm
l	Liter
T <sub>2</sub> – L <sub>3</sub>	2. Brust- bis 3. Lendenwirbel
LMN	lower motor neuron
MHC	major histocompatibility complex
ml	Milliliter
Mnl-I	Restriktionsenzym
OMN	oberes motorisches Neuron
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PD	Privat Dozent
pH	Gewicht Wasserstoff
RBC	red blood cells
RCP-Zellen	renale Choroidplexus-Zellen
RFLP	Restriktionsenzym Längenpolymorphismus
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
SCID	severe combined immunodeficiency
SLP	Schalldruckpegel
sog.	sogenannt
spp.	Subspezies
t-Test.	statistisches Verfahren zur Überprüfung von Mittelwertsunterschieden bei ein oder zwei Stichproben

u. s. w.	und so weiter
u. a.	und andere
UMN	unteres motorisches Neuron, engl. upper motoneuron
UV	ultraviolett
WBC	white blood cells
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil
ZNS	zentrales Nervensystem
%	Prozent
μl	Mikroliter
μmol	Mikromol



# I Einleitung und Problemstellung

Die Enzephalitozoonose, ausgelöst durch *Enzephalitozoon cuniculi* stellt neben einem Trauma die häufigste Erkrankung des ZNS bei Heimtierkaninchen dar (Gentz u. Carpenter 1997). Neben Kaninchen können sich viele weitere Säugetiere, unter anderem auch der Mensch mit *E. cuniculi* infizieren und die *Enzephalitozoonose* wird heute als opportunistische Infektion bei AIDS-Patienten angesehen (Canning u. Hollister 1991; Wasson u. Peper 2000; Gamboa-Dominguez 2003). Zur klinischen Diagnosestellung wird bei Kaninchen mit Verdacht auf *Enzephalitozoonose* hauptsächlich der Nachweis von Antikörpern im Serum mit Tuschetest oder IFAT angewendet. Laut neuerer Studien liegt jedoch bei Heimtierkaninchen in Deutschland eine Seroprävalenz von 42 bis 45 % vor (Meyer-Breckwoldt 1996; Ewringmann u. Göbel 1999). Somit kann mit Hilfe indirekter Nachweismethoden nur die meist chronische *E. cuniculi* Infektion, nicht aber eine aktive Erkrankung selbst eindeutig diagnostiziert werden. Die bei den betroffenen Kaninchen z.T. angewendeten konventionellen Färbemethoden zum Nachweis von *E. cuniculi* Sporen im Urin können zudem durch eine niedrige Sporenkonzentration erschwert sein (Müller 1998). Daher ist bis heute in den meisten Fällen eine sichere Diagnosestellung der *Enzephalitozoonose* bei Kaninchen erst post mortem anhand des typischen histologischen Erscheinungsbildes möglich. Ein Großteil der an *Enzephalitozoonose* erkrankten Kaninchen (45 %), zeigt als Folge der granulomatösen Enzephalitis mit perivaskulären Infiltraten eine neurologische Symptomatik, meist ohne eine klinisch nachweisbare Nierenschädigung (Innes u. Saunders 1962; Shaddock u. Pakes 1971; Wilson 1979; Scharmann et al. 1986; Ewringmann u. Göbel 1999). Anlehnend an das histologische Erscheinungsbild der neurologischen Form der *Enzephalitozoonose* ist bei den betroffenen Kaninchen ein entzündlich veränderter Liquor cerebrospinalis zu erwarten. Das führt zu der Annahme, dass speziell die Untersuchung des Liquor cerebrospinalis zur klinischen Diagnose der *Enzephalitozoonose* beitragen könnte. In der Humanmedizin werden zum sicheren Nachweis der *Enzephalitozoonose* zunehmend mikrobiologische Diagnostikmethoden wie die PCR, zum Nachweis von *E. cuniculi* Antigen in Kot und verschiedenen Körperflüssigkeiten u.a. Urin und Liquor cerebrospinalis eingesetzt (Fedorko et al. 1995; Didier et al. 1996; De Groote et al. 1995;

Katzwinkel-Wladarsch et al. 1997; Franzen et al. 1998; Furuya et al. 2001). Diese Diagnostikmethode gewinnt auch in der Veterinärmedizin bei verschiedenen Krankheiten zunehmend an Bedeutung.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, zu untersuchen, ob die diagnostische Liquoranalyse bei Heimtierkaninchen mit der neurologischen Form der *Enzephalitozoonose* zur klinischen Diagnosestellung beiträgt. Hierfür wurde zum einen die Durchführbarkeit der Liquorpunktion selbst, als auch die Bestimmung einzelner Liquorparameter bei den betroffenen Kaninchen untersucht (Studie 1). Ein weiteres Hauptziel bestand darin, den diagnostischen Wert einer bereits etablierten PCR zum Antigennachweis von *E. cuniculi* bei den genannten Kaninchen zu beurteilen. Die PCR wurde dabei in Liquor cerebrospinalis und Urin erkrankter Kaninchen mit *Enzephalitozoonose* evaluiert und die Ergebnisse der PCR im Urin mit denen der Trichromfärbung nach Weber (1992) verglichen (Studie 2).

## II Literaturübersicht

### 1. Allgemeines zum Erreger

#### 1.1 Entdeckung und Taxonomie

Die erste öffentliche Beschreibung des Erregers erfolgte 1922 durch Wright und Craighead, die während eines Übertragungsversuchs mit dem humanen infantilen Paralysevirus beim Kaninchen einen Protozoon-ähnlichen Organismus in verschiedenen Organsystemen entdeckten. Levaditii et al. gaben dem Erreger 1923 den Namen *Enzephalitozoon cuniculi* und forderten noch im gleichen Jahr aufgrund morphologischer Kriterien die Zuordnung zu den Mikrosporidien. In den folgenden Jahren wurde die Erregermorphologie und -entwicklung von verschiedenen Autoren genauer untersucht und beschrieben (Goodpasture 1924; Smith u. Florence 1925; Nelson 1962). Lainson et al. und auch Weiser postulierten 1964 beide im Zuge ihrer Veröffentlichungen die Verwandtschaft des Erregers mit dem Mikrosporidium „Nosema Nägeli“. Die daraufhin erfolgte Namensänderung auf *Nosema cuniculi* wurde jedoch im Jahre 1971 aufgrund genauerer elektronenmikroskopischer Untersuchungen von Morphologie und Entwicklungszyklus revidiert (Cali 1971; Sprague u. Vernick 1971; Shaddock u. Pakes 1971). Die seit 1992 bis heute akzeptierte taxonomische Klassifikation des Erregers (siehe Sprague et al. 1992; Tabelle 1), beruht auf morphologischen Kriterien und speziellen Merkmalen des Entwicklungszyklus, dürfte aber in Zukunft von neueren immunologischen und molekularbiologischen Kriterien wesentlich beeinflusst werden.

Evolutionär wurden Mikrosporidien und damit auch *E. cuniculi* aufgrund ihrer primitiven Morphologie und genauerer Untersuchung ihrer rRNA-Sequenz als sehr alte Eukaryonten angesehen (Vossbrinck et al. 1987). Neuere Studien ergaben jedoch, dass Mikrosporidien unter anderem ein Gen zur Expression von Mitochondrienprotein besitzen (Pyretailade et al. 1998). Aufgrund der genaueren Analyse des Genoms und weiterer Strukturmerkmale wie z.B.  $\beta$ -Tubulin, Chitin und Trehalose wird aktuell postuliert, dass Mikrosporidien entwicklungs-geschichtlich mit Pilzen verwandt sind und im Laufe der Evolution wesentlichen genetischen und funktionellen Umbauvorgängen unterworfen waren (Edlind et al.

1996; Mathis 2000; Brugere et al. 2000). Nach speziellen molekularbiologischen Untersuchungen der Gensequenz sind drei *E. cuniculi*-Stämme bekannt (Shaddock et al. 1979; Didier et al. 1995; Muller-Doblies et al. 2002). Die Stämme unterscheiden sich dabei innerhalb ihrer intergenetischen Spacer-Region nur in der Anzahl des Genabschnittes 5`-GTTT-3` und somit auch im Molekulargewicht. Die Namensgebung der einzelnen Stämme erfolgte dabei nach dem Wirt, aus dem der jeweilige Stamm zuerst isoliert wurde (siehe Tabelle 2). Bislang wurde angenommen, dass die einzelnen Stämme keine sehr enge Wirtsspezifität aufweisen. Eine aktuelle Studie von Muller-Doblies et al. (2002) beschreibt jedoch ein, speziell an Ratten adaptiertes Isolat von *E. cuniculi* Typ II, welches sich laut der Autoren von den, bisher bei Mäusen und Blaufüchsen isolierten *E. cuniculi* Typ II im Western Blot minimal unterscheidet.

**Tabelle 1:** Taxonomische Klassifikation (Sprague et al. 1992)

Taxon	
<b>Stamm</b>	Microspora
<b>Klasse</b>	Haplophasea
<b>Ordnung</b>	Glugeida
<b>Familie</b>	Enzephalitozoonidea
<b>Gattung</b>	Enzephalitozoon
<b>Art</b>	<i>Enzephalitozoon cuniculi</i>

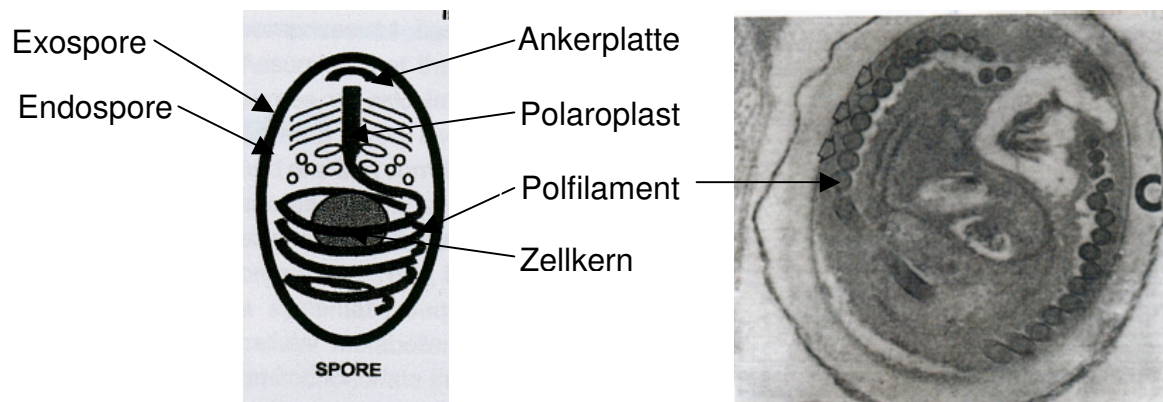
**Tabelle 2:** *E. cuniculi*-Stämme (Didier et al. 1995)

Stamm	Anzahl der Gensequenz	Vorkommen
Typ I = Kaninchen	3 x 5`-GTTT-3`	Kaninchen, Maus, Mensch
Typ II = Maus	2 x 5`-GTTT-3`	Maus, Blaufuchs
Typ III = Hund	4 x 5`-GTTT-3`	Hund, Mensch

## 1.2 Entwicklung und Morphologie

Die Vermehrung von *E. cuniculi* verläuft einwirtig und rein asexuell. Der Entwicklungszyklus bis hin zur infektiösen Spore findet dabei obligat intrazellulär statt, innerhalb parasitophorer Vakuolen im Zytoplasma, in der Nähe zu den Mitochondrien. Die am Ende des Entwicklungszyklus entstandene Spore ist ca.

1,5 – 2,5  $\mu\text{m}$  mal 1,5 - 4,0  $\mu\text{m}$  groß, oval geformt und besitzt eine dicke dreischichtige chitinhaltige Zellwand. Der Zellkern besteht aus einem sehr kleinen Genom mit nur 2,9 Megabasenpaaren. Ein sekundärer Verlust weiterer Zellorganellen im Laufe der Evolution (Mitochondrien, Peroxisomen und Golgiapparat) als Anpassung an das intrazelluläre parasitäre Leben wird vermutet (Pakes u. Shadduck 1975; Wasson u. Peper 2000; Vivares u. Méténier 2001). Als ein weiteres Merkmal der Mikrosporidien besitzt die *E. cuniculi*-Spore ein sog. Polfilament. Dies ist ein einzigartiger Extrusionsapparat, der aus fünf bis sieben schlauchartigen Windungen besteht, und an einer sog. Ankerplatte innerhalb der Spore aufgehängt ist (siehe Abbildung1).

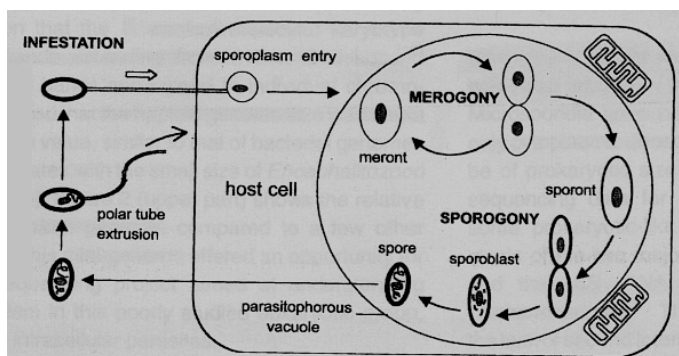


**Abbildung 1:** Aufbau einer *E. cuniculi*-Spore  
(nach Vivares u. Méténier 2001)

Mikrosporidien-Spore  
(nach Buyukmihci et al. 1977)

Unter Einfluss bestimmter Faktoren kann das Polfilament harpunenartig ausgeschossen werden. Es besteht die Hypothese, dass vom Polaroplast sezernierte  $\text{Ca}^{++}$ -Ionen hierbei in vivo als wichtigster Modulator fungieren. Auch ein Anstieg des osmotischen Drucks innerhalb der Spore sowie Ca-Kanäle und Elemente des Zytoskeletts wie z.B. Mikrotubuli und Mikrofilamente sollen an diesem Prozess mitbeteiligt sein (Undeen 1990; Undeen u. Van der Meer 1999). Das Polfilament dient zur Kontaktherstellung mit der Wirtszelle. Ob das Sporoplasma nachfolgend hauptsächlich über Endozytose in die jeweilige Wirtszelle gelangt (Cox et al. 1986), oder aber über eine direkte Injektion durch den Schlauch des Polfilaments (Diazytose), ist noch nicht genau bekannt. Es sind laut Vivarés und Méténier (2001) jedoch beide Möglichkeiten beobachtet worden (Hamilton u. Cox 1981; Weiser 1993; Wasson u. Peper 2000; Couzinet et al.

2000; Vivarés u. Méténier 2001). Nachdem das infektiöse Sporoplasma in die Wirtszelle gelangt ist, entsteht dort in mehreren Schritten über Merogonie (proliferative Phase) und Sporogonie (Ausbildung von Sporoblasten) die reife Spore. Wenn die Anzahl der heranreifenden Sporen ein bestimmtes Maß überschreitet, platzt die Wirtszelle und setzt die infektiösen Sporen frei, die nun ihrerseits neue Wirtszellen befallen (Schottelius und da Costa 2000). Die Dauer des Entwicklungszyklus ist abhängig von der Aktivität der Wirtszelle und beträgt vermutlich zwei bis fünf Tage, in der Zellkultur ca. 48 Stunden (Weiser 1993; Pakes u. Shaddock 1975).



**Abbildung 2:** Lebenszyklus *E. cuniculi*  
(nach Vivares u. Metenier 2001)

### 1.3 Wirtsspektrum

*Encephalitozoon cuniculi* weist ein sehr breites Wirtsspektrum auf. Der Erreger befällt fast alle Säugetiere (Tabelle 3) und wurde nicht nur bei Haus- und Labortieren (Perrin 1943; Gannon 1980; Greenstein et al. 1991), sondern auch bei wildlebenden Arten nachgewiesen (siehe Tabelle 1). Neben Säugetieren können auch Fische (Bederník u. Vávra 1972; Elston et al. 1987) und Vögel (Kemp u. Kluge 1975; Nelson 1967; Petri 1969; Branstetter u. Knipe 1982; Poonacha et al. 1985; Reetz 1993) infiziert werden. Selbst in beziehungsweise an niedrigen Wirbeltieren wie Arthropoden – die dem Erreger höchstwahrscheinlich als Vektor dienen – scheint *E. cuniculi* zumindest einige Zeit überleben zu können (Nelson 1967; Petri 1969; Ribeiro u. Guimaraes 1998).

Die erste Infektion beim Menschen mit einem Erreger der Gattung *Encephalitozoon* (vermutlich *E. cuniculi*) wurde 1959 bei einem Jungen aus Japan beschrieben (Matsubayashi et al.). Bisher wurden bei Menschen fünf

Mikrosporidien-Gattungen identifiziert. Neben Enterozytozoon, Septata, Pleistophora und Nosema wurden Arten der Gattung Encephalitozoon, unter anderem auch *E. cuniculi* nachgewiesen (Weber u. Deplazes 1995; Gunnarson et al. 1995).

**Tabelle 3:** Aktuelle Literaturübersicht über das Vorkommen von *E. cuniculi* bei Säugetieren (ergänzte Version von Mayer-Breckwoldt 1996)

Tierart	Literaturquelle
Kaninchen	Wesongau. Munda 1992; El-Razek 1993; Kötsche u. Gottschalk 1990; Wolfer et al. 1993; Deeb u. Di Giacomo 1994; Somvanshi et al. 1994; Deeb u. Carpenter 1997; Levkut et al. 1997; Wagner 2000
Wildkaninchen	Jungherr 1955; Wilson 1979b; Chalupský et al. 1990; Thomas et al. 1995
Meerschwein	Ruge 1951; Chalupský et al. 1973; Boot et al. 1988; Illanes et al. 1993 ; Wan et al. 1996
Maus	Innes et al. 1962; Bismanis 1970; Hersteinsson et al. 1993
Ratte	Lainson et al. 1964; Canning 1965; Huldt u. Waller 1974
Hamster	Lainson et al. 1964; Canning 1965; Huldt u. Waller 1974
Hund	Plowright 1952; Basson u. Mc Cully 1978; Shaddock et al. 1978; Cole et al. 1982; Hollister et al. 1989; Botha et al. 1979 u. 1986; Stewart et al. 1979a,b; Van Heerden et al. 1989
Blaufuchs	Nordstoga 1972; Arnesen u. Nordstoga 1977; Persin u. Dousek 1986
Katze	Van Rensburg u. Du Plessis 1971; Buyukmihci et al. 1977; Pang u. Shaddock 1985; Gevrey 1993
Nerz	Bjerkås 1990; Zhou et al. 1992; Zhou u. Nordstoga 1993
Leopard	Vavra u. Blažek 1971
Ziege	Khanna u. Iyer 1971; Cislakova et al. 2001
Schaf	Pang u. Shaddock 1985
Bulle	Von Kücken et al. 1990; Halanova et al. 1999

Tierart	Literaturquelle
Pferd	Von Kücken et al. 1993; Van Rensburg u. Du Plessis 1991; Patterson-Kane 2003
Schwein	Pang u. Shaddock 1985
Primaten	Anver et al. 1972; Brown et al. 1973; Zeman u. Baskin 1985; Shaddock u. Baskin 1989; Reetz et al. 2004
Lemming	Randall u. Dennis 1993
Seekuh	Dao 2004

## 2. Epizootiologie beim Kaninchen

### 2.1 Übertragung

Die *E. cuniculi*-Spore als infektiöses Agens stellt das einzige Entwicklungsstadium dar, das außerhalb des Wirts abhängig von Temperatur und Feuchtigkeitsgehalt bis zu zwei Jahre in der Umwelt persistieren kann (Waller 1979, Koudela et al. 1999). Die Ausscheidung der Sporen erfolgt ab der 3. bis 4. Woche bzw. ab der 6. bis 8. Woche bis zu 98 Tage nach experimenteller Infektion hauptsächlich über den Urin (Scharmann et al. 1986; Hamilton u. Cox 1981; Cox u. Galichio 1978; Smith u. Florence 1925). Von Kücken et al. (1987) vermuteten auch eine möglich Ausscheidung über den Darm beim Kaninchen, die jedoch von Müller (1998) nicht bestätigt werden konnte. Manche Kaninchen scheiden nachweislich bis zu  $10^6$  Sporen/ml Urin aus (Cox u. Pye 1975; Hamilton u. Cox 1981). Die Ausscheidung erfolgt hierbei jedoch nicht kontinuierlich (Wilson 1979). Bisherige Studien über eine Ausscheidung von *E. cuniculi*-Sporen mit dem Urin beziehen sich jedoch nur auf experimentell frisch infizierte Tiere über einen begrenzten Zeitraum. Bis heute gibt es keine Studie, die eine Ausscheidung der Sporen bei chronisch und/oder natürlich infizierten Kaninchen über einen längeren Zeitraum als drei Monate untersucht. Müller (1998) vermutet jedoch, dass subklinisch infizierte Kaninchen ohne größere histologische Läsionen keine oder kaum Sporen über den Urin ausscheiden. Auch Schottelius et al. (1994) konnten nur bei zwei von 70 seropositiven asymptomatischen Tieren Sporen im Urin nachweisen. Die Übertragung der ausgeschiedenen Sporen erfolgt meist horizontal über die orale



Aufnahme von kontaminiertem Futter oder Einstreu bzw. bei Karnivoren oral über infizierte Beute (Barker 1974). Erstmals wurde eine mögliche orale Infektion 1924 durch Levaditii et al. nach Eingabe der Sporen über eine Magensonde beim Kaninchen nachgewiesen. In mehreren experimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass vereinzelt auch über nasale, intratracheale, intrazerebrale, parenterale, intraperitoneale und rektale Übertragung eine Infektion beim Kaninchen ausgelöst werden kann (Goodpasture 1924; Perrin 1943; Shaddock u. Pakes 1971; Cox et al. 1979; Fuentealba et al. 1992). Jedoch ist die orale Aufnahme der *E. cuniculi*-Sporen als Hauptinfektionsweg beim Kaninchen anzusehen. Eine vertikale Übertragung vom Muttertier auf die Jungen wird seit längerem vermutet, wurde jedoch lange Zeit nur in einer einzigen Studie von Hunt u. King (1972) beim Kaninchen beobachtet. In einer aktuellen Studie von Baneux u. Pognau (2003) konnte diese Vermutung durch den direkten Antigennachweis von *E. cuniculi* mittels PCR in Plazenta und Fötus von infizierten Muttertieren bestätigt werden. Jedoch wird dieser Übertragungsmöglichkeit beim Kaninchen nur eine geringe Bedeutung beigemessen (Plowright 1952; Shaddock u. Pakes 1971; Nordstoga et al. 1978; Owen u. Gannon 1980; Boot et al. 1988). Größere Bedeutung als mögliche Überträger haben Meerschweinchen, die oft in einem Haushalt mit Kaninchen gehalten werden und als subklinisch infizierte Träger angesehen werden. Laut einer Studie von Wan et al. (1996) weisen 46,5 % der untersuchten Meerschweinchen Antikörper gegen *E. cuniculi* im Serum auf, sind jedoch klinisch gesund und haben selten histologisch darstellbare Läsionen. Auch ist bisher nicht bekannt, wie und in welchem Maße Meerschweinchen infektiöse Sporen ausscheiden. Als weitere Übertragungswege – unter anderem auch für den Menschen – werden infizierte Hühnereier, Hautwunden, Geschlechtsverkehr oder aber Insekten als Vektoren vermutet (Innes et al. 1962; Waller 1979; Reetz 1994; Wright u. Craighead 1922; Petri 1969).

## 2.2 Verbreitung und Durchseuchung

Die *Enzephalitozoonose* beim Kaninchen ist weltweit verbreitet (Wesonga u. Munda 1992; Gannon 1980; Greenstein et al. 1991; Thomas et al. 1995). Verbreitung und Durchseuchung der Kaninchenbestände sind jedoch regional sehr verschieden. Nach einer Studie von Meyer-Breckwoldt (1996, Hannover) sind in Deutschland 42 % der Heimtierkaninchen infiziert, laut Ewringmann u.

Göbel (1999, Berlin) sogar 45 %. Laut Kunstyr und Naumann dagegen (1985, Göttingen), weisen nur 33 % der untersuchten Kaninchen einen positiven Antikörpertiter auf. Wildkaninchen dagegen sind laut Meyer-Breckwoldt (1996) deutschlandweit nicht mehr als Erregerreservoir anzusehen und auch in der Schweiz und in England oder Schottland konnten bei Wildkaninchen keine positiven Antikörpertiter gegen *E. cuniculi* nachgewiesen werden (Cox u. Ross 1980; Müller 1998). In Australien jedoch ist die Wildkaninchenpopulation zu 25% infiziert und auch verschiedene Zuchtbestände weisen in diesem Land eine Infektionsrate von 25 bis 75 % auf (Cox u. Pye 1975; Thomas et al. 1995). Wie die Wildkaninchen sind auch Kaninchen aus Zuchtbeständen in Deutschland mit 5,6 % kaum infiziert. Bei Versuchstieren zeigten lediglich zwischen 4,7 % und 10,2 % der Kaninchen einen positiven Titer (Lev 1982). Das sind deutlich niedrigere Zahlen als in einigen Nachbarländern Deutschlands wie Tschechien, Schweden und Norwegen, die eine Antikörperprävalenz je nach Kaninchenbestand von 20 % bis zu 100 % angeben (Waller 1977; Chalupský et al. 1979; Lyngset 1980). Auch die Kaninchenbestände in der Türkei sind laut einer aktuellen Studie von Eroksuz et al. (1999) mit 65 % seropositiven Tieren stark betroffen. Für England und Schottland werden dagegen deutlich niedrigere Werte angegeben (Cox u. Ross 1980). In der Schweiz weisen laut einer aktuellen Studie 7,5 % der Zucht- und Schlachtkaninchen Antikörper gegen *E. cuniculi* im Serum auf. Hauskaninchen dagegen liegen auch hier mit bis zu ca. 28 % positiven Tieren deutlich höher (Müller 1998).

### **3. Pathologie und Organtropismus beim Kaninchen**

Die Vermehrung der Sporen nach oraler Aufnahme erfolgt beim Menschen vermutlich primär in Endo- und Epithelzellen des Darms oder in peritonealen Makrophagen. Beim Kaninchen hingegen sind die Darmzellen wohl zumindest primär nicht betroffen (Fuentealba et al. 1992; Cox et al. 1979). Die Ausbreitung in andere Organe erfolgt hämatogen v.a. über phagozytierende Zellen (Monozyten) und Lymphozyten. Allgemein bevorzugt der Erreger sich schnell teilende Zellen (Didier 1998; Vivarés u. Méténier 2001; Weiser 1993; Weidner 1975; Wilson 1979). Laut einem experimentellen Infektionsversuch von Cox et al. (1979) sind in der frühen Phase der Infektion vor allem die Nieren, Lunge, Leber und evtl. das

Herz als gut durchblutete Organe betroffen. Ab Tag 98 post infectionem weisen dann neben den Nieren vor allem das Gehirn und zum Teil das Herz histologische Veränderungen auf. Auch andere Studien belegen, dass die Nieren zeitlich vor dem Gehirn und Rückenmark betroffen sind (Cox u. Gallichio 1978). Die Vermehrung der Sporen in den Nieren erfolgt hauptsächlich in Epithelzellen der Sammelrohre (Hamilton u. Cox 1981). Die intrazelluläre Vermehrung der Sporen schädigt dabei die Tubuluszelle (sog. Pseudozyste) derart, dass ein Großteil der Sporen in das Lumen der Sammelrohre gelangt und so mit dem Urin ausgeschieden wird (Smith u. Florence 1925; Cox u. Pye 1975). Ein Teil der Sporen wird jedoch auch in das Nierengewebe freigesetzt und löst dort eine charakteristische Entzündungsreaktion aus. Im Gehirn kann der Erreger in Nervenzellen und in zur Phagozytose befähigten Zellen wie Gliazellen nachgewiesen werden (Pakes et al. 1975). Eroksuz et al. (1999) konnten bei 21 % der histologisch untersuchten seropositiven Kaninchen Veränderungen in den Nieren, bei 25 % im Gehirn und bei 17 % in beiden Organen feststellen. Neben Niere und Gehirn als bevorzugte Organe können beim Kaninchen unter anderem auch die Augen betroffen sein (Wolfer et al. 1993; Wodecki 1994; Ewringmann u. Göbel 1999).

Histologisch stellt sich im Gehirn eine typische multifokale nichteitrig granulomatöse Meningoenzephalitis mit Astrogliose und perivaskulären lymphozytären Infiltraten dar (Cox u. Gallichio 1978, Wasson u. Peper 2000). Lokalisiert sind die typisch herdförmigen Veränderungen dabei hauptsächlich in der grauen und weißen Substanz des Cerebrums, in Pons, Mittel- und Stammhirn. Das Kleinhirn sowie Medulla und Rückenmark sind dabei laut einiger Autoren eher selten betroffen (Innes et al. 1962; Shaddock u. Pakes 1971; Wilson 1979; Scharmann et al. 1986). Shaddock und Orenstein (1993) beschreiben dagegen diffus multifokale Veränderungen in allen Gehirnbereichen. Die histologischen Veränderungen sind im Gehirn laut Cox und Galichio (1978) ab der achten Woche post infectionem zu finden, wobei nur sehr selten die *E. cuniculi*-Sporen selbst nachgewiesen werden können. Laut Wilson (1979) sind vor allem an der Gehirnoberfläche infizierter Kaninchen häufig Pseudozysten mit einem Durchmesser von ca. 2 mm zu finden.

Die Nieren weisen histologisch eine fokale bis segmentale lymphozytär-plasmazytäre granulomatöse interstitielle Nephritis auf, mit einem variablen Anteil

an Fibrosen. Durch Bildung von Fibrosen in der Nähe der Nierenrindenoberfläche kommt es zu Depression der Nierenrinde und es entstehen die post mortem sichtbaren „weißen Narben“. Die Granulome selbst sind meist kugelförmig, können sich aber auch als längliche Striche entlang der Nierentubuli darstellen. Bevorzugt betroffen von den entzündlichen Veränderungen ist das Nierenmark (Flatt u. Jackson 1970; Wilson 1979; Levkut et al. 1997).

Neben Veränderungen in Gehirn und Nieren können bei Kaninchen vereinzelt herdförmige, lymphozytäre, entzündliche Reaktionen in der Leber (meist in der Umgebung der Glissonschen-Dreiecke), der Lunge und im Herz festgestellt werden (Cox et al. 1979; Scharmann et al. 1986; Fuentealba 1992; Levkut et al. 1997; Somvanshi et al. 1994). Wolfer et al. (1993) und Wodecki (1994) beschreiben zudem auch Veränderungen an den Augen in Form einer phakoklastischen Uveitis und es konnten mehrfach auch Veränderungen in der Milz, den Lymphknoten, Nebennieren, Peritoneum und im Darm dargestellt werden (Perrin 1943; Von Kücken et al. 1987; Levkut et al. 1997; Somvanshi et al. 1994). In einem Fallbericht bei einem sieben Wochen alten spontan infizierten Kaninchen werden zudem histologische Veränderungen in der Skelettmuskulatur und in einer Nervenwurzel beschrieben (Nast et al. 1996).

Allgemein sind die *E. cuniculi*-Sporen histologisch meist nicht mehr im Entzündungsgebiet selbst, sondern in benachbartem Gewebe ohne Entzündungsreaktion innerhalb intakter Wirtszellen (meist Epithelzellen oder Makrophagen) nachzuweisen (Flatt u. Jackson 1970; Shaddock u. Pakes 1971; Wasson u. Peper 2000).

## **4. Immunsystem und Immunreaktion bei Enzephalitozoonose**

### **4.1 Bedeutung**

*Enzephalitozoon cuniculi* ist wie viele andere Parasiten in der Lage, trotz einer Immunantwort des Wirts im Organismus zu persistieren. Das Überleben des Erregers in Makrophagen wird zum Beispiel ermöglicht durch die Unfähigkeit der Lysosomen, mit der parasitophoren Vakuole zu verschmelzen (Weidner 1975).

Auch der obligat intrazelluläre Lebenszyklus bietet einen gewissen Schutz vor der wirtseigenen Immunabwehr.

Ein Großteil der bisher untersuchten Säugetiere, unter anderem auch das Kaninchen ist chronisch latent mit *E. cuniculi* infiziert, worauf persistierende Antikörpertiter bei klinisch gesunden Tieren hinweisen (Shadduck u. Pakes 1971; Akerstedt 2003a). Welche Faktoren im einzelnen für das Auftreten der klinischen Symptomatik der Enzephalitozoonose verantwortlich sind, ist noch nicht eindeutig geklärt. Sicher ist jedoch, dass der Immunstatus des Wirts hierbei eine wichtige Rolle spielt. Eine Studie von Horvath et al. (1999) zeigt, dass eine Cyclophosphamid-induzierte Immunsuppression bei experimentell mit *E. cuniculi* infizierten Kaninchen eine starke Erkrankung der Tiere bis hin zum Tod bewirken kann. Bei einem weiteren Versuch mit immundefizienten (SCID-)Mäusen konnte experimentell eine disseminierte, ebenfalls tödlich endende *E. cuniculi*-Infektion ausgelöst werden (Koudela et al. 1993). In einer anderen Studie zeigten Mäuse nach Verabreichung von Kortikosteroiden in immunsupprimierender Dosierung, im Gegensatz zu immunkompetenten Mäusen, chronischen Aszites und granulomatöse Läsionen in verschiedenen Organen (Lallo et al. 2002). Auch beim Mensch wird die Krankheit in den letzten Jahren zunehmend bei HIV-Patienten und im Rahmen von Transplantationen beschrieben (Zender et al. 1989; Del Aguila et al. 2001; Weber u. Deplazes 1995; Weber et al. 1997; Guntinas-Lichius 1997; Gunnarson et al. 1995; Garvey et al. 1995; Franzen et al. 1995; Mertens et al. 1997; Gumbo et al. 1999; Gamboa-Dominguez et al. 2003). Allgemein wird vermutet, dass vor allem Neugeborene und anderweitig immunsupprimierte Wirte akut mit häufig letalem Ausgang erkranken, wohingegen sich bei immunkompetenten Wirten eine Art immunologisches Gleichgewicht zwischen Parasit und Wirt einstellt (Weber et al. 1994; Schmidt u. Shadduck 1983; Didier et al. 1994; Didier 1998). Eine Ausnahme scheinen immunkompetente Karnivoren darzustellen, die bei chronischer Infektion mit *E. cuniculi* zum Teil eine Hyperimmunitätsreaktion ausbilden. Die daraus resultierende Bildung und Ablagerung von Immunkomplexen führt zu Nierenschäden (Botha et al. 1986; Shadduck et al. 1993; Didier u. Bessinger 1999). Auch bei neonatal infizierten Hundewelpen konnte in einer Studie bereits eine deutliche Hypergammaglobulinämie nachgewiesen werden (Szabo u. Shadduck 1987).

## 4.2 Zelluläre Immunreaktion

Laut aktueller Studien ist bei der *Enzcephalitozoonose* hauptsächlich die zelluläre Immunabwehr von Bedeutung. Neben den eigentlichen phagozytierenden Zellen spielen hierbei vor allem die CD8(+) T-Zellen eine signifikante Rolle. Diese primären Effektorzellen werden über mehrere Schritte über MHC-Klasse I-Rezeptoren an der Membranoberfläche der *E. cuniculi*-infizierten Zellen aktiviert und bewirken nach Ausschüttung von bestimmten Zytokinen über den Perforin-Mechanismus eine direkte Zytolyse. An der Aktivierung der CD8(+) T-Zellen (siehe Abbildung 3) sind hierbei laut Khan et al. (1999) Makrophagen, dendritische Zellen und  $\gamma\delta$  T-Zellen beteiligt, wobei Cytokine, unter anderem IL-12, IFN- $\gamma$  und IL-2 als wichtige Mediatoren fungieren (Boehm et al. 1997; El-Fakhry et al. 2001; Khan et al. 1999). Aktivierte T-Helferzellen produzieren dabei einen Großteil des genannten IL-2, das den wichtigsten T-Zell Wachstumsfaktor darstellt. Die Rolle der CD4(+) T-Zellen bei der Immunabwehr gegen *E. cuniculi* ist noch nicht eindeutig geklärt (Naas et al. 1999; Khan et al. 1999; Khan et al. 2001). Zwei Studien an Mäusen jedoch zeigen, dass CD4(-) Tiere eine Infektion mit *E. cuniculi* überstehen, wohingegen CD8(-)-Tiere und Tiere ohne Perforin-Gen einer intraperitonealen Infektion erliegen (Khan et al. 1999; Moretto et al. 2000; Braunfuchsova et al. 2002). Andererseits scheinen CD4(+) T-Zellen z.T. wohl doch entscheidend bei der Immunabwehr gegen *E. cuniculi* mitbeteiligt zu sein, da HIV-positive Patienten besonders dann anfällig für eine *E. cuniculi*- (Mikrosporidien-) Infektion sind, wenn in ihrem Blut stark erniedrigte Werte an CD4(+) T-Zellen gemessen werden (Asmuth et al. 1994; Khan et al. 1999; Kotler u. Orenstein 1998 u. 1999). Nach einer Studie von Schmidt und Shaddock (1983) und auch laut Didier (1995) ist zu vermuten, dass die T-Zellen nicht nur direkt, sondern hauptsächlich als Vermittler zum Schutz gegen eine *E. cuniculi*-Infektion beitragen, indem sie über die Ausschüttung von Cytokinen Makrophagen aktivieren, die letztendlich den Erreger abtöten.

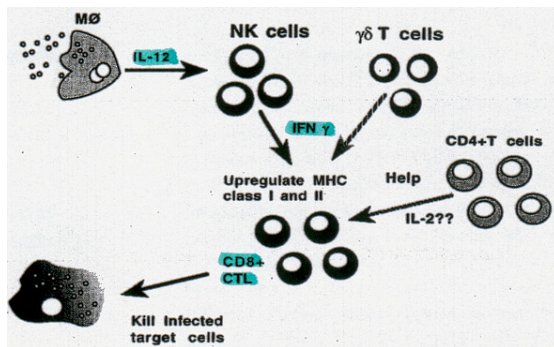


Abbildung 3: aus Khan et al. (2001)

### 4.3 Humorale Immunreaktion

Neben der zellulären Immunabwehr kommt es nach einer Infektion mit *E. cuniculi* über die humorale Immunantwort nachweislich zu einer starken Antikörperproduktion. Erstmals können beim Kaninchen entsprechende Antikörper im Blut 14 bis 21 Tage (Waller et al. 1978; Scharmann et al. 1986), laut Cox et al. (1979) sogar bereits zehn Tage nach peroraler Infektion nachgewiesen werden. Die Immunglobuline der Klasse M werden hierbei meist zeitlich vor denen der Klasse G gebildet. In einigen Fällen, möglicherweise abhängig von der Nachweismethode, treten diese IgM-Antikörper aber laut Müller (1998) auch erst zeitgleich oder einige Tage nach denen der Klasse G im Serum auf. Bei experimentell infizierten Tieren sind ab 1 bis 1,5 Monaten post infectionem die Immunglobuline der Klasse M dann nicht mehr nachzuweisen (Lev 1982). Laut mehrerer Autoren spielen Antikörper eine wichtige Rolle bei der Limitierung einer *E. cuniculi*-Infektion, indem sie die Phagozytose der *E. cuniculi* Sporen durch Zellen der zellulären Immunabwehr verstärken. Wahrscheinlich sind sie allein aber nicht in der Lage, eine Infektion zu verhindern oder zu heilen (Nieder Korn u. Shaddock 1980; Schmidt u. Shaddock 1983; Nieder Korn et al. 1983; Khan et al. 1999). Andererseits wird bei neugeborenen Kaninchen vermutet, dass diese in den ersten zwei (Bywater u. Kellet 1978), bzw. sechs bis sieben Lebenswochen (Scharmann et al. 1986) durch maternale Antikörper vor einer Infektion geschützt sind und erst nach deren Verschwinden bei Antigenkontakt eigene Antikörper bilden, die dann ab der 8. bis 12. Woche im Serum nachweisbar sind (Scharmann et al. 1986).

In einer Studie von Sobottka et al. (2001) konnten erstmals auch nach subkutaner Injektion von inaktivierten *E. cuniculi*-Sporen beim Kaninchen hohe Antikörpertiter

festgestellt werden, die für eine Dauer von 87 bis 91 Monaten persistierten. Falls persistierende Antikörper wirklich zum Schutz vor einer Infektion beitragen, kann diese Studie laut der Autoren als ein erster Schritt in Richtung einer möglichen Impfung gegen Mikrosporidien angesehen werden. Gegen diese These spricht jedoch eine experimentelle Studie von Lev (1982), laut der bei einigen Kaninchen nach peroraler Infektion mit aktiven Sporen am Tag 64 post infectionem keine positiven Titer mehr nachgewiesen werden konnten. Bei Scharmann et al. (1986) wiederum zeigten Kaninchen mit spontaner Infektion nach drei Jahren immer noch Antikörper gegen *E. cuniculi* im Blut.

#### **4.4 Immunstatus bei chronischer Infektion**

Immunkompetente Kaninchen mit chronischer *E. cuniculi*-Infektion zeigen zwar meist keine klinische Symptomatik, ihr Immunsystem scheint jedoch trotzdem beeinträchtigt zu sein. Laut Cox (1977) zeigen chronisch infizierte Kaninchen nach zusätzlicher Infektion mit *Brucella abortus* im Gegensatz zu *E. cuniculi*-negativen Tieren eine verzögerte Immunantwort mit verminderter Bildung spezifischer Antikörper. Zudem leiden Kaninchen mit positivem Antikörpertiter gegen *E. cuniculi* deutlich häufiger an anderen Krankheiten als Tiere mit negativem Antikörper-Titer (Von Kücken et al. 1987; Meyer-Breckwoldt 1996). Allgemein stellt eine Infektion für den Organismus stets eine Stresssituation dar und führt zu einer Veränderung des Katecholamin-Spiegels im Blut und somit folglich auch zu einer vermehrten Ausschüttung an endogenem Kortisol. Diese Hormone bewirken neben der Aufrechterhaltung lebenswichtiger Körperfunktionen in akuten Stresssituationen langfristig auch eine Beeinträchtigung des Immunsystems (Cohn 1997; Silbernagel u. Despopoulos 1991). Bei chronisch infizierten Kaninchen ohne klinische Symptomatik ist eine Balance zwischen dem Immunsystem des Wirts und der Erregervermehrung vorhanden. Wird nun durch irgendeine Art von Stress wie zum Beispiel schlechte Haltungsbedingungen, Zugluft, Ortsveränderungen, Tod eines anderen Tieres im Haushalt oder eine zusätzliche Krankheit das Immunsystem negativ beeinflusst, wird dieses empfindliche Gleichgewicht zu Gunsten des Erregers verschoben und es kommt zur Ausbildung klinischer Symptome. Jungtiere, gravide oder anderweitig erkrankte Kaninchen haben zwar durch ihre verminderte Immunfunktion eine bestimmte Prädisposition für eine Infektion mit *E. cuniculi*,



generell ist die Verteilung jedoch unabhängig von Alter, Rasse und Geschlecht (Kimman u. Akkermans 1987; Packham 1992; Meyer-Breckwoldt 1996; Müller 1998). Eine frühere Theorie, dass die Ausbildung klinischer Symptomatik bei der *Enzephalitozoonose* von der unterschiedlichen Virulenz der einzelnen Erreger abhängt, kann heute als ungültig angesehen werden, da auch in großen Beständen immer nur Einzeltiere erkranken (Kunstyr et al. 1983).

## **5. Klinik der Enzephalitozoonose beim Kaninchen**

### **5.1 Symptomatik beim Kaninchen**

Das klinische Erscheinungsbild der *Enzephalitozoonose* beim Kaninchen wurde erstmalig in Form einer motorischen Paralyse der Hintergliedmaßen beschrieben (Wright u. Craighead 1922). Laut Ewringmann und Göbel (1999), die 277 Heimtierkaninchen untersuchten, zeigten 40,8 % der Tiere mit positivem Antikörpertiter eine klinische Symptomatik. In der Studie von Mayer-Breckwoldt (1996) waren von 86 Antikörper-positiven Zwergkaninchen lediglich 21,4 % klinisch auffällig. Da das Gehirn und die Nieren als Prädilektionsorgane anzusehen sind, lassen sich die meisten Symptome der *Enzephalitozoonose* auf Veränderungen in diesen Organen zurückführen (siehe Kapitel III). Ewringmann und Göbel (1999) stellten bei 45 % der erkrankten Kaninchen neurologische Ausfälle fest, weitere 31,4 % zeigten Symptome bedingt durch Nierenversagen und 13,7 % der Kaninchen hatten Veränderungen an ein oder beiden Augen. Auffällig war hierbei, dass die meisten Kaninchen entweder neurologische Symptome oder aber Anzeichen für ein Nierenversagen aufwiesen. Nur bei 3,9 % traten diese Symptome in Kombination auf und 5,9 % der erkrankten Tiere zeigten dabei zusätzlich eine Augensymptomatik, wahrscheinlich zu erklären durch den zeitlich versetzten Organtropismus (siehe Kapitel III).

#### **5.1.1 Symptomatik bei Befall des ZNS**

Es werden verschiedene neurologische Defizite im Zusammenhang mit der klinisch-neurologischen Form der *Enzephalitozoonose* beim Kaninchen beschrieben. Die Kopfschiefhaltung zusammen mit dem Auftreten von Ataxien scheint hierbei im Vordergrund zu stehen, jedoch bilden die betroffenen Tiere

meist eine Kombination verschiedener zusätzlicher neurologischer Einzelsymptome aus. Laut Mayer-Breckwoldt (1996) zeigten 81 % der betroffenen Kaninchen eine Kopfschiefhaltung und davon 45 % zusätzlich einen Nystagmus. Auch in zwei Studien von Kunstyr und Naumann (1985 u. 1986) wird die Kopfschiefhaltung in unterschiedlich starker Ausprägung mit und ohne Tortikollis als Hauptsymptom beschrieben. In einer aktuellen Studie wird die Häufigkeit dieser Symptomatik sogar mit 91 % angegeben (Harcourt-Brown u. Holloway 2003). Daneben können Gleichgewichtsstörungen bis hin zum Umfallen der Tiere auftreten. Bei Aufregung und oder Berührung werden diese neurologischen Ausfälle meist verstärkt und können bei den betroffenen Kaninchen Kreislaufen, Umfallen oder ein Rollen um die eigene Körperlängsachse bewirken. Bei der *Enzephalitozoonose* handelt es sich dabei ausgehend von der klinischen Symptomatik und den pathohistologischen Untersuchungen um ein sog. zentrales Vestibularsyndrom, bedingt durch Läsionen der vestibulären Kerne im Hirnstamm- oder in seltenen Fällen im Kleinhirnbereich (Oliver et al. 1997; Fenner 2000). Ob und in welcher Form bei den betroffenen Kaninchen klinisch-neurologisch eine Unterscheidung zwischen peripherem und zentralem Vestibularsyndrom möglich ist, wurde bisher nicht untersucht. Als weitere Symptome –bedingt durch neurologische Ausfälle– werden in der Literatur Opisthotonus (von einigen Autoren auch als „Sternkucker“ bezeichnet) und ganz vereinzelt Krämpfe, Anfälle, Kopftremor und Absencen beschrieben. In einer Studie wird auch die Teilparese einiger Gesichtspartien und eine Ventroflexion des Halses als mögliche Symptomatik aufgeführt (Goodpasture 1924; Cox u. Walden 1972; Ewringmann u. Göbel 1999; Von Kücken et al. 1987; Naas et al. 1996; Harcourt-Brown u. Holloway 2003). Meist getrennt von den eben beschriebenen neurologischen Symptomen werden motorische Ausfälle in Form von Paresen bzw. Paralysen vor allem der Nachhand beschrieben, die auf Läsionen im Rückenmark (oberes motorisches Neuron) zurückzuführen sind. Die Parese tritt meist zusammen mit einem mehr oder weniger stark ausgeprägten Ausgrätschen der Vordergliedmaßen und evtl. Hyperreflexien auf und ist beim Kaninchen nur selten beschrieben worden (Wright u. Craighead 1922; Cox u. Walden 1972; Kimman u. Akkermans 1987; Ewringmann u. Göbel 1999). In einer Studie von Somvanshi et al. (1994) wiesen jedoch 2 Angorakaninchen auch eine Kombination von Nachhandparese und Kopfschiefhaltung auf. Allgemein zeigen die betroffenen

Kaninchen trotz der neurologischen Ausfälle ein meist ungestörtes Sensorium und versuchen auch bei starker Kopfschiefhaltung Futter und Wasser aufzunehmen (Wenzel u. Albert 1996).

### **5.1.2 Symptomatik bei Befall der Nieren**

Klinische Symptome der *Enzephalitozoonose* bedingt durch eine Schädigung der Nieren sind Erreger-unspezifisch und treten beim Kaninchen wie bei anderen Haussäugetieren erst dann auf, wenn eine Niereninsuffizienz vorliegt. Die betroffenen Kaninchen zeigen meist typische Folgesymptome wie Apathie, Anorexie, Gewichtsverlust und Entwicklungsstörungen. Bei einigen Autoren wird zudem Polydypsie und Polyurie beschrieben (Cox u. Walden 1972; Keeble 2001; Kimman u. Akkermans 1987; Von Kücken et al. 1987; Ewringmann u. Göbel 1999). In der Studie von Ewringmann u. Göbel (1999) konnten mittels röntgenologischer Untersuchungen auch vereinzelt renale Osteodystrophien mit teils daraus resultierenden pathologischen Frakturen festgestellt werden.

### **5.1.3 Symptomatik bei Befall der Augen**

Neben den sehr prägnanten Symptomen ausgehend von Veränderungen an Gehirn und Nieren werden in zunehmendem Maße auch Veränderungen an den Augen in Zusammenhang mit der *Enzephalitozoonose* gebracht. Diese Veränderungen treten hauptsächlich in Form einer phakoklastischen Uveitis auf und betreffen meist nur ein Auge. In einem Fallbericht von Wodecki (1994) wurden klinisch eine schmerzhafte Bulbusvergrößerung, vermehrter Tränenfluß, Blepharospasmus sowie vermehrt injizierte Episkleralgefäße festgestellt. Als weitere makroskopisch sichtbare Veränderungen sind weißliche Fibrinmassen im Bereich der Pupille und in der vorderen Augenkammer sowie hintere Synechien und eine mehr oder weniger stark ausgeprägte *Occlusio pupillae* beschrieben. Ewringmann und Göbel (1999) konnten zudem bei allen Kaninchen mit phakoklastischer Uveitis eine deutliche Iritis mit starker Gefäßinjektion beobachten. Drei der Tiere litten zusätzlich an einer Konjunktivitis und ein Tier an einem Korneaödem (Ewringmann u. Göbel 1999; Wodecki 1994; Wagner 2000). Ashton et al. (1976) und Wagner (2000) beschreiben als weitere Veränderungen am Auge die *Cataracta vera* in unterschiedlich starker Ausprägung mit daraus

resultierender Blindheit. Abhängig vom Schweregrad der Katarakt ist hierbei der Pupillarreflex mehr oder weniger herabgesetzt.

Die Veränderungen am Auge korrelieren nicht immer mit einem positiven Antikörpertiter auf *E. cuniculi*, so dass v.a. bei Jungtieren der Verdacht besteht, dass der Erreger wahrscheinlich bereits intrauterin in die Linse eingedrungen ist (Ashton et al. 1976).

## 5.2 Labordiagnostische Veränderungen

Labordiagnostische Veränderungen bei Kaninchen mit Enzephalitozoonose wurden bis vor kurzem kaum untersucht und sind bisher nur in wenigen Studien beschrieben. Hinzu kommt, dass nur wenige fundierte Studien über Referenzbereiche verschiedener Blutparameter beim Heimtierkaninchen existieren (Von Müller 1990; Ewringmann u. Göbel 1998; Hein 2001). Kötsche und Gottschalk (1983) beschreiben bei Kaninchen mit Tortikollis Veränderungen im Elektrolythaushalt in Form eines gestörten Natrium-Kalium-Verhältnisses. Als Ursache vermuteten die Autoren eine Natrium-Unterversorgung. In einer anderen Studie wurde eine deutliche Neutrophilie bei Schlachtkaninchen festgestellt. Die erhöhte Anzahl der neutrophilen Granulozyten wurde hier auf die *Enzephalitozoonose* zurückgeführt, da früher die Annahme bestand, dass diese Zellen eine große Rolle in der Abwehr des Parasiten spielen (Von Müller et al. 1990).

Klinisch gesunde Tiere zeigen laut der Studie von Müller (1998) zumindest bis Tag 161 post infectionem bei verschiedenen Blutparametern keine signifikanten Unterschiede. Auch bei Kaninchen mit reinen ZNS-Symptomen bzw. phakoklastischer Uveitis konnten in einer aktuellen Studie von Ewringmann und Göbel (1999) keine Abweichungen der Laborwerte von denen gesunder Tiere festgestellt werden. Kaninchen mit Niereninsuffizienz wiesen dagegen signifikant höhere Werte für Harnstoff, Kreatinin, Kalium, GOT, GLDH und Leukozyten sowie signifikant niedrigere Werte für Hämoglobin, Hämatokrit, Erythrozyten und Natrium auf. Laut einer früheren Studie der gleichen Autoren von 1998 und den Untersuchungen von Meyer-Breckwoldt (1996) sind in einigen Fällen bereits bei seropositiven Tieren ohne klinische Symptomatik signifikant höhere Werte für Harnstoff und Kreatinin in Serum feststellbar.

## 6. ***E. cuniculi*-Infektion bei anderen Tierarten und beim Menschen**

### 6.1 **Vorkommen bei Nagetieren**

Bei Labortieren wurde neben Kaninchen auch in Mäuse-, Ratten- und Meerschweinchenkolonien in unterschiedlichem Ausmaß ein positiver Antikörpertiter auf *E. cuniculi* nachgewiesen und die Durchseuchung variiert hier zwischen 25 % und 95 % (Bismanis 1970; Gannon 1980). In einer Meerschweinchenzucht stellten Wan et al. (1996) bei 46,5 % der klinisch gesunden Tiere im ELISA Antikörper gegen *E. cuniculi* fest. Laut Innes et al. (1962) sind fast 50 %, laut Bismanis (1970) immerhin 30 % der untersuchten Mäuse seropositiv. Nagetiere sind jedoch nicht so empfänglich für den Erreger wie Kaninchen und immunkompetente Tiere bilden genau wie das Kaninchen nur eine okkulte subklinische Infektion aus. Meerschweinchen mit Kontakt zu infizierten Kaninchen wurden laut einer Studie leichter infiziert als bei getrennter Haltung (Perrin 1943; Pakes et al. 1975; Gannon 1980; Innes et al. 1962). Ob eine leichtere Infizierung umgekehrt auch für Kaninchen mit Kontakt zu Meerschweinchen gilt, kann nur vermutet werden. Meerschweinchen würden dann allerdings ein wichtiges Erregerreservoir für Heimtierkaninchen darstellen. Bei verschiedentlich experimentell infizierten immunkompetenten Mäusen konnte klinisch lediglich ein geringgradig vergrößertes Abdomen festgestellt werden, bedingt durch Aszites, welcher sich nach mehreren Wochen wieder zurückbildete (Perrin 1943). Immundefiziente Mäuse dagegen zeigten klinische Symptome wie Lethargie, Abmagerung, hochgradigen Aszites mit Peritonitis bis hin zu Todesfällen (Schmidt u. Shaddock 1983; Koudela et al. 1993). Pathohistologisch konnte bei 93 % aller Mäuse (auch bei denen ohne neurologische Symptomatik) eine Meningoenzephalitis mit weiteren Veränderungen in Niere, Leber, Milz, Herz, Muskulatur, Nebennieren und Lunge diagnostiziert werden. Die Läsionen waren auch hier abhängig von der Eintrittspforte des Erregers, dem Immunstatus des Tieres und der Dauer der Infektion. Untersuchungen von Laborparametern im Blut bei experimentell infizierten immunkompetenten Mäusen zeigten einen signifikanten Abfall vor allem der Lymphozyten an mehreren Tagen post infectionem sowie einen signifikanten Anstieg der Monozyten zwischen dem 60. und 120. Tag. Eine Verbindung zwischen der erniedrigten Anzahl weißer

Blutkörperchen und dem Abwandern dieser Zellen in das infizierte Gewebe wird vermutet (Naas et al. 1999).

Bei immunkompetenten Ratten und Hamstern zeigen sich ähnliche klinische Veränderungen wie bei der Maus, aber in noch abgeschwächterer Form. Bei betroffenen Ratten konnten jedoch unabhängig von der klinischen Symptomatik histologisch meist deutliche Veränderungen im Zusammenhang mit einer *E. cuniculi*-Infektion in Gehirn, Niere, Lunge und Leber festgestellt werden (Levaditii et al. 1924; Perrin 1943; Lainson et al. 1964).

Bei Meerschweinchen verläuft die *Encephalitozoonose* wie bei immunkompetenten Mäusen in der Regel subklinisch. Es wurden nur bei einem sehr geringen Prozentsatz der untersuchten Tiere histologische Veränderungen gefunden. Perrin (1943) konnte nur bei einem von 291 Meerschweinchen *E. cuniculi* Sporen im Gehirn nachweisen und auch in den Arbeiten von Sebek (1969) und Ruge (1951) wurden nur bei je einem Meerschweinchen Veränderungen in Gehirn und Nieren festgestellt. Gannon (1980) entdeckte bei 12 Meerschweinchen nur typische Veränderungen in den Nieren und Wan et al. (1996) konnte bei fünf Tieren histologische Veränderungen einzig im Gehirn feststellen.

Allgemein sind auch bei den Nagetieren Jungtiere und anderweitige immunsupprimierte Tiere besonders empfänglich (Perrin 1943). Die Übertragung erfolgt hauptsächlich horizontal. Eine vertikale Übertragung konnte bisher bei Nagetieren noch nicht eindeutig nachgewiesen werden, wird aber zumindest bei Mäusen und Meerschweinen vermutet (Boot 1988).

## 6.2 Vorkommen bei Karnivoren

Bei Karnivoren wurde die *Encephalitozoonose* bisher vor allem bei in Gefangenschaft gehaltenen Blaufüchsen (*Alopex lagopus*), bei Nerzen und in einer Lemmingkolonie beschrieben (Nordstoga 1972; Arnesen u. Nordstoga 1977; Cole et al. 1982; Bjerkås 1990; Randall u. Dennis 1993).

In einer Gruppe streunender Hunde in London konnte bei 13 % der Tiere im Serum ein positiver Titer auf Antikörper gegen *E. cuniculi* nachgewiesen werden. Stewart et al. (1979) stellte in einem Zuchtbetrieb in Südafrika eine Seroprävalenz von 75 % fest und konnte in einer weiteren Studie bei Hunden mit chronischer Niereninsuffizienz in 23 % der Fälle einen positiven Antikörpertiter im Serum

feststellen. Laut einer aktuellen Studie aus Norwegen, in der 1104 Serumproben von Hunden aus verschiedenen Tierarztpraxen untersucht wurden, waren dagegen keinerlei Antikörper feststellbar (Akerstedt 2003). Auch von 212 Hunden, 86 Rotfüchsen und 45 getesteten Katzen in der Schweiz wies nur eine Katze Antikörper gegen *E. cuniculi* im Serum auf (Müller 1998).

Im Gegensatz zu Kaninchen und Nagetieren wird bei den Karnivoren der transplazentare Übertragungsweg als der wichtigste angesehen (Mohn et al. 1974). Aber auch eine orale Infektion ist laut einer Übertragungsstudie möglich (Botha et al. 1979). Klinisch manifestiert sich die Infektion bei Karnivoren v.a. bei Welpen und Jungtieren unter einem Jahr. Als weitere Ursache für die zum Teil hochgradige klinische Symptomatik bei Karnivoren wird eine autoimmune Komponente vermutet, mit Ablagerung von Antigen-Antikörperkomplexen überwiegend in den Nieren (siehe Kapitel 4.1.).

In utero infizierte Blaufuchswelpen (*Alopex lagopus*) von klinisch gesunden seropositiven Muttertieren zeigten akut Symptome wie Anorexie, Durst und reduzierte Gewichtszunahme mit plötzlich auftretenden Todesfällen. Die Mortalitätsrate ist bei den betroffenen Tieren sehr hoch und kann bis zu 100 % betragen. Daneben treten neurologische Ausfälle wie Ataxie, Nachhandschwäche, Anfälle und Kreislaufen auf. In der histologischen Untersuchung treten bei dieser akuten Form der Infektion hauptsächlich Veränderungen in den Nieren und im Gehirn auf. Daneben konnten auch geringgradige Läsionen in Milz, Leber, Mesenteriallymphknoten, Lunge und Harnblase dargestellt werden. In einer Studie traten neben den charakteristischen histologischen Veränderungen auch ein zerebraler Infarkt und eine nekrotisierende Pelvitis renalis auf. (Basson u. Mc Cully 1966; Van Dellen et al. 1978; Nordstoga 1972; Akerstedt et al. 2002). Bei Welpen und jungen Blaufüchsen mit chronischer *E. cuniculi*-Infektion und geringen klinischen Symptomen dagegen wird eher eine neonatale Infektion vermutet. Bei diesen Tieren konnten zusätzlich zu den bereits beschriebenen Veränderungen vorwiegend generalisierte arterielle Läsionen vom Typ einer „Polyarteritis nodosa“ dargestellt werden. Nordstoga und Westbye (1976) beschrieben bei betroffenen Blaufüchsen Polyarteritis nodosa-artige Veränderungen in allen Organen außer den Augen. Arnesen und Nordstoga (1977) konnten daneben auch

entsprechende Läsionen in den Gefäßen der Augen feststellen. Bei den meisten dieser Tiere trat neben den Gefäßwandveränderungen der Augen eine hochgradige Katarakt auf. Sporen von *E. cuniculi* konnten von den Autoren sowohl in den Arterienwänden als auch in der Linse nachgewiesen werden. Weitere bevorzugt betroffene Gefäße sind mittlere bis kleine Koronar-, Leber-, Darm-, ZNS- und Nierenarterien (Nordstoga et al. 1978). Als Ätiologie der Polyarteritis nodosa wird heute eine Hypersensitivitätsreaktion vom Typ III mit Ablagerung von Antigen-Antikörperkomplexen im Zusammenhang mit verschiedenen Infektionskrankheiten vermutet. Dass eine derartige Immunreaktion auch durch *E. cuniculi* ausgelöst werden kann wird bestärkt durch die Tatsache, dass infizierten Blaufüchse und Hunde im Blut meist eine deutliche Hypergammaglobulinämie aufweisen (Mohn et al. 1974; Botha et al. 1986).

Nerze galten bis vor einiger Zeit als resistent gegenüber einer Infektion mit *E. cuniculi* (Nordstoga et al. 1974). In einer neueren Studie wurde jedoch auch in einer Gruppe Nerze eine derartige Infektion vermutet. Hierzu wurden Nerze im Alter zwischen fünf Monaten und 2,5 Jahren mit Veränderungen an den Augen in Form einer Katarakt pathohistologisch untersucht: Bei allen Tieren konnten histologisch für eine *E. cuniculi* -Infektion typische Läsionen in Gehirn und Rückenmark gefunden werden, obwohl diese Tiere keine klinisch-neurologisch sichtbaren Ausfälle zeigten. Bei allen Tieren zwischen fünf Monaten und einem Jahr wurden mikroskopisch Sporen nachgewiesen, bei denen es sich höchstwahrscheinlich um *E. cuniculi* handelt. Bei betroffenen Tieren zwischen 1,5 und 2,5 Jahren konnten die Autoren ähnlich wie beim Blaufuchs, Veränderungen an den Gefäßen vom Typ der Polyarteritis nodosa darstellen (Bjerkås 1990).

Bei einer in Gefangenschaft gehaltenen Lemmingkolonie in Iowa (USA) dagegen wurden über einen Zeitraum von fünf Jahren immer wieder Todesfälle beobachtet. Viele der betroffenen Tiere zeigten neurologische Veränderungen wie Kreislaufen, Tortikollis und Nachhandparese. Als Hauptursache wurde neben einer Otitis media/interna, ausgelöst durch *Klebsiella pneumoniae*, eine Infektion mit *E. cuniculi* diagnostiziert (Randall u. Dennis 1993).

Berichte über das Vorkommen der klinischen Form der *Enzephalitozoonose* bei Hunden stammen größtenteils aus Südafrika und einige aus den USA und



England. Auch hier sind primär Welpen von klinisch unauffälligen serologisch positiven Muttertieren betroffen, die sich entweder bereits kongenital oder aber perinatal infiziert haben. Die Morbiditäts- und Mortalitätsrate der infizierten Welpen kann dabei bis zu 100 % betragen. Auch neonatal infizierte Welpen haben laut einer Studie von Szabo und Shaddock (1987) histologisch hochgradige Veränderungen in den einzelnen Organen und zeigen Entwicklungsstörungen bis hin zu plötzlichen Todesfällen trotz einer nachweislich stark ausgeprägten Immunabwehr (Mc Innes u. Stewart 1991; siehe auch Kapitel 4.1.). Neben den bereits genannten Entwicklungsstörungen bei Hundewelpen sind klinisch Apathie und Depression sowie neurologische Symptome wie Ataxien, Inkoordination, Kreislaufen, Nachhandschwäche bzw. -parese, Tremor und Anfälle beschrieben worden. Auch beim Hund können neben den Läsionen im ZNS schwere Schäden der Nieren auftreten, bis hin zu Nierenversagen und Veränderungen an den Gefäßwänden, ähnlich denen, wie sie bei Blaufüchsen beschrieben worden sind (Plowright 1952; Shaddock et al. 1978; Botha et al. 1979 u. 1986). In einem Zwinger mit Foxhounds (USA) zeigten alle 12 Welpen eines Wurfes starke Entwicklungsstörungen sowie Polydipsie und Polyurie. Bei jedem betroffenen Tier konnten unter anderem vergrößerte Nieren festgestellt werden. Mikrobiologische und serologische Untersuchungen ergaben den Verdacht auf eine duale Infektion mit Leptospiren und *E. cuniculi*, welche durch charakteristische histologische Läsionen und Nachweis der *E. cuniculi*-Sporen in Gehirn und Nieren bestätigt werden konnte (Cole et al. 1982). In drei verschiedenen Zwingern mit vermehrtem Welpensterben, z.T. mit vorausgehender neurologischer Symptomatik, konnten *E. cuniculi*-Sporen aus Nierengewebe der betroffenen Welpen isoliert werden (Stewart et al. 1979b). Neben Gehirn und Nieren können beim Hund weitere Organe wie Milz, Lymphknoten, Leber, Herz und Lunge betroffen sein (Botha et al. 1979). Auch Läsionen an den Augen bis hin zum Erblinden sind beim Hund beschrieben worden. In einer weiteren Studie traten bei Wildhunden in Südafrika zwei Wochen nach Impfung gegen Staupe mit einem Lebendimpfstoff neurologische Symptome auf. Als Auslöser wird hier eine primäre Immunsuppression durch eine subklinische Infektion mit *E. cuniculi* vermutet (Van Heerden et al. 1989).

Bei Katzen wurde die klinische Form der *Enzephalitozoonose* bis heute erst in zwei Fallberichten beschrieben. Eine eindeutige Erregerbestimmung wurde in beiden Fällen leider nicht durchgeführt (Van Rensburg u. Du Plessis 1971; Buyukmihci et al. 1977). Im ersten Fall handelt es sich um eine generalisierte Infektion bei einem Siamesenkätzchen mit neurologischen Ausfällen. In der Histologie konnten in Gehirn und Nieren Läsionen diagnostiziert werden, die denen von *E. cuniculi* entsprechen. Außerdem wurden *Enzephalitozoon*-artige Sporen im Gehirn, den Nieren, der Milz und einigen Lymphknoten gefunden. Im zweiten Fall wurden bei einer 3½-jährigen Europäisch Kurzhaarkatze Veränderungen am Auge beschrieben. Die Katze zeigte seit 6 Monaten Blepharospasmus des rechten Auges. Es wurde eine Keratitis, eine Konjunktivitis und eine Uveitis anterior diagnostiziert. Aus der histologischen Untersuchung ergab sich ein charakteristisches polymorphkerniges mononukleäres Zellbild. Licht- und elektronenmikroskopisch konnten zahlreiche Sporen vom Stamm der Mikrosporidien nachgewiesen werden mit großer morphologischer Ähnlichkeit zu *E. cuniculi*.

### 6.3 Vorkommen bei Vögeln

Der erste Bericht über eine mögliche Infektion mit *E. cuniculi* bei Vögeln stammt von Kemp und Kluge (1975). Die Autoren konnten bei 10 verstorbenen Liebesvögeln (Agaporniden) in Leber, Niere, Gallengang und Darm Sporen nachweisen, die morphologisch den Sporen von *E. cuniculi* ähnelten. Leider erfolgte keine eindeutige Klassifizierung und der Erreger wurde nur als *Enzephalitozoon*-Subspezies deklariert. Bis heute wurden weitere 5 Studien über eine mögliche Infektion bei Agaporniden und eine bei einem Papagei veröffentlicht. Jedoch erfolgte die Erregerklassifizierung auch hier immer nur nach morphologischen Kriterien.

Laut einer aktuellen Studie wird eine Infektion mit *E. cuniculi* auch bei Hühnern vermutet. In einem Legehennenbestand traten innerhalb von 14 Tagen bei vier Tieren klinische Symptome wie Apathie, Lähmungserscheinungen, Gleichgewichtsstörungen, leichter Durchfall und Gewichtsverlust auf. Bei der immunhistochemischen Untersuchung zeigten sich positive Reaktionen auf *E. cuniculi*-Antiserum, nicht aber auf Toxoplasmose. *E. cuniculi*-artige Sporen konnten in der Schleimhaut des Kropfes, des Ösophagus und des Magens sowie

in der Skelettmuskulatur, im Pankreas, Milz, Leber, den Nieren, der Lunge, im Myokard, im Gehirn, im N. ischiadicus und in einem Eileiter nachgewiesen werden. Auch bei den Hühnern wird eine primär horizontale, daneben aber auch eine vertikale Übertragung vermutet. In einer weiteren Studie bei Hühnereiern waren 40 % der Embryonen mit *E. cuniculi* infiziert (Reetz 1993 u. 1994).

#### **6.4 Vorkommen bei Primaten**

Bei Affen wird das Auftreten einer spontanen Infektion mit *E. cuniculi* überwiegend bei Totenkopffaffen (Neuweltaffen) beschrieben. Betroffen sind auch hier hauptsächlich Neugeborene (jünger als vier Wochen) oder Jungtiere (jünger als neun Monate), bei denen eine bereits in utero oder perinatal erfolgte Infektion vermutet wird (Anver et al. 1972; Brown et al. 1973; Guscetti et al. 2003). Nach oraler Infektion bei immunsupprimierten Rhesusaffen (Altweltaffen) konnten zwar Sporen in Kot und Urin nachgewiesen werden, die Tiere entwickelten jedoch keinerlei Organläsionen (Didier et al. 1994). In einer Affenkolonie in den USA wurde bei klinisch gesunden und kranken Tieren eine Seroprävalenz zwischen 60 und 70 % festgestellt, was auf eine starke Durchseuchung schließen lässt (Shadduck u. Baskin 1989). Es gibt neben den genannten Affenarten auch einen Fallbericht über einen ausgewachsenen, wahrscheinlich immunsupprimierten *Callicebus moloch*. Bei dem Tier wurde eine spontane intestinale Mikrosporidieninfektion diagnostiziert, die eventuell auf *E. cuniculi* zurückzuführen ist (Seibold u. Fussell 1973). Bei Totenkopffaffen verläuft die Infektion in den meisten Fällen klinisch inapparent und ohne schwere Organveränderungen (Baskin 1993). In einem Fallbericht wird aber auch ein akuter Todesfall bei einem 24 Stunden alten Totenkopffaffen beschrieben. Die bei diesem Tier dargestellten Organismen wurden aufgrund der Färbereigenschaften und genauer elektronenmikroskopischer Untersuchungen als *E. cuniculi* identifiziert und die damit verbundene Infektion als Ursache für das Versterben des Tieres angesehen (Anver et al. 1972). Eine weitere Studie berichtet über klinische Symptome wie Entwicklungsstörungen und neurologische Ausfälle in Form von „petit mal“-Anfällen bei einem einen Monat alten Jungtier. In der histologischen Untersuchung wurden multiple Veränderungen in Gehirn, Leber und Nieren vom Typ *E. cuniculi* gefunden sowie der Erreger selbst nachgewiesen (Brown et al. 1973). Bei mehreren subklinischen *E. cuniculi*-Infektionen wurden bei

Totenkopffäffchen zudem histologische Veränderungen in der Lunge und der Plazenta beschrieben (Zeman u. Baskin 1985; Baskin 1993). Eine aktuelle Studie berichtet auch über eine lethale *E. cuniculi*-Infektion bei einem Tamarinaffen (Reetz 2004). Experimentell infizierte Grüne Meerkatzen (Altweltaffen) und Rhesusaffen dagegen wiesen keine klinische Symptomatik auf und die Tiere entwickelten nur geringe histologische Veränderungen (Didier et al. 1994).

## 6.5 Vorkommen beim Menschen

Gefährdet sind vor allem immundefiziente und -supprimierte Menschen. Eine Studie untersuchte Seren von homosexuellen Männern in Schweden, die als besondere Risikogruppe für HIV-Infektionen angesehen werden. Es wiesen 33 % der Probanden Antikörper gegen *E. cuniculi* auf, wobei alle positiven und die Hälfte der negativen Probanden vor der Studie schon mal die Tropen bereist hatten (Berquist et al. 1984). Auch bei immunkompetenten Menschen mit verschiedenen anderen Krankheiten unbekannter Ätiologie (neurologische Defizite, Nierenschäden etc.) und bei bis zu 40 % von gesunden Tropenrückkehrern wurden Antikörper gegen *Enzcephalitozoon* spp. nachgewiesen (Weber u. Deplazes 1995; Hollister et al. 1991). Verschiedenen Fallbeschreibungen bei HIV-positiven Patienten zufolge äußert sich die *Enzcephalitozoonose* auch beim Menschen unter anderem in Nephropathien, bis hin zum Nierenversagen. Je nach Eintrittspforte des Erregers kommt es zu primären Veränderungen im Darm, im Respirationstrakt und den Augen. Begleitend treten dabei klinische Symptome wie Durchfall, Gewichtsverlust, Sinusitis, Pneumonie und Keratokonjunktivitis auf. Daneben gibt es mehrere Studien über eine klinisch-disseminierte Form der *Enzcephalitozoonose* mit multifokaler Organbeteiligung unter anderem auch des ZNS (Marigleth et al. 1973; Zender et al. 1989; Aarons et al. 1994; Weber u. Bryab 1994; Rogowska-Szadkowska 1994; Garvey et al. 1995; Franzen et al. 1995; Weber u. Deplazes 1997; Mertens et al. 1997). Berichte über eine Infektion des ZNS, ausgelöst durch *E. cuniculi*, beschränken sich jedoch nicht allein auf AIDS-Patienten. Selbst bei HIV-negativen Menschen wie z.B. bei einem Jungen aus Japan und einem Kleinkind aus Kolumbien wird eine Infektion mit Beteiligung des ZNS beschrieben, die vermutlich auf *E. cuniculi* zurückzuführen ist. Bei dem Jungen handelte es sich um einen neun Jahre alten Japaner mit unbekanntem Immunstatus, der unter

generalisierten epileptischen Anfällen litt. In Proben von Urin und Liquor konnten Mikrosporidien-Sporen, vermutlich *E. cuniculi*, nachgewiesen werden. Auch das zwei Jahre alte Kind aus Kolumbien zeigte klinisch Symptome einer Epilepsie. Serologisch wurde ein hoher Antikörpertiter gegen *E. cuniculi* festgestellt und Sporen im Urin nachgewiesen, bei denen es sich laut der Autoren morphologisch sehr wahrscheinlich um *E. cuniculi* handelt (Matsubayashi et al. 1959; Berquist et al. 1984). In der Mehrzahl der beschriebenen Fälle tritt bei immunkompetenten Menschen jedoch nur eine lokal begrenzte Infektion auf, wie verschiedene Berichte über eine alleinige Infektion der Augen zeigen. Jedoch konnte auch in diesen Fallberichten der Erreger rein morphologisch nicht sicher als *E. cuniculi* identifiziert werden (Ashton u. Wirasinha 1973; Davis et al. 1990; Cali et al. 1991). Laut aktueller Studien hat die *Enzephalitozoonose* neben AIDS-Patienten auch zunehmende Bedeutung bei Patienten nach Organtransplantation. Mohindra et al. (2002) und auch Gamboa-Dominguez (2003) konnten jeweils bei einem HIV-negativen Patienten nach einer Nierentransplantation zum einen aus verschiedenen Organproben mittels PCR/ Immunfluoreszenztest *E. cuniculi*-Erreger isolieren. Zum anderen entwickelten diese Patienten eine disseminierte Infektion mit Beteiligung des ZNS, vermutlich aufgrund der immunsuppressiven Therapie nach der Organtransplantation.

## 6.6 Bedeutung als Zoonose

Heutzutage wird die *Enzephalitozoonose* als opportunistische Infektion bei HIV-Infizierten angesehen. Bisher ist bei den meisten Studien jedoch noch unklar, ob die Patienten mit *E. hellem* oder *E. cuniculi* infiziert waren, da diese beiden *Enzephalitozoon*-Arten morphologisch identisch sind (Canning u. Hollister 1991). Neuere molekularbiologische Studien belegen aber, dass auch *E. cuniculi* neben *E. intestinalis* etc. sicher zu einer Infektion beim Menschen führen kann (Weber u. Deplazes 1995; Franzen et al. 1995). Die Gefahr einer Übertragung der *E. cuniculi*-Infektion des Kaninchens auf den Menschen wird in den letzten Jahren zunehmend diskutiert. 1997 wurde mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) verschiedener *E. cuniculi*-Isolate von Mensch und Kaninchen eine 99,9 %ige Übereinstimmung des Genoms nachgewiesen (Mathis et al. 1997; Deplazes et al. 1996). Der Mensch kann sich bisher nachweislich mit den *E. cuniculi*-Stämmen Typ III vom Hund und Typ I vom Kaninchen infizieren (Didier et al. 1996; Mertens

et al. 1997; Mathis et al. 1997; Snowden et al. 1999; Müller 1998; Deplazes et al. 1998; Weitzel et al. 2001). Hinsichtlich des zoonotischen Charakters von *E. cuniculi* wurde jedoch bisher nur in einem Fall eine Serokonversion beim Mensch nach Kontakt mit infizierten Hundewelpen nachgewiesen. Auch bei einem AIDS-Patienten mit vorberichtlich dauerhaft engem Kontakt zu Hunden wurde eine disseminierte duale Infektion mit *E. intestinalis* und *E. cuniculi* vom Typ III (Hundetyp) diagnostiziert (Mc Innes u. Stewart 1991; Del Aguila et al. 2001; Weitzel et al. 2001). In einer Studie aus Texas wurde darauf hingewiesen, dass klinisch gesunde Hunde nach eigenen Untersuchungen über einen Zeitraum von vier Monaten niedrige Konzentrationen an Sporen über den Urin ausschieden und somit als mögliche Infektionsquelle für den Menschen anzusehen sind (Snowden et al. 1999). Eine Übertragung des beim Menschen nachgewiesenen *E. cuniculi* Typ I vom Mensch auf das Kaninchen ist wissenschaftlich belegt (Mathis et al. 1997; Müller 1998), die Übertragung in der Gegenrichtung höchst wahrscheinlich. In einem Fall bei einem Jungen aus Ceylon mit lokaler *E. cuniculi*-Infektion des Auges wurde eine Übertragung durch einen vorausgehenden Ziegenbiss vermutet (Ashton u. Wirasinha 1973). Eine Studie von Reetz (1993) belegt, dass 40 % der befruchteten Hühnereier mit *E. cuniculi* infiziert sind und gibt diese als mögliche weitere Infektionsquelle für den Menschen an.

## **7. Diagnostik**

### **7.1 Direkte Nachweisverfahren**

#### **7.1.1 Histologische Untersuchung**

Die histologische Untersuchung war in früheren Jahren die einzige Möglichkeit einer sicheren Diagnosestellung. Erste histologische Läsionen können jedoch nach einer Studie an experimentell mit *E. cuniculi*-infizierten Kaninchen erst ab der 8. Woche post infectionem dargestellt werden (Cox u. Galichio 1978) und erste Veränderungen im Gehirn sogar erst ab Tag 98. Heutzutage werden am lebenden Tier hauptsächlich serologische Nachweisverfahren eingesetzt. Antikörper gegen *E. cuniculi* lassen sich laut Cox et al. (1979) bereits ab Tag 15 bis 21 post infectionem im Blut nachweisen. Somit wären sie zum Nachweis einer akuten Infektion mit *E. cuniculi* besser geeignet. Auch lässt sich daraus schließen,

dass durch eine negative histologische Untersuchung allein eine Infektion mit *E. cuniculi* nicht ausgeschlossen werden kann, im positiven Fall diese jedoch eine durch klinische Untersuchung und Serologie erhobene Verdachtsdiagnose bestätigt. In den meisten Fällen (chronische Infektion) korreliert jedoch ein positiver Antikörpertiter mit den histologischen Veränderungen (Waller 1977; Cox u. Gallichio 1978; Pakes et al. 1984; Scharmann et al. 1986).

### 7.1.2 Nachweis der Sporen im Urin

Vor einiger Zeit konnte aufgezeigt werden, dass sich die Sporen von *E. cuniculi* unter anderem bevorzugt in den Tubulusepithelzellen der Niere vermehren (siehe Kapitel I.1.3.). Von dort aus gelangen sie unter anderem in das Lumen der Sammelrohre und werden mit dem Urin ausgeschieden (Hamilton und Cox 1981). Prinzip: Kaninchen scheiden einen alkalischen Urin aus (pH=8), der große Mengen anorganischer Kristalle, primär Kalziumphosphat enthält. Diese Kristalle beeinträchtigen stark den Nachweis von Zellen und Organismen und damit auch von *E. cuniculi*-Sporen. Goodman und Garner (1972) beschreiben mit der Sedimentation und der Azidifikation zwei Möglichkeiten zur Entfernung dieser Kristalle. Nach der Studie der genannten Autoren ist die Auflösung der Kalziumkristalle durch Azidifikation des Urins die Methode der Wahl, um den meist stark trüben Urin zu klären. Nach der Ansäuerung erfolgt die Zentrifugation, das Auftragen auf einen Objektträger und dann nach dem Trocknen die Fixation mit anschließender Färbung der Urinprobe. Es werden heute in der Diagnostik verschiedene Spezialfärbungen zur Darstellung von Mikrosporidien in Urin und anderen Körperflüssigkeiten eingesetzt (siehe Tabelle 4).

**Tabelle 4:** Spezialfärbungen zum Nachweis von *E. cuniculi* in Körperflüssigkeiten  
(abgewandelt nach Müller 1998):

<b>Färbung</b>	<b>Prinzip</b>	<b>Bemerkung</b>
<b>Modifizierte Trichrom-Färbung/ Chromotrop-Färbung (Weber 1992)</b>	Chromotrope 2R, Echtgrün, Phosphorwolframsäure und Essigsäure konz.; Sporen stellen sich rosa bis pink dar, der Sporenhalt erscheint farblos; Bakterien und anderer Hintergrund färben sich blau-grünlich	In der Routinediagnostik am häufigsten eingesetzte Färbung; positive Kontrollen werden benötigt; zur Beurteilung ist Erfahrung nötig; sensitiv
<b>Gram-Chromotrope Färbung (modifizierte Trichrom- Färbung nach Moura et al. 1996)</b>	zusätzlich primäre Gram- Färbung; Sporen färben sich violett mit grampositiven Granula; Hintergrund bleibt neutral	Dauer hier nur 11 Min. statt 120 Min. bei der Chromotrop-Färbung; Sporen heben sich deutlicher vom Hintergrund ab
<b>Trichrom-Blau-Färbung (modifizierte Trichrom- Färbung nach Ryan et al. 1993)</b>	Anillin-Blau statt Echtgrün; weniger Phosphorwolfram- säure; Sporen stellen sich pink- rosa dar	Deutlichere Differenzierung von Mikrosporidien und Hintergrundmaterial v.a. bei Stuhlproben
<b>Färbung mit fluoreszierenden Stoffen: Calcofluor (Vavra und Chalupsky 1982)  Uvitex 2B (Van Gool et al. 1993)</b>	Calcofluor bindet an Chitin der Sporenwand; Sporen stellen sich unter UV-Licht als weiss- bläuliche bis türkise Halos dar	Wenig zeitaufwendig, aber auch wenig spezifisch bei Stuhlproben, da andere Partikel mitangefärbt werden; Sensitivität 80-100 %, abh. vom jeweiligen Labor
<b>Duale Färbung: Calcofluor-weiss M2R und Sytox-Grün (Green et al. 2000)</b>	Lebende Sporen: türkisblaue Halos unter UV-Licht; tote Sporen: gelb-grün bei 470-490 nm	Unterscheidung zwischen lebenden (infektiösen) und toten Sporen möglich, da Sytox-Grün von lebenden Sporen aktiv ausgeschieden wird
<b>Immunfluoreszenz- Technik (Aldras et al. 1994)</b>	Verwendung von mono- bzw. polyklonalen Antikörpern; Sporen fluoreszieren unter UV-Licht bei 380-490nm	Sensitiv; genus-spezifisch für <i>E. cuniculi</i> ; Kreuzreaktionen mit Sporen anderer Mikrosporidien möglich; bisher keine kommerziellen AK erhältlich



Die am häufigsten eingesetzten histochemischen Färbungen zur Darstellung von Mikrosporidien in Flüssigkeiten sind modifizierte Trichrom-Färbungen und der Einsatz von fluoreszierenden Stoffen. Beide Färbemethoden haben eine vergleichbare Sensitivität von 80 bis 100 %, abhängig vom jeweiligen Labor, und werden von verschiedenen Autoren auch zum Nachweis niedriger Sporenkonzentrationen empfohlen (Didier et al. 2000; Weber et al. 1992).

Beim Kaninchen wird bisher neben Tuschetest und IFAT häufig die modifizierte Trichrom-Färbung nach Weber (1992) zum Nachweis der *E. cuniculi*-Sporen im Urin eingesetzt. Die Diagnostik über den Urin stellt ein einfaches, wenig invasives Verfahren dar, jedoch ist es nicht immer leicht, bei aufgeregten Kaninchen Urin zu gewinnen (Müller 1998).

Ein Nachweis der ausgeschiedenen *E. cuniculi*-Sporen ist laut Hamilton und Cox (1981) im Urin ab der 8. Woche post infectionem möglich und Scharmann et al. (1999) konnten bereits ab der 3. bis 4. Woche Sporen im Urin nachweisen. Die Ausscheidung der Sporen erfolgt beim Kaninchen jedoch diskontinuierlich bis zur 15. Woche bzw. bis zum 98. Tag nach experimenteller Infektion. Es scheiden nur ca. 25 % der infizierten Kaninchen Sporen über den Urin aus (Pye u. Cox 1977). Nach einer Studie von Schottelius et al. (1994) schieden sogar nur zwei von 70 subklinisch infizierten Kaninchen Sporen über den Urin aus und Müller (1998) konnte zwischen 14. und 161. Tag bei keinem von sechs experimentell infizierten Kaninchen Sporen im Urin nachweisen. Daher ist anzunehmen, dass nur akut erkrankte Kaninchen mit überwiegender Nierensymptomatik Sporen über den Urin ausscheiden. Diese These wird auch bestärkt durch die Tatsache, dass Cox und Gallichio (1977) bei 9 von 11 klinisch auffälligen Kaninchen Sporen im Urin nachweisen konnten, von den klinisch gesunden Tieren schied hingegen nur eins von 6 Sporen aus. Die Diagnose einer Enzephalitozoonose beim Kaninchen über den Nachweis von Sporen im Urin ist demnach nur im positiven Falle beweisend und wird zumindest mit den bisher angewendeten Nachweismethoden eher als wenig geeignet angesehen (Müller 1998).

Bei anderen Tierspezies und auch beim Menschen sollte zur Bestätigung einer *E. cuniculi*-Infektion immer eine zusätzliche Färbung, z.B. ein IF-Antikörpertest oder weitere elektronenmikroskopische und molekularbiologische Tests durchgeführt werden, da lichtmikroskopisch keine Spezies-Differenzierung

möglich ist und bei diesen Tieren häufig auch eine Infektion mit anderen Mikrosporidien in Frage kommt (Didier 1998; Didier et al. 2000).

### 7.1.3 Elektronenmikroskopische Untersuchung

Die elektronenmikroskopische Untersuchung verschiedener Organproben zur Diagnose von Mikrosporidieninfektionen wird bis heute in der Humanmedizin als „Goldstandard“ angesehen (Asmuth et al. 1994; Kotler u. Orenstein 1998; Wasson u. Peper 2000). Anhand charakteristischer Merkmale der einzelnen Sporen ist bei dieser Methode im Gegensatz zu einer rein lichtmikroskopischen Untersuchung eine Spezies-Differenzierung der Mikrosporidien möglich. Die Arten *E. cuniculi* und *E. hellem* z.B. können jedoch rein morphologisch nicht unterschieden werden (Canning u. Hollister 1991).

Prinzip: Die gewonnenen Proben werden über Zentrifugation, Fixierung und Dehydratation in einen speziellen Kunststoff eingebettet. Daraus werden in mehreren Schritten Ultradünnschnitte angefertigt und diese anschließend unter dem Elektronenmikroskop untersucht. Um die Sporen besonders hervorzuheben, kann unter anderem Goldstaub eingesetzt werden. Mit dem Elektronenmikroskop können aufgrund des Vorhandenseins bestimmter morphologischer Kriterien, wie z. B. des charakteristischen Polfilaments der Mikrosporidien, die jeweiligen Sporen spezies-spezifisch differenziert werden. Anhand der Anzahl der Windungen des Polschlauchs, der Kernzahl der reifen Spore etc. können die Erreger zudem einer Gattung oder meist sogar einer einzelnen Art zugeordnet werden (Cali et al. 1991; Canning u. Lom 1986).

Leider ist die Untersuchung mittels Elektronenmikroskop sehr teuer, zeitaufwendig und vermutlich weniger sensitiv als angenommen, da eine relativ große Menge des zu untersuchenden Erregers notwendig ist. Diese Methode wird deshalb in der Routinediagnostik als eher ungeeignet betrachtet (Didier 1995).

### 7.1.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

In den letzten Jahren wird in der Humanmedizin zunehmend auch bei Mikrosporidieninfektionen die **Polymerasekettenreaktion (PCR)** als direktes Nachweisverfahren eingesetzt.

Hierzu wurden von mehreren Autoren unterschiedliche Primer-Sets entwickelt und getestet. Mit Hilfe dieser Primer ist eine eindeutige Zuordnung zu Mikrosporidien (z. B. pan-*Enzcephalitozoon*-Primer) und zum Teil eine direkte Spezies-

Identifikation von *E. cuniculi* möglich. Neben den PCR-Protokollen für Biopsieproben, bei denen immer primär eine Erreger-Kultivierung erfolgte, wurden nun auch PCR-Protokolle für den Nachweis der Mikrosporidien direkt aus Körperflüssigkeiten entwickelt, so dass auch der Nachweis von *E. cuniculi*-Sporen in Proben von Stuhl, Urin, Sputum und Liquor direkt möglich ist. Hierbei wird die DNA aus der gewonnenen Probe extrahiert und anschließend via PCR amplifiziert, ohne dass eine primäre Erreger-Kultivierung notwendig ist (Fedorko et al. 1995; Didier et al. 1996; De Groote et al. 1995; Katzwinkel-Wladarsch et al. 1996; Franzen et al. 1998; Furuya et al. 2001).

Prinzip: In einem ersten Schritt wird die zu amplifizierende **DNA** aus der zu untersuchenden Probe **extrahiert**. Das kann zum Beispiel in mehreren Waschschritten durch eine spezielle DNA-bindende Silikamembran erfolgen (z.B. QIAmp DNA Mini Kit™)

Danach erfolgt die eigentliche **Polymerasekettenreaktion (PCR)**: Sofern im Reaktionsgemisch ein DNA-Doppelstrang als Matrize (Template) vorhanden ist, wird dieser zuerst durch Erhitzung **denaturiert** und damit in seine Einzelstränge aufgetrennt. Danach werden aus einem Gemisch vorhandener dNTP`s die zuvor entstandenen Einzelstränge durch ein Polymerase-Enzym zum erneuten DNA-Doppelstrang polymerisiert, sofern ein kurzer doppelsträngiger Bereich als Starter (Primer) zur Verfügung steht. Hierfür erfolgt als 2. Reaktionsschritt nach der Denaturierung das sog. **Annealing**, d. h. die Hybridisierung der Primer an die komplementären Einzelstränge. Die so entstandenen doppelsträngigen Bereiche dienen nun als Startstelle für die **Polymerasekettenreaktion** (Kettenverlängerung, 3. Reaktionsschritt). Nach der Polymerasekettenreaktion werden die hierbei neu synthetisierten Doppelstränge durch erneutes Erhitzen wiederum in ihre Einzelstränge getrennt und es erfolgt ein erneuter Reaktionszyklus (Kettenreaktion). Bei jedem erfolgten Reaktionsschritt kommt es so zur Verdoppelung der Matrizen und somit auch zur Verdoppelung der von der Polymerase synthetisierten DNA. Dies führt durch die Kettenreaktion zu einer exponentiellen Anreicherung der zwischen den Primern liegenden DNA-Sequenz. Anschließend können die amplifizierten Produkte der Polymerasekettenreaktion auf ein Agarosegel aufgetragen, mittels **Elektrophoresekammer** aufgetrennt und z. B. durch Ethidiumbromid im UV-Licht durch Fluoreszenz sichtbar gemacht werden.

Bei Einsatz eines pan-Enzephalitozoon-Primers kann die Spezies-Identifizierung nach der PCR z. B. durch **Restriktionsenzym polymorphismus**, DNA-Sequenzierung oder „Southern-blot“-Hybridisierung erfolgen.

Beurteilung: Laut Katzwinkel-Wladarsch et al. (1997) weist die PCR für den Menschen eine vermutliche Sensitivität von ca. 88 %, sowie eine Spezifität von 78 % auf. Jedoch konnten bei verschiedenen klinischen Proben auch bei lichtmikroskopischer Untersuchung fast identische Werte für Sensitivität und Spezifität ermittelt werden. Auch laut einer Vergleichsstudie von Rinder et al. (1998) speziell bei Stuhlproben vom Menschen wurde für die PCR nur eine etwas höhere Sensitivität im Gegensatz zur lichtmikroskopischen Untersuchung ermittelt und eventuelle Unterschiede der beiden Verfahren hauptsächlich auf die verschiedenen Labors zurückgeführt.

Die PCR ermöglicht jedoch im Gegensatz zu anderen Untersuchungstechniken eine relativ einfache, schnelle und sichere Speziesdifferenzierung. Außerdem können bereits kleinste Mengen auch an fraktioniertem Antigen ermittelt werden. Von Bedeutung ist die PCR-Diagnostik in der Humanmedizin v. a. bei Patienten mit dualen Mikrosporidieninfektionen, da die Wirksamkeit der eingesetzten Medikamente größtenteils speziesabhängig ist (Weber et al. 1994; Dietrich et al. 1994; Weitzel et al. 2001).

## 7.2 Indirekte Nachweisverfahren

Shadduck et al. (1969) berichtete als erster über die erfolgreiche Vermehrung von Enzephalitozoon cuniculi in Choroid-Plexus-Zellen von Kaninchen (RCP). Seitdem gab es immer wieder Studien über die Kultivierung von *E. cuniculi*-Sporen in verschiedenen Zelltypen (Bedrnik u. Vavra 1972; Waller 1975; Visvesvara 2002). Heutzutage wird die Vermehrung von *E. cuniculi* und auch anderen Mikrosporidienarten in Zellkulturen standardisiert durchgeführt. Es können somit große Mengen an Antigen hergestellt werden, eine wichtige Voraussetzung für die Durchführung indirekter Nachweismethoden auch bei der Routinediagnostik der *Enzephalitozoonose* beim Kaninchen. Die genauen Prinzipien der einzelnen Nachweisverfahren wurden bereits 1996 und 1998 von Mayer-Breckwoldt bzw. Müller im Einzelnen beschrieben.

## 7.2.1 Serologische Nachweisverfahren

### Immunfluoreszenz-Antikörper-Test (IFAT)

Der Immunfluoreszenz-Antikörpertest wurde 1971 von Chalupsky et al. als erste indirekte Nachweismethode zur Bestimmung von Antikörpern gegen *E. cuniculi* im Serum entwickelt.

Beurteilung: Der IFAT bietet den Vorteil, dass sowohl Immunoglobuline der Klasse M als auch der Klasse G bestimmt werden können. Hierdurch ist bei gleichzeitigem Nachweis beider Immunoglobulinklassen im Serum eine fast 100 %ig sichere Diagnosestellung möglich (Lev 1982). Laut mehrerer Studien handelt es sich um einen einfach durchzuführenden, verlässlichen und sehr sensitiven Test (99 %) mit einer sehr guten Korrelation zu den histopathologischen Veränderungen (Cox u. Pye 1975; Cox u. Gallichio 1977; Cox et al. 1977; Müller 1998). Nachteilig ist, dass bei diesem Test zur Auswertung ein Fluoreszenzmikroskop benötigt wird und die Erkennung von fraktioniertem Antigen nicht möglich ist. Auch ist der genaue Endpunkt bei den einzelnen Verdünnungsstufen relativ schwierig zu bestimmen (Wosu et al. 1977a).

### Schwarztusche-Test (Syn.: Carbonimmunoassay [CIA], India-Ink Immunoreaktion [IIR] )

Der erste sog. „Tusche“-Test zum Nachweis von Antikörpern wurde 1971 von Geck zur Identifizierung von Enterobacteriaceae beschrieben. 1977 wurde dieser „Tusche“-Test von Waller zum Nachweis von Antikörpern gegen *E. cuniculi* weiterentwickelt und ein Jahr später von Kellet und Bywater modifiziert.

Beurteilung: Der Tusche-Test ist schnell und einfach, ohne aufwendige Hilfsmittel durchzuführen. Zudem wird dieser Test als sehr spezifisch angesehen und wurde in einer Studie sogar als etwas empfindlicher bewertet als der IFAT (Lev 1982). Da mit dem Tuschetest zum Nachweis von *E. cuniculi* nachweislich keine Kreuzreaktionen mit *Toxoplasma gondii* auftreten, bietet er dadurch den Vorteil, dass bei Anwendung eines entsprechenden Kombinationstests ein gleichzeitiger Nachweis von Antikörpern gegen beide Erreger möglich ist (Waller u. Bergquist 1982).

Nachteilig ist, dass mit dem Tusche-Test lediglich Immunoglobuline der Klasse G nachgewiesen werden und zudem keine quantitative Bestimmung des Antikörper-Titers möglich ist. Daher werden anhand dieses Tests Kaninchen mit akuter

Infektion und sehr niedrigen Titern meist nicht erfasst und sollten nach 2 - 4 Wochen nachgetestet werden (Waller et al. 1978; Waller u. Bergquist 1982).

### **Enzym-Immunotest (EIA)/**

#### **Enzymgebundener Immunadsorbtionstest [ELISA]**

Der enzymabhängige Immunotest oder auch ELISA wurde von mehreren Autoren in unterschiedlich modifizierter Form als Nachweis von *E. cuniculi*-Antikörpern im Serum beschrieben (Cox et al. 1981; Beckwith et al. 1988; Müller 1998).

Beurteilung: Abhängig vom eingesetzten Anti-Antikörper können mit dem EIA bzw. ELISA wie beim IFAT speziell Immunglobuline der Klassen M oder G bestimmt werden und es ist keine Weiterbearbeitung des einzusetzenden Antigens notwendig. In der Vergleichsstudie von Cox et al. (1981) wurde der EIA sogar als 10 mal sensitiver als der IFAT bewertet. Zudem ist dieser Test einfach durchzuführen und ermöglicht durch die Beurteilung der Ergebnisse mittels photometrischer Messung eine objektivere Auswertung als z. B. der Tuschetest. Jedoch wichen diese photometrischen Messungen bei Cox et al. (1981) noch sehr voneinander ab und Dot-ELISA haben den Nachteil, dass keine exakte Messung der Farbreaktion erfolgt. Andererseits wird beim Dot-ELISA kein Spektralphotometer für die Auswertung benötigt und das Ergebnis kann durch den Einsatz des Serums in verschiedenen Verdünnungsstufen quantifiziert werden (Beckwith et al. 1988). In einer Vergleichsstudie von Müller (1998) erschien der ELISA im Vergleich zum Immunfluoreszenz-Test zu Beginn der Infektion weniger geeignet, ergab jedoch bei chronischen Infektionen meist höhere Antikörper-Titer. Laut Müller (1998) stimmten die Ergebnisse des getesteten ELISA mit denen des IFAT zu 98,2 % überein und der ELISA wurde in dieser Studie als zuverlässiger Test bewertet.

### **Komplementbindungsreaktion (KBR)**

Dieser Test wurde 1971 von Wosu et al. zur indirekten Diagnostik von *E. cuniculi*-Infektionen beschrieben:

Beurteilung: Die Komplementbindungsreaktion (KBR) bietet gegenüber dem IFAT den Vorteil, dass auch fraktioniertes Antigen eingesetzt werden kann. Wosu et al. (1977b) sehen in der Komplementbindungsreaktion einen einfach durchzuführenden, sensitiven und spezifischen Test, dessen Ergebnisse laut ihrer

Studie mit denen des IFAT oder des Intrakutantests korrelierten. Jedoch ergab die KBR im Vergleich zum IFAT deutlich niedrigere Titer und die Herstellung fraktionierten Antigens kann Variationen innerhalb der Antigengruppe erzeugen (Cox et al. 1981).

### **Immunoperoxidase-Test (IP)**

Gannon beschrieb diesen Test 1978 zum Nachweis der *E. cuniculi*-Infektion beim Kaninchen und verglich ihn mit dem Immunfluoreszenz-Test.

Beurteilung: Laut Gannon (1978) ist der Immunoperoxidase-Test ein relativ sensitiver und verlässlicher Test. Im Vergleich zum IFAT konnten ähnliche Ergebnisse ermittelt werden, jedoch ergab der IP in einigen Fällen einen höheren Antikörper-Titer. Als nachteilig wird vom Autor die niedrige Spezifität der Farbreaktion in Bezug auf die Anfärbung der Sporen angesehen. Das hat zur Folge, dass die Sporen sich als etwas unförmig braune Gebilde darstellen.

### **Mikroagglutinations-Test**

Der Mikroagglutinations-Test wurde von Shadduck und Geroulo (1979) zum Nachweis von Antikörpern gegen *E. cuniculi* entwickelt:

Beurteilung: Laut der Autoren stellt diese Methode einen einfach durchzuführenden und verlässlichen Test dar, bei dem im Gegensatz zum IFAT auch längere Zeit eingefrorenes Antigen eingesetzt werden kann. Die positiven und negativen Proben konnten im Hämozytometer leicht unterschieden werden und der Mikroagglutinations-Test erwies sich im Vergleich zum IFAT als gleich sensitiv. Auch laut Pakes et al. (1984) sollen die Ergebnisse der Mikroagglutination gut mit denen des IFAT und des Tuschetests korrelieren (Shadduck u. Geroulo 1979).

### **Radiale Hämolysen**

Dieses Nachweisverfahren wurde 1997 von Balent et al. zur Bestimmung hämolytischer Antikörper gegen *E. cuniculi* beschrieben.

Beurteilung: Die Ergebnisse der Radialen Hämolysen stimmten laut der Studie von Balent et al. (1997) mit denen des indirekten Immunfluoreszenztests größtenteils überein. Bestehende Abweichungen wurden dabei von den Autoren auf die unterschiedliche Auswertung und das Reaktionsprinzip zurückgeführt. Balent et al. (1997) sind der Meinung, dass es sich um einen sehr einfach

durchzuführenden und sehr ökonomischen Test handelt, der sich gut zur serologischen Kontrolle in Kaninchenbeständen eignet. Jedoch wurde diese Methodik bisher nur einmal beschrieben und es fehlt eine sichere Abklärung über den genauen diagnostischen Wert dieses Tests.

### **Intrakutantest (IK) (Syn. Intradermaltest [ID])**

Die Durchführung des Intrakutantests bei Kaninchen wurde 1972 von Pakes et al. beschrieben und die Ergebnisse anhand histologischer Untersuchungen post mortem bewertet.

Beurteilung: Es treten beim Intrakutan-Test keine Kreuzreaktionen mit Eimeria oder Toxoplasma gondii auf und der Test wurde als ein spezifischer, sehr sensitiver und leicht durchzuführender Test bewertet: In der Studie von Pakes et al. (1972) zeigte sich eine sehr gute Korrelation dieser Methode zu den Ergebnissen des IFAT und der histopathologischen Untersuchung. Als nachteilig zu bewerten ist jedoch die relativ lange Zeit bis zur Auswertung und ein relativ hoher Verbrauch an Antigen. Der Test ist außerdem bei jedem Tier nur einmal als diagnostisch aussagekräftig anzusehen, da durch die intrakutane Injektion des Antigens evtl. eine nachfolgende Sensibilisierung stattfinden kann. Zur Diagnose akuter Infektionen ist er ungeeignet und die Auswertung erfolgt manchmal sehr subjektiv. Laut der Studie von Pakes et al. (1972) waren Kaninchen mit deutlichen histologischen Veränderungen auch immer im Intrakutan-Test positiv. Andererseits zeigten serologisch positive Tiere mit geringen oder fehlenden histologischen Läsionen bei diesem Test nicht immer eine positive Reaktion. Diese Diskrepanz wird von den Autoren darauf zurückgeführt, dass Organläsionen ähnlich wie der Intrakutan-Test auf die Anwesenheit sensibilisierter T-Lymphozyten zurückzuführen sind (Pakes et al. 1972; Waller 1977; Wosu et al. 1877a).

### **7.2.2 Aktuelle Bewertung serologischer Nachweisverfahren**

Laut Meinung der jeweiligen Autoren wurden der Intrakutan-Test und auch die anderen beschriebenen indirekten Nachweisverfahren als gut geeignet befunden. Jedoch wurden in den einzelnen Studien z. T. zu geringe Tierzahlen verwendet, um eine statistisch endgültige Bewertung geben zu können. Bis heute werden in der Routinediagnostik beim Kaninchen nur der Tusche-Test und der



Immunfluoreszenztest eingesetzt. In einer neueren Studie von Boot et al. (2000) wurden Immunfluoreszenztest, ELISA, Tuschetest und Intrakutantest bei 152 Kaninchen miteinander verglichen. Die Unterschiede in Sensitivität und Spezifität wurden als zu gering eingeschätzt, um in der Praxis von Bedeutung zu sein. Es wurde empfohlen, sowohl negative als auch positive Testergebnisse zweimal nachzutesten, wobei zumindest eine Kontrolle durch den quantitativ sehr genauen Immunfluoreszenztest erfolgen sollte.

Laut Levkut et al. (1978, Slovakai) und Müller (1998, Schweiz) besitzen rund 85 % der Kaninchen mit neurologischer Symptomatik auch Antikörper gegen *E. cuniculi* im Blut, laut einer Studie aus England sind es immerhin 69 % (Harcourt-Brown u. Holloway 2003). Die ersten Antikörper sind im Serum ab Tag 14 bis 21 post oraler Infektion nachweisbar (Waller 1978). Allgemein ist jedoch die Bestimmung des Antikörpertiters beim Kaninchen allein nicht ausreichend für eine sichere Diagnosestellung der *Enzephalitozoonose* (Keeble 2001). Eine eindeutige Diagnose kann bisher nur durch direkte Nachweisverfahren erfolgen. Die histologische Untersuchung kann beim Kaninchen jedoch meist erst postmortal durchgeführt werden und ausgeschiedene Sporen sind im Urin zumindest mit den beim Kaninchen gängigen Methoden nicht immer nachzuweisen (siehe Kapitel 7.1.2.).

### **7.3 Möglichkeiten klinischer Diagnosestellung**

Die Diagnose der *Enzephalitozoonose* am lebenden Tier stützt sich bisher auf die Kombination verschiedener Untersuchungsmethoden. Hierzu gehören neben einer ausführlichen Anamnese, der klinisch-neurologischen Untersuchung und Bestimmung von Laborparametern auch eine spezielle Augenuntersuchung sowie bildgebende Verfahren wie Röntgen der Bulla und der Wirbelsäule, um in Frage kommende Differentialdiagnosen auszuschließen. In einer neueren Studie von Kniepen und Fehr (2001) wurde zum Ausschluss einer Otitis media et interna als wichtige Differentialdiagnose der *Enzephalitozoonose* der Einsatz früh akustisch evozierter Potentiale (FAEP) beim Kaninchen untersucht. Hierbei wurden Ergebnisse des FAEP von gesunden und an Otitis media erkrankten Kaninchen ermittelt und verglichen. Aufgrund der starken Rassenunterschiede und der daraus resultierenden Kopfgröße der Kaninchen kommt es zu starken Schwankungen der ermittelten Werte für Latenz und Amplitude. Laut der Autoren

ist demnach keine sichere Diagnose einer Otitis media et interna möglich. Jedoch wurden hier lediglich die Werte für die krankheitsbedingt veränderten Ohren ermittelt und miteinander verglichen. Eine Messung am gesunden Ohr und die Auswertung der Ergebnisse für beide Ohren bezogen auf jedes einzelne Kaninchen erfolgte in dieser Studie jedoch nicht. Weitere Nachweisverfahren wie die Liquoranalyse, sowie PCR von Urin und Liquor bei Kaninchen mit Enzephalitozoonose werden in der vorliegenden Arbeit untersucht.

## 8. Differentialdiagnosen bei neurologischer Manifestation

Die im Zusammenhang mit der neurologischen Form der *Enzephalitozoonose* beim Kaninchen auftretenden Symptome können auch durch eine ganze Reihe anderer Krankheiten bedingt sein. Ausgehend von der neurologischen Symptomatik wurden für die beiden Hauptsymptome Vestibularsyndrom und Parese von verschiedenen Autoren unterschiedliche Differentialdiagnosen aufgezählt. Auch auf seltener auftretenden Symptome wie Anfälle oder sonstige neurologische Defizite wird dabei näher eingegangen (Kötsche u. Gottschalk 1990; Wenzel u. Albert 1996; Deeb u. Carpenter 2004). Jedoch werden die einzelnen Differentialdiagnosen dabei meist nach der Häufigkeit des Auftretens genannt und weniger den einzelnen neurologischen Defiziten selbst zugeordnet.

### 8.1 Pasteurellose

Als eine Hauptdifferentialdiagnose bei Kaninchen mit Tortikollis werden von Kunstyr und Naumann (1985 u. 1986) eine bakterielle Infektion mit Pasteurella multocida sowie der Befall mit Ohrmilben angesehen. Rund 66 % der untersuchten Kaninchen zeigten in dieser Studie eine Otitis media et interna bedingt durch Pasteurellen. Diese Bakterien gelangen dabei laut der Autoren meist über die Tuba auditiva ins Mittel- und Innenohr und bewirken dort eine suppurative Entzündungsreaktion. Auch eine retrograd aufsteigende Entzündung entlang des N. trigeminus oder via Lymphdrainage, ausgehend von der Nasenschleimhaut oder hämatogenen Ursprungs wird diskutiert (Kpodékon 1983a+b). Das entstehende Empyem in Mittelohr und Innenohr kann evtl. durch

bildgebende Verfahren (Röntgen) dargestellt werden. Jedoch zeigte in einer Studie auch ein Großteil der mit Pasteurellen subklinisch infizierten Kaninchen ein Exsudat in der Bulla tympanica (Snyder et al. 1973). Durch eine bakterielle Untersuchung des gewonnenen Sekrets allein ist meist keine eindeutige Diagnosestellung der Pasteurellose möglich, da dieses Bakterium häufig auch auf der Schleimhaut gesunder Kaninchen nachgewiesen werden kann (Snyder et al. 1973; Deeb 1997). Die an Pasteurellose erkrankten Kaninchen zeigen jedoch im Gegensatz zu Kaninchen mit *Enzephalitozoonose* zusätzlich zu den durch Otitis media/interna bedingten Symptomen sehr häufig eine Rhinitis (80 %). Weiterhin können eine Infektion des unteren Respirationstrakts, eine erhöhte Körpertemperatur, Peritonitis sowie multiple Abszesse in verschiedenen Organen einen weiteren Hinweis auf eine bakterielle Infektion geben (Kpodékon 1983b; Bjoedvt et al. 1979). Als weitere Auslöser einer bakteriellen Otitis media et interna beim Kaninchen werden neben *Pasteurella multocida* z.B. Staphylokokken, *E. Coli* und *Pseudomonas aeruginosa* beschrieben (Deeb 1994). Alle genannten Bakterien können zudem sekundär im Zuge einer Bakteriämie ins ZNS gelangen und dort eine bakteriellen Enzephalitis auslösen. Abhängig von der Lokalisation der Entzündungsreaktion im ZNS treten hierbei ähnliche bis gleiche neurologische Defizite auf wie bei der Enzephalitozoonose (Murray et al. 1985).

## 8.2 Trauma

Neurologische Ausfälle, wie sie beim klinischen Verlauf der *Enzephalitozoonose* auftreten können, sind besonders bei Heimtierkaninchen sehr häufig traumatisch bedingt. Vor allem bei dem Symptomekomplex Parese ist ein Trauma als Hauptdifferentialdiagnose anzusehen und sollte bei Verdacht auf eine *E. cuniculi*-Infektion stets in Betracht gezogen werden (Weisbroth et al. 1974; Wenzel u. Albert 1996; Deeb u. Carpenter 2004). Traumatische Läsionen der Wirbelsäule und des Rückenmarks treten dabei sehr häufig im Bereich des 7. Lendenwirbels auf, wobei laut Literatur Wirbelfrakturen häufiger vorkommen als Luxationen. Auch Schädeltraumata, die entsprechende neurologische Ausfälle im Kopfbereich auslösen können, sind für Kaninchen beschrieben (Deeb u. Carpenter 2004). Bei einer Parese kann es zusätzlich bei schwerem Trauma der Wirbelsäule auch zu einem Ausfall der Hautsensibilität, sowie Harn- und Kotinkontinenz kommen.

Auch können Röntgenaufnahmen sowie die Bestimmung der Kreatinkinase im Serum in einigen Fällen die Verdachtsdiagnose Trauma bestätigen.

### 8.3 Toxoplasmose

In früheren Jahren wurde die Toxoplasmose vornehmlich bei Versuchskaninchen als eine der Hauptdifferentialdiagnosen der *Enzephalitozoonose* angesehen. Die Ursache hierfür dürfte wohl v.a. in dem ähnlichen histologischen Erscheinungsbild beider Infektionen begründet sein (Perrin 1943; Shaddock u. Pakes 1971). Heutzutage spielt die Toxoplasmose jedoch nur noch eine untergeordnete Rolle. Kunstyr et al. (1970) beschrieben in Zuchtbeständen eine Seroprävalenz von 63 %, Uhlikova und Hübner (1973) sogar von 89 %. In einer neueren Studie dagegen konnten nur bei 9,8 % von insgesamt 467 untersuchten Kaninchen unterschiedlicher Herkunft Antikörper im Serum nachgewiesen werden. Dabei wurden nur bei 10,7 % der Kaninchen mit Kopfschiefhaltung Antikörper gegen *Toxoplasma gondii* nachgewiesen, nicht jedoch gegen *E. cuniculi* (Müller 1998). Ähnlich wie bei der *Enzephalitozoonose* sind die Kaninchen meist latent ohne die Ausbildung klinischer Symptome mit *Toxoplasma gondii* infiziert (Sedlák et al. 2000). Die Übertragung der Toxoplasmose erfolgt primär kongenital, aber auch infizierte Jungtiere erkranken nur in seltenen Fällen (Uhlikova u. Hübner 1973). Wenn die betroffenen Tiere klinisch erkranken, zeigen sie jedoch neben der neurologischen Symptomatik im Gegensatz zur *Enzephalitozoonose* meist ein deutlich gestörtes Allgemeinbefinden. Dabei werden Symptome wie Kümmern, Apathie, Anorexie, Dehydratation, generalisierte Muskelschwäche sowie Fieber beschrieben und die Kaninchen sterben meist innerhalb von 2 bis 8 Tagen nach Auftreten der Symptomatik. Auch plötzliche Todesfälle ohne vorausgehende klinische Symptome wurden beobachtet. Nur selten treten neurologische Veränderungen wie Ataxie, Tremor, Nachhandparese oder Tetraplegie auf, und Veränderungen an den Augen in Form einer Katarakt oder einer Iridozyklitis sind nur nach experimenteller Infektion beschrieben worden (Uhliková u. Hübner 1973; Leland et al. 1992; Von Bergmann et al. 1980; Dubey et al. 1992). Histologisch wird bei der Toxoplasmose genau wie bei der *Enzephalitozoonose* im ZNS eine granulomatöse Meningoenzephalitis beschrieben. Außerhalb des ZNS sind bei der Toxoplasmose jedoch besonders Nekrosen in vielen weiteren Organen, unter anderem in der Muskulatur beschrieben, bevorzugt jedoch in der Milz. Die Nieren

dagegen sind nur selten verändert (Shadduck u. Pakes 1971; Von Bergmann et al. 1980; Dubey et al. 1992; Leland et al. 1992). Auch wenn rein klinisch und histologisch evtl. keine Unterscheidung zur *Enzephalitozoonose* möglich ist, kann die Toxoplasmose doch durch spezielle Färbemethoden für die jeweiligen Sporen und charakteristische morphologische Unterschiede der beiden Erreger gut differenziert werden. Auch serologisch ist eine sichere Unterscheidung möglich, da keine Kreuzreaktionen zwischen den beiden Erregern auftreten (Perrin 1943; Leland et al. 1992; Waller u. Bergquist 1982; Wosu 1977a; Wilson 1979; Dubey et al. 1992).

## 8.4 Ohrmilben

Die beim Kaninchen vorkommenden Ohrmilben (*Psoroptes cuniculi*, *Chorioptes cuniculi*) sind laut Kunstyr und Naumann (1986) v.a. im äußeren Gehörgang zu finden und daher leicht mittels otoskopischer Untersuchung und durch mikroskopische Untersuchung eines Ausstrichs von der *Enzephalitozoonose* abzugrenzen. Betroffene Kaninchen leiden meist unter starkem Juckreiz, und die evtl. zu beobachtende Kopfschiefhaltung ist in diesem Fall meist rein reflektorisch bedingt, durch eine starke Hautirritation. Eine Otitis interna mit Symptome eines peripheres Vestibularsyndrom wird durch Ohrmilben laut der Autoren nicht ausgelöst.

## 8.5 Weitere Differentialdiagnosen

Als eine weitere Ursache neurologischer Ausfälle beim Kaninchen wird von einigen Autoren aus den USA die sog. „**zerebrale Nematodiose**“ beschrieben, ausgelöst durch wandernde Larven der Gattung *Baylascaris procyonis* und *Ascaris columnaris* (Dade et al. 1975; Deeb u. Di Giacomo 1994). *Baylascaris procyonis* und *Ascaris columnaris* sind bei Waschbären allgemein vorkommende Nematoden. Eine Ansteckung der Kaninchen wird in den USA über Kontakt mit kontaminiertem Heu oder Stroh vermutet. Eine sichere Diagnose der zerebralen Nematodiasis kann erst durch eine histologische Untersuchung post mortem gestellt werden. In Deutschland gibt es bis heute keine Berichte über eine derartige Infektion bei Kaninchen (Deeb u. Carpenter 2004). Als neurologische Symptome werden von den Autoren hauptsächlich Ataxien, Kreislaufen,

Opisthotonus, Tremor und auch Tortikollis beschrieben. Für den Symptomenkomplex Parese wird beim Kaninchen weiterhin, zumindest nach experimenteller Infektion, auch der Befall von Sarcocystis leporum erwähnt, ein Parasit, der hauptsächlich von Wildkaninchen in den USA übertragen wird (Deeb u. Carpenter 2004).

Traub (1942) beschreibt auch bei Kaninchen mit **Listeriose** eine neurologische Beteiligung mit Symptomen wie Tortikollis und Rollen um die eigene Achse, ausgehend von einer Meningoenzephalitis im Hirnstamm. Betroffen sind in erster Linie trächtige Häsinnen und Jungtiere. Jedoch kommt eine Infektion mit *Listeria monocytogenes* beim Kaninchen, besonders bei Heimtierkaninchen, sehr selten vor. Weder die klinischen Symptome noch die pathologischen Veränderungen sind direkt beweisend für eine Listerien-Infektion, so dass die bakteriologische Untersuchung verschiedener Organ- und Körperflüssigkeiten empfohlen wird (Weisbroth et al. 1974; Wenzel u. Albert 1996; Peters u. Scheele 1996; Deeb u. Carpenter 2004). In Gebieten mit enzootischem Auftreten von **Borna** bei Pferd und Schaf wurden ganz vereinzelt spontane Infektionen beim Kaninchen beobachtet. Neben neurologischen Ausfällen haben die betroffenen Tiere ein stark gestörtes Allgemeinbefinden und versterben in der Regel nach 10 bis 14 Tagen. Nur die histologische Untersuchung inklusive Erregernachweis gewährleistet hier eine sichere Diagnosestellung. Vor allem beim Heimtierkaninchen ist diese Virusinfektion jedoch von sehr geringer Bedeutung (Risch-Laasch 1981; Wenzel u. Albert 1996).

In früheren Jahren wurden **nutritive Störungen** als weitere mögliche Differentialdiagnosen für die *Enzephalitozoonose* angegeben. Kötsche und Gottschalk (1990) sahen die Ursache in einer fehlerhaften Futterzusammenstellung und konnten bei Kaninchen mit Tortikollis ein gestörtes Na-, K- Verhältnis feststellen. Auch ein Mangel an Vitamin A, Vitamin E, Magnesium, Selen etc. sowie Intoxikationen werden im Zusammenhang mit neurologischen Symptomen, Lahmheiten, generalisierter Muskelschwäche und Krämpfen bei Kaninchen angegeben (Deeb u. Carpenter 2004; Wenzel u. Albert 1996). Daneben müssen bei Jungtieren auch **angeborene Missbildungen** wie z. B. der sog. „Splay-Leg“, die Schüttellähme des „Deutschen Widder“, die Epilepsie der „Weißen Wiener“, erbliche Ataxien, die spastische Spinalparalyse oder Glykogenspeicherkrankheiten im Zusammenhang mit dem Auftreten

neurologischer Defizite berücksichtigt werden (Deeb u. Carpenter 2004; Wenzel u. Albert 1996).

Unabhängig vom Auftreten neurologischer Symptome führt eine Infektion mit *E. cuniculi* zu einer Immunsuppression und zu einer erhöhten Anfälligkeit für andere Krankheiten. Nach Von Kücken et al. (1987) sollte daher bei jedem kranken Kaninchen, insbesondere auch bei der mukoiden Enteritis immer eine Primärinfektion mit *E. cuniculi* in Betracht gezogen werden.

## 9. Therapie

### 9.1 Bewertung verschiedener Substanzen in vitro

Lange Zeit galt die *Enzephalitozoonose* beim Kaninchen als unheilbar. Von diversen Autoren wurde v. a. für Zuchtbestände und bei Labortieren eine regelmäßige serologische Untersuchung mit anschließender Selektierung und oder Tötung der serologisch positiven Tiere empfohlen. Verschiedentlich wird auch auf ein konsequentes Hygienemanagement hingewiesen, um eine Ausbreitung der Infektion im Bestand zu verhindern (Lyngset 1981; Kunstyr et al. 1986; Scharmann et al. 1986; Wenzel u. Albert 1996; Hillyer u. Quesenberry 1997). Erst im Zuge der zunehmenden Beliebtheit des Kaninchens als Haustier mit starkem persönlichen Bezug entstand das Interesse an einer möglichen Therapie. Bis heute basiert die Therapie der *Enzephalitozoonose* beim Kaninchen auf den allgemeinen Grundsätzen der Behandlung einer granulomatösen Enzephalitis bei anderen Tierspezies sowie auf in vitro und in vivo Studien zur Bestimmung der Wirksamkeit einzelner Chemotherapeutika (Harcourt-Brown u. Holloway 2003; Waller 1979; Beauvais et al. 1994; Franssen et al. 1995; Weiss et al. 1994; Ridoux u. Drancourt 1998). In Tabelle 6 sind die Chemotherapeutika mit der erfolgsversprechendsten Hemmwirkung in vitro zusammengefasst dargestellt. Ein direkter Vergleich der angegebenen Zahlen wird jedoch durch die verschiedenen Versuchsansätze erschwert (Müller 1998).

**Tabelle 6:** Chemotherapeutika mit guter Hemmwirkung gegen *E. cuniculi* in vitro

Substanz ( $\mu\text{g/ml}$ )	Hemmung Zellwachstum [%]	Bemerkung	Literatur
Chloroquinphosphat (12,5)	69	Vorkultivierung der Sporen: 8 Wochen	Waller (1979)
Oxytetracyclin (5,0)	58		
Spiramycin (50,0)	49		
Sulfadoxin-Trimethprim (24,0)	47	Expositionszeit: 8 Wochen	
Albendazol (0,005)	>90	Vorkultivierung der Sporen: 5 Stunden Expositionszeit: 3 Tage	Beauvais et al. (1994)
Fumagillin (0,001)	>90		
5-Fluorouracil (3,0)	>90		
Sparfloxacin (30,0)	>90		
Albendazol (5,0)	78	Vorkultivierung der Sporen: 24 Stunden Expositionszeit: 8 Tage	Franssen et al. (1995)
Thiabendazol (5,0)	89		
Fumagillin (5,0)	84		
Oxibendazol	90		

Zum Teil wird für die einzelnen Substanzen eine sehr gute Hemmwirkung gegen *E. cuniculi*-Sporen in vitro erreicht. Albendazol, Fumagillin, 5-Fluorouracil und Sparfloxacin hemmen laut Beauvais et al. (1994) das Sporenwachstum sogar um mehr als 90 %. Jedoch ist die Wachstumshemmung stark abhängig von der Dauer der Vorkultivierung der Sporen im Zellmedium und der Expositionszeit mit der jeweiligen Substanz. Auch weitere Laborparameter werden als beeinflussende Faktoren angegeben (Müller 1998). Trotz der guten Ergebnisse konnte bei zeitgleichem Zusatz von Sporen und zu testendem Medikament zum Zellmedium bei keinem der getesteten Medikamente eine Infektion der Zellen verhindert werden (Beauvais et al. 1994; Franssen et al. 1995).

## 9.2 Anwendung verschiedener Medikamente in vivo

### 9.2.1 Therapie bei primärer ZNS-Manifestation

#### 9.2.1.1 Einsatz verschiedener Antibiotika

Der Einsatz verschiedener Chemotherapeutika zur Behandlung der *Enzcephalitozoonose* beim Kaninchen in vivo wird bis heute nur anhand einiger klinischer Studien bei Patienten beschrieben. Jedoch existieren bisher keine statistisch aussagekräftigen Vergleichstudien zur Bewertung des Heilungserfolgs unter anderem unter Einbezug von Placebo-Kontrollen.



Von Kücken et al. (1987) beschreiben erste Therapie-Erfolge beim Kaninchen nach Einsatz von **Sulfonamiden** und **Methylenblau** zu Beginn der Krankheit. In dieser Studie sind jedoch weder Patientenzahlen noch eine genaue Auswertung aufgeführt.

In einer Arbeit von Ewringmann und Göbel (1999) wurden bei 51 serologisch positiven Heimtierkaninchen mit klinischer Symptomatik verschiedene Therapie-Protokolle, in Abhängigkeit von der jeweils vorherrschenden Organmanifestation getestet. Dabei wurde zwischen einer ZNS-, einer Nieren- und einer Augenmanifestation unterschieden. Bei Kaninchen mit rein neurologischer Symptomatik erfolgte der 14-tägige Einsatz von **Oxytetracyclin**, basierend auf der in vitro Studie von Waller (1979) und Dosierungsempfehlungen nach Schall (1995). Mayer-Breckwoldt (1996) dagegen beschreibt bei *E. cuniculi*-infizierten Kaninchen mit neurologischen Ausfällen den Einsatz von **Sulfonamid/Trimethoprim**. Dieses Antibiotikum zeigte in vitro eine Wachstumshemmung von nur 47 %, im Gegensatz zu Oxytetracyclin mit 58 % (Waller 1979). Laut Ewringmann und Göbel (1999) konnten von den 20 therapierten Tieren mit ZNS-Manifestation 55 % geheilt werden, weitere 25 % zeigten nach 14 Tagen eine deutliche klinische Besserung. Die Ergebnisse von Mayer-Breckwoldt (1996) dagegen ergaben lediglich bei 2 von 18 Kaninchen (11 %) eine klinische Besserung und nur eines dieser Kaninchen war nach 8 Wochen symptomfrei. Die starke Diskrepanz der Ergebnisse dieser beiden Therapievarianten wird jedoch weniger auf die Wahl der Antibiotika, als vielmehr auf die unterschiedliche Dosierung des ebenfalls eingesetzten **Glukokortikoids (Dexamethason)** zurückgeführt. Mayer-Breckwoldt (1996) wählte mit 2 mg/kg eine 10-fach höhere Dosierung. Ewringmann und Göbel (1999) vermuteten daher neben einer entzündungshemmenden auch eine starke immunsuppressive Wirkung, durch die der schlechte Heilungserfolg in dem einen Fall zu erklären wäre (Cohn 1997; siehe auch Kapitel 4.1.).

#### 9.2.1.2 Einsatz von Glukokortikoiden

Der Einsatz von **Glukokortikoiden** zur Therapie der *Enzephalitozoonose* beim Kaninchen wird verschiedentlich diskutiert. Allgemein wird aufgrund ihrer immunsuppressiven Komponente mit Gefahr der Verstärkung einer Infektion zur Vorsicht geraten. Jedoch wird der Einsatz von Glukokortikoiden auch bei der infektiös bedingten Meningoenzephalitis von Hund und Katze empfohlen,

aufgrund der daraus resultierenden starken Reduktion der klinischen Symptome (Platt 2002; Bondy et al. 2002). Feaga (1997) empfiehlt sogar eine alleinige symptomatische Therapie mit Glukokortikoiden. Seiner Meinung nach sind die klinischen Symptome rein auf die Entzündungsreaktion nach Freisetzung der *E. cuniculi*-Sporen in das umgebende Gewebe zurückzuführen. Auch konnte der genannte Autor in Gehirnarealen mit intakten Pseudozysten keinerlei entzündliche Reaktionen feststellen, in den Entzündungsregionen dagegen waren keinerlei Sporen mehr nachzuweisen, so dass diese seiner Meinung nach nicht primär bekämpft werden müssen. Feaga (1997) gibt bei einer ein- bis zweimaligen hochdosierten Gabe von Prednisolon (11 mg/kg i.m.) gute Erfolge an.

### 9.2.1.3 Einsatz von Benzimidazolen

In der Humanmedizin wird zur Behandlung von Infektionen mit *E. cuniculi* und anderen Mikrosporidien überwiegend Albendazol eingesetzt. Alle bisher therapierten AIDS-Patienten zeigten eine deutliche Besserung der klinischen Symptomatik. Jedoch wurde in einigen Fällen nach Absetzen der Therapie ein erneutes Auftreten der Symptome beobachtet (Aarons et al. 1994; Gunnarson et al. 1995; Franzen et al. 1995; Joste et al. 1996; Weber et al. 1997) und in einem Fall kam es trotz klinischer Besserung zu einem Fortschreiten der *E. cuniculi*-Infektion (Weitzel et al. 2001).

Neuschl et al. (1999) setzten **Albendazol** erstmals bei experimentell infizierten Kaninchen ohne klinische Symptomatik ein. Die Kaninchen erhielten in dieser Studie ab Tag 7 post infectionem über einen Zeitraum von 11 Wochen Albendazol (5 mg/kg, 2 mal/Woche oral). Der Therapieerfolg wurde anhand der Höhe des Antikörpertiters im Serum und dem Grad der klinischen Symptomatik bewertet. Ab Tag 14 konnten bei 85 % der Kaninchen im Serum keine Antikörper gegen *E. cuniculi* mehr nachgewiesen werden. Während der gesamten Dauer der Studie kam es zu keiner Ausbildung klinischer Symptome, die auf eine Infektion mit dem Erreger zurückzuführen gewesen wären. Auch nach Absetzen der Therapie traten bei den hier infizierten Tieren keine klinischen Symptome auf. Die Autoren sind der Meinung, dass Albendazol die Ausbildung einer aktiven Infektion verhindert und von Kaninchen gut toleriert wird. Auch in einem aktuellen Update von Jenkins (2003) wird die Therapie der Enzephalitozoonose beim Kaninchen mit Albendazol empfohlen. Laut einer Studie bei SCID-Mäusen dagegen, wurden zwar während der Therapie weder histologische Veränderungen, noch Sporen nachgewiesen;

nach Absetzen von Albendazol kam es jedoch teilweise zur Ausbildung hochgradiger klinischer Symptome, so dass hier von keiner Erregerelimination ausgegangen werden kann (Koudela 1994).

Allgemein ist das auch bei Mikrosporidien vorhandene  $\beta$ -Tubulin als Basis für die Benzimidazol-Wirkung anzusehen. Das Benzimidazol bindet dabei an die Cholchizinseite des  $\beta$ -Tubulins und verhindert dessen Polymerisation. Dadurch kann u. a. kein Zytoskelett ausgebildet werden, zudem kommt es zu einer starken Beeinträchtigung der Glukoseaufnahme (Venkatesan 1998; Li et al. 1996; Katiyar et al. 1994). Benzimidazole haben daher einen rein parasitostatischen Effekt, der zusammen mit dem beeinträchtigten Immunsystem bei AIDS-Patienten oder immunsupprimierten Kaninchen das Persistieren einer Infektion mit *E. cuniculi* erklären könnte. Allerdings hat Albendazol gegenüber den anderen bisher eingesetzten Substanzen den Vorteil, das es liquorgängig ist, wobei im Liquor fast 50 % und im Gehirngewebe ca. 40 % des Plasmaspiegels erreicht werden (Venkatesan 1998). Trotz der z. T. erfolgsversprechenden klinischen Wirkung wird von einer Behandlung mit Albendazol beim Kaninchen aufgrund des starken embryotoxischen und teratogenen Effekts abgeraten (Kotler u. Orenstein 1999). Eine neuere Studie von Suter et al. (2001) testete die prophylaktische und therapeutische Wirkung von **Fenbendazol** bei experimentell infizierten Kaninchen und Kaninchen mit natürlich erworbener Infektion. Keines der prophylaktisch mit Fenbendazol über 7 bis 14 Tage behandelten Kaninchen wies bis zum 150. Tag post infectionem Antikörper im Serum auf. Post mortem konnte bei keinem dieser Tiere Sporen im Gehirn nachgewiesen werden. Auch die Therapie der natürlich infizierten Kaninchen mit Fenbendazol (20 mg/kg oral über 28 Tage) führte laut dieser Studie bei allen behandelten Tieren zu einer Erregerelimination, obwohl Fenbendazol den gleichen Wirkmechanismus aufweist wie Albendazol. Prozentual konnte ein ähnlicher klinischer Therapieerfolg wie bei Ewringmann und Göbel (1999) erzielt werden. Die Autoren empfehlen daher sowohl die prophylaktische Anwendung als auch eine Therapie der *Enzephalitozoonose* beim Kaninchen mit Fenbendazol. Die Persistenz neurologischer Symptome bei einigen der behandelten Tiere führen die Autoren auf eine hochgradige Entzündungsreaktion zurück mit einer daraus resultierenden irreversiblen Nervenschädigung, die allein durch eine kausale Therapie nicht ausreichend behandelt werden konnte. Harcord-Brown und Holloway (2003) beschreiben in

einer aktuellen Studie bei schweren vestibulären Ausfällen neben dem Einsatz der bisher genannten Substanzen zusätzlich die Anwendung von Prochlorperazin (0,2-0,5 mg/kg per os) oder Midazolam (1-2 mg/kg s.c.) zur Minderung der neurologischen Symptomatik. Der Therapieerfolg nach Behandlung mit Albendazol oder Fenbendazol wird auch in dieser Studie nur anhand meist subjektiver Beurteilung zum Teil durch den Kaninchenbesitzer bewertet und mit 53 % angegeben. Hervorzuheben ist die Tatsache, dass laut dieser Veröffentlichung fünf Kaninchen auch ohne kausale Therapie überlebten, wobei bei drei dieser Tiere die neurologischen Ausfälle vollständig verschwanden. In weiteren Studien wird als zusätzliche symptomatische Therapie bei neurologischer Manifestation der Enzephalitozoonose der Einsatz von **Vitamin B** zur Nervenregeneration beschrieben (Ewringmann u. Göbel 1999). Die eben genannten Autoren vermuteten zudem stets einen vorliegenden Nierenschaden und empfehlen daher zusätzlich täglich eine subkutane **Infusion** zur Förderung der Nierenperfusion und Minderung des nephrotoxischen Effekts des Oxytetracyklins.

### 9.2.2 Therapie bei primärer Nierenmanifestation

Aufgrund der nephro- und hepatotoxischen Potenz des Oxytetracyklins führten Ewringmann und Göbel (1999) die Therapie niereninsuffizienter Tiere mit **Enrofloxacin** (2 x tgl. 5 mg/kg s.c.) durch. Zusätzlich erhielten diese Tiere täglich Infusionen und ein Multi- Vitaminpräparat. Der Therapieerfolg wird jedoch bei diesen Tieren als sehr schlecht bewertet. Laut der Autoren konnte nur in Einzelfällen eine langfristige Besserung erzielt werden. In der Studie von Harcourt-Brown und Holloway (2003) wird neben der Gabe von Enrofloxacin und einer Flüssigkeitstherapie der Einsatz von anabolen Steroiden (Nandrolon 2 mg/kg) beschrieben. Alle Kaninchen mit klinisch und labordiagnostisch bestätigter Niereninsuffizienz wurden in dieser Studie aufgrund sehr schlechten Allgemeinbefindens euthanasiert.

### 9.2.3 Therapie bei primärer Augenmanifestation

In der Studie von Ewringmann und Göbel (1999) erhielten Kaninchen mit phakoklastischer Uveitis neben einer systemischen Therapie zusätzlich eine lokale Applikation in Form Oxytetracyklin-haltiger Augensalben über 10-14 Tage. Zusätzlich wurde systemisch und lokal Dexamethason in entzündungshemmender Dosierung angewendet. Bei allen Kaninchen mit

alleiniger Augenmanifestation konnte mit diesem Therapieregime die reaktive Uveitis dauerhaft beseitigt werden. Andere Autoren beschreiben bei einer Uveitis neben Dexamethason die lokale Anwendung von Fusidinsäure und Neomycin bzw. Polymycin B mit gutem Erfolg. Weitere Veränderungen am Auge in Form der Katarakt konnten jedoch durch diese Therapie nicht beeinflusst werden (Harcourt-Brown u. Holloway 2003). Bei einer stark fortgeschrittenen Uveitis oder Katarakt ist laut Wagner (2000) ein chirurgisches Vorgehen angeraten bzw. die Entfernung des entzündlichen Materials mittels Phakoemulsifikation, da diese Tiere auf eine alleinige symptomatische Therapie nicht mehr ansprechen (Fechle u. Sigler 2002).

### **III Kapitel 1:**

## **Results of CSF analysis in healthy rabbits and rabbits with encephalitozoonosis**

**A. Jaß (DVM)<sup>1)</sup>, K. Matiasek (DrVetMed)<sup>2)</sup>, H. Küchenhoff (PD,  
DrStat)<sup>3)</sup>, A. Fischer (Priv-Doz, DrMedVet, Dipl ESVN-ACVIM)<sup>1)</sup>**

<sup>1)</sup>Clinic of Veterinary Internal Medicine, Ludwig-Maximilians-University Munich;

<sup>2)</sup>Institute of Veterinary Pathology & Neuropathology Ludwig-Maximilians-  
University Munich; <sup>3)</sup>Department of Statistics, Ludwig-Maximilians-University

Munich

# **Results of CSF analysis in healthy rabbits and rabbits with encephalitozoonosis**

**A. Jaß (DVM), A. Fischer (PD, DrMedVet, Dipl ESVN-ACVIM), K. Matiasek (DrVetMed), H. Küchenhoff (PD, DrStat)**

**keywords: CSF analysis – rabbits – encephalitozoonosis – neurological symptoms**

**The aim of this study was to evaluate CSF analysis in healthy rabbits and rabbits with neurological symptoms due to encephalitozoonosis. In all rabbits CSF tap could be performed without long-time worsening of neurological symptoms. CSF analysis in healthy laboratory rabbits revealed WBC counts from 0 – 4 cells/ $\mu$ l (median 1.5 cells/ $\mu$ l) and a protein level from 0.13 – 0.31 g/l (median 0.24 g/l). Pet rabbits with encephalitozoonosis showed distinct pleocytosis with WBC counts from 5 – 78 cells/ $\mu$ l (median 15.3 cells/ $\mu$ l) and increased protein levels from 0.31 – 1.54 g/l (median 0.69 g/l). For both groups of rabbits statistical comparison revealed a clear difference with  $p < 0.001$  for both parameters. Cell differentiation of CSF from rabbits with encephalitozoonosis showed mononuclear cells with predominantly lymphocytes and monocytes.**

## **Introduction**

For several years now collection of cerebrospinal fluid (CSF) samples has been a matter of routine in cats and dogs, and CSF analysis is used as an aid in the diagnosis of many neurological disorders. Total and differential white blood cell counts as well as protein levels are regarded as the most important parameters for this (Parker 1972, Vandeveld and others 1987, Oliver and others 1997, Tipold 2002). Mader (1997) was the first to describe a more detailed technique for

collecting CSF from the cisterna magna in rabbits. The author used a method similar to that employed in cats. Reference values exist for some constituents of CSF in neurological healthy laboratory rabbits, including protein and glucose content (Weisbroth 1974, Kusumi and Plouffe 1980). Curiel and others (1892) were the first, who described reference values for WBC count and leukocyte subpopulations in CSF of normal laboratory rabbits. But to date, there exists only one published study about CSF analysis in rabbits with neurological infection. The authors investigated white blood cell count and protein levels within CSF of laboratory rabbits experimentally infected with Borna disease virus, as well as detection of the virus itself (Ludwig and others 1977). On the other hand, neurological diseases especially have been reported to occur with increasing frequency in pet rabbits, with head tilt, posterior paresis and paralysis as well as general muscular incoordination being the most common symptoms seen. The main differential diagnoses for these neurological symptoms in the pet rabbit are encephalitozoonosis, trauma and otitis media/interna or encephalitis due to pasteurellosis. Other infections, namely listeriosis, Borna disease, toxoplasmosis and cerebral nematodiasis, have also been described in a few cases. Up to now in most cases a definitive clinical diagnosis is impossible. Serological tests for detection of antibodies of *E. cuniculi* within serum are most commonly used as a diagnostic aid in living rabbits. But these tests have no evidential value in diagnosing active infection, as there is a relatively high prevalence of infection in pet rabbits. Prevalence of infection for *E. cuniculi* was reported to be 45 % in Germany (Ewringmann and Göbel 1999), reaching close to 100 % in some neighbouring countries (Chalupsky and others 1979, Lyngset 1981), and about 44 % in San Diego area, USA (Jenkins 2003) with the neurological form of encephalitozoonosis being reported to occur in up to 45 % of affected dwarf rabbits in Germany (Kunstyr and Naumann 1986, Wenzel and Albert 1996, Genz and Carpenter 1997, Ewringmann and Göbel 1999, Jenkins 2003). Clinical diagnosis of encephalitozoonosis, therefore, is most often achieved by combination of clinical-neurological examination, serological confirmation or the attempt to detect the causative spores directly in urine by microscopic examination. However, according to Pye and Cox (1975) spores are only excreted by about 25 % of experimentally infected rabbits and currently, definitive diagnosis in most cases can only be made post mortem. Clinically, definitive diagnosis in the



living animal is important when considering costs, distribution within the stock and zoonotic risk for the owner. According to the histopathological picture, which consists of granulomatous encephalomyelitis and perivascular infiltrates in rabbits with encephalitozoonosis, one would suspect inflammatory changes of CSF composition (Shadduck and Pakes 1971, Wasson and Peper 2000).

The aim of this study was to evaluate CSF tap and diagnostic value of CSF analysis in pet rabbits with neurological symptoms due to encephalitozoonosis. For this, reference values for WBC count, cell differentiation and protein content of CSF in healthy laboratory rabbits were established and compared with results of pet rabbits with neurological signs due to encephalitozoonosis.

## Materials and Methods

**Case-selection** – Cerebrospinal fluid samples of 20 fully grown, neurological healthy rabbits with negative *E. cuniculi* serum antibody titers were used to establish reference ranges for CSF analysis. Samples were obtained from laboratory rabbits housed by the Department of Experimental Oncology (TU Munich). All laboratory rabbits were kept in a close environment and were about 6 months to one year of age. Breeds included in this study consisted of 14 New Zealand White and 6 Chinchilla mixed breeds. CSF samples from rabbits with the neurological form of *E. cuniculi* infection were obtained from 21 pet rabbits presented to the Clinic of Internal Medicine (Faculty of Veterinary Medicine, University of Munich) from 2000 to 2003. 1/21 pet rabbits was a laboratory rabbit (Chinchilla mix breed). All other presented pet rabbits consisted of mixed bred dwarf rabbits (20/21). All pet rabbits were indoor housed, mainly single kept or in company with 1 or 2 pet rabbits or guinea pigs. Confirmation of active infection with *E. cuniculi* in these rabbits was achieved by neurological examination (21/21), serological testing (17/21 IIR, 3/21 IFAT) and necropsy in case of euthanasia or death (12/21). Other causes were ruled out by otoscopic examination (21/21), radiography (3/21), antibody test for toxoplasmosis (21/21), routine haematology, blood chemistry and urine analysis (21/21).

**CSF-tap** - CSF tap was performed with the animal under general anaesthesia using the technique employed in cats and described by Mader (1997). Induction and maintenance of anaesthesia was with propofol 1 % intravenously dosed to effect. All rabbits were intubated in order to enable easy ventilation without respiratory distress during CSF collection. The rabbits were positioned in lateral recumbency with the head flexed 90° to the spinal cord (Figure 1a). Collection of CSF was performed, after shaving and disinfection of the skin, from the cisterna magna with a spinal needle (Fa. Braun, 0,73x40mm/22G11/2). A stylet was used to minimize blood contamination (Figure 1b).

**CSF-analysis** – 100 µl of each CSF sample were used for determination of total leukocyte and erythrocyte cell count by use of a standard “Fuchs-Rosenthal” cell counting chamber. A further 100 µl were used for cytological evaluation after cytopsin preparation with added albumin. Both techniques were performed as described by Tipold (2002). Cell count and cytopsin preparation were performed within 30 minutes after collection of CSF. Quantitative protein determination in a 200 µl CSF sample was done by a nephelometric procedure, using trichloroacetic acid 30 % for protein denaturation (Nephelometer-100, Dade Behring, Marburg). All CSF samples for protein determination were stored for 2 to 5 days by –20°C until protein analysis was performed.

**Serological testing** – Detection of antibodies (IgG) to Encephalitozoon cuniculi in serum was performed by India-Ink Immunoreaction (IIR), as described by Kellet and Bywater (1978), at the “Tierärztliches Labor Freiburg” (Germany). Results were reported as positive or negative without any further details of titers. Since July 2002 detection of antibodies (IgG) has been performed by indirect immunofluorescence antibody test (IFAT) with titers from 1:80 up determined as positive (Deplazes and others, Zürich, unpublished data).

**Histopathological examination** – After necropsy, brain samples were taken from eight frontal levels throughout the brain. Samples obtained were fixed in 4 per cent buffered formalin and processed for paraffin embedding. Sections were stained with heamalaun, eosin and Nissl's cresylviolett for routine microscopic

examination as well as with special stains such as Giemsa for detection of *E. cuniculi* “pseudocysts”.

**Statistical analysis** – All statistical results were calculated with the aid of SPSS® 11.5 for Microsoft Windows. Established WBC cell counts and protein levels were statistically compared between healthy and diseased rabbits by the Mann-Whitney U-test. For protein contents in addition the t-test was performed, assuming unequal standard deviations. Values of  $p < 0.05$  were considered to be significant.

## Results

All pet rabbits of this study were tested serologically for antibodies against *E. cuniculi*. 20 out of the 21 pet rabbits with neurological form of encephalitozoonosis were tested positive by india ink immunoassay (IIR) or immunofluorescence antibody test (IFAT). Results of serum tested by IFAT ranged from 1:80 to 1:320 in these animals. Clinical diagnosis was confirmed by necropsy in 12 of the 21 rabbits. 11 of these 12 rabbits were euthanased and 1 died, because of worsening of clinical symptoms despite therapy for encephalitozoonosis as recommended by Ewringmann and Göbel (1999). Neurological symptoms in the remaining 9 rabbits significantly improved or disappeared during 10 days of therapy. In the one rabbit with negative IgG antibody titer (IIR) diagnosis was also confirmed by necropsy.

In all 21 rabbits results of a complete neurological examination were available. 20 of the pet rabbits had vestibular symptoms in varying degrees and only one showed paresis of the hind limbs. Neurological examination clearly identified central vestibular disease in 12 of the affected rabbits. In the one rabbit with hind limb paresis, neurological examination indicated multifocal disease due to LMN signs in the hind limbs and UMN signs in the front limbs with decreased mental status. Suspected diagnosis of encephalitozoonosis in this rabbit was confirmed by necropsy.

Laboratory evaluation revealed mild (3/21) to moderate (1/21) leucocytosis accompanied with lymphocytosis in 4 rabbits. The one rabbit with marked leucocytosis also had mild clinical signs of additional renal failure and showed moderate azotaemia with a low specific gravity of urine. Two other rabbits also

showed mild to marked azotaemia, low specific gravity of urine and distinct polyuria. These 4 rabbits were only included in the study, because CSF tap was performed just before euthanasia. Neurological deficits after anaesthesia therefore could not be evaluated in these animals. All other rabbits with significant clinical signs due to severe renal failure were excluded from the study because of potential risk of additional deterioration of renal function due to anaesthesia. Creatine kinase activity was elevated in 2/21 rabbits, indicating muscle cell damage. Both rabbits showed severe rolling to the side of the lesion.

Depending on weight and size (1.0 - 2.4 kg), an amount of 400 to 700  $\mu\text{l}$  CSF could be collected from each pet rabbit. All CSF samples obtained from the 20 healthy laboratory rabbits in this study were macroscopically water lucid and blood contamination did not exceed 150 RBC per  $\mu\text{l}$  fluid. In three CSF samples from healthy laboratory rabbits blood contamination was 273, 275 and 2000 RBC/ $\mu\text{l}$ . These samples were excluded from the study to ensure that influence of blood contamination on protein content and leukocyte count was negligible. In one patient it wasn't possible to collect enough CSF for complete laboratory analysis. This CSF sample was also excluded from the study.

White blood cell count of CSF in neurologically healthy laboratory rabbits was between 0 and 4 (cells/ $\mu\text{l}$ ) with a median of 1.5 (cells/ $\mu\text{l}$ ). Standard deviation in these samples was 1.1. Protein content in healthy rabbits showed values between 0.13 to 0.31 (g/l) with a median of 0.24 (g/l) and a standard deviation of 0.05 (Table 1). Microscopic cell differentiation in healthy laboratory rabbits revealed only few RBC' s according to blood contamination. WBC counts of CSF in these rabbits were not sufficient to enable a convincing WBC differentiation.

CSF samples of rabbits suffering from encephalitozoonosis were statistically different from healthy rabbits for WBC count as well as for protein content with  $p < 0.001$ . WBC counts in these samples were significantly higher than in tested CSF samples of healthy animals (16/21), with values ranging from 8 to 87 (cells/ $\mu\text{l}$ ), a median of 15.3 (cells/ $\mu\text{l}$ ) and a standard deviation of 24.4 (Table 2 and Figure 3). In four rabbits WBC count in CSF was within the reference range of healthy rabbits and in one sample WBC count was only 5 (cells/ $\mu\text{l}$ ), but protein was also clearly elevated in all these samples. Protein in all cell-free samples of diseased rabbits was significantly higher than in healthy animals with values from

0.31 to 1.54 (g/l), a median of 0.69 (g/l) and a standard deviation of 0.35 (Table 2 and Figure 4). For protein content also the t-test was significant ( $p < 0.001$ ).

CSF WBC differentiation in rabbits with encephalitozoonosis consistently showed distinct mononuclear pleocytosis with predominance of monocytes and lymphocytes (Figure 2a and b). Few to medium amounts of RBC's could be seen per visual field, depending on blood contamination of each CSF sample. In two cases red blood cell contamination was above 500 cells/ $\mu$ l. These samples revealed one to two neutrophils besides RBC's and in one of the two samples a plasma cell could be detected.

## Discussion

One aspect of this study was evaluation of the CSF tap technique in rabbits in general. In all healthy and neurologically diseased rabbits CSF tap was easy to perform by use of the described technique (Figure 1a and b). In the neurologically diseased pet rabbits, there was not any long-term worsening of neurological symptoms due to either anaesthesia or CSF tap itself. Some rabbits with vestibular disease showed increased neurological deficits for up to eight hours after anaesthesia and CSF tap, which were completely reversible. This appeared to have no influence on recovery from the underlying disease. Similar conditions have also been recognized in dogs and cats with vestibular disease after anaesthesia most likely due to the negative effects of anaesthesia on central compensatory mechanisms (Le Couteur and Vernau 1999). Depending on weight and size (1.0 - 2.4 kg) of the patients included in the study, an amount of 400 to 700  $\mu$ l CSF could be collected from each pet rabbit with encephalitozoonosis. Collected amount of CSF in healthy laboratory rabbits (2.4 - 3.9 kg) was about 700 to 1000  $\mu$ l CSF. There was no increased cranial pressure noticed according to tripping speed in any case. CSF samples of 3 additional pet rabbits were not included because of either blood contamination or lack of enough material.

WBC counts of CSF in healthy laboratory rabbits revealed values ranging from 0 to 4 (cells/ $\mu$ l) with a median of 1.5 (cells/ $\mu$ l). In all but one CSF sample WBC count was below or equal 3 (cells/ $\mu$ l) (Table 1). These results are only slightly lower than those established earlier by Curiel and others (1982) with values for WBC count ranging from 0 to 7 (cells/ $\mu$ l), and are similar to established reference values in

healthy dogs with a WBC count between 0 and 3 (cells/ $\mu$ l) (Tipold 2002) and < 5 (cells/ $\mu$ l) (Oliver and others 1997). Tipold (2002) suggested correction of the WBC count by 1 unit for every 500 (RBC's/ $\mu$ l). According to Rossmeis (2002) even a blood contamination of up to 1.000 (RBC's/ $\mu$ l) seems to be negligible. Nevertheless, CSF samples with RBC counts >500 (cells/ $\mu$ l) were excluded from this study to eliminate any influence of blood contamination on the establishment of reference values. The highest level for RBC's for healthy rabbits in this study was even much lower with 170 (cells/ $\mu$ l). As breed and age of the laboratory rabbits used by Curiel and others (1982) were similar to those used for this study, different WBC counts in the present study are most probably related to the different number of rabbits used, or different cell counting techniques. Protein content of CSF samples in healthy rabbits was between 0.13 and 0.31 (g/l) with a median of 0.24 (g/l). These results are significantly lower than those given by Weisbroth and others (1974) with a median protein content of 0.59 (g/l) in CSF of laboratory rabbits and established reference values from Kusumi and Pluoffe (1980) with a protein content ranging from 0.16 up to 0.66 (g/l) and a standard deviation of 0.33. Different values might be due to the use of different laboratory methods, blood contamination, age, breed or strain differences and number of rabbits used. Results of cell differentiation of CSF in healthy rabbits in the present study revealed negligible amounts of RBC's but too few leukocytes to get a meaningful evaluation. Based on the findings of Tipold (2002), who recommends 1ml CSF for cell differentiation in samples with low WBC counts, definite evaluation of the cell type in CSF of healthy rabbits by use of 100  $\mu$ l CSF was not possible. But according to Curiel and others (1982) one would have suspected a small pool of mononuclear cells, consisting of lymphocytes and monocytes.

Cell counts of CSF samples from rabbits with encephalitozoonosis revealed pleocytosis (16/21) in all but five samples. Moderate to marked pleocytosis ( $\geq$  12 cells/ $\mu$ l) was seen in 15/21 rabbits (Table 2). Therefore 100  $\mu$ l CSF of these samples revealed enough cells for evaluation after cytopspin preparation. All CSF samples of diseased rabbits had mild to moderate elevated protein contents when compared with the healthy laboratory rabbits, ranging from 0.31 to 1.54 (g/l) (Table 2). But 3 of these samples would come within the previously established reference values of Weisbroth (1974), Kusumi and Pluoffe (1980). In dogs CSF

samples with elevated protein content but normal WBC count (“albuminocytologic dissociation”) are considered to be due to neoplasia, peripheral polyneuropathy, degenerative or demyelinating disease, trauma or vascular disease (Vandeveldel and others 1987, Oliver and others 1997). In rabbits no such investigations have been carried out so far. In the five samples with WBC count within the reference range of healthy laboratory rabbits of the present study, diagnosis of encephalitozoonosis was confirmed by necropsy in three of them. The two other rabbits showed signs of central vestibular disease, had total protein levels within CSF statistically much higher than the healthy animals and responded well to treatment for encephalitozoonosis as recommended by Ewringmann and Göbel (1999). The low WBC count of these five CSF samples may be attributed to severe inflammatory reaction in connection with immunosuppression, but there was no evidence for this assumption found in haematology. Therefore it is thought to be most probably related to the deep parenchymatous localisation of inflammation as described for encephalitozoonosis with reduced meningeal infiltration in these cases. As pleocytosis alone is only confirming a non-specific inflammatory reaction within the CNS, cell differentiation is most important to provide further information about the underlying cause. CSF samples of rabbits with encephalitozoonosis in this study revealed mononuclear pleocytosis consisting of lymphocytes and monocytes (Figure 2a and b). This cell population might, however, be related to the granulomatous type of inflammation in rabbits, with perivascular and meningeal lympho-plasmacytic infiltrates being the dominant pathological alterations in the *E. cuniculi* infected brain of rabbits (Cox and Gallichio 1978, Nast and others 1996).

As all rabbits with encephalitozoonosis in this study had similar CSF results especially regarding cell differentiation, these are most probably characteristic for this kind of infection. However, it must be taken into account, that according to Ludwig and others (1977) Borna disease virus infection in rabbits causes comparable results of CSF analysis. For other neurological diseases in the rabbit no data of CSF analysis exist so far, but at least for toxoplasmosis, considering the similar histopathological features in rabbits, one would also expect comparable changes within CSF (Perrin 1943, Shaddock and Pakes 1971). In general, any viral encephalitis, protozoan encephalitis, immune-mediated encephalitis and some cases of CNS lymphoma will most likely show a similar

mononuclear pleocytosis within CSF. According to recent literature, protozoan encephalitis in dogs in general has been frequently characterized by a mixed cell population, including eosinophiles occasionally (Tipold 2002). To date there are no published results for CSF analysis of dogs with encephalitozoonosis. Referring to histopathological examinations one would also expect mononuclear pleocytosis with predominantly monocytes and lymphocytes, most probably accompanied with higher levels of plasma cells.

## **Conclusions**

This study has confirmed, that results of CSF analysis could support a clinical diagnosis of encephalitozoonosis in rabbits. However, it must be taken into account that any viral encephalitis, protozoan encephalitis, immune-mediated encephalitis and some cases of CNS lymphoma might present with a similar mononuclear pleocytosis within CSF and therefore need to be considered as differentials. To definitive proof the diagnostic value of CSF analysis, further studies are warranted investigating CSF parameters in healthy pet rabbits, *E. cuniculi* affected laboratory rabbits, rabbits with neurological symptoms due to other causes and rabbits with other types of diseases. Furthermore, solely on the base of CSF examination, differentiation between peripheral and central vestibular disease and diagnosis of encephalitozoonosis itself is not definitive (Vandeveld and others 1987). Interpretation of CSF analysis always requires simultaneous evaluation of all other clinical data together with additional diagnostic tests. To date, detection of the causative agent itself is the most definitive prove for the disease. In veterinary medicine, trichrome staining of urine for detection of *E. cuniculi* spores has only been diagnostic in a minority of cases. In human medicine, PCR methods for detection of *E. cuniculi* antigen in CSF and urine are used (Weber and Deplazes 1995). A PCR study in rabbits with encephalitozoonosis is currently under investigation by the authors and results will soon be published.



## Acknowledgements

The authors wish to thank all involved colleagues especially Dr. A. Kopp, T. Steinberg and I. Haselbeck for their technical support during CSF collection, and the Department of Experimental Oncology (TU Munich) for enabling CSF taps in healthy rabbits. Further thanks refer to all the technicians who take care of the rabbits and those who helped with CSF analysis. The work was supported by a stipend of the fund for support of up-and-coming young artists and scientists of the LMU Munich and represents one part of the dissertation (Dr. Med. Vet.) of A. Jaß.

## References

- COX, J.C. and GALLICHO, H.A. (1978) Serological and histological studies on adult rabbits with recent, naturally acquired encephalitozoonosis. *Research in Veterinary Science* 24, 260-261
- CURIEL, T.J., PERFECT, J.R. and DURACK, D.T. (1982) Leukocyte subpopulations in cerebrospinal fluid of normal rabbits. *Laboratory Animal Science* 32(6), 622-624
- EWRINGMANN, A. und GÖBEL, T. (1999) Untersuchungen zur Klinik und Therapie der Enzephalitozoonose beim Heimtierkaninchen. *Kleintierpraxis* 44, 357-372
- GENZ, E.J. and CARPENTER, J.W. (1997) Rabbits - Neurologic and Musculoskeletal Disease. In: *Ferrets, Rabbits and Rodents Clinical Medicine and Surgery* (Ed. HILLYER & QUESENBERRY). Philadelphia, W.B. Saunders Company. pp 221-225
- JENKINS, J.F. Update on testing and treatment of rabbits with *E. cuniculi* (2003), In House Rabbit Society. com, San Diego. [www.rabbit.org/chapters/san-diego/health/vet-talk/cuniculi-up.html](http://www.rabbit.org/chapters/san-diego/health/vet-talk/cuniculi-up.html)
- KELLET, B.S. and BYWATER, J.E.C. (1978) A modified india-ink immunoreaction for the detection of encephalitozoonosis. *Laboratory Animals* 12, 59-60
- KUNSTYR, I., NAUMANN, S. and Kaup, F.-J. (1986) Tortikollis bei Kaninchen: Ätiologie, Pathologie, Diagnose und Therapie. *Berliner und Münchner Wochenschrift* 99(1), 14-19

- KUSUMI, R.K. and PLOUFFE, J.F. (1980) Cerebrospinal fluid glucose and protein values in normal rabbits. *Laboratory Animals* 14, 41-42
- LE COUTEUR, R.A. and VERNAU, K.M. (1999) Feline vestibular disorders part I: anatomy and clinical findings. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 1, 71-80
- LUDWIG, H., KOESTER, V., PAULI, G. and ROTT, R. (1977) The Cerebrospinal fluid of rabbits infected with Borna disease virus. *Archives of Virology* 55, 209-223
- MADER, D.R. (1997) Rabbits – basic approach to veterinary care. In: Ferrets, Rabbits and Rodents Clinical Medicine and Surgery (HILLYER E.V. and QUESENBERRY K.E.). eds. E W.B. Saunders Company, Philadelphia, pp 165-166
- NAST, R., MIDDLETON, D.M. and WHEELER, C.L. (1996) Generalized encephalitozoonosis in a Jersey woolly rabbit. *Canadian Veterinary Journal* 37, 303-305
- OLIVER, J.E., LORENZ, M.D. and KORNEGAY, J.N. (1997) In Handbook of Veterinary Neurology, eds. W.B. Saunders Company, Philadelphia, pp. 89-93
- PARKER, A.J. (1972) The diagnostic use of cerebrospinal fluid. *Journal of small Animal Practice* 13, 607-611
- PERRIN, T.L. (1943) Toxoplasma and Encephalitozoon in spontaneous and in experimental infections of animals. *Archives of Pathology* 36, 568-577
- PYE, D., and COX, J. (1975) Isolation of Encephalitozoon cuniculi from urine samples. *Laboratory Animals* 11, 233-234
- ROSSMEISL, J.H. (2002) Effects of blood contamination on canine cerebrospinal fluid white blood cell counts and total protein concentrations. In Proceedings of Annual Congress of Veterinary Internal Medicine.
- PERRIN, T.L. (1943) Spontaneous and experimental Encephalitozoon Infection in laboratory animals. *Archives of Pathology* 36, 559-567
- SHADDUCK, J.A. and PAKES, S.P. (1971) Encephalitozoonosis (Nosematosis) and Toxoplasmosis. *American Journal of Pathology* 64(3), 657-674
- TIPOLD, A. (2002) Cerebrospinal Fluid. In Clinical Neurology in Small Animals – Localization, Diagnosis and Treatment (Braund K.G.), eds. International Veterinary Information Service, Ithaca, New York, USA. [www.IVIS.org](http://www.IVIS.org). Document No. B0235.0102.

- VANDEVELDE, M., RICHARD, A. and FANKHAUSER, R. (1987) Liquoruntersuchungen bei neurologisch kranken Hunden und Katzen. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* 129, 443-456
- WASSON, K. and PEPPER, R.L. (2000) Mammalian Microsporidiosis. *Veterinary Pathology* 37, 113-128
- WEBER, R. und DEPLAZES, P. (1995) Neue parasitäre Erkrankungen beim Menschen: Infektionen durch Mikrosporidien- und Cyclosporaspezies. *Schweizer Medizinische Wochenschrift* 125(18), 909-922
- WEISBROTH, S.H., FLATT, R.E. and KRAUS, A.L. (1974) The biology of the laboratory rabbit. *Academic Press*, New York, chapter 3, 62-65
- WENZEL, U.D. und ALBERT, G. (1996) In *Kaninchenkrankheiten*, Berlin, Deutscher Landwirtschaftsverlag, pp. 75-76

Ariane Jaß, DVM

Dr. Andrea Fischer, PD, Dr. Med. Vet., Dipl. ESVN-ACVIM (Neurology)

Clinic of Veterinary Internal Medicine

Ludwig-Maximilians-University Munich

Veterinaerstraße 13

D-80539 München

+49-89-21802650

+49-89-21806240

[Ariane.Jass@gmx.de](mailto:Ariane.Jass@gmx.de)

[Andrea.fischer@med.vetmed.uni-muenchen.de](mailto:Andrea.fischer@med.vetmed.uni-muenchen.de)

Kaspar Matiasek, Dr. Vet. Med.

Institute of Veterinary Pathology & Neuropathology

Ludwig-Maximilians-University Munich

Veterinaerstraße 13

D-80539 Munich

+49-89-21803313

[matiasek@patho.vetmed.uni-muenchen.de](mailto:matiasek@patho.vetmed.uni-muenchen.de)

Helmut Küchenhoff, PD, Dr. Stat.

Department of Statistics

Ludwig-Maximilians-University Munich

Akademiestraße 1

D-80799 Munich

+49-89-21892789

[helmut@stat.uni-muenchen.de](mailto:helmut@stat.uni-muenchen.de)

Table 1: Results of CSF analysis in healthy laboratory rabbits

<b>Rabbit ID</b>	<b>RBC (cells/<math>\mu</math>l)</b>	<b>WBC (cells/<math>\mu</math>l)</b>	<b>Protein (g/l)</b>
A1	40	0	0,24
A2	46	1	0,22
A3	8	1	0,26
A4	19	1	0,19
A5	142	3	0,25
A6	4	1	0,30
A7	114	4	0,29
A8	7	2	0,15
A9	4	1	0,13
A10	9	3	0,18
A11	16	2	0,21
A12	29	2	0,27
A13	4	1	0,27
A14	86	3	0,19
A15	39	1	0,20
A16	125	2	0,31
A17	14	0	0,21
A18	2	1	0,24
A19	44	2	0,31
A20	4	2	0,24

Table 2: Results of CSF analysis in pet rabbits with the neurological type of Encephalitozoonosis

<b>Rabbit ID</b>	<b>RBC (cells/<math>\mu</math>l)</b>	<b>WBC (cells/<math>\mu</math>l)</b>	<b>Protein (g/l)</b>
B1	2195	15	0,31
B2	72	48	1,54
B3	34	19	0,8
B4	18	79	1,2
B5	183	45	0,8
B6	19	15	0,6
B7	63	16	1,2
B8	97	12	0,31
B9	15	24	0,79
B10	10	13	1,11
B11	35	12	1,03
B12	14	5	0,38
B13	4	87	1,3
B14	12	33	0,66
B15	277	8	1,22
B16	104	3	0,93
B17	45	21	0,72
B18	7	2	0,4
B19	28	1	0,55
B20	587	4	0,53
B21	4	59	0,53

Figure 2a,b: CSF cell differentiation of rabbits with encephalitozoonosis: predominantly mono- and lymphocytes; cytopspin preparation and staining with hemalaun eosin; magnification x100;

Figure 2a

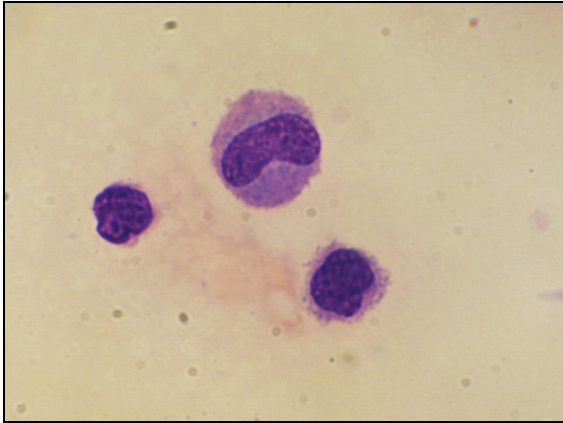


Figure 2b

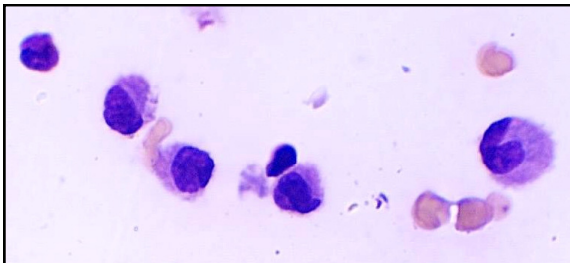


Figure 3: Comparison of CSF WBC count in healthy rabbits and rabbits with encephalitozoonosis

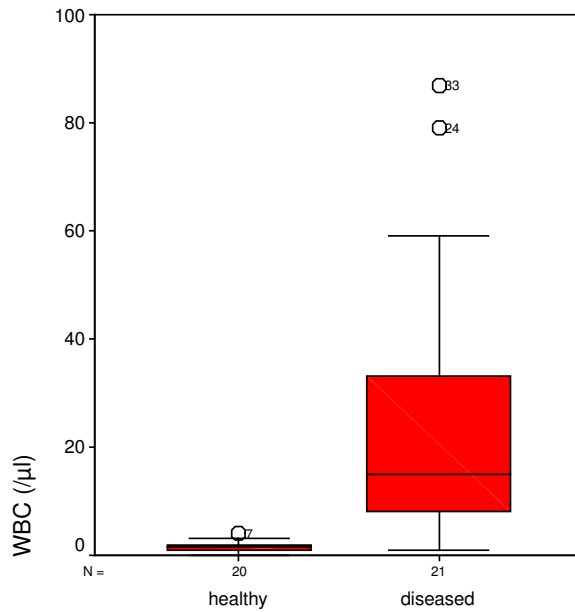
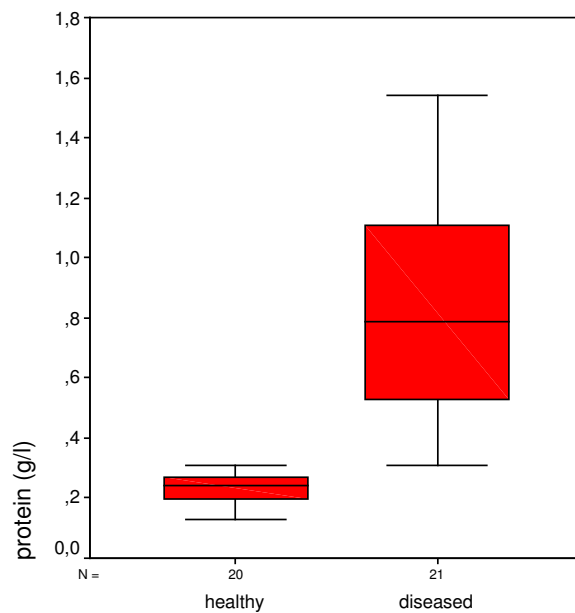


Figure 4: Comparison of total protein contents of CSF in healthy rabbits and rabbits with encephalitozoonosis







## **IV Kapitel 2:**

# **Polymerase chain reaction (PCR) for the clinical diagnosis of encephalitozoonosis in rabbits**

A. Jaß (DVM)<sup>1)</sup>, K. Hartmann (ProfDrMedVet, Dipl. ECVIM-CA)<sup>1)</sup>, K.  
Matiasek (DrMedVet)<sup>2)</sup>, A. Fischer (PD, DrMedVet, Dipl. ESVN-  
ACVIM)<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Clinic of Veterinary Internal Medicine, Ludwig-Maximilians-University Munich;

<sup>2)</sup>Institute of Veterinary Pathology & Neuropathology Ludwig-Maximilians-  
University Munich;

# **Polymerase chain reaction (PCR) for the clinical diagnosis of encephalitozoonosis in rabbits**

A. Jaß (DVM), K. Matiasek (DrMedVet), K. Hartmann (Prof, DrMedVet, Dipl ECVIM-CA), A. Fischer (PD, DrMedVet, Dipl ESVN-ACVIM)

**Keywords: polymerase chain reaction (PCR), encephalitozoonosis, rabbits, urine, cerebrospinal fluid (CSF)**

The aim of this study was the evaluation of PCR for the diagnosis of encephalitozoonosis in rabbits. PCR for detection of *Encephalitozoon cuniculi* DNA was performed from urine and CSF of 44 rabbits with clinic-neurological signs typical of encephalitozoonosis. Only 2 out of 19 CSF samples tested positive by PCR (10.5 %). For urine, PCR results were compared with conventional light microscopic examination after trichrome stain: Fifteen out of 38 urine samples tested positive by PCR (39.5 %), only 4 of 38 urine samples revealed positive results with light microscopic examination after trichrome stain (10.5 %). All urine samples positive by trichrome stain tested also positive by PCR.

## Introduction

Infection with the microsporidian *Encephalitozoon cuniculi* has gained increasing significance worldwide. According to recent studies, rabbits, especially pet rabbits are commonly affected, resulting in CNS disorders (45 %), kidney disease (31 %) or phacoclastic uveitis (14 %), respectively (Ewringmann and Göbel 1999, Meyer-Breckwoldt 1996). In addition, infection with *E. cuniculi* has been described in other mammals including humans (Weiser 1993, Wasson and Peper 2000) as well as in birds and even fishes (Bedriník and Vávra 1972; Poonacha and others 1985; Reetz 1994). Today, encephalitozoonosis is known as an important opportunistic infection in patients with AIDS or any other kind of immunosuppressions (Weber and Deplazes 1995, Wasson and Peper 2000), and the zoonotic potential of *E. cuniculi* has become subject of intense discussion. Transmission of infection from humans to rabbits was proven scientifically (Mathis and others 1997, Müller 1998). Transmission vice versa is very likely. Additionally, rabbits are becoming increasingly popular as pets with increasing emotional value for the owner. A very high percentage of rabbits are presented with neurological deficits, mainly vestibular syndrom and paresis. Main differentials in these patients are meningoencephalitis due to encephalitozoonosis, trauma, peripheral vestibular disease due to otitis media/interna (e. g. with *Pasteurella multocida*) or focal or systemic spread of bacterial infection causing bacterial encephalitis. In larger breeds, infestation with ear mites and pasteurellosis seems to predominate (Kunstyr and Naumann 1986, Deeb and Carpenter 1997).

Definitive diagnosis of encephalitozoonosis in pet rabbits is important for consideration of prognosis, treatment, and zoonotic risk for the owner. Up to now, diagnosis in rabbits has mainly been based on clinical examination combined with antibody testing and ruling out other causes. Solely antibody testing in rabbits, however, is not reliable as many clinically inapparent infections exist and prevalence of antibodies in healthy pet rabbits varies from 42 to 45 % in Germany, about 44 % in San Diego, USA and about 23 % in England (Meyer-Breckwoldt 1996, Ewringmann and Göbel 1999, Jenkins 2003, Harcourt-Brown and Holloway 2003). Therefore confirmation of clinical diagnosis in most cases is achieved by histological examination of the brain showing typical chronic granulomatous meningoencephalitis with or without *E. cuniculi* spores. Recently, results of CSF analysis were described as a further diagnostic method in rabbits with neurological

symptoms due to encephalitozoonosis. Mononuclear pleocytosis with predominant monocytes and lymphocytes was present in the majority of animals affected (Jaß and others 2004, In press).

Methods for detection of the causative agent itself, in this case the infectious spores or *E. cuniculi* DNA, are the methods of choice today. In human medicine, electron microscopy was considered to be the “gold standard” (Asmuth and others 1994, Didier 1998). Up to now, light microscopy using special stains (mainly modified trichrome stain, fluorescent brighteners or indirect immunofluorescent antibody (IFA) staining), is the most commonly used method in clinical diagnostic laboratories for detection of *E. cuniculi* in different body fluids in humans (Didier and others 2000). In research laboratories, however, polymerase chain reactions (PCR) for the detection of different microsporidia including *E. cuniculi* have already been developed several years ago (Katzwinkel-Wladarsch and others 1996, Wasson and Peper 2000, Didier and others 2000).

*E. cuniculi* spores are known to be excreted via urine, as spores have been detected in urine of experimentally infected rabbits (Scharmann and others 1986, Hamilton and Cox 1981). As the most severely affected organs in rabbits with encephalitozoonosis are kidneys and brain, detection of *E. cuniculi* antigen or *E. cuniculi* spores within CSF and urine of infected rabbits seems to be a very straightforward method to confirm this disease (Meyer-Breckwoldt 1996, Ewringmann and Göbel 1999). However, the detection of spores in urine has been reported to be difficult in rabbits using conventional methods, as concentration of spores is supposed to be low (Müller 1998). To our knowledge diagnostic methods for detection of *E. cuniculi* in CSF of rabbits have never been published before.

Therefore, the aim of this study was to investigate PCR as a further clinical diagnostic tool in rabbits with the neurological form of encephalitozoonosis.

## **Materials and Methods**

**Case selection** – This study was a clinical prospective study, in which 44 rabbits suffering from the neurological form of encephalitozoonosis were included. All rabbits were presented to the Teaching Hospital of the Department of Small Animal Internal Medicine (Ludwig Maximilians University of Munich, Germany)

between 2000 and 2003. There were only rabbits included in the study with a neurological examination compatible with brainstem, or spinal cord disease and either (1) a seropositive blood test for antibodies against *E. cuniculi* or (2) confirmation of active *E. cuniculi* infection by necropsy (17/44), and/or (3) detection of spores in urine by use of trichrome stain and microscopy (4/38) and/or (4) abnormal CSF analysis showing mononuclear pleocytosis (15/19), consistent with encephalitozoonosis according to our previous study (Jaß and others 2004, In Press). There were 4 rabbits included in this study despite a negative antibody titer against *E. cuniculi*, but in which diagnosis of encephalitozoonosis was confirmed either with necropsy (3/4) or positive trichrome stain (1/4). In all rabbits other causes of neurological deficits were ruled out by otoscopic examination, radiography of the bulla and/or vertebral column, antibody test for toxoplasmosis, routine haematology, blood chemistry and urine analysis. Therapy of all rabbits patients of this study consisted of oxytetracycline (20 mg/kg, SID), dexamethasone (0.2 mg/kg, SID) and Vitamine B - complex (1 ml in 60 ml NaCl s.c. SID) for ten days.

**Antibody testing** – Detection of serum IgG antibodies against *Encephalitozoon cuniculi* was performed by India-ink immunoreaction (IIR) (38/44) from January 2000 to June 2002, as described by Kellet and Bywater (1978) at the commercial “Tierärztliches Labor Freiburg” (Germany). Results were determined as either positive or negative. Since July 2002 detection of serum IgG antibodies has been performed by indirect immunofluorescence antibody test (IFAT) (6/44), as described by Chalupsky (1971). Titers from 1:80 up were set for positive results.

**Laboratory** – Routine haematological and biochemical tests including creatinkinase (CK) for all rabbits were performed in the diagnostic laboratory of the “Medizinische Kleintierklinik”, LMU Munich.

**Urine samples** – Collection of urine was performed in 38 rabbits by cystocentesis or voiding. Collected amounts of urine were at least 2.5 ml in all rabbits with a mean of 3 ml. 2 ml of each sample were used for trichrome stain following the instructions of Weber and others (1992). All 38 samples were snap frozen and stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  until DNA isolation or Weber`s trichrome staining was performed.

**CSF samples** – CSF tap was performed in 19 rabbits under general anaesthesia using the technique described by Mader (1997) and Jaß and others (2003, In Press). Induction and maintenance of anaesthesia was done with propofol 1 % dose to effect. The rabbits were positioned in lateral recumbency with the head flexed 90° to the spinal cord. Collection of CSF was performed after shaving and disinfection of the suboccipital skin at the cisterna magna with a spinal needle (Fa. Braun, 0,73 x 40mm/22G11/2). A stylet was used to minimize blood contamination. Most taps, of the pet rabbits with encephalitozoonosis in the present study ranged between 400 and 700 µl. From each of the 19 CSF samples, 200 µl were frozen within one hour and stored for PCR at –70 °C until DNA isolation was performed. In all but 4 of these CSF samples CSF analysis was performed including determination of protein content, RBC count, WBC count and WBC differentiation.

**Microscopy** – Before staining, calcium carbonate was removed from every urine sample by acidification with 5 - 8 µl acetic acid 99 % as described by Goodman and Garner (1972). Of each urine sample, 2 ml were centrifuged at 4 °C (refrigeration) with 1400 g force for 5 minutes. Most of the supernatant was removed and sediment mixed with 200 µl distilled water. Another centrifugation was performed again removing most of the supernatants thereafter. Urine sediment then was vortexed; 8 µl of each sample were applied on a slide, air-dried and fixed with ethanol 95 %. For every sample, two stains were prepared. Light microscopy of the 38 urine samples was performed after staining with Weber's trichrome stain as described by Weber and others (1992), with multiplication by factor 400 and 1000 (figure 1). Each sample was examined for at least 10 minutes as recommended (Weber 1996). To achieve impartial results, evaluation of the stained samples was performed without any knowledge of PCR results. Each specimen was evaluated by comparing it to a positive control.

**DNA isolation** – From each sample 200 µl were used for isolation of *E. cuniculi* DNA from urine and CSF using the commercial QIAmp DNA Mini Kit™ (QIAGEN, Germany). Instructions were followed as recommended by the manufacturer and extracted DNA was stored at –20 °C until PCR was performed. For CSF samples, extracted DNA was eluted with 100 µl Buffer AE to increase final DNA concentration. For half of the CSF samples extracted DNA solution was further concentrated by absorption to 5 µl of a silica gel-suspension (Genclean, BIO 101, USA) and resolved in 25 µl of water (Katzwinkel-Wladarsch 1996). For every group of samples tested, one positive control and for most samples two negative controls were used for evaluation of quality of procedure. Positive controls consisted of 10 µl solution of *E. cuniculi* spores, which were cultured in vitro, mixed with 190 µl of NaCl- or phosphate buffered saline (PBS) solution. As negative controls, 9 urine and 3 CSF samples from neurologically healthy laboratory rabbits from an *E. cuniculi* free stock were used, which tested negative for *E. cuniculi* antibodies.

**PCR analysis** – The nested PCR used in this study has been described in humans and tested for different body fluids by Katzwinkel-Wladarsch and others (1996 and 1997) and was evaluated as a reliable test in human samples by Rinder and others (1998); For the first (outer) PCR, 1 µl each of 50 µM solutions of the outer primers MSP-1 (TGA ATG (G,T)GT CCC TGT), MSP-2A (TCA CTC GCC GCT ACT) and MSP-2B (GTT CAT TCG CAC TAC T) were used, and for the second (nested) PCR, equal amounts and concentrations of the inner primers MSP-3 (GGA ATT CAC ACC GCC CGT C(A,G)(C,T)TAT), MSP-4A (CCAAGC TTA TGC TTA AGT (C,T)(A,C)A A(A,G)G GGT), and MSP-4B (CCA AGC TTA TGC TTA AGT CCA GGG AG) were used. PCR reactions were done using the “hot start” technique as described by both authors just mentioned. Fifty cycles were performed with denaturisation at 92 °C for 60 seconds, annealing for 60 seconds at 58 °C (for both PCR reactions), and extension at 72 °C for 90 seconds. PCR products were separated by electrophoresis and visualized on a 1.3 % agarose gel containing 0.2 µg/ml ethidium bromide. A 1 kb DNA-Ladder (Invitrogen™, USA) was used to size DNA fragments (figure 2). For urine samples, two PCR`s were performed, using 2 µl and 38.5 µl material of isolated

DNA, respectively. For CSF samples 38.5 µl of concentrated DNA isolation was used for PCR amplification.

**Species determination** – To verify PCR products as *E. cuniculi*, restriction enzyme *MnII* (Biolabs, New England, USA) was used to generate restriction fragment length polymorphism (RFLP) patterns. After DNA extraction from agarose gel, repeated electrophoresis, and visualizing in 2.6 % agarose gel, *E. cuniculi* was identified by defined bands at 0.21 and 0.09 bp (Katzwinkel-Wladarsch and others 1996). A 100 bp DNA-ladder (Invitrogen<sup>TM</sup>, USA) was used to size RFLP patterns (figure 3).

**Histopathological and immunohistochemical examination** – Postmortal investigations were carried out on 17 of the 44 rabbits including macroscopy and histological inspection of the brain, spinal cord and all other visceral organs. After necropsy and macroscopical inspection, transverse sections from 8 levels of the brain underwent further histotechnical processing. Samples were fixed in 6 % neutral buffered formalin, processed routinely in an automatic tissue processor, and embedded in paraffin. Sections of 5 µm thickness were stained with heamalaun-eosin and Nissl's cresylviolet for routine microscopic examination as well as with special stains such as Giemsa for detection of *E. cuniculi* "pseudocysts". Protozoan infection was considered proven upon detection of spores and cysts. Differentiation between *Toxoplasma gondii* and *E. cuniculi* was based on microscopic differences in size, shape and birefringence. To definitely rule out *Toxoplasma gondii* (co) infections, immunohistochemical investigations addressing the P30 membrane protein were initiated after antigen unmasking by microwave treatment. In short, incubation with mouse monoclonal primary antibodies (Novocastra, UK) was followed by application of biotinylated goat-anti-mouse immunoglobulins (DAKO, Denmark). Retained secondary antibodies, then, were visualized by a commercial ABC kit (Vector, USA).

**Data analysis** – Data were analysed with Microsoft Excel and SPSS11.5® for Microsoft Windows. The results of PCR were given in percentage calculation. Additionally the confidence interval 95 % for PCR was calculated by the Clopper Pearson method for both groups of samples, CSF and urine.



## Results

Detailed results for all 44 rabbits of this study are listed in table 1. The predominant neurological symptom was vestibular disease in 38 and tetra- or paraparesis or paralysis in 6 rabbits. In 22 of the 38 rabbits with vestibular syndrome neurological examination revealed unequivocal central vestibular disease. Central vestibular disease was indicated in these rabbits by either vertical nystagmus, unequivocal postural reaction deficits, additional cranial nerve deficits (other than that of N. facialis or Horner) or reduced mental status. All 6 rabbits with paresis or paralysis had signs of upper motor neuron (UMN) disease, localizing the lesion to a region of the spinal cord.

Laboratory evaluation revealed moderate leukocytosis (17.6 – 35.2  $10^9/l$ ) with lymphocytosis (1440 - 6500  $10^9/l$ ) in 5 rabbits. Seven rabbits had moderate to marked azotaemia (18.4 - 91,7 mmol/l) with low specific gravity of urine, indicating impaired renal function. PCV was decreased in 12 rabbits, 9 of them showing mild (30 - 33 %), 3 rabbits showing moderate decreased (25 – 28 %) PCV. Four of these rabbits had concurrent azotaemia.

Routine CSF analysis was performed in 15 rabbits and revealed mononuclear pleocytosis (5 – 78 cells/ $\mu l$ ; normal < 4 cells/ $\mu l$ ) with predominantly monocytes and lymphocytes being most probably characteristic for encephalitozoonosis (Jaß and others 2004, In Press, table 2). Additionally all CSF samples showed elevated protein contents (0.31 – 1.54 g/l; normal < 0.31 g/l). In 4 rabbits following storage of CSF for PCR, there was not enough material for routine CSF analysis.

In all 17 rabbits that underwent a postmortem examination revealed a moderate to marked interstitial nephritis. Histopathological and immunohistochemical examination of the 17 rabbits presented a moderate to severe meningoencephalitis with granuloma formation. Of these, all but three revealed intracellular microsporidial cysts spotted all over the brain with an emphasis on watershed areas. Apart from a few intralesional organisms, microscopically visible parasites were sparsely associated with the granuloma - induced local inflammation. Morphological appearance was consistent with *E. cuniculi* spores and all of them stained negatively for Toxoplasma antigen which, in turn, gave rise

to the aetiological diagnosis "encephalitozoonosis". For the three remaining animals with granulomatous meningoencephalitis but no cysts, *Toxoplasma* IHC was negative too and therefore infection with *E. cuniculi* was assumed.

PCR of CSF in rabbits with encephalitozoonosis revealed 2 positive results out of 19 CSF samples (10.5%). Four out of 38 urine samples were positive by microscopic examination after trichrome stain (10.5%). Fifteen out of 38 urine samples tested positive by PCR (39.5%) and all 4 samples which tested positive by microscopic examination also tested positive by PCR (10.5%) (table 1). All positive PCR products were clearly verified as *E. cuniculi* species by generated RFLP patterns (figure 3). For PCR of urine the calculated confidence interval 95% is 24 to 57% with a calculated probability for success of 39.5%. The calculated confidence interval 95% for PCR of CSF is 2.3 to 43% with an estimated probability of success of 11%.

## Discussion

To our knowledge, there have not been any studies published so far, using PCR technique for detection of *E. cuniculi* DNA in rabbits with clinical signs of encephalitozoonosis, although this disease is the most common brain disease in rabbits and serologic diagnosis is limited by the high seroprevalence. The PCR used in this study has already been described in humans by Katzwinkel-Wladarsch and others (1996) and was evaluated by the same authors (Katzwinkel-Wladarsch and others 1997) for the detection of *E. cuniculi* DNA in different body fluids of humans, including urine and CSF. Recent sequence analysing of *E. cuniculi* DNA revealed three different *E. cuniculi* strains, each named by the animal in which it was first discovered (Didier and others 1995). So far there exists a rabbit strain (type I), a mice strain (type II) and a dog strain (type III) of which strain I and III are proven to be infectious to men. As the rDNA ITS of all these three *E. cuniculi* strains is 99.9% identical, it was concluded that the primers used for the PCR in this study are reliable also for detection of *E. cuniculi* antigen in rabbits. Earlier summarized, but unpublished results from Katzwinkel-Wladarsch and others revealed that the mentioned PCR can already detect 3 to 100 *E. cuniculi* spores per 0.1 g stool sample (Katzwinkel-Wladarsch and others 1996). Detection limit of PCR differed between individual stool samples,

presumably due to differences in the quantity or type of DNA polymerase inhibitors present in the samples. In a multicenter trial of Rinder and others (1998), detection limits in some laboratories were even lower, reaching 1 spore per 0.01 g stool. Although there are no concentration studies for urine and CSF, even higher sensitivities have to be expected due to the lower concentration of polymerase inhibitors in these fluids. According to Rinder and others (1998), specificity for both PCR and microscopy for detection of microsporidia in human samples is 95 to 100 %, with light microscopy appearing to be the more reliable method for detecting high concentrations of spores, while PCR was far more sensitive for detection of low concentrations of *E. cuniculi* spores or DNA.

Testing CSF samples by PCR of rabbits with encephalitozoonosis in this study revealed only 2 positive results out of 19 CSF samples (10.5 %). Eleven of these 19 rabbits were euthanized or died during the course of the study because of worsening of neurological deficits. Infection with *E. cuniculi* in each of these rabbits was confirmed histopathologically in the brain (10/11) and/or spinal cord (1/11). In addition, all CSF samples of which laboratory CSF analysis had been performed, exhibited significant mononuclear pleocytosis and elevated protein concentrations characteristic of encephalitozoonosis (Jaß and others 2004, In press, table 2). There exist a few case reports in human medicine, which describe the detection of *E. cuniculi* spores in CSF of patients with neurological symptoms due to encephalitozoonosis not only by use of PCR, but even microscopically (Gunnarson and others 1995, Weber and others 1997, Katzwinkel-Wladarsch and others 1997). In the present study, however, calculated percentage of positive results for PCR of CSF was low. This might be explained by the fact, that inflammatory reactions following *E. cuniculi* infection in rabbits are actually immune mediated and typically, *E. cuniculi* spores are not associated with inflammatory granulomas in histopathological brain lesions of rabbits with encephalitozoonosis, but are found in brain regions without any inflammatory reaction (Cox and Gallichio 1978, Wasson and Peper 2000). Our results show that there are no or only very small numbers of *E. cuniculi* spores or - DNA present in CSF, despite its significant inflammatory changes. Detection of *E. cuniculi* in CSF often proved to be difficult also in humans, due to low numbers of spores present (Weber and others 1995). In rabbits it might be even more

difficult, as only very small amounts of CSF (about 400 to 700 µl in pet rabbits) can be collected due to the small body weight (1.0 – 2.4 kg) of these breeds (Tipold 2002; Jaß and others 2004, In press). In order to increase the number of *E. cuniculi* spores possibly present, 2 concentrations steps for isolation of *E. cuniculi* DNA of CSF samples were performed, but this did not improve the sensitivity of the method. As in the present study, 200 - 400 µl of each sample were used for routine CSF analysis, there were only about 200 µl CSF left for DNA isolation in most cases. Therefore, further concentration of CSF could not be performed prior to DNA isolation.

PCR of urine in the present study was found to be better than conventional trichrome stain for detection of *E. cuniculi* spores. By use of PCR even 15 out of 38 urine samples tested positive (39.5 %). Light microscopic examination after trichrome stain for urine revealed positive results only in case of positive results by PCR (10.5 %). As false positive results due to antigen contamination present one of the most common pitfalls inherent to the PCR technique, one positive and one negative control were used for each group of samples and, moreover, different rooms were used for DNA extraction, amplification and isolation. All 12 negative control samples (CSF or urine samples) from 10 laboratory rabbits tested negative. As all these rabbits were antibody negative and were housed in a closed environment, it was assumed that this rabbitry was free of *E. cuniculi* infection. In addition all positive results were verified as *E. cuniculi* by generated RFLP patterns (figure 3). According to Katzwinkel-Wladarsch and others (1997) species determination by RFLP analysis with enzyme *Mnl*-I is as accurate as DNA sequencing for all microsporidian isolates from human samples. Therefore the high percentage of positive PCR results of urine in the present study is considered to be accurate.

Trichrome staining tested positive only in 10.5 % of urine specimen and the results of this method were all identical to those by PCR (100 %). In contrast to these results, light microscopy and PCR for detection of microsporidia including *E. cuniculi* in human samples of different origin, revealed similar average sensitivities of 54 % and 67 % respectively. The authors suspected the difference in sensitivities of the two methods to be due to the individual laboratories and not to the analytic methods themselves (Rinder and others 1998). The main reason

for the higher sensitivity especially for lightmicroscopy in human stool samples when compared with the results of the own study, might be related to the fact, that excretion of spores in stool of infected humans is much higher than excretion of spores in urine of chronically infected rabbits with encephalitozoonosis. Microscopic detection limit of spores after trichrome stain in humans ranges between  $10^4$  and  $10^6$  spores per g stool sample (Rinder and others 1998). In all urine samples of the own study, however, which tested positive by trichrome stain, only 2 to 10 *E. cuniculi* spores per slide could be detected (figure 1). On the other hand, excretion of *E. cuniculi* spores in rabbits can also reach high concentrations with up to  $10^6$  spores/ml urine (Cox and Pye 1975, Hamilton and Cox 1981). However, the rabbits of these 2 studies were experimentally infected and urine was examined early in course of infection (up to day 98 post infection). Naturally infected rabbits instead, which present with clinical neurological signs of encephalitozoonosis are all chronically infected and most probably excrete only very small numbers of spores (Müller 1998, Pye and Cox 1977). Furthermore shedding of spores can occur discontinuously (Wilson 1979). Since histological lesions of the brain can not be detected until 8 weeks after *E. cuniculi* infection (Cox and Galichio 1978, Cox and Hamilton 1979), and the present study included only rabbits with the neurological form of encephalitozoonosis, these rabbits most probably were chronically infected. The results of the present study therefore correlate more with the results from Pye and Cox (1977), who describe detection of *E. cuniculi* spores by use of conventional staining methods only in 25 % of urine samples of serologically positive rabbits. Interestingly in the present study even of the 7 rabbits with clinical signs of decreased renal function, there tested only 2 positive with trichrome stain (1/2) or PCR (1/2).

There were 4 rabbits included in the study with no IgG antibodies against *E. cuniculi*, but in which diagnosis was confirmed by necropsy (3/4) or trichrome stain (1/4) (table 1). One of these rabbits tested also PCR positive. There are several reasons mentioned in literature, which may explain these negative antibody test results in rabbits with encephalitozoonosis, like infection of very young rabbits (< 8 – 10 weeks) from infected dams, early infection (< 3 weeks), false-negative test results and severe immunosuppression (Lyngset 1980, Weber and Deplazes 1995, Müller 1998). As all rabbits mentioned were more than 10

weeks old, histopathological lesions cannot be detected until 8 weeks post infectionem and severely diseased immunosuppression was not apparent according to blood work, false negative test results are considered to be the cause most likely. An acute *E. cuniculi* infection can potentially be diagnosed by determination of IgM titers, which increase within the first 3 weeks of infection (Müller 1998). This, however, is also not very helpful in chronically infected rabbits.

We are very well aware of the limitations of this study. With the guideline, that up to now only necropsy or positive trichrome stain are considered as the “gold standard” for diagnosing encephalitozoonosis in rabbits (Wasson and Peper 2000, Didier and others 2000), diagnosis of encephalitozoonosis in this paper was definitive only in 20 rabbits (table 1). Confirmation of diagnosis by necropsy in all cases was based on histological and immunohistological examination. In the near future, histopathological diagnosis of *E. cuniculi* might be even more improved by immunohistochemical application of a species – specific *E. cuniculi* antibody (CIT) (Mo and Drancourt 2004). As this study was a clinical study, however, there were also rabbits included with negative microscopic examination and without histopathologic examination, because clinical signs improved with treatment. In these animals (24/44), diagnosis was mainly based on exclusion of other diseases and neurological examination demonstrating central vestibular disease or UMN signs. Furthermore, for the CSF group at least 15 of the 19 rabbits included in the study showed mononuclear pleocytosis of CSF. These changes do not definitively prove *E. cuniculi* infection, but were found to be characteristic for this disease in rabbits (A. Jaß and others 2004, In Press, table 2).

## **Conclusions**

The purpose of this study was, to evaluate prospective benefit of PCR in CSF and urine as a further clinical diagnostic tool in rabbits with neurological symptoms typical of encephalitozoonosis. This study showed that (1) PCR of CSF in rabbits, as used in this study, offers no further help in diagnosing the neurological form of encephalitozoonosis; (2) PCR of urine, on the other hand, was found to be better than conventional light microscopy after trichrome stain, due to it's higher sensitivity. Further studies are needed, however, including larger numbers of rabbits to further determine sensitivity and specificity of this PCR in rabbits. Additionally, it must be taken into account that PCR in general is only diagnostic in case of positive results. Furthermore, a zoonotic risk for the owner even in rabbits with the neurological type of encephalitozoonosis is present in a significant number of cases despite the low excretion of spores. In order to confirm these statements, investigations are needed, evaluating long time excretion rate and concentration of spores in naturally infected rabbits in the course of the disease, including those with clinical signs solely due to kidney disease.

## **Acknowledgements**

The authors wish to thank all involved colleagues especially Dr. A. Kopp, T. Steinberg and I. Haslbeck for their technical support during CSF collection. Special thanks refer to Dr. H. Rinder and his colleagues, especially A. Thomschke and M. Wiedemann from the Department of tropical medicine and parasitology (University Munich), who enabled the performing of PCR of CSF and urine and supported me by all occurring problems. Further thanks refer to all the technicians who take care of the rabbits. This work was supported by a stipend of the fund for support of up-and-coming young artists and scientists of the Ludwig Maximilians University of Munich (Germany) and represents one part of the dissertation (DrMedVet) of A. Jaß.

## References

- ASMUTH, D.M. DE GIROLAMI, P.C., FEDERMANN, M., EZRATTY, C.R., PLESKOW, D.K., DESAI, G. and WANKE, C.A. (1994) Clinical features of microsporidiosis in patients with AIDS. *Clinic of Infectious Diseases* 18, 819-825
- BEDRNIK, P. and VAVRA, J. (1972) Further observations on the maintenance of *E. cuniculi* in tissue culture. *Journal of Protozoology* 19, Suppl. 229
- CHALUPSKY, J., BEDRNIK, P. and VAVRA, J. (1971) The indirect fluorescent antibody test for *Nosema cuniculi*. *Journal of Protozoology* 18(Suppl), 47
- COX, J.C. and GALLICHIO, H.A. (1978) Serological and histological studies on adult rabbits with recent, naturally acquired encephalitozoonosis. *Research in Veterinary Science* 24, 260-261
- COX, J.C. and PYE, D. (1975) Serodiagnosis of nosematosis by immunofluorescence using cell-culture-grown organisms. *Laboratory Animals* 9, 297-304
- DEEB, B.J. and CARPENTER, J.W. (1997) Chapter 20 In: Ferrets, Rabbits and Rodents Clinical Medicine and Surgery (HILLYER E.V. & QUESENBERRY K.E.). Eds. W.B. Saunders Company, Philadelphia, pp 203-210
- DIDIER, E.S., VISVESVARA, G., BAKER, M., ROGERS, L., BERTUCCI, D., DE GROOTE, M. and VOSSBRINCK, C. (1995) A microsporidian isolated from an AIDS patient corresponds to *Encephalitozoon cuniculi* III, originally isolated from domestic dogs. *Journal of Clinical Microbiology* 34(11), 2835-2837
- DIDIER, E.S. (1998) Microsporidiosis. *Journal of Clinical Infectious Diseases* 27, 1-8
- DIDIER, E.S., DIDIER, P.J., SNOWDEN, K.F. and SHADDUCK, J.A. (2000) Microsporidiosis in mammals. *Microbes and Infection* 2, 709-720
- EWINGMANN, A. and GÖBEL, T. (1999) Untersuchungen zur Klinik und Therapie der Enzephalitozoonose beim Heimtierkaninchen. *Kleintierpraxis* 44, 357-372
- GOODMAN, D.G. and GARNER, F.M. (1972) A comparison of methods for detecting *Nosema cuniculi* in rabbit urine. *Laboratory Animal Science* 22(4), 568-572



- GUNNARSON, G., HURLBUT, D., DE GIROLAMI, P.C., FEDERMANN, M. and WANKE, C. (1995) Multiorgan microsporidiosis: Report of five cases and review. *Clinic of Infectious Diseases* 21, 37-44
- HAMILTON, R.C. and COX, J.C. (1981) The ultrastructure of *Encephalitozoon cuniculi* growing in renal tubules of rabbits. *Zeitschrift für Parasitenkunde* 64, 271-278
- HARCOURT-BROWN, F.M. and HOLLOWAY, H.K.R. (2003) *Encephalitozoon cuniculi* in pet rabbits. *Veterinary Record* 152(5), 427-431
- JASS, A., FISCHER, A., MATIASEK, K. and KÜCHENHOFF, H. (2004) Results of CSF analysis in healthy rabbits and rabbits with encephalitozoonosis. *Veterinary Record*, In Press
- JENKINS, J.F., DVM (2003) Update on testing and treatment of rabbits with *E. cuniculi*. House Rabbit Society, San Diego Chapter, [www.rabbit.org/chapters/san-diego/health/vet-talk/cuniculi-up.html](http://www.rabbit.org/chapters/san-diego/health/vet-talk/cuniculi-up.html)
- KATZWINKEL-WLADARSCH, S., LIEB, H., HEISE, W., LÖSCHER, T. and RINDER, H. (1996) Direct amplification and species determination of microsporidian DNA from stool specimens. *Tropical Medicine and International Health* 1(3), 373-378
- KATZWINKEL-WLADARSCH, S., DEPLAZES, P., WEBER, R., LÖSCHER, T. and RINDER, H. (1997) Comparison of polymerase chain reaction with light microscopy for detection of microsporidia in clinical specimens. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 16(1), 7-10
- KEEBLE, E. (2001) *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits. *Veterinary Record* 12(1), p. 688
- KELLET, B.S. and BYWATER, J.E.C. (1978) A modified india-ink immunoreaction for the detection of encephalitozoonosis. *Laboratory Animals* 12, 59-60
- KÜCKEN VON, U., LUDWIG, H.-J., LANGE, S., GÜNTHER, H., DIX, B., LANGE, M. und MÜLLER, D. (1987) Eine generalisierte Erkrankung des Kaninchens durch *Encephalitozoon cuniculi*. *Monatshefte für Veterinärmedizin* 42, 781-784
- KUNSTYR, I., NAUMANN, S. and KAUP, F.-J. (1986) Tortikollis bei Kaninchen: Ätiologie, Pathologie, Diagnose und Therapie. *Berliner Münchner Wochenschrift* 99(1), 14-19

- MADER, D.R. (1997) Rabbits - Basic approach to veterinary care. In: Ferrets, Rabbits and Rodents Clinical Medicine and Surgery (HILLYER E.V. and QUESENBERRY K.E.). Eds. W.B. Saunders Company, Philadelphia, pp 165-166
- MATHIS, A., MICHEL, M., KUSTER, H., MÜLLER, C., WEBER, R. and DEPLAZES, P. (1997) Two Encephalitozoon cuniculi strains of human origin are infectious to rabbits. *Parasitology* 114(1), 29-35
- MEYER-BRECKWOLDT, A. (1996) Epidemiologische und klinische Untersuchungen zur Enzephalitozoonose beim Zwergkaninchen. *Inaugural doctor thesis*, Faculty of Veterinary Medicine Hannover. 22-23
- MO, L., DRANCOURT, M. (2004) Monoclonal Antibodies for specific detection of Encephalitozoon cuniculi. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 11, 1060-1063
- MÜLLER, C. (1998) Untersuchungen zur Diagnostik, Biologie und Verbreitung von Mikrosporidien bei Kaninchen und anderen Tierarten. *Inaugural doctor thesis*, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zürich
- POONACHA, K.B., WILLIAM, B.S. and STAMPER, R.D. (1985) Encephalitozoonosis in a parrot. *Journal of American Veterinary Medicine Association* 186, 700-702
- PYE, D. and COX, J.C. (1977) Isolation of Encephalitozoon cuniculi from urine samples. *Laboratory Animals* 11, 233-234
- REETZ, J. (1994) Natural transmission of microsporidia (Encephalitozoon cuniculi) by way of the chicken egg. *Tierärztliche Praxis* 21, 429-435
- RINDER, H., JANITSCHKE, K., ASPÖCK, K., DA SILA, A.J., DEPLAZES, P., FEDORKO, D.P., FRANZEN, C., FUTH, U., HÜNGER, F., LEHMACHER, A., MEYER, C.G., MOLINA, J.-M., SANDFORT, J., WEBER, R. and LÖSCHER, T. (1998) Blinded, externally controlled multicenter evaluation of light microscopy and PCR for detection of microsporidia in stool specimens. The Diagnostic Multicenter Study Group on Microsporidia. *Journal of Clinical Microbiology* 36(6), 1814-1818
- SCHARMANN, W., REBLIN, L. and GRIEM, W. (1986) Untersuchungen über die Infektion von Kaninchen durch Enzephalitozoon cuniculi. *Berliner und Münchner Wochenschrift* 99(1), 20-25

- WASSON, K. and PEPPER, R. (2000) Mammalian microsporidiosis. *Veterinary Pathology* 37, 113-12
- WEBER, R., BRYAN, R.T., OWEN, R.L., WILCOX, C.M., GORELKIN, L. and VISVESVARA, G.S. (1992) Improved light-microscopical detection of microsporidia spores in stool and duodenal aspirates. *New England Journal of Medicine* 326, 161-166
- WEBER, R. and DEPLAZES, P. (1995) Neue parasitäre Erkrankungen beim Menschen: Infektionen durch Mikrosporidien und Cyclospora spezieis. *Schweizer Medizinische Wochenschrift* 125(18), 909-922
- WEBER, R. (1996) Empfehlungen zur Labordiagnostik von Infektionen mit Mikrosporidien. *German Gazette of Public Health*, special edition 39(9), 262-265
- WEBER, R., DEPLAZES, P., FLEPP, M., MATHIS, A., BAUMANN, R. SAUER, B., KUSTER, H. and LÜTHY, R. (1997) Cerebral microsporidiosis due to Encephalitozoon cuniculi in a patient with human immunodeficiency virus infection. *New England Journal of Medicine* 336, 474-478
- WEISER, J. (1993) Early experiences with microsporidia of man and mammals. *FoI Parasitologica* 40, 257-260
- WILSON, J.M. (1979) Encephalitozoon cuniculi in wild European rabbits and a fox. *Research in Veterinary Science* 26, 11

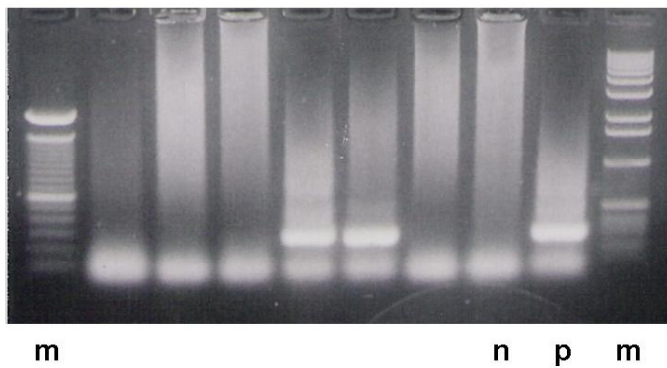
**Figure 2** Ethidium bromide stained gel with PCR products of urine samples.

3 samples with bands at 305 bp as characteristic for *E. cuniculi*

(Katzwinkel.Wladarsch and others 1996), m: DNA size marker ( 1 kb

DNA-

ladder, Invitrogen), p: positive control, n: negative control



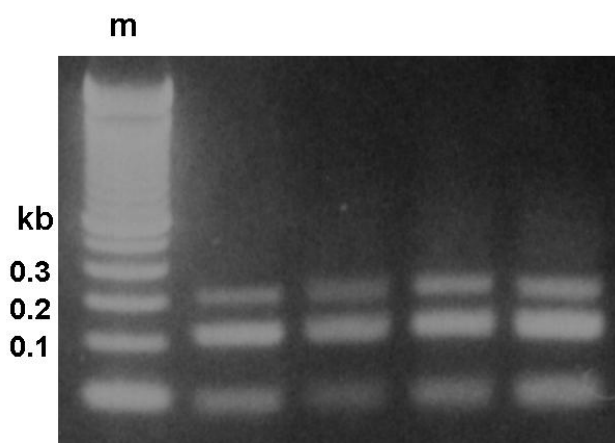
**Figure 3** *Mnl*I restriction endonuclease digest patterns of PCR products identified

*E. cuniculi* by defined bands at 0.21 and 0.09 kb (Katzwinkel-Wladarsch

and others 1996). M = DNA size marker (100 bp DNA-ladder,

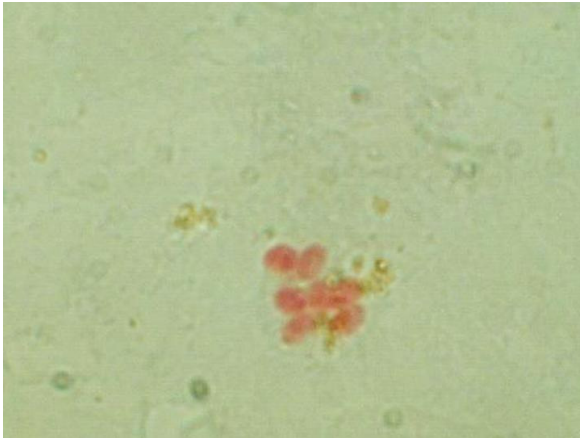
Invitrogen);

kb = kilobase



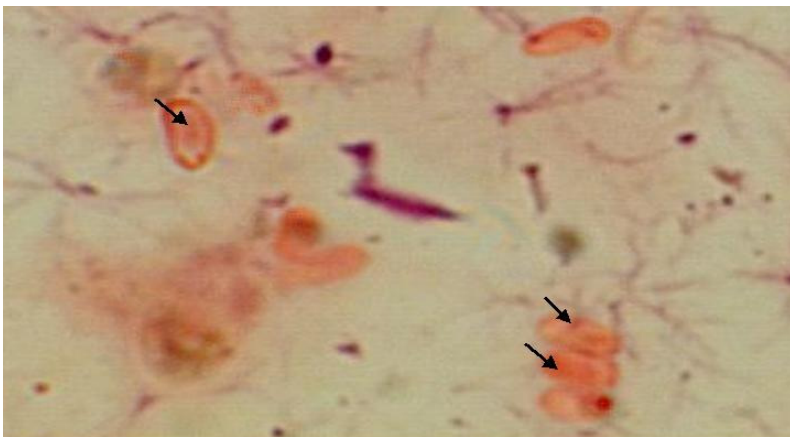
**Figure 1** Trichrome stained urine samples of a rabbit with encephalitozoonosis

(magnification by factor 400)



(magnification by factor 1000)

*E. cuniculi* spores stain reddish-pink (arrows)



**Table 1** Overview of the results of PCR, trichrome stain and further diagnostic tests of all 44 rabbits included in the study.

n= negative, p= positive, nem= not enough material, np= not performed, VD= vestibular disease

Rabbit ID	Antibody test	Neurological deficits	Necropsy	Trichrome stain	Inflammatory CSF	PCR CSF	PCR urine	
A1	IFAT 1:160	central VD	positive	negative	nem	negative	negative	
A2	positive	central VD	positive	negative	Yes	negative	negative	
A3	positive	central VD	positive	negative	Yes	negative	negative	
A4	positive	central VD	positive	negative	Yes	negative	positive	
A5	positive	central VD	alive	negative	Yes	positive	negative	
A6	positive	VD	positive	negative	nem	negative	negative	
A7	IFAT <1:40	central VD	positive	negative	Yes	negative	positive	
A8	positive	central VD	positive	negative	Yes	negative	positive	
A9	positive	central VD	positive	negative	Yes	negative	negative	
A10	positive	VD	alive	negative	Yes	negative	negative	
A11	positive	central VD	alive	negative	Yes	positive	positive	
A12	positive	central VD	alive	negative	Yes	negative	negative	
A13	positive	VD	alive	negative	Yes	negative	negative	
A14	positive	VD	alive	no urine	Yes	negative	no urine	
A15	positive	central VD	positive	no urine	Yes	negative	no urine	
A16	IFAT >1:160	central VD	positive	no urine	nem	negative	no urine	
A17	positive	VD	alive	no urine	Yes	negative	no urine	
A18	negative	paraparesis	none	no urine	nem	negative	no urine	
A19	IFAT >1:160	central VD	alive	no urine	Yes	negative	no urine	
A20	positive	central VD	alive	negative	np	no CSF tap	positive	
A21	positive	VD	alive	negative	np	no CSF tap	positive	
A22	IFAT 1:1280	VD	positive	negative	np	no CSF tap	positive	
A23	positive	VD	positive	negative	np	no CSF tap	negative	
A24	positive	VD	alive	positive	np	no CSF tap	positive	
A25	positive	central VD	positive	positive	np	no CSF tap	positive	
A26	positive	central VD	alive	negative	np	no CSF tap	negative	
A27	positive	tetraplegia	positive	negative	np	no CSF tap	negative	
A28	negative	tetraplegia	positive	negative	np	no CSF tap	negative	
A29	positive	central VD	alive	negative	np	no CSF tap	negative	
A30	positive	central VD	alive	positive	np	no CSF tap	positive	
A31	positive	tetraplegia	alive	negative	np	no CSF tap	positive	
A32	positive	central VD	positive	negative	np	no CSF tap	negative	
A33	positive	central VD	positive	negative	np	no CSF tap	positive	
A34	positive	VD	alive	negative	np	no CSF tap	positive	
A35	negative	VD	alive	positive	np	no CSF tap	positive	
A36	positive	VD	alive	negative	np	no CSF tap	negative	
A37	positive	VD	alive	negative	np	no CSF tap	negative	
A38	positive	central VD	alive	negative	np	no CSF tap	negative	
A39	positive	VD	alive	negative	np	no CSF tap	negative	
A40	positive	VD	alive	negative	np	no CSF tap	negative	
A41	positive	tetraparesis	alive	negative	np	no CSF tap	negative	
A42	IFAT 1:80	paraparesis	alive	negative	np	no CSF tap	negative	
A43	positive	VD	alive	negative	np	no CSF tap	negative	
A44	positive	central VD	alive	negative	np	no CSF tap	positive	

Table 2: Results of laboratory CSF analysis

**nem= not enough material**

<b>Rabbit ID</b>	<b>RBC (cells/<math>\mu</math>l)</b>	<b>WBC (cells/<math>\mu</math>l)</b>	<b>Protein (g/l)</b>
A1	nem	nem	nem
A2	72	48	1.54
A3	2195	15	0.63
A4	97	12	0.31
A5	4	59	0.53
A6	nem	nem	nem
A7	183	45	0.8
A8	63	16	0.12
A9	19	15	0.45
A10	163	8	Pandy+
A11	10	13	1.11
A12	587	4	0.79
A13	15	24	0.79
A14	nem	Nem	nem
A15	35	12	Pandy+
A16	18	79	1.2
A17	nem	Nem	nem
A18	34	19	0.8
A19	14	5	0.38

Ariane Jaß, DVM

Andrea Fischer, Dr. Med. Vet., Dipl. ESVN-ACVIM (Neurology)

“Medizinische Kleintierklinik”

Ludwig-Maximilians-University Munich

Veterinärstraße 13

D-80539 Muenchen

+49-89-21802650

+49-89-21806240

[Ariane.Jass@gmx.de](mailto:Ariane.Jass@gmx.de)

[Andrea.fischer@med.vetmed.uni-muenchen.de](mailto:Andrea.fischer@med.vetmed.uni-muenchen.de)

Kaspar Matiasek, Dr. Med. Vet.

Institute of Veterinary Pathology & Neuropathology

Ludwig-Maximilians-University Munich

Veterinärstraße 13

D-80539 München

+49-89-21803313

[matiasek@patho.vetmed.uni-muenchen.de](mailto:matiasek@patho.vetmed.uni-muenchen.de)

Katrin Hartmann, Prof., Dr. Med. Vet., Dipl. ECVIM-CA

“Medizinische Kleintierklinik”

Ludwig-Maximilians-University Munich

Veterinärstraße 13

D-80539 Muenchen

+49-89-21802653

[Hartmann@uni-muenchen.de](mailto:Hartmann@uni-muenchen.de)



## V Allgemeine Diskussion

### 1. Allgemeine methodische Aspekte

Ziel dieser Arbeit war es, den diagnostischen Wert von Liquoruntersuchung und PCR zur Diagnose der Enzephalitozoonose bei Kaninchen zu evaluieren. Voraussetzung für die Aufnahme der Kaninchen in die Studie waren neurologische Symptome, die auf eine Erkrankung des Gehirns oder Rückenmarks hinwiesen sowie ein positiver Antikörpertiter gegen *E. cuniculi* im Serum. Bei allen Kaninchen der eigenen Untersuchungen konnte von einer chronischen *E. cuniculi*-Infektion ausgegangen werden, da histologische Läsionen im ZNS erst ab der achten Woche post infectionem auftreten (Cox u. Gallichio 1978). Antikörper (IgG) gegen *E. cuniculi* können bei Kaninchen in experimentellen Studien jedoch bereits ab Tag 14 bis 21 (Waller et al. 1978, Scharmann et al. 1986) bzw. Tag zehn post infectionem (Cox et al. 1979) nachgewiesen werden. Daher ist eigentlich davon auszugehen, dass an Enzephalitozoonose erkrankte Kaninchen mit neurologischen Symptomen immer seropositiv sind. In die eigenen Untersuchungen wurden jedoch zusätzlich auch vier Kaninchen mit einem negativen Ergebnis im Tuschetest (drei Tiere) oder IFAT (ein Tier) einbezogen. Die Diagnose Enzephalitozoonose wurde bei diesen Tieren entweder durch die histopathologische Untersuchung des ZNS (3/4) oder den Nachweis von *E. cuniculi*-Sporen in der Trichromfärbung von Urin (1/4) bestätigt. Als Begründung für diese negativen Testergebnisse werden in der Literatur als mögliche Ursachen angegeben: junge Tiere (6 - 8 Wochen alt) von seropositiven Müttern (Cox und Gallichio 1978; Scharmann et al. 1986), stark immunsupprimierte Tiere (Levkut et al. 1997), oder aber falsch negative Testergebnisse. Eine mögliche akute Infektion konnte bei den Tieren der eigenen Studie generell ausgeschlossen werden, da ein Nachweis von Antikörpern (IgG) gegen *E. cuniculi* mindestens zwei Wochen vor den histopathologischen Veränderungen und dem Nachweis von Sporen im Urin möglich ist (Cox u. Gallichio 1978). Alle Tiere der eigenen Studien waren zudem älter als 12 Wochen. Somit kommt auch der Zeitraum der sog. „Immunologischen Lücke“ im Alter von 6 - 8 Wochen als Begründung nicht in Frage (Scharmann et al. 1986). Weiterhin

waren auch im Blutbild keinerlei Hinweise auf eine starke Immunsuppression gegeben, so dass die genannten negativen Antikörpertiter sehr wahrscheinlich falsch negative Testergebnisse darstellten. Da die gewonnenen Mengen an Serum nicht ausreichend waren, um die seronegativen Tiere nochmals nachzutesten, ist hierüber jedoch keine definitive Aussage möglich.

Bei 21 der zusammen insgesamt 46 Tiere aus beiden eigenen Untersuchungen (Kapitel 1 und 2) konnte die Diagnose Enzephalitozoonose mit dem „Goldstandard“, d. h. histopathologisch (18/46) oder durch direkten Erregernachweis im Urin nach Trichromfärbung (4/46) bestätigt werden. Bei den übrigen Tieren ist laut Keeble (2001) das Vorhandensein neurologischer Symptome in Kombination mit einem positiven Antikörpertiter gegen *E. cuniculi* allein nicht als beweisend für eine aktive *E. cuniculi*-Infektion anzusehen. Selbst sehr hohe Antikörpertiter der Klasse G im Serum dienen lediglich dazu, eine Verdachtsdiagnose zu bestärken (Kunstyr et al. 1986). Bei der eigenen Arbeit handelte es sich jedoch um klinisch-orientierte Untersuchungen an Patienten. Nur die gesunde Kontrollgruppe aus Studie 1 setzte sich aus Laborkaninchen zusammen. Daher standen geheilte oder nach klinischer Besserung entlassene Tiere für eine histopathologische Untersuchung nicht zur Verfügung. Bei diesen Kaninchen wurden andere Ursachen für die neurologische Symptomatik durch die klinisch-neurologische Untersuchung, otoskopische Untersuchung, Röntgen von Bulla tympanica oder der Wirbelsäule, einem Test auf Antikörper gegen Toxoplasmose, Blutbild und Blutchemie sowie Urinuntersuchung ausgeschlossen. Zusätzlich wurde bei allen erkrankten Tieren, bei denen eine Liquoranalyse durchgeführt wurde, eine Entzündung im Liquor cerebrospinalis nachgewiesen.

## **2. Neurologische Untersuchung bei Kaninchen mit Enzephalitozoonose**

Kaninchen mit der neurologischen Form der Enzephalitozoonose zeigen laut verschiedener Autoren (Meyer-Breckwoldt 1996; Harcourt-Brown u. Holloway 2003) klinisch meist ein Vestibularsyndrom und in einigen Fällen eine Para-bzw. Tetraparese/-paralyse. Die vestibulären Defizite im Zusammenhang mit der

Enzephalitozoonose, werden dabei dem sog. zentralen Vestibularsyndrom zugeordnet und sind bedingt durch Läsionen der vestibulären Kerne im Hirnstamm und den angrenzenden Bereichen. Bei der Otitis media et interna dagegen, die eine wichtige Differentialdiagnose zur Enzephalitozoonose beim Kaninchen darstellt, treten in der Regel Symptome eines peripheren Vestibularsyndroms auf. Der Symptomenkomplex Parese wird ausgelöst durch Läsionen im Rückenmark (Oliver et al. 1997; Le Couter u. Vernau 1999a, b). Wie bei Hund und Katze kann vermutlich auch beim Kaninchen mit Hilfe der klinisch-neurologische Untersuchung in vielen Fällen eine Lokalisation der neurologischen Läsion erfolgen. Ein weiteres Ziel der eigenen Arbeit lag daher darin, die Durchführung der neurologischen Untersuchung und deren Auswertung beim Kaninchen zu beurteilen. Weiterhin wurde getestet, ob und in welcher Form bei Kaninchen mit Enzephalitozoonose klinisch-neurologisch eine Unterscheidung zwischen peripherem und zentralem Vestibularsyndrom bzw. einer Parese vom Typ oberes oder unteres Motoneuron möglich ist, und inwieweit die neurologische Untersuchung zur klinischen Diagnosestellung der Enzephalitozoonose beitragen kann.

Bei jedem der insgesamt 46 Kaninchen aus beiden Studien, wurde ein vollständiger und einheitlicher neurologischer Untersuchungsgang durchgeführt. Bis auf wenige Einschränkungen konnten die einzelnen Abschnitte des neurologischen Untersuchungsgangs, so wie er für Hund und Katze standardisiert ist (Oliver et al. 1997; Fenner 2000), auch beim Kaninchen zur Bewertung herangezogen werden. Bei der Untersuchung der Haltungs- und Stellreaktionen war die Hüpfreaktion der Hintergliedmaßen nur in einigen Fällen auszulösen. Nach eigenen Beobachtungen kann diese auch bei neurologisch gesunden Kaninchen nur bedingt ausgelöst werden, wahrscheinlich aufgrund der für Kaninchen typischen Angststarre beim Hochheben. Dies ist wahrscheinlich auch die Erklärung dafür, dass laut eigener Beobachtungen die Drohreaktion bei keinem der Kaninchen vorhanden war. Über den Grund dafür, dass die propriozeptive Korrekturreaktion der Hintergliedmaße bei den Kaninchen zum Teil innerhalb eines Untersuchungsgangs nur wechselnd auslösbar war, kann nur spekuliert werden. Möglicherweise liegt die Ursache in der plantigraden Fußung der Hintergliedmaßen bei Kaninchen. Da die Durchführung der Propriozeption der

Hintergliedmaßen innerhalb eines Untersuchungsganges stark variierte, ist davon auszugehen, dass diese Reaktion beim Kaninchen zur Lokalisation einer neurologischen Läsion nur bedingt aussagekräftig ist.

Bei 40 von den insgesamt 46 Kaninchen aus beiden Studien wurde klinisch ein Vestibularsyndrom festgestellt (86,9 %). Sechs Tiere (13,1 %) hatten Anzeichen einer Para- oder Tetraparese. Der Anteil an Kaninchen mit Vestibularsyndrom ist vergleichbar zu den Angaben von Meyer-Breckwoldt (1996) mit ca. 81 % und denen von Harcourt-Brown und Holloway (2003) mit 91 %. Die eigenen Untersuchungen bestätigen somit die allgemeine Meinung, dass das Vestibularsyndrom als Hauptsymptom der Enzephalitozoonose beim Kaninchen anzusehen ist. Die weiterhin in der Literatur beschriebenen Symptome wie Opisthotonus, Krämpfe, Anfälle und Absenzen (Goodpasture 1924; Cox u. Walden 1972; Ewringmann u. Göbel 1999; Von Kücken et al. 1987; Nast et al. 1996, Harcourt-Brown u. Holloway 2003) konnten in den eigenen Untersuchungen nicht beobachtet werden. Zwei der Kaninchen zeigten jedoch neben dem Vestibularsyndrom einen geringgradigen Kopftremor, wie er in der Literatur bereits in mehreren Fällen beschrieben wurde (Goodpasture 1924; Von Kücken et al. 1987; Nast et al. 1996; Wasson u. Peper 2000; Harcourt-Brown u. Holloway 2003). Bei drei Kaninchen konnten zudem Kopfnervenausfälle in Form von Schluckstörungen (N. glossopharyngeus und N. vagus, zwei von drei Tieren) und einer hängenden Oberlippe (N. facialis, eins von drei Tieren). Die Aussage von Wenzel und Albert (1996), dass die an Enzephalitozoonose erkrankten Kaninchen trotz neurologischer Defizite meist ein ungestörtes Sensorium zeigen und versuchen, auch bei starker Kopfschiefhaltung Futter und Wasser aufzunehmen, konnte durch die eigenen Beobachtungen bestätigt werden.

Zweiundzwanzig der 40 Kaninchen mit vestibulärer Symptomatik (55 %) hatten bei der klinisch-neurologischen Untersuchung eindeutige Hinweise auf das Vorliegen eines zentralen Vestibularsyndrom, wie sie in der Literatur für Hund und Katze beschrieben werden (Oliver et al. 1997, Le Couter u. Vernau 1999a). Es ist davon auszugehen, dass diese neuroanatomische Zuordnung der klinisch erhobenen Befunde auch für Kaninchen zutreffend sind. Als hinweisend für ein zentrales Vestibularsyndrom wurden bei den Kaninchen daher ein vertikaler

Nystagmus sowie ein positioneller Richtungswechsel des Nystagmus, verminderte Haltungs- und Stellreaktionen, ein Ausfall zusätzlicher Kopfnerven (ausgenommen des Nervus facialis) sowie eine reduzierte Bewusstseinslage angesehen. Folgende Symptome, die auf ein zentrales Vestibularsyndrom und somit eine Läsion in Hirnstamm oder Vestibulozerebellum hinweisen, wurden beobachtet. Achtundzwanzig der 40 Tiere mit Vestibularssyndrom (70 %) zeigten neben der Kopfschiefhaltung zusätzlich Nystagmus. Dieser Anteil an Tieren mit Nystagmus ist deutlich höher, als laut der Studie von Meyer-Breckwoldt (1996), der zusätzlichen Nystagmus nur bei 45 % der untersuchten Tiere beschreibt. Bei 16 der 28 Tiere mit Nystagmus hatte dieser eine vertikale Ausrichtung, drei Tiere zeigten einen positionellen Richtungswechsel. Vier der 40 Kaninchen mit Vestibularsyndrom hatten einen deutlichen Kopftremor und bei 16 Tieren traten zusätzlich zum Vestibularsyndrom eindeutige Defizite in den Haltungs- und Stellreaktionen auf. Eine vestibuläre Ataxie konnte bei allen 40 Kaninchen festgestellt werden, zwei Tiere zeigten zusätzlich Kopfnervenausfälle und ein Kaninchen zudem Somnolenz. Bei letztgenannten Kaninchen waren keine Hinweise auf eine Schädigung der Nieren oder Leber gegeben. Folglich ist die reduzierte Bewusstseinslage in diesem Fall auch auf die Erkrankung des Gehirns zurückzuführen. Hier kommt neben der Schädigung der vestibulären Kerne eine zusätzliche Läsion des „aufsteigenden retikulär aktivierenden Systems“ (ARAS) im Hirnstammbereich in Frage, oder aber eine multifokale Schädigung unter Einbeziehung der Großhirnrinde (Le Couter u. Vernau 1999a), wie sie auch bei Kaninchen beschrieben wird (Shadduck u. Pakes 1971; Nast et al. 1996; Wasson u. Peper 2000). Die Defizite in Haltungs- und Stellreaktionen bei den einzelnen Kaninchen waren in den eigenen Untersuchungen nicht eindeutig zu beurteilen, da sie v. a. bei Tieren mit starker Kopfschiefhaltung und Rollen auftraten. Die Beurteilung der Haltungs- und Stellreaktion kann auch bei Hund und Katze mit hochgradigem Vestibularsyndrom erschwert sein und muss gegebenenfalls wiederholt werden (Oliver et al. 1997).

Zusammenfassend war in der eigenen Arbeit mit Hilfe der klinisch-neurologischen Untersuchung bei 22 der 40 Tiere mit Vestibularsyndrom (47,8 %) bedingt durch eine Enzephalitozoonose, die Lokalisation der neurologischen Defizite im ZNS möglich. Somit konnte gezeigt werden, dass die neurologische Untersuchung beim Kaninchen zur klinischen Diagnosestellung der Enzephalitozoonose und zur

Abgrenzung einer Otitis media/interna beiträgt. Jedoch kann diese letztgenannte Erkrankung, die vor allem bei großen Kaninchenrassen häufiger vorkommt (Kunstyr u. Naumann 1985) als Ursache für ein zentrales Vestibularsyndrom nicht sicher ausgeschlossen werden, da auch hier in seltenen Fällen eine Ausbreitung der Infektion in den Hirnstammbereich möglich ist (Oliver et al. 1997, Le Couter u. Vernau 1999b). Als eine weitere klinisch-neurologische Diagnostikmethode wäre beim Kaninchen daher neben Röntgen und weiteren bildgebenden Verfahren möglicherweise die Ableitung früher akustisch evozierter Potentiale (FAEP oder BAEP) beider Ohren im Vergleich sinnvoll, um eine Otitis media et interna als Ursache des Vestibularsyndroms auszuschließen. Kniepen und Fehr (2001) haben diese Untersuchung bei Kaninchen verschiedener Rassen unter klinischen Bedingungen bereits getestet. Hierfür wurden für gesunde Kaninchen bei 40, 60 und 80 dB Schalldruckpegel die FAEP gemessen und die jeweiligen Verzögerungen der Latenzzeiten berechnet. Die Ergebnisse wurden mit den FAEPs von den jeweils entzündlich veränderten Ohren der an Otitis media erkrankten Kaninchen verglichen. Der Vergleich der Latenzen ergab in dieser Studie eine signifikante Verlängerung für die Potentiale II, III und IV bei 80 dB SLP für beide Gruppen. Eine Verlängerung dieser späten Potentiale wäre analog zu Hund und Katze eher typisch für ein zentrales Vestibularsyndrom mit Veränderungen im Hirnstamm wie bei der Enzephalitozoonose, als für eine Otitis media bei der man fehlende Latenzen aufgrund der Schalleitungsstörung bereits ab Peak I erwarten würde.

Bei jedem der sechs Kaninchen aus den eigenen Studien, die neurologisch eine Para- bzw. Tetraparese aufwiesen, war durch die neurologische Untersuchung (Haltungs- und Stellreaktionen sowie spinale Reflexe) die Lokalisation einer Parese vom Typ oberes motorisches Neurons (OMN) im Bereich C<sub>1</sub> – C<sub>5</sub> oder T<sub>2</sub> – L<sub>3</sub> möglich. Ein Kaninchen mit Tetraparese zeigte zudem Symptome von Apathie sowie Anzeichen für eine Schädigung des unteren motorischen Neurons (UMN) der Vordergliedmaßen, was auf eine multifokale Erkrankung schließen ließ. Bei diesem Kaninchen konnte die Verdachtsdiagnose Enzephalitozoonose durch eine histologische Untersuchung nach Sektion gesichert werden. Allgemein kann laut der eigenen Arbeit die neurologische Untersuchung auch bei dem Symptomenkomplex „Parese“ durch die Möglichkeit einer Lokalisation der Läsion im Rückenmark zur Diagnosestellung der Enzephalitozoonose beim Kaninchen

beitragen. Einschränkend ist jedoch zu erwähnen, dass hierbei zwar meist Schlüsse auf den Grad der Schädigung und somit auf die Prognose gezogen werden können, ein Trauma jedoch als wichtigste Differentialdiagnose bei Heimtierkaninchen sowie weitere Ursachen wie zum Beispiel Neoplasien und hämatogen streuende Infektionen durch weitere Untersuchungsmethoden sicher ausgeschlossen werden müssen.

Auch ist zu bedenken, dass mit Hilfe der neurologischen Untersuchung generell nur eine Lokalisation der neurologischen Läsion und keine ätiologische Diagnosestellung möglich ist (Oliver et al. 1997). Daher müssen nachfolgend stets weitere diagnostische Tests durchgeführt werden.

### **3. Labordiagnostische Parameter**

Labordiagnostische Befunde sind bei Kaninchen mit Enzephalitozoonose bisher nur in einigen wenigen Studien beschrieben worden. Die Werte der für die Tiere der eigenen Studien ermittelten Blutparameter wurden anhand der von Hein (2001) für Kaninchen ermittelten Referenzbereiche beurteilt. Für die Bewertung der Urinparameter wurde auf die von Quesenberry (1994) angegebenen Werte zurückgegriffen. Bezogen auf alle 46 Kaninchen der eigenen Studien konnte im Blutbild bei sechs Kaninchen (13,0 %) eine deutliche Leukozytose (17,6 - 35,2  $10^9/l$ ) mit Lymphozytose (1440 – 6500  $10^9/l$ ) festgestellt werden, wie sie auch von Ewringmann und Göbel (1999) beschrieben wurde. Die Leukozytenzahlen lagen bei zwei dieser Kaninchen jedoch noch innerhalb dessen, was von Hein (2001) als potentiell stressinduzierte Leukozytose beschrieben wird. Eine Azotämie konnte bei elf Kaninchen diagnostiziert werden (23,9 %), bei zwei Kaninchen mit leicht, bei drei Kaninchen mit deutlich (18,4 - 28,8 mmol/l) und bei sechs mit stark (31,4 - 91,7 mmol/l) erhöhten Werten für Harnstoff (212 - 305 mmol) und für Kreatinin (349 - 853  $\mu\text{mol}$ ). Zwei der Kaninchen mit Leukozytose hatten zugleich eine Azotämie. Die eigenen Untersuchungen können somit die Angaben von Ewringmann und Göbel (1999) bestätigen, die bei allen *E. cuniculi*-infizierten Kaninchen mit Niereninsuffizienz signifikant erhöhte Werte für Harnstoff, Kreatinin und Leukozyten feststellen konnten. Insgesamt vierzehn Kaninchen aus den eigenen Untersuchungen

zeigten einen erniedrigten Hämatokritwert. Dieser lag jedoch nur bei den fünf Kaninchen, die zugleich eine Azotämie hatten, unter 30 % (25 – 28 %). Bei diesen fünf Tieren waren keine Anzeichen einer Regeneration vorhanden und es konnten auch keine weiteren zu Grunde liegenden Ursachen ermittelt werden. Daher ist zu vermuten, dass es sich entweder um eine Anämie im Zusammenhang mit der Nierenschädigung (Ewringmann u. Göbel 1999), bedingt durch Erythropoetinmangel, oder aber um die Anämie der „chronischen Entzündungen“ handelt, wie sie für Hund und Katze beschrieben wird (Cotter 2000). Für die nur geringfügig unter dem Referenzbereich liegenden Hämatokritwerte bei den anderen neun Kaninchen sind wohl eher physiologisch bedingte Abweichungen aufgrund von Alter (<12 Wochen), Rasse und Geschlecht oder aber iatrogene Ursachen (Infusion) ursächlich (Hein 2001). Alle Kaninchen mit Azotämie, aber auch alle anderen Kaninchen bis auf zwei hatten ein niedriges spezifisches Gewicht im Urin. Da jedoch ein Großteil dieser Kaninchen vor Abnahme der Urinproben bereits einmalig subkutan infundiert wurde und selbst für gesunde Kaninchen ein Referenzbereich von 1,003 bis 1,036 angegeben wird (Quesenberry 1994), war dieser Parameter für die Bewertung einer möglichen Nierenschädigung nicht aussagekräftig.

#### **4. Liquorpunktion und Liquoranalyse (Kapitel 1)**

Das Hauptziel der Studie aus Kapitel 1 lag in der Auswertung der Liquoruntersuchung bei Kaninchen mit neurologischen Symptomen bedingt durch Enzephalitozoonose im Vergleich zu gesunden Kaninchen. Weiterhin sollte dabei die praktische Durchführbarkeit der Liquorpunktion beim Kaninchen bewertet werden.

Bei allen Kaninchen konnte die Liquorpunktion, so wie sie von Mader (1997) beschrieben wurde und auch bei der Katze praktiziert wird, gut durchgeführt werden. Einige wenige Kaninchen mit Vestibularsyndrom zeigten bis zu acht Stunden nach der Liquorgewinnung verstärkt neurologische Defizite, höchstwahrscheinlich bedingt durch die Narkose und nicht durch die Liquorpunktion selbst. Die verstärkten neurologischen Defizite waren jedoch



vollständig reversibel und hatten keinerlei Einfluss auf das Allgemeinbefinden der Kaninchen. Ähnliche Beobachtungen werden auch von Le Couter und Vernau (1999b) für Hunde und Katzen mit Vestibularsyndrom nach einer Narkose beschrieben und wurden von diesen Autoren hauptsächlich auf den negativen Einfluss der Narkose auf die zentralen Kompensationsmechanismen zurückgeführt. Die in Kapitel 1 ermittelten Ergebnisse haben somit klar gezeigt, dass auch beim Kaninchen die Liquorpunktion als klinische Diagnostikmethode gut durchführbar ist.

Abhängig von Größe und Gewicht der Heimtierkaninchen mit Enzephalitozoonose (1,0 - 2,4 kg) konnten bei den meisten Kaninchen zwischen 400 und 700  $\mu\text{l}$  an Liquor cerebrospinalis gewonnen werden. Bei den gesunden Kontrollkaninchen mit höherem Körpergewicht (2,4 bis 3,9 kg) betrug die gewonnene Liquormenge 700 – 1000  $\mu\text{l}$ . Während der Liquorpunktion konnte bei keinem der Kaninchen eine erhöhte Tropfgeschwindigkeit als Hinweis auf einen erhöhten intrakraniellen Druck festgestellt werden. Bis auf drei Proben mit Blutkontamination bzw. zu geringer Probenmenge, konnten alle gewonnenen Liquorproben bei der Liquoranalyse ausgewertet werden. Laut Tipold (2002) werden 100 - 200  $\mu\text{l}$  Liquor für Zellzählung und Proteinbestimmung benötigt. Bei deutlicher Pleozytose sind darüber hinaus ca. 200  $\mu\text{l}$  für eine Zelldifferenzierung nötig. Somit haben die eigenen Untersuchungen aus Kapitel 1 eindeutig gezeigt, dass auch bei klinischen Fragestellungen beim Kaninchen eine ausreichend große Menge an Liquor gewonnen werden kann, um wichtige labordiagnostische Parameter zu bestimmen und eventuell weitere Tests durchzuführen. Die Liquoruntersuchung beim Kaninchen ist also nicht nur technisch möglich, sondern auch für klinische Fragestellungen diagnostisch sinnvoll einzusetzen.

Die Zellzählung im Liquor gesunder Kaninchen ergab Leukozytenwerte von 0 bis 4 Zellen/ $\mu\text{l}$  mit einem Median von 1,5 Zellen/ $\mu\text{l}$ . Bei 19 von 20 untersuchten Liquorproben der gesunden Kaninchen lagen die Leukozytenwerte unter 3 Zellen/ $\mu\text{l}$ . Diese Ergebnisse unterscheiden sich von den bereits veröffentlichten Referenzwerten für gesunde Kaninchen mit einer Leukozytenzahl zwischen 0 und 7 Zellen/ $\mu\text{l}$  (Curiel et al. 1982), und sind ähnlich den Werten für gesunde Hunde mit 0 bis 3 Leukozyten/ $\mu\text{l}$  (Tipold 2002) bzw. <5 Leukozyten/ $\mu\text{l}$  (Oliver et al. 1997). Laut Tipold (2002) kann, um eine diagnostisch aussagekräftige Zellzählung im

Liquor trotz Blutkontamination zu gewährleisten, je ein Leukozyt pro 500 Erythrozyten/ $\mu\text{l}$  abgezogen werden, und eine Blutkontamination  $<1.000$  Erythrozyten/ $\mu\text{l}$  ist laut Rossmeisel (2002) zu vernachlässigen. Dennoch wurden einige wenige Liquorproben gesunder Kaninchen mit  $>500$  Erythrozyten/ $\mu\text{l}$  aus den eigenen Untersuchungen in Kapitel 1 ausgeschlossen, um jeglichen Einfluss einer Blutkontamination auf die Erstellung der Referenzwerte für Leukozyten zu vermeiden. Der höchste Erythrozytengahl aus Kapitel 1 lag mit  $170$  Erythrozyten/ $\mu\text{l}$  sogar wesentlich unter dem genannten Grenzwert. Da Rasse und Alter der Kaninchen in den eigenen Untersuchungen ähnlich denen waren, die von Curiel et al. (1982) untersucht wurden und auch bei diesen Autoren eine Blutkontamination ausgeschlossen wurde, liegt der Schluss nahe, dass die Unterschiede in den jeweils ermittelten Leukozytenzahlen statistisch bedingt sind oder aber auf die Verwendung verschiedener Labortechniken bei der Zellzählung zurückgeführt werden können.

Für den Gesamtproteingehalt im Liquor gesunder Kaninchen ergaben sich Werte zwischen  $0,13$  und  $0,31$  g/l mit einem Median von  $0,24$  g/l. Diese eigenen Ergebnisse aus Kapitel 1 sind deutlich niedriger als der von Weißbroth et al. (1974) für den Liquor gesunder Versuchskaninchen angegebene durchschnittliche Proteingehalt von  $0,59$  g/l. Auch der von Kusimi und Pluoffe (1980) ermittelte obere Referenzwert von  $0,66$  g Protein/l liegt deutlich höher als in den eigenen Untersuchungen. Leider gibt es von den genannten Autoren keine genauen Angaben über den jeweils korrelierenden Erythrozytengehalt im Liquor. Daher kann nur spekuliert werden, dass diese abweichenden Resultate durch unterschiedliche Messmethoden, Blutkontamination oder Unterschiede in Anzahl der Liquorproben, Alter oder Rasse der Kaninchen bedingt sind.

Bei der Zytozentrifugation von  $100 - 200$   $\mu\text{l}$  Liquor gesunder Kaninchen konnten in den eigenen Untersuchungen lediglich vereinzelt Erythrozyten, jedoch keine Leukozyten festgestellt werden. Basierend auf den Ergebnissen von Tipold (2002), die für die Zelldifferenzierung von Liquor mit geringer Leukozytenzahl  $1$  ml der jeweiligen Probe empfiehlt, war demzufolge in der eigenen Studie mit dem Einsatz von jeweils  $100 - 200$   $\mu\text{l}$  Liquor keine definitive Aussage möglich. Es wurden daher die bereits von Curiel et al. (1982) bei Laborkaninchen ermittelten

Daten zur Beurteilung der Zellpopulationen der Kaninchen mit Enzephalitozoonose herangezogen. Nach der genannten Studie besteht die Zellpopulation des Liquor cerebrospinalis bei gesunden Kaninchen überwiegend aus Lymphozyten (Median 67 %) und Monozyten (Median 33 %). Die Zellzählung im Liquor der an Enzephalitozoonose erkrankten Heimtierkaninchen (21 Tiere) ergab in den eigenen Untersuchungen eine mittel- bis hochgradige Pleozytose  $\geq 12$  Zellen/ $\mu\text{l}$  bei 15 der 21 untersuchten Proben. Bei einer Probe lag eine geringgradige Pleozytose (5 Leukozyten/ $\mu\text{l}$ ) vor und bei vier Proben lag der Leukozytengehalt innerhalb des eigenen für gesunde Kaninchen ermittelten Referenzbereichs. Ausgehend von der überwiegend stark ausgeprägten Pleozytose war bei den erkrankten Kaninchen somit mit 100  $\mu\text{l}$  Probeneinsatz nach Zytocentrifugation eine Beurteilung der Zellpopulation möglich.

Alle 21 Liquorproben von Kaninchen mit Enzephalitozoonose aus Kapitel 1 wiesen einen erhöhten Proteingehalt auf mit Werten zwischen 0,31 und 1,54 g/l. Bei drei dieser Proben würden die Ergebnisse zwar deutlich über den eigenen ermittelten Werten, aber innerhalb des Referenzbereichs (0,59 g/l) von Weisbroth et al. (1974) liegen. Sie sind daher unter der Voraussetzung, dass die gleichen Messmethoden angewandt wurden, eher als grenzwertig erhöht zu beurteilen. Auch die fünf Liquorproben mit niedriger Leukozytenzahl zeigten erhöhte Proteinwerte. Als Ursachen für einen erhöhten Gesamtproteingehalt bei normaler Zellzahl beim Hund (sog. "albuminozytologische Dissoziation") werden in der Literatur als primäre Differentialdiagnosen Neoplasien, periphere Polyneuropathien, degenerative oder demyelinisierende Krankheiten, Traumata sowie Gefäßerkrankungen angegeben (Vandefelde et al. 1987; Oliver et al. 1997). Bei Kaninchen sind bisher keine vergleichbaren Untersuchungen veröffentlicht worden. Bei drei der fünf Kaninchen mit niedriger Leukozytenzahl im Liquor konnte die Diagnose Enzephalitozoonose durch eine histopathologische Untersuchung nach Sektion bestätigt werden. Die Liquorproben der anderen zwei Kaninchen wiesen einen sehr stark erhöhten Gesamtproteingehalt (0,53 - 0,93 g/l) im Liquor cerebrospinalis auf. Bei diesen Tieren wurde die Diagnose Enzephalitozoonose klinisch-neurologisch und nach Ausschlussdiagnostik gestellt. Der niedrige Leukozytengehalt im Liquor cerebrospinalis bei diesen fünf Kaninchen mit Enzephalitozoonose könnte bedingt gewesen sein durch eine

starke Entzündungsreaktion in Verbindung mit einer Immunsuppression. Da hierfür im Blut keinerlei Hinweise vorlagen, ist jedoch anzunehmen, dass die niedrige Leukozytenzahl in diesem Fall auf eine tief-parenchymale Lokalisation der Entzündung im ZNS mit einer verminderten Beteiligung der Meningen zurückzuführen ist.

Alle in den eigenen Studien ermittelten Laborwerte für die Untersuchung des Liquor cerebrospinalis wurden mit Hilfe gesunder Laborkaninchen der Rassen New Zealand White und Chinchilla Mix erstellt. Dies könnte als Nachteil hinsichtlich eventueller Rasseunterschiede beim Kaninchen gewertet werden. Jedoch ist nicht anzunehmen, dass diese beim Kaninchen auftreten, anlehnend an Rasse-unspezifische Referenzbereiche im Liquor cerebrospinalis bei Hund und Katze (Tipold 2002). Um diese Aussage jedoch abzusichern, müssen in weiteren Studien auch Liquorproben gesunder Heimtierkaninchen verschiedener Rassen untersucht werden.

Der alleinige Nachweis einer Pleozytose im Liquor kann lediglich eine Entzündungsreaktion innerhalb des ZNS oder der Meningen bestätigen. Eine Zelldifferenzierung des Liquors ist somit stets notwendig, um weitere Hinweise auf die zu Grunde liegende Ursache zu erhalten. In Kapitel 1 wurde daher zudem untersucht, ob bei der Enzephalitozoonose beim Kaninchen charakteristische Zellpopulationen im Liquor cerebrospinalis vorhanden sind. Die Zelldifferenzierung der untersuchten Liquorproben dieser Kaninchen ergab in allen Fällen eine mononukleäre Pleozytose, bestehend aus Lympho- und Monozyten. Anlehnend an histopathologische Studien der Enzephalitozoonose beim Kaninchen, in denen perivaskuläre und meningeale lymphoplasmozytäre Infiltrate als charakteristisch angegeben werden, war zu vermuten, dass diese Zellpopulation auch im Liquor cerebrospinalis vorherrschen würde (Cox u. Gallichio 1978; Nast et al. 1996). Da bei allen Kaninchen mit Enzephalitozoonose übereinstimmende Resultate in der Liquoranalyse ermittelt wurden, kann davon ausgegangen werden, dass eine monolymphozytäre Pleozytose charakteristisch für diese Krankheit ist. Es muss jedoch in Betracht gezogen werden, dass auch mögliche Differentialdiagnosen ähnliche Ergebnisse bei der Liquoranalyse erbringen können. Nach einer experimentellen Studie von Ludwig et al. (1977) verursacht zumindest eine Borna-Virus-Infektion bei Kaninchen vergleichbare

Veränderungen des Liquor cerebrospinalis. Über Ergebnisse der Liquoranalyse bei weiteren neurologischen Krankheiten gibt es bei Kaninchen bis heute keine Publikationen. Jedoch wäre auch bei Kaninchen mit Toxoplasmose, wenn man das histologische Erscheinungsbild mit dem der Enzephalitozoonose vergleicht, eine ähnliche Veränderung der Liquorzusammensetzung zu erwarten (Perrin 1943; Shaddock u. Pakes 1971). Weiterhin könnte jede durch Viren, Protozoen oder Autoimmunreaktionen ausgelöste Enzephalitis und in einigen Fällen auch ein zentrales Lymphom oder die Listeriose eine ähnliche mononukleäre Pleozytose bewirken. Somit kann die Liquoranalyse, da sie lediglich hinweisend aber nicht beweisend zur Diagnosestellung beiträgt, auch bei Kaninchen mit neurologischen Symptomen generell nicht als alleinige Diagnostikmethode eingesetzt werden. Die Pathogenese der Enzephalitozoonose ist auch für Hund und Katze bereits genauer beschrieben worden (Plowright 1952; Von Rensburg u. Du Plessis 1971; Buyukmihci et al. 1977; Shaddock et al. 1978; Cole et al. 1982; Botha et al. 1986), aber selbst bei diesen Tierarten gibt es bislang keinerlei Ergebnisse über mögliche Veränderungen der Liquorzusammensetzung. Im Schrifttum liegen nur allgemeine Angaben über die veränderte Liquorzusammensetzung bei Protozoen-Enzephalitiden vor (Tipold 2002). Für die Enzephalitozoonose wäre auch beim Hund, aufgrund der histopathologischen Veränderungen eine mononukleäre Pleozytose des Liquors mit überwiegend Mono- und Lymphozyten zu erwarten (Plowright 1952; Shaddock et al. 1978; Botha et al. 1982 und 1986; Cole et al. 1982). Jedoch ist anzunehmen, dass diese Zellpopulation wohl aufgrund der bei Carnivoren stark ausgeprägten humoralen Immunantwort (Szabo u. Shaddock 1987; Mc Innes u. Stewart 1991; Didier et al. 1999) zusätzlich mit einem hohem Anteil an Plasmazellen vergesellschaftet ist. Hervorzuheben ist, dass in einem humanmedizinischen Fallbericht von Weber et al. (1997) bei einem HIV-Patienten mit Enzephalitozoonose im Liquor eine Pleozytose mit 90 % Neutrophilen und lediglich 10 % mononukleären Zellen beschrieben wurde. Darüber, ob es sich hier um eine Ausnahme handelt, oder ob dieses Zellbild im Liquor für die Enzephalitozoonose beim Menschen charakteristisch ist, kann nur spekuliert werden.

## 5. Polymerasekettenreaktion (PCR) von Liquor- und Urin (Kapitel 2)

Die Enzephalitozoonose stellt die häufigste Erkrankung des ZNS beim Kaninchen dar. In der Humanmedizin wird zur Diagnose der Enzephalitozoonose sowie anderer Mikrosporidieninfektionen neben Elektronenmikroskopie und Spezialfärbungen zum direkten Erregernachweis seit einigen Jahren vermehrt die PCR als neuer „Goldstandard“ eingesetzt (Katzwinkel-Wladarsch et al. 1996; Wasson u. Peper 2000; Didier et al. 2000). Auch in der Tiermedizin wird die PCR in zunehmendem Maße als direkte Diagnostikmethode angewendet. Da eine Antikörperbestimmung aufgrund der hohen Prävalenz beim Kaninchen wenig aussagekräftig ist und konventionelle Färbemethoden zum Nachweis von *E. cuniculi* im Urin durch niedrige Sporenkonzentrationen erschwert sind (Müller 1998), lag das Hauptziel in Kapitel 2 darin, den diagnostischen Wert der PCR beim Kaninchen mit Enzephalitozoonose zu beurteilen. Da bei Kaninchen mit Enzephalitozoonose das Gehirn und die Nieren die primär geschädigten Organe darstellen (Mayer-Breckwoldt 1996; Ewringmann u. Göbel 1999) und die *E. cuniculi*-Sporen mit dem Urin ausgeschieden werden (Scharmann et al. 1986; Hamilton u. Cox 1981; Cox u. Gallichio 1978; Smith u. Florence 1925), erschien es sinnvoll, einen direkten Erregernachweis aus Liquor und Urin durchzuführen.

Das Protokoll der in Kapitel 2 eingesetzten Polymerasekettenreaktion (PCR) zum Nachweis von Mikrosporidienantigenen wurde in dieser Form bereits von Katzwinkel-Wladarsch et al. (1997) für verschiedene humane Körperflüssigkeiten getestet und für gut befunden. Dabei wurden auch Urin- und Liquorproben untersucht. Da es sich bei der Enzephalitozoonose um eine Zoonose handelt und die bei Mensch und Kaninchen vorkommenden *E. cuniculi*-Isolate sich nur bezüglich einer kleinen Genfrequenz der rDNA ITS unterscheiden (Deplazes et al. 1996; Mathis 2000), ist davon auszugehen, dass die Primer dieses PCR-Protokolls auch zum *E. cuniculi*-Nachweis beim Kaninchen geeignet sind. Frühere unveröffentlichte Konzentrationstests der Autoren, die im Rahmen der Entwicklung dieses PCR-Protokolls durchgeführt wurden, ergaben beim Menschen positive Ergebnisse selbst in Anwesenheit von nur 3 - 100 *E. cuniculi*-Sporen pro 0,1 g eingesetzte Stuhlprobe (Katzwinkel-Wladarsch et al. 1996). Die Nachweisgrenze differierte dabei zwischen den unterschiedlichen Stuhlproben,

wahrscheinlich aufgrund der darin in unterschiedlicher Menge und Qualität enthaltenen DNA-Polymerase-Inhibitoren. Bei Rinder et al. (1998) lag die Nachweisgrenze mit 1 Spore pro 0,01 g Stuhlprobe sogar noch wesentlich niedriger und für diese PCR ergab sich zumindest beim Menschen eine Spezifität von 95 – 100 %. Obwohl es bisher keine Konzentrationsstudien für Urin und Liquor cerebrospinalis gibt, kann hier eventuell mit besseren Ergebnissen gerechnet werden, da DNA-Polymerase-Inhibitoren in diesen Körperflüssigkeiten nur in sehr geringer Konzentration vorkommen.

Fünfzehn von insgesamt 38 Urinproben (39,5 %) von Kaninchen mit Enzephalitozoonose testeten in der PCR positiv. Die lichtmikroskopische Untersuchung nach Trichromfärbung dagegen ergab nur bei vier von 38 Urinproben (10,5 %) ein positives Ergebnis. Da bei der PCR das Risiko falsch-positiver Reaktionen durch Antigenkontamination eine Hauptschwierigkeit darstellt, wurde das Zusammenpipettieren der benötigten Reagenzien in einem separaten Raum durchgeführt. Dieser Raum war sowohl getrennt von dem Ort der Auswertung der PCR-Amplifikation, als auch von dem der DNA-Extraktion. Weiterhin wurden stets getrennte Pipettensets mit Filterspitzen für die Durchführung der einzelnen Schritte verwendet und für jede Probengruppe je eine Positiv- und in der Mehrzahl der Fälle zwei Negativkontrollen mitgetestet, um eigene technische Fehler während der Durchführung der PCR zu kontrollieren. Alle 13 Negativkontrollen (Liquor und Urin), die von acht neurologisch gesunden und *E. cuniculi*-Antikörper-negativen Kaninchen stammten, testeten negativ. Da es sich bei diesen Kaninchen um Laborkaninchen handelte, die in einer geschlossenen Umgebung gehalten wurden, ist anzunehmen, dass dieser Bestand wirklich *E. cuniculi*-frei ist. Zudem konnten alle positiven PCR-Produkte durch restriktionsenzymatischen Verdau mit *Mnl*-I als *E. cuniculi* identifiziert werden (Kapitel 2, Bild 3). Laut Katzwinkel-Wladarsch et al. (1997) ist diese Methode der Speziesidentifizierung genauso akkurat wie eine DNA-Sequenzierung. Falsch positive Ergebnisse der PCR infolge einer Antigenkontamination sind daher bei den eigenen Untersuchungen auszuschließen.

Mit dem beschriebenen PCR-Protokoll konnte in den eigenen Untersuchungen nur bei zwei von insgesamt 19 Liquorproben von Kaninchen mit

Enzephalitozoonose *E. cuniculi*-Antigen nachgewiesen werden (10,5 %). Elf dieser 19 Kaninchen wurden im Laufe der Studie aufgrund einer starken Verschlechterung der neurologischen Symptomatik euthanasiert oder sind natürlich verstorben. Bei jedem dieser elf Kaninchen konnte histopathologisch ein für *E. cuniculi* charakteristisches Entzündungsbild in Gehirn oder Rückenmark nachgewiesen werden, sowie bei acht der Tiere sog. Pseudozysten mit Sporen. Da alle histologischen Schnitte in der immunhistochemischen Untersuchung negativ auf Toxoplasmose testeten, konnten die nachgewiesenen Organismen eindeutig als *E. cuniculi* Sporen identifiziert werden. Weiterhin zeigten alle Liquorproben aus Kapitel 2, bei denen in Kapitel 1 auch eine Liquoranalyse durchgeführt wurde (15/19), eine signifikante mononukleäre Pleozytose und einen erhöhten Proteingehalt. Jedes der untersuchten Kaninchen hatte somit deutlich entzündliche Veränderungen in ZNS und Liquor cerebrospinalis, was nach den eigenen Untersuchungen für die Enzephalitozoonose bei Kaninchen als charakteristisch anzusehen ist.

Beim Menschen ist der Nachweis von *E. cuniculi*-Sporen im Liquor cerebrospinalis laut einiger weniger Fallberichte aus der Humanmedizin bei Patienten mit neurologischen Symptomen sogar lichtmikroskopisch möglich (Gunnarson et al. 1995; Weber und Deplazes 1997; Katzwinkel-Wladarsch et al. 1997). Daher kann angenommen werden, dass zumindest beim Menschen *E. cuniculi*-Sporen tatsächlich und z.T. in höheren Konzentrationen im Liquor vorhanden sind. Dennoch waren bei den Kaninchen in Kapitel 2 nur zwei der 19 Liquorproben PCR-positiv. Das könnte zum einen durch die Tatsache erklärt werden, dass die im Zuge der *E. cuniculi*-Infektion entstehende Entzündungsreaktion bei Kaninchen überwiegend immunmediert ist, und weniger durch den Erreger selbst ausgelöst wird. Zudem können die *E. cuniculi*-Sporen selten im Entzündungsgebiet selbst, sondern meist in histologisch unveränderten Gehirnanaren der betroffenen Kaninchen nachgewiesen werden (Cox u. Gallichio 1978; Wasson u. Peper 2000). Daher kann man auch annehmen, dass trotz deutlich ausgeprägter entzündlicher Veränderungen des Liquor cerebrospinalis die Konzentration an *E. cuniculi*-Sporen und -Antigen im Liquor bei Kaninchen extrem niedrig ist. Zudem ist auch in der Humanmedizin in vielen Fällen der Nachweis von *E. cuniculi*-Sporen aufgrund der niedrigen Konzentrationen erschwert (Weber et al. 1995). Bei Kaninchen kann zudem



angenommen werden, dass der Antigennachweis im Liquor durch die geringen Mengen an Probenmaterial erschwert wird, da bei Heimtierkaninchen laut der eigenen Untersuchungen nur ca. 400 - 700 µl an Liquor gewonnen wurden. Zudem wurden von den meisten Proben bereits 200 - 300 µl zur Liquoranalyse in Kapitel 1 benötigt. Somit standen meist nur je 200 µl für die PCR zur Verfügung. Auch war es nicht möglich, weitere Methoden zur Konzentrierung des Liquors als die in Kapitel 2 angeführten im Rahmen der eigenen Untersuchungen zu testen. Es kann nur vermutet werden, dass durch eine weitere Konzentration des Liquors bzw. eine größere Liquormenge eine höhere Sensitivität der PCR erzielt worden wäre.

Die angewendete PCR erwies sich laut Kapitel 2 im Urin als die wesentlich sensitivere Methode im Vergleich zur lichtmikroskopischen Untersuchung nach Trichromfärbung. Mit der Trichromfärbung waren nur 10,5 % der Urinproben positiv, mit der PCR dagegen 39,5 %. Alle positiven Ergebnisse der Trichromfärbung stimmten dabei mit denen der PCR überein (100 %). In der Humanmedizin ergaben sich im Vergleich dazu für die lichtmikroskopische Untersuchung und PCR zum Nachweis von Mikrosporidien eine durchschnittliche Sensitivität von 54 % bzw. 67 % (Rinder et al. 1998). Die Autoren führten dabei die Ursache der Differenz in der Sensitivität beider Methoden mehr auf die unterschiedlichen Labors zurück als auf die Methoden selbst. Die Hauptbegründung für die höhere Sensitivität der mikroskopischen Untersuchung in der Humanmedizin liegt vermutlich in der Tatsache begründet, dass *E. cuniculi*-infizierte Menschen teilweise wesentlich höhere Konzentrationen an Sporen über den Darm oder die Nieren ausscheiden als chronisch infizierte Kaninchen. Die Nachweisgrenze für den lichtmikroskopischen Nachweis beim Menschen wird dabei mit Werten von  $10^4$  bis  $10^6$  Sporen pro g Stuhlprobe angegeben (Rinder et al. 1998). In den eigenen Untersuchungen konnten selbst in den vier Urinproben, die lichtmikroskopisch als positiv bewertet wurden, nur jeweils zwei bis fünf Sporen pro Objektträger gefunden werden. Laut einiger älterer Studien scheiden experimentell mit *E. cuniculi* infizierte Kaninchen ab der 3. - 4. Woche bzw. ab der 6. - 8. Woche bis zum 98. Tag post infectionem Sporen über den Urin aus. Dabei konnten zum Teil auch höhere Konzentrationen mit bis zu  $10^6$  Sporen/ml Urin gemessen werden (Scharmman et al. 1986; Hamilton u. Cox 1981; Cox u.

Gallichio 1978; Smith u. Florence 1925). Die Kaninchen dieser Studien waren jedoch experimentell infiziert und die Untersuchung der Urinproben erfolgte in der frühen Phase der Infektion. Generell sind die Nieren bei der *E. cuniculi*-Infektion bei Kaninchen v.a. in der frühen Phase einer Infektion betroffen. Das ZNS und die daraus resultierenden neurologischen Defizite treten erst zu einem späteren Zeitpunkt der Infektion auf (Cox u. Gallichio 1978; Cox u. Hamilton 1979). Bis heute gibt es keine veröffentlichten Daten über die langfristige Sporenausscheidung chronisch infizierter Tiere. Daher kann nur vermutet werden, dass chronisch infizierte Kaninchen mit neurologischer Symptomatik, wie sie für die eigenen Untersuchungen ausgewählt wurden, nur sehr geringe Mengen an *E. cuniculi*-Sporen über den Urin ausscheiden. Diese Annahme wird auch bestärkt durch eine Studie von Pye und Cox (1977), die bei chronisch infizierten, klinisch gesunden Kaninchen lediglich bei 25 % der Urinproben *E. cuniculi*-Sporen mittels konventioneller Färbeverfahren nachweisen konnten. Weiterhin ist anlehnend an die Studie von Wilson (1979) anzunehmen, dass auch natürlich infizierte Tiere nicht kontinuierlich Sporen ausscheiden. Dies könnte die Erklärung dafür sein, dass in den eigenen Untersuchungen nur in vier von 38 Urinproben (10,5 %) *E. cuniculi* Sporen lichtmikroskopisch festgestellt werden konnten. Mit der PCR dagegen, die bereits kleinste Mengen an *E. cuniculi*-Antigen nachweist, war zumindest bei 15 von 38 Urinproben (39,5 %) ein direkter Erregernachweis möglich.

## 6. Schlussfolgerungen

Die eigenen Untersuchungen haben gezeigt, dass eine Liquorpunktion auch bei Heimtierkaninchen gut durchzuführen ist. Bedingt durch die Narkose kann in wenigen Fällen eine kurzfristige, aber reversible Verschlechterung der neurologischen Symptomatik auftreten. Im Liquor erkrankter Kaninchen liegt eine charakteristische mononukleäre Pleozytose und ein erhöhter Proteingehalt vor. Somit bietet die Liquoranalyse auch bei Kaninchen die Möglichkeit, eine Entzündung im ZNS zu diagnostizieren und trägt zur klinischen Diagnosestellung der Enzephalitozoonose bei. Jedoch können auch bei anderen seltener auftretenden Enzephalitiden potentiell ähnlichen Veränderungen im Liquor auftreten. Diese wurde beim Kaninchen bisher nicht untersucht und sind in weiteren Studien abzuklären. Generell ist zu bedenken, dass eine Liquoranalyse stets zusammen mit allen anderen klinischen Parametern beurteilt werden sollte, da diese nur allgemein das Vorhandensein einer entzündlichen ZNS-Erkrankung bestätigen kann, allein jedoch keine definitive Diagnose ermöglicht.

Die PCR im Liquor hat bei Kaninchen mit der neurologischen Form der Enzephalitozoonose keinen diagnostischen Wert. Für Urin andererseits erwies sich die PCR im Vergleich zur mikroskopischen Untersuchung nach Trichromfärbung als die sensitivere Diagnostikmethode mit positiven Ergebnissen bei 39,5 % der untersuchten Urinproben. Zur Beurteilung der Sensitivität und Spezifität der Methode sind jedoch auch hier weitere Untersuchungen von größeren Tierzahlen und bei Kaninchen mit alleiniger oder zusätzlicher Nierenerkrankung notwendig, da das Konfidenzintervall bei der gegebenen Tierzahl für die PCR mit Werten zwischen 24 und 57 % eine große Breite aufweist.

## VI Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Evaluierung der diagnostischen Liquorpunktion und PCR zur Diagnose der neurologischen Form der Enzephalitozoonose beim Kaninchen.

Im Rahmen der Studie wurden insgesamt 46 Kaninchen mit neurologischen Symptomen untersucht. Die Liquorpunktion wurde bei 21 kranken Kaninchen mit Enzephalitozoonose und 20 gesunden Kontrolltieren durchgeführt. Bei allen Tieren war Liquorpunktion gut durchführbar. Nur wenige Tiere mit vestibulärer Symptomatik zeigten eine kurzfristige Verschlechterung der neurologischen Symptomatik, die sich jedoch innerhalb von acht Stunden wieder normalisierte. Die Liquoruntersuchung der gesunden Kontrollgruppe ergab Leukozytenzahlen von 0 – 4 Zellen/ $\mu$ l (Median 1,5 Zellen/ $\mu$ l). Der Proteingehalt betrug 0,13 - 0,31 g/l (Median 0,24 g/l). Im Gegensatz hierzu zeigten die Kaninchen mit Enzephalitozoonose eine deutlich mono- lymphozytäre Pleozytose mit Leukozytenzahlen zwischen fünf und 78 Zellen/ $\mu$ l (Median 15,3 Zellen/ $\mu$ l) und einem erhöhten Proteingehalt von 0,31 - 1,54 g/l (Median 0,69 g/l). Die Unterschiede für beide Parameter (Leukozytenzahl und Protein) waren für beide Gruppen hochsignifikant ( $p < 0,001$ ). Es konnte somit gezeigt werden, dass eine limpo-monozytäre Pleozytose und ein erhöhter Proteingehalt im Liquor charakteristisch für diese Krankheit sind.

Die PCR zum Nachweis von *E. cuniculi*-DNA wurde nach einem bereits etablierten Protokoll (Katzwinkel-Wladarsch et al. 1996) in Urin- und Liquor durchgeführt. Im Liquor wurden mit der PCR nur bei zwei von 19 Proben (10,5 %) *E. cuniculi*-DNA nachgewiesen, im Urin jedoch bei 15 von 38 Proben (39,5 %). Mit der mikroskopischen Untersuchung nach Trichromfärbung wurden nur bei vier von 38 Urinproben (10,5 %) *E. cuniculi*-Sporen nachgewiesen. Die Ergebnisse der Trichromfärbung stimmten mit den Ergebnissen der PCR überein. Somit hat die PCR im Liquor bei Kaninchen mit der neurologischen Form der Enzephalitozoonose keinen diagnostischen Wert. Für Urin andererseits erwies sich die PCR im Vergleich zur lichtmikroskopischen Untersuchung nach Trichromfärbung als die wesentlich sensitivere Diagnostikmethode. Zur genauen Beurteilung der Sensitivität und Spezifität der PCR-Methode im Urin sind weitere

Untersuchungen mit größeren Tierzahlen und bei Kaninchen mit Nierenproblematik notwendig.

## VII Summary

### **Evaluation of CSF analysis and PCR for the diagnosis of encephalitozoonosis in rabbits**

The purpose of the present study was the evaluation of the clinical utility of CSF analysis and PCR for the diagnosis of the neurological type of encephalitozoonosis in rabbits.

A total of 46 rabbits with neurological symptoms due to encephalitozoonosis were included in the study. CSF was examined in 21 rabbits with encephalitozoonosis and 20 healthy laboratory rabbits. In all rabbits collection of CSF was easy to perform. Few rabbits with vestibular disease showed short-term deterioration of neurological symptoms which were completely reversed after eight hours. CSF analysis of laboratory rabbits revealed WBC counts from 0 to 4 cells/ $\mu$ l (median 1.5 cells/ $\mu$ l). The protein level ranged from 0.13 to 0.31 g/l (median 0.24 g/l). In contrast to this, pet rabbits with the neurological type of encephalitozoonosis showed distinct monocytic-lymphocytic pleocytosis with WBC counts from 5 to 78 cells/ $\mu$ l (median 15.3 cells/ $\mu$ l) and increased protein levels from 0.31 to 1.54 g/l (median 0.69 g/l). Compared to healthy rabbits, distinction for both parameters was highly significant ( $p < 0.001$ ). It was concluded that mononuclear pleocytosis and elevated protein is a regular feature of rabbit encephalitozoonosis.

PCR for detection of *E. cuniculi* DNA as used in this study was based on an established protocol (Katzwinkel-Wladarsch et al. 1996). PCR-testing of CSF revealed positive results only in two of 19 samples (10.5 %), while for urine 15 of 38 samples (39.5 %) tested positive for *E. cuniculi*-DNA. With microscopy after trichrome stain, however, *E. cuniculi* spores were detected only in four out of 38 urine samples (10.5 %). All results of trichrome stain correlated with those of PCR. In conclusion, PCR of CSF is no help for diagnosis of encephalitozoonosis in rabbits. PCR for detection of *E. cuniculi* in urine on the other hand, was found to be far more sensitive than trichrome stain. To determine sensitivity and specificity of this PCR in urine, future studies should include larger numbers of rabbits and those with clinical renal disease.

## VIII Literaturverzeichnis

- Aarons E., Woodrow D., Hollister W., Canning E., Francis N. and Gazzard B.  
Reversible renal failure caused by a microsporidian infection. *AIDS* 1994;  
8(8):1119-1121
- Akerstedt J., Nordstoga K., Mathis A., Smeds E. and Deplazes P. Fox  
Encephalitozoonosis: isolation of the agent from an outbreak in farmed blue  
foxes (*Alopex lagopus*) in Finland and some hitherto unreported pathologic  
lesions. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2002; 49(8):400-405
- Akerstedt J. Humoral immune response in adult blue foxes (*Alopex lagopus*) after  
oral infection with *Encephalitozoon cuniculi* spores. *Vet Parasitol* 2003a;  
113(3-4):203-210
- Akerstedt J. Serological investigations of canine encephalitozoonosis in Norway.  
*Parasitol Res* 2003b; 89(1):49-52
- Aldras A.M., Orenstein J.M., Kotler D.P., Shadduck J.A. and Didier E.S. Detection  
of microsporidia by indirect immunofluorescence antibody test using  
polyclonal and monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* 1994; 32:608-612
- Anver M.R., King N.W. and Hunt R.D. Congenital encephalitozoonosis in a  
squirrel monkey. *Vet Pathol* 1972; 9:475-480
- Arnesen K. and Nordstoga K. Ocular encephalitozoonosis (nosematosis) in  
blue foxes. *Acta Ophthalmol Copenh* 1977; 55(4):641-651
- Ashton N. and Wirasinha P.A. Encephalitozoonosis (nosematosis) of the cornea.  
*Br J Ophthalmol* 1973; 57:669-674
- Ashton N., Cook C. and Glegg F. Encephalitozoonosis (nosematosis) causing  
bilateral cataract in a rabbit. *Brit J Ophthal* 1976; 60:618-631
- Asmuth D.M., De Girolami P.C., Federmann M., Ezratty C.R., Pleskow D.K.,  
Desai G. and Wanke C.A. Clinical features of microsporidiosis in patients  
with AIDS. *Clin Infect Dis* 1994; 18:819-825
- Balent P., Vlasta H., Levkutova M., Levkut M., Horvath M. and Kolodzieyski L.  
The method of radial hemolysis for the detection of antibodies to  
*Encephalitozoon cuniculi* antigens. *Acta Vet (Beograd)* 1997; 47(4):207-210
- Baneux P.J. and Pognan F. In utero transmission of *Encephalitozoon cuniculi*  
strain type I in rabbits. *Lab Anim* 2003; 37(2):132-138

- Barker R.J. Studies on the life cycle and transmission of *Encephalitozoon cuniculi*. Vet Med Diss.1974, London
- Baskin G. *Encephalitozoon cuniculi* infection in a squirrel monkey. In: Nonhuman primates II, Jones T.C., Mohr U. and Hunt R.D., ed. Springer-Verlag, Berlin, Germany 1993; 193-196
- Basson P.A. and Mc Cully R.M. Nosematosis. Report of a canine case in the Republic of South Africa. J S Afr Med Assoc 1966; 37:3-9
- Beauvais B., Sarfati C., Challier S. and Derouin F. In vitro model to assess effect of antimicrobial agents on *Encephalitozoon cuniculi*. Antimicrob Agent Chemother 1994; 38(10):2440-2448
- Beckwith C., Peterson N., Liu J.J. and Shaddock J.A. Dot enzyme-linked immunosorbent assay (Dot ELISA) for antibodies to *Encephalitozoon cuniculi*. Lab Anim Sci 1988; 38(5):573-576
- Bederník P. and Vávra J. Further observations on the maintenance of *Encephalitozoon cuniculi* in tissue culture. J Protozool 1972; 19(Suppl):229
- Berquist R., Morfeldt-Månsson L., Pehrson P.O., Petrini B. and Wasserman J. Antibody against *Encephalitozoon cuniculi* in Swedish homosexual men. Scand J Infect Dis 1984; 16:389-391
- Bismanis J.E. Detection of latent murine nose matosis and growth of *Nosema cuniculi* in cell cultures. Can J Microbiol 1970; 16:237-242
- Bjerkås I. Brain and spinal cord lesions in encephalitozoonosis in mink. Acta Vet Scand 1990; 31(4):423-432
- Bjotvedt G., Berte E.M. and Hendrik G.M. Peritonitis due to *Pasteurella multocida* in a rabbit. Vet Med Small Anim Clin 1979; 74(2):215-216
- Boehm U., Klamp T., Groot M. and Howard J.C. Cellular responses to interferon- $\gamma$ . Annu Rev Immunol 1997; 15:749-795
- Bondy P.J. and Cohn L.A., Physiological effects and pharmacologic considerations of glucocorticoids. Vet Med 2002; 11:836-850
- Boot R., Van Knapen F., Krijt B.C. and Walvoort H.C. Serological evidence for *Encephalitozoon cuniculi* infection (nosematosis) in gnotobiotic guinea pigs. Lab Anim 1988; 22:337-242
- Boot R., Hansen C., Nozari N. and Thuis H. Comparison of assays for antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits. Lab Anim 2000; 34(3):281-289



- Botha W.S., Van Dellen A.F. and Stewart C.G. Canine encephalitozoonosis in South Africa. *J S Afr Vet Med Ass* 1979; 50:135-144
- Botha W.S., Dormehl I.C. and Goosen D.J. Evaluation of kidney function in dogs suffering from canine encephalitozoonosis by standard clinical pathological and radiopharmaceutical techniques. *J S Afr Vet Assoc* 1986; 57(2):79-86
- Branstetter D.G. and Knipe S.M. Microsporidian infection in the lovebird *Agapornis roseicollis*. *Micron* 1982; 13:62-65
- Braunfuchsova P., Salat J. and Kopecky J. Comparison of the significance of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in the protection of mice against *Encephalitozoon cuniculi* infection. *J Parasitol* 2002; 88(4):797-799
- Brown R.J., Hinkle D.K., Trevethan W.P., Kupper J.L. and MC Kee A.E. Nosematosis in a squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). *J med Prim* 1973; 2:114-123
- Brugere J.F., Cormillot E. and Vivares C.P. Physical map of the genome of the microsporidian *Encephalitozoon cuniculi*. *J Eukaryot Microbiol* 2000; 47:11A
- Bryan R. Microsporidiosis as an AIDS-related opportunistic infection. *Clin Infect Dis* 1995; 21(Suppl 1):62-5
- Buyukmihci N., Bellhorn R.W., Hunziger J. and Clinnton J. *Encephalitozoon* (Nosema) infection of the cornea in a cat. *J Am Vet Med* 1977; 171:355-357
- Bywater J. and Kellet B. The eradication of *Encephalitozoon cuniculi* from a specific pathogen-free rabbit colony. *Lab Anim Sci* 1978; 28(4):402-404
- Cali A., Meisler D.M., Lowder C.Y., Lembach R., Ayers L., Takvorian P.M., Rutherford I., Longworth D.L., MC Mahon J. and Bryan R.T. Corneal microsporidiosis: characterization and identification. *J Protozool* 1991; 38(6):215S-217S
- Cali A. Morphogenesis in the genus *Nosema*. *Proc. 4<sup>th</sup> Intern Colloq Insect Pathol.* Maryland, 1971; 431-438
- Canning E.U. An unusually heavy natural infection of *Nosema cuniculi* in a laboratory rat. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1965; 59:371
- Canning E.U. and Lom J., In: *The microsporidiosis of vertebrates.* Orlando F.L. ed. Academic Press, N.Y., 1986
- Canning E.U. and Hollister W.S. In vitro and in vivo investigations of human microsporidia. *J Protozool* 1991; 38(6):631-635

- Chalupský J., Bedrník P. and Vavra J. The indirect fluorescent antibody test for *Nosema cuniculi*. *J Protozool* 1971; 18(Suppl):47
- Chalupský J., Vávra J. and Bedrník P. Detection of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits by the indirect immunofluorescent antibody test. *Folia Parasitol (Praha)* 1973; 20:281-284
- Chalupský J., Vávra J. and Bedrník P. *Encephalitozoonosis* in laboratory animals - a serological survey. *Folia Parasitol (Praha)* 1979; 26:1-8
- Chalupský J., Vávra J., Gaudin J.C., Vandewalle P., Arthur C.P., Guenezan M. and Launay H. Serological evidence of the occurrence of *encephalitozoonosis* and *toxoplasmosis* in the European wild rabbit (*Oryctolagus cuniculi*) in France. *Bull Soc Parasitol* 1990; 8:91-95
- Cislakova L., Literak I., Balent P., Hipikova V., Levkutova M., Travnicek M. and Novotna A. Prevalence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* (Microsporidia) in angora goats – a potential risk of infection for breeders. *Ann-Agric Environ-Med* 2001; 8(1):289-91
- Cohn L.A. Glucocorticosteroids as immunosuppressive agents. *Seminars in veterinary medicine and surgery (small animal)* 1997; 12(3):150-156
- Cole J.R., Sangster L.T., Sulzer C.R., Pursell A.R. and Ellinghausen C.H. Infections with *Encephalitozoon cuniculi* and *Leptospira interrogans*, serovars *grippotyphosa* and *ballum*, in a kennel of foxhounds. *JAVMA* 1982; 180(2):435-437
- Cotter S.M. Non-regenerative anemia. In: *Textbook of Veterinary Internal Medicine*, Ettinger S.J. and Feldmann E.C., 5<sup>th</sup> ed. Volume 2, Section XV, eds. W.B. Saunders Company. 2000; 1806-1807
- Couzinet S., Cejas E., Schittny J., Deplazes P., Weber R. and Zimmerli S. Phagocytic uptake of *Encephalitozoon cuniculi* by nonprofessional phagocytes. *Infect Immun* 2000; 68(12):6939-6945
- Cox J.C. and Walden N.B. Presumptive diagnosis of *Nosema cuniculi* in rabbits by immunofluorescence. *Res vet Sci* 1972; 13:595-597
- Cox J.C. and Pye D. Serodiagnosis of *nosematosis* by immunofluorescence using cell-culture-grown organisms. *Lab Anim* 1975; 9:297-304
- Cox J.C. Altered immune responsiveness associated with *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbits. *Infect Imm* 1977; 15(2):392-395

- Cox J.C. and Gallichio H.A. An evaluation of indirect immunofluorescence in the serological diagnosis of *Nosema cuniculi* infection. *Res Vet Sci* 1977; 22:50-52
- Cox J.C. and Gallichio H.A. Serological and histological studies on adult rabbits with recent, naturally acquired encephalitozoonosis. *Res in Vet Sci* 1978; 24:260-261
- Cox J., Hamilton R. and Attwood H. An investigation of the route and progression of *Encephalitozoon cuniculi* infection in adult rabbits. *J Protozool* 1979; 26(2):260-265
- Cox J.C. and Ross J. A serological survey of *Encephalitozoon cuniculi* infection in the wild rabbit in England and Scotland. *Res Vet Sci* 1980; 28(3):396
- Cox J.C., Horsburgh R. and Pye D. Simple diagnostic test for antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* based on enzyme immunoassay. *Lab Anim* 1981; 25:41-43
- Cox J.C., Hamilton R.C., Pye D. and Edmonds J.W. The infectivity of *Encephalitozoon cuniculi* in vivo and in vitro. *Z Parasitenkd* 1986; 72:65-72
- Curiel T.J., Perfect J.R. and Durack D.T. Leukocyte subpopulations in cerebrospinal fluid of normal rabbits. *Lab Anim Sci* 1982; 32(6):622-624
- Dade A.W., Williams J.F., Whitenack D.L. and Williams C.S.F. An epizootic of cerebral nematodiasis in rabbits due to *Ascaris columnaris*. *Lab Anim Sci* 1975; 25:65-9
- Dao M.L. Detection of disseminated microsporidiosis in manatees (*Trichechus manatus latirostris*). Biology, University of California, Tampa FL USA, 2004
- Davis R.M., Font R.L., Keisler M.S. and Shaddock J.A. Corneal microsporidiosis : A case report including ultrastructural observations. *Ophthalmol* 1990; 97(7):953-957
- De Groote M., Visvesvara G., Wilson M., Pieniazek N., Slemenda S., da Silva A., Leitch G., Bryan R. and Reves R. Polymerase chain reaction and culture confirmation of disseminated *Encephalitozoon cuniculi* in a patient with AIDS: Successful therapy with albendazole. *J Inf Dis* 1995; 171:1375-1378
- Deeb B.J. and Di Giacomo R.F. Cerebral larva migrans caused by *Baylascaris* sp. in pet rabbits. *J Am Vet Med Assoc* 1994; 205:1744-1747

- Deeb B.J. In: Farrets, Rabbits and Rodents: Clinical Medicine and Surgery, Chapter 18, 2<sup>nd</sup> ed. Hillyer E.V. and Quesenberry K.E., eds. W.B. Saunders Company, 1997; 195
- Deeb B.J. and Carpenter J.W. In: Farrets, Rabbits and Rodents: Clinical Medicine and Surgery, Chapter 20, 2<sup>nd</sup> ed., Hillyer E.V. and Quesenberry K.E., eds. W.B. Saunders Company 2004; 203-210
- Del Aguila C., Moura H., Fenoy S., Navajas R., Lopez-Velez R., Li L., Leitch G., da Silva A., Pieniazek N., Lal A. and Visvesvara G. In vitro, ultrastructure, antigenic, and molecular characterisation of *Encephalitozoon cuniculi* isolated from urine and sputum samples from a spanish patient with AIDS. *J Clin Microbiol* 2001; 39(3):1105-1108
- Deplazes P., Mathis A., Baumgartner R., Tanner I. and Weber R. Immunologic and molecular characteristics of encephalitozoon-like microsporidia from humans and rabbits indicate that *Encephalitozoon cuniculi* is a zoonotic parasite. *Clin Infect Dis* 1996; 22(3):557-559
- Deplazes P., Mathis A. and Weber R. Sind Mikrosporidien Zoonoseerreger? (Abstract) XXXII. Tagung der Österreichischen Gesellschaft für Tropenmedizin und Parasitologie, 19.-21. Nov., Wien 1998; 18
- Didier E.S., Varner P.W., Didier P.J., Aldras A.M., Millichamp N.J., Murphey-Corb M., Bohm R. and Shaddock J.A. Experimental microsporidiosis in immunocompetent and immunodeficient mice and monkeys. *Folia Parasitol* 1994; 41:1-11
- Didier E.S. Reactive nitrogen intermediates implicated in the inhibition of *Encephalitozoon cuniculi* (phylum Microspora) replication in murine peritoneal macrophages. *Parasitol Immunol* 1995; 17:405-412
- Didier E.S., Orenstein J.M., Aldras A., Bertucci D., Rogers L.B. and Janney F.A. Comparison of three staining methods for detecting microsporidia in fluids. *J Clin Microbiol* 1995; 33(12):3138-3145
- Didier E., Visvesvara G., Baker M., Rogers L., Bertucci D., De Groote M. and Vossbrinck C. A microsporidian isolated from an AIDS patient corresponds to *Encephalitozoon cuniculi* III, originally isolated from domestic dogs. *J Clin Microbiol* 1996; 34(11):2835-2837
- Didier E.S. Microsporidiosis. *J Clin Inf Dis* 1998; 27:1-8

- Didier E.S. and Bessinger G.T. Host-parasite relationships in microsporidiosis: animal models and immunology, In: The Microsporidia and Microsporidiosis, Wittner M. and Weiss L. eds. Am Soc Microbiol, Washington, DC 1999; 225-257
- Didier E.S., Didier P.J., Snowden K.F. and Shadduck J.A. Microsporidiosis in mammals. *Microb Infect* 2000; 2:709-720
- Ditrich O., Kučerová Z. and Koudelá B. In vitro sensitivity of *Encephalitozoon cuniculi* and *E. hellem* to albendazole. *J Eukaryot Mikrobiol* 1994; 41:37S
- Dubey J.P., Brown C.A., Carpenter J.L. and Moore J.J. Fatal toxoplasmosis in domestic rabbits in the USA. *Vet Parasitol* 1992; 44:305-309
- Edlind T.D., Li J., Visvesvara G.S., Vodkin M.H., McLaughlin G.L. and Katiyar S.K. Phylogenetic analysis of  $\beta$ -tubulin sequences from amitochondrial protozoa. *Mol Phylogen Evol* 1996; 5:359-367
- El-Fakhry Y., Achbarou A., Desportes I. and Mazier D. Resistance to *Encephalitozoon intestinalis* is associated with interferon-gamma and interleukin-2 cytokines in infected mice. *Parasite Immunol* 2001; 23(6):297-303
- El-Razek I. Clinicopathological studies on the renal infections in rabbits. *Vet Med J* 1993; 28:318
- Eroksuz Y., Eriksuz H., Ozer H., Cevik A. and Unver O. A survey of *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbit colonies in Elazig, Turkey: pathomorphologic and serologic (carbonimmunoassay test) studies. *Israel J Vet Med* 1999; 54(3):73-77
- Ewringmann A. und Göbel T. Untersuchung blutchemischer Parameter bei Heimtierkaninchen. *Kleintierpraxis* 1998; 43(6):411-492
- Ewringmann A. und Göbel T. Untersuchungen zur Klinik und Therapie der Enzephalitozoonose beim Heimtierkaninchen. *Kleintierpraxis* 1999; 44:357-372
- Feaga W. P. Wry neck in rabbits. *JAVMA* 1997; 210(4):480
- Fechle L.M. and Sigler R.L. Phacoemulsification for the management of *Encephalitozoon cuniculi*-induced phacoclastic uveitis in a rabbit. *Vet Ophthalmol* 2002; 5(3):211-215

- Fedorko D., Nelson N. and Cartwright C. Identification of microsporidia in stool specimens by using PCR and restriction endonucleases. *J Clin Microbiol* 1995; 33(7):1739-1741
- Fenner W.R. Diseases of the brain, In: *Textbook of Veterinary Internal Medicine*, 5<sup>th</sup> ed., eds. W.B. Saunders Company 2000, 552-572
- Flatt R.E. and Jackson S.J. Renal nosematosis in young rabbits. *Path Vet* 1970; 7:492-497
- Franssen F., Lumeij J. and van Knapen F. Susceptibility of *Encephalitozoon cuniculi* to several drugs in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39:1265-1268
- Franzen C., Schwartz D., Visvesvara G., Muller A., Schwenk A., Salzberger B., Fatkenheuer G., Hartmann P., Mahrle G. and Diehl V. Immunologically confirmed disseminated, asymptomatic *Encephalitozoon cuniculi* infection of the gastrointestinal tract in a patient with AIDS. *Clin Infect Dis* 1995; 21(6):1480-1484
- Franzen C., Müller A., Hartmann P., Schrappe M., Diehl V., Fätkenheuer G. and Salzberger B. Polymerase chain reaction for diagnosis and species differentiation of microsporidia. *Fol Parasitol* 1998; 45:140-148
- Fuentealba I.C., Mahoney N.T., Dhaddock J.A., Harvill J., Wicher V. and Wicher K. Hepatic lesions in rabbits infected with *Encephalitozoon cuniculi* administered per rectum. *Vet Pathol* 1992; 29:536-540
- Furuya K., Fukui D., Yamaguchi M., Nakaoka Y., Bando G. and Kosuge M. Isolation of *Encephalitozoon cuniculi* using primary culture techniques from a rabbit in a colony showing encephalitozoonosis. *J Vet Med Sci* 2001; 63(2):203-206
- Gamboa-Dominguez A., De Anda J., Donis J., Riuz-Maza F., Visvesvara G.S. and Diliz H. Disseminated *encephalitozoon cuniculi* infection in a Mexican kidney transplant recipient. *Transplantation* 2003; 75(11):1898-900
- Gannon J. The Immunoperoxidase test diagnosis of *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits. *Lab Anim* 1978; 12:125-127
- Gannon J. A survey of *Encephalitozoon cuniculi* in laboratory animal colonies in the United Kingdom. *Lab Anim* 1980; 14:91-94
- Garvey M., Ambrose P. and Ulmer J. Keratoconjunktivitis in AIDS. *Ann Pharmacother* 1995; 29(9):872-874

- Geck P. India-ink immunoreaction for the rapid detection of enteric pathogens. *Acta Microbiol* 1971; 18:191-196
- Gentz E.J. and Carpenter J.W. In: *Ferrets Rabbits and Rodents: Clinical Medicine and Surgery*. Chapter 21, 2<sup>nd</sup> ed., Hillyer E.V. and Quesenberry K.E., eds. W.B. Saunders Company 1997; 220-226
- Gevrey J, Encephalitozoonosis in domestic dogs and cats. *Rec Med Vet* 1993; 169:477-481
- Goodman D.G. and Garner F.M. A comparison of methods for detecting *nosema cuniculi* in rabbit urine. *Lab Anim Sci* 1972; 22(4):568-572
- Goodpasture E.W. Spontaneous encephalitis in rabbits. *J Inf Dis* 1924; 34:428-32
- Green L.C. Le Blanc P.J. and Didier E.S. Discrimination between viable and dead *Encephalitozoon cuniculi* (Microsporidian) spores by dual staining with Sytox Green and Calcofluor White M2R. *J Clin Microbiol* 2000; 38(10):3811-3814
- Greenstein G., Drozdowicz C.K., Garcia F.G. and Lewis L.L. The incidence of *Encephalitozoon cuniculi* in a commercial barrier-maintained rabbit breeding colony. *Lab Anim* 1991; 25:287-290
- Grundmann E. *Einführung in die allgemeine Pathologie*. 9. Auflage, Gustav Fischer Verlag 1994
- Gumbo T., Hobbs R.E., Carlyn C., Hall G. and Isada C.M. Microsporidia infection in transplant patients. *Transplantation* 1999; 67:482-484
- Gunnarson G., Hurlbut D., De Girolami P.C., Federmann M. and Wanke C. Multiorgan microsporidiosis: report of five cases and review. *Clin Inf Dis* 1995; 21:37-44
- Guntinas-Lichius O. Cerebral microsporidiosis due to *Encephalitozoon cuniculi*. *New Engl J Med* 1997; 337(9):640-641
- Guscetti F., Mathis A., Hatt J.M. and Deplazes P. Overt fatal and chronic subclinical *Encephalitozoon cuniculi* microsporidiosis in a colony of captive emperor tamarins (*Sanguinus oemator*). *J Med Primatol* 2003; 32(2):111-119
- Halanova M., Letkova V., Macak V., Stefkovic M. and Halan M. The first finding of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in cows in Slovakia. *Vet Parasitol* 1999; 82(2):167-171

- Hamilton R.C. and Cox J.C. The ultrastructure of *Encephalitozoon cuniculi* growing in renal tubules of rabbits. *Z Parasitenkd* 1981; 64:271-278
- Harcourt-Brown F.M. and Holloway H.K.R. *Encephalitozoon cuniculi* in pet rabbits. *Vet Rec* 2003; 152(5):427-431
- Hein J. Labordiagnostische Referenzbereiche bei Kaninchen und Meerschweinchen. *Diss med vet, München* 2001; 7,14,107-109
- Hersteinsson P., Gunnarson E., Hjartardottir S. and Skirnisson K. Prevalence of *Encephalitozoon cuniculi* antibodies in terrestrial mammals in Iceland, 1986 to 1989. *J Wildlife Dis* 1993; 29:341-44
- Hollister W.S., Canning E.U. and Viney M. Prevalence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in stray dogs as determined by an ELISA. *Vet Record* 1989; 124:332-336
- Hollister W.S., Canning E.U. and Willcox A. Evidence for widespread occurrence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* (*Microspora*) in man provided by ELISA and other serological tests. *Parasitol* 1991; 102:33-43
- Horvath M., Leng L., Stefkovic M., Revajova V. and Halanova M. Lethal encephalitozoonosis in cyclophosphamide-treated rabbits. *Acta Vet Hing* 1999; 47(1): 85-93
- Huldt G. and Waller T. Accidental nosematosis in mice with impaired immunological competence. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1974; 82B:451-452
- Hunt R.D. and King N.W. Encephalitozoonosis: evidence for vertical transmission. *J Inf Dis* 1972; 126(2):212-214
- Illanes O.G., Tiffani-Castiglioni E., Edwards J.F. and Shaddock J.A. Spontaneous encephalitozoonosis in an experimental group of guinea pigs. *J Vet Diagn Invest* 1993; 5(4):649-651
- Innes J.R.M., Zeman W., Frenkel J.K. and Borner G. Occult endemic encephalitozoonosis of the central nervous system of mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 1962; 21:519-533
- Jenkins J.F. In: Update on Testing and Treatment of Rabbits with *E. Cuniculi*. eds. House Rabbit Society. com, San Diego Chapter 2003; [www.rabbit.org/chapters/san-diego/health/vet-talk/cuniculi-up.html](http://www.rabbit.org/chapters/san-diego/health/vet-talk/cuniculi-up.html)
- Joste N.E., Rich J.D., Busam K.J. and Schwartz D.A. Autopsy verification of *Encephalitozoon intestinalis* (microsporidiosis) eradication following albendazole therapy. *Arch Pathol Lab Med* 1996; 120(2):199-201



- Jungherr E. Encephalitozoon encephalomyelitis in a rabbit. J Am Vet Med Assoc 1955; 127:518
- Katiyar S.K., Gordon V.R., McLaughlin G.L. and Edlind T.D. Antiprotozoal activities of benzimidazoles and correlations with  $\beta$ -tubulin sequence. Antimicrob Agents Chemother 1994; 38(9):2086-2090
- Katzwinkel-Wladarsch S., Lieb M., Heise W., Löscher T. and Rinder H. Direct amplification and species determination of microsporidian DNA from stool specimen. Trop Med Intern Health 1996; 1(3):373-378
- Katzwinkel-Wladarsch S., Deplazes P., Weber R., Löscher T. and Rinder H. Comparison of polymerase chain reaction with light microscopy for detection of microsporidia in clinical specimens. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1997; 16(1):7-10
- Keeble E. Encephalitozoon cuniculi in rabbits. Vet Rec 2001; 12(1):688
- Kellet B.S. and Bywater J.E.C. A modified india-ink immunoreaction for the detection of encephalitozoonosis. Lab Anim 1978; 12:59-60
- Kemp R.L. and Kluge J.P. Encephalitozoon sp. in the blue-masked lovebird *Agapornis personata* (Reichenow): First confirmed report of microsporidian infection in birds. J Protozool 1975; 22:489-491
- Khan I., Schwartzmann J., Kasper L. and Moretto M. CD8+CTLs are essential for protective immunity against Encephalitozoon cuniculi infection. J Immunol 1999; 162(10):6086-6091
- Khan I., Moretto M. and Weiss L. Immune response to Encephalitozoon cuniculi infection. Microbes Infect 2001; 3(5):401-405
- Khanna R.S. and Iyer P.K.R. A case of *Nosema cuniculi* infection in a goat. Indian J Med Res 1971; 59:993
- Kimman T.G. and Akermans J.P. Encephalitozoon cuniculi in a rabbit-breeding colony. Tijdschr Diergeneeskd 1987; 112(24):1405-1409
- Kniepen A. und Fehr M. Frühe akustisch evozierte Potentiale (FAEP) in der klinischen Diagnostik der Otitis media beim Kaninchen. Dtsch tierärztl Wschr 2001; 108(2):43-48
- Kotler D.P. and Orenstein J.M. Clinical syndromes associated with microsporidiosis. Adv Parasitol 1998; 40:321-47

- Kotler D.P. and Orenstein J.M. Clinical syndromes associated with microsporidiosis. In: *The Microsporidia and Microsporidiosis*, Wittner M. and Weiss L.M., ed. Washington DC, ASM Press 1999; 285-292
- Kötsche W. und Gottschalk C. Krankheiten der Kaninchen und Hasen. Hrsg. Gustav Fischer Verlag, Jena 1990; 240-242
- Koudela B., Vitovec J., Kučerová Z., Ditrich O. and Trávniček J. The severe combined immunodeficient mouse as a model for *Encephalitozoon cuniculi* microsporidiosis. *Fol Parasitol* 1993; 40:297-286
- Koudela B. In vivo efficiency of albendazole against *Encephalitozoon cuniculi* in SCID mice. *Euk Microbiol* 1994; 41(5):49-50S
- Koudela B., Kucerova S. and Hudcovic T. *Encephalitozoon cuniculi* spores suspended in water. *Fol Parasitol ( Praha )* 1999; 46(3):171-174
- Kpodékon M. Étude expérimentale de la pathogénie des méningites et encéphalites lors de la Pasteurellose du lapin. *Ann Rech Vét* 1983a; 14(3):217-224
- Kpodékon M. Pathologie et pathogénie des complications auriculaires et encéphaliques de la Pasteurellose du lapin d`elevage. *Ann Rech Vét* 1983b; 14(3):225-232
- Kunstýf I., Jíra J., Princová D. and Míka J. Survey of toxoplasma antibodies in domestic rabbits. *Folia Parasitol (Praha)* 1970; 17:277-280
- Kunstyr I., Lev L. und Naumann S. Experimentelle und spontane Infektion mit *Encephalitozoon cuniculi* beim Kaninchen. *Dtsch Tierärztl Woschr* 1983, 90(11):492
- Kunstyr I. and Naumann S. Head tilt in rabbits caused by pasteurellosis and encephalitozoonosis. *Lab Anim* 1985; 19:208-213
- Kunstyr I., Naumann S. und Kaup F.-J. Tortikollis bei Kaninchen: Ätiologie, Pathologie, Diagnose und Therapie. *Berl Münch WSchr* 1986; 99(1):14-19
- Kusumi R.K. and Plouffe J.F. Cerebrospinal fluid glucose and protein values in normal rabbits. *Lab Anim* 1980; 14:41-42
- Lainson R.L., Garnham P.C.C., Killick-Kendrick R. and Bird R.G. Nosematosis, a microsporidial infection of rodents and other animals, including man. *Brit Med J* 1964; 2:470-472

- Lallo M.A., Santos M.J., Bondan E.F. Experimental Encephalitozoon cuniculi infection in dexamethasone-immunosuppressed mice. *Rev Saude Publica* 2002; 36(5):621-626
- Le Couter R.A. and Vernau K.M. Feline vestibular disorders. Part I: anatomy and clinical signs. *J Fel Med Surg* 1999a; 1:71-80
- Le Couter R.A. and Vernau K.M. Feline vestibular disorders. Part II: diagnostic approach and differential diagnosis. *J Fel Med Surg* 1999b; 1:81-88
- Leland M.M., Hubbard G.B. and Dubey J.P. Clinical toxoplasmosis in domestic rabbits. *Lab Anim Sci* 1992; 42:318-319
- Lev L. Untersuchungen von experimentellen und spontanen Enzephalitozoon-cuniculi-Infektionen bei Kaninchen mit drei serologischen Methoden. *Diss med vet*, Hannover 1982
- Levaditii C., Nicolau S. et Schoen R. L'étiologie d'encéphalite. *C R Acad Sci (Paris)* 1923; 177:987
- Levaditii C., Nicolau S. et Schoen R. L'étiologie de l'encéphalite épizootique du lapin dans ses rapports avec l'étude expérimentale de l'encéphalite léthargique Encephalitozoon cuniculi. *N sp Ann Inst Pasteur (Paris)* 1924; 38:651-712
- Levkut M., Lešník F., Bálent P., Zajak V. and Sláviková K. Bovine leukemia virus-induced clinical signs and morphological changes of encephalitozoonosis in rabbits. *Fol Parasitol* 1997; 44:249-254
- Levkut M., Lesnik F., Balent P., Levkutova M., Kolodzieyski L., Horvath M. An unusual manifestation of encephalitozoonosis in chinchilla rabbits. *Can Vet J* 1998; 39(9):576-577
- Li T., Qiao G.L., Hu G.Z., Meng F.D., Qiu Y.S., Zhang X.Y., Guo W.X., Yie S.F. and Li S.Y. Comparative plasma and tissue pharmacokinetics and drug blood profiles of different chemotherapeutics in fowls and rabbits. *J Vet Pharmacol Ther* 1995; 18(4):260-273
- Li J., Santosh K. K., Hamelin A., Visvesvara G.S. and Edlind T.D. Tubulin genes from AIDS-associated microsporidia and implications for phylogeny and benzimidazole sensitivity. *Mol Biochem Parasitol* 1996; 78:289-298
- Ludwig H., Koester V., Pauli G. and Rott R. The cerebrospinal fluid of rabbits infected with Borna disease virus. *Arch Virol* 1977; 55:209-223

- Lyngset A. A survey of serum antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in breeding rabbits and their young. *Lab Anim Sci* 1980; 30:558-561
- Lyngset A. Enzephalitozoon-Infektionen beim Kaninchen – Diagnose und Ausmerzung. 4. Tagung über Krankheiten der Pelztiere, Kaninchen und Heimtiere. *Dtsch Vet-Med Ges* 1981, Celle
- Mader D. R. Rabbits - basic approach to veterinary care. In: *Ferrets, Rabbits and Rodents Clinical Medicine and Surgery*, chapter 14, Hillyer E.V. and Quesenberry K.E., 2<sup>nd</sup> ed., eds. Philadelphia, W.B. Saunders Company 2004; 152
- Margileth A.M., Strano A.J., Chandra R., Neafie R., Blum M. and Mc Cully R.M. Disseminated nosematosis in an immunologically compromised infant. *Arch Pathol* 1973; 95:145-150
- Mathis A., Michel M., Kuster H., Muller C., Weber R. and Deplazes P. Two *Encephalitozoon cuniculi* strains of human origin are infectious to rabbits. *Paras* 1997; 114(1):29-35
- Mathis A. Microsporidia: emerging advances in understanding the basic biology of these unique organisms. *Int J Parasitol* 2000; 30(7):795-804
- Matsubayashi H., Koike T., Mikata I., Takei H. and Magiwaru S. A case of encephalitozoon-like body infection in man. *Arch Pathol* 1959; 67:1817
- Meyer-Breckwoldt A. Epidemiologische und klinische Untersuchungen zur Enzephalitozoonose beim Zwergkaninchen. *Diss med vet*, Hannover 1996
- Mc Cully R.M., van Dellen A.F., Basson P.A. and Lawrence J. Observations on the pathology of canine microsporidiosis. *Onderstepoort J Vet Res* 1978; 45:75-92
- Mc Innes E.F. and Stewart C.G. The pathology of subclinical infection of *Encephalitozoon cuniculi* in canine dams producing pups with overt encephalitozoonosis. *J S Afr Vet Assoc* 1991; 62(2):51-54
- Mertens R., Didier E., Fishbein M., Bertucci D., Rogers L. and Orenstein J. *Encephalitozoon cuniculi* microsporidiosis: infection of the brain, heart, kidneys, trachea, adrenal glands, and urinary bladder in a patient with AIDS. *Mod Pathol* 1997; 10(1):68-77
- Mohindra A.R., Lee M.W., Visvesvara G., Moura H., Parasuraman R., Leitch G.J., Xiao L., Yee J. and del-Busto R. Disseminated microsporidiosis in a renal transplant recipient. *Transpl Infect Dis* 2002; 4(2):102-7

- Mohn S.F., Nordstoga K., Krogsrud J. and Helegbostad A. Transplacental transmission of *Nosema cuniculi* in the blue fox (*Alopex lagopus*). *Acta Path Microbiol Scand* 1974; 82B:299-300
- Moretto M., Cosciotti L., Durell B. and Khan I. Lack of CD4(+) T cells does not affect induction of CD8(+) T-cell immunity against encephalitozoon cuniculi infection. *Infect Immun* 2000; 68(11):6223-6232
- Moura H., Da Silva G., Sodre F., Brasil P., Wallmo K., Wahlquist S., Wallace S., Croppo G.P. and Visvesvara G.S. Gram-chromotrope: a new technique that enhances detection of microsporidial spores in clinical samples. *J Euk Microbiol* 1996; 43(5):94S-95S
- Müller C. Untersuchungen zur Diagnostik, Biologie und Verbreitung von Mikrosporidien bei Kaninchen und anderen Tierarten. Diss med vet, Zürich 1998
- Muller-Doblies U.U., Herzog K., Tanner I., Mathis A. and Deplazes P. First isolation and characterisation of *Encephalitozoon cuniculi* from a free-ranging rat (*Rattus norvegicus*). *Vet Parasitol* 2002; 22,107(4):279-285
- Murray K.A., Hobbs B.A. and Griffith J.W. Acute meningoencephalomyelitis in a rabbit infected with *Pasteurella multocida*. *Lab Anim Sci* 1985; 35(2):169-171
- Naas A., Revajova V., Letkova L. and Halanova M. Immune response to *Encephalitozoon cuniculi* infection in laboratory mice. *Vet Parasitol* 1999; 82:137-143
- Nast R., Middleton D.M. and Wheler C.L. Generalized encephalitozoonosis in a Jersey woolly rabbit. *Can Vet J* 1996; 37:303-305
- Nelson J.B. An Intrazellular parasite resembling a microsporidian associated with ascites in Swiss mice. *Proc Soc Exp Biol (N.Y.)* 1962; 109:714
- Nelson J.B. Experimental transmission of a murine microsporidian in Swiss mice. *J Bacteriol* 1967; 94:1340-1345
- Neuschl J., Čonkova E., Krokavec P., Čelarova E., Halanova M., Hipikova V., Balent P. and Šutiak V. The development of encephalitozoonosis in rabbits after infection by *Encephalitozoon cuniculi* and treatment with albendazole. *Acta Vet (Beograd)* 1999; 49(4):327-334
- Niederkorn J. and Shadduck J. Role of antibody and complement in the role of *Encephalitozoon cuniculi* infection by rabbit macrophages. *Infect Immun* 1980; 27(3):995-1002

- Niederkorn J.Y., Brieland J.K. and Mayhew E. Enhanced natural killer cell activity in experimental murine encephalitozoonosis. *Infect Immun* 1983; 41:302-307
- Nordstoga K. Nosematosis in blue foxes. *Nord Vet Med* 1972; 24:21-24
- Nordstoga K., Mohn S.F. and Loftsgaard G. Nosematose hos blårev. (Nosematosis in the blue foxes). *Proc. 12<sup>th</sup> Nord Vet Congr, Reykjavik* 1974:183-6
- Nordstoga K. and Westbye K. Polararteritis nodosa associated with nosematosis in blue foxes. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1976; 84:291-296
- Nordstoga K., Mohn S.F., Aamdal J. and Helgebostad A. Nosematosis (encephalitozoonosis) in a litter of blue foxes after intrauterine infection of nosema spores. *Acta Vet Scand* 1978; 19:150-152
- Oliver J.E., Lorenz M.D. and Kornegay J.N. *Handbook of Veterinary Neurology*. Chapter 1 and 2, 3<sup>rd</sup> ed. W.B. Saunders Company, 1997; 3-63
- Owen D.G. and Gannon J. Investigation into the transplacental transmission of *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits. *Lab Anim* 1980; 14:35-38
- Packham D.K., Hewitson T.D., Whitworth J.A. and Kincaid-Smith P.S. Glomerulosclerosis and hyalinosis in rabbits. *Pathol* 1992; 24:164-169
- Pakes S.P., Shaddock J.A. and Olsen R.G. A diagnostic skin test for encephalitozoonosis (nosematosis) in rabbits. *Lab Anim Sci* 1972; 22(6):870-77
- Pakes S.P., Shaddock J.A. and Cali A. Fine structure of *Encephalitozoon cuniculi* from rabbits, mice and hamster. *J Protozool* 1975; 22(4):481-488
- Pakes S., Shaddock J., Feldmann D. and Moore J. Comparison of tests for the diagnosis of spontaneous encephalitozoonosis in rabbits. *Lab Anim Sci* 1984; 34(4):356-359
- Pang V.F. and Shaddock J.A. Susceptibility of cats, sheep, and swine to a rabbit isolate of *Encephalitozoon cuniculi*. *Vet Res* 1985; 46(5):1071-1077
- Patterson-Kane J.C. *Encephalitozoon cuniculi* placentitis and abortion in a quarterhorse mare. *J Vet Diagn Invest* 2003; 15(1): 579
- Perrin T.L. Spontaneous and experimental encephalitozoon infection in laboratory animals. *Arch Pathol* 1943; 36:559-567
- Persin M. and Dousek J. Encephalitozoonosis in farm-bred arctic blue foxes (*Alopex lagopus*). *Vet Med (Praha)* 1986; 31(1):49-54

- Peters M. und Scheele G. Listeriose in einem Kaninchenbestand. Dtsch tierärztl Wschr 1996; 103:460-462
- Petri M. Studies on *Nosema cuniculi* found in transplantable ascites tumors with a survey of microsporidiosis in mammals. Acta Pathol Microbiol Scand 1969; 204(Suppl):1-91
- Platt S.R. Recommendations for corticosteroid use in neurological disease. ACVIM Proceedings 2002; 1-5
- Plowright W. An encephalitis-nephritis syndrome in the dog probably due to congenital encephalitozoon infection. Journal of comparative pathology and therapeutics 1952; 62:83-92
- Poonacha K.B. William B.S. and Stamper R.D. Encephalitozoonosis in a parrot. J Am Vet Med Assoc 1985; 186:700-702
- Pye D. and Cox J. Isolation of *Encephalitozoon cuniculi* from urine samples. Lab Anim 1977; 11:233-234
- Quesenberry K.E. Rabbits. In: Saunders Manual of small animal practice. Brichard S.J. and Sherding R.G. eds., WB Saunders, Philadelphia 1994; 1346
- Pyretailade E., Biderre C. and Pyret P. *Microsporidium Encephalitozoon cuniculi*, a unicellular eukaryote with an unusual chromosomal dispersion of ribosomal genes and a LSU rRNA reduced to the universal core. Nucleic Acids Res 1998; 26:3513-3520
- Randall C.C. and Dennis E.D. Retrospective study of diseases in a captive lemming colony. J Wildlife Dis 1993; 29(4):620-622
- Reetz J. Natürliche Mikrosporidien-(*Encephalitozoon cuniculi*-) Infektionen bei Hühnern. Tierärztl Prax 1993; 21:429-435
- Reetz J. Natural transmission of microsporidia (*Encephalitozoon cuniculi*) by way of the chicken egg. Tierärztl Prax 1994; 22(2):147-50
- Reetz J., Wiedemann M., Aul A., Wittstatt U., Ochs A., Thomschke A., Manke H., Schwebs M. und Rinder H. Disseminated lethal *Encephalitozoon cuniculi* (genotype III) infections in cotton-top tamarins (*Oedipomidas oedipus*) – a case report. Parasitol Int 2004; 53(1):29-34
- Ribeiro M. and Guimaraes A. *Encephalitozoon*-like microsporidia in the ticks *Amblyomma cajennense* and *Anocentor nitens* ( Acari: Ixodidae ). J Med Entomol 1998; 35(6):1029-1033

- Ridoux O. and Drancourt M. In vitro susceptibilities of the microsporidia *Encephalitozoon cuniculi*, *Encephalitozoon hellem*, and *Encephalitozoon intestinalis* to albendazole and its sulfoxide and sulfone metabolites. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42(12):3301-3303
- Rinder H., Janitschke K., Aspöck K., Da Sila A.J., Deplazes P., Fedorko D.P., Franzen C., Futh U., Hüniger F., Lehmacher A., Meyer C.G., Molina J.-M., Sandfort J., Weber R. and Löscher T. Blinded, externally controlled multicenter evaluation of light microscopy and PCR for detection of microsporidia in stool specimens. The Diagnostic Multicenter Study Group on Microsporidia. *J Clin Microbiol* 1998; 36(6):1814-1818
- Risch-Laasch W. Immunhistologische sowie lichtmikroskopische Untersuchungen zur Pathogenese der experimentellen Bornaschen Krankheit beim Kaninchen. *Diss vet med, Gießen* 1981; 4-5
- Rogowska-Szadkoska D. and Kramarz P. infected with human immunodeficiency virus (HIV). *Przegl Epidemiol* 1994; 48(4):449-53
- Rommel M. Parasitosen der Kaninchen und Meerschweinchen. *Collegium veterinarium*, Hrsg. Institut für Parasitologie, Tierärztliche Hochschule, Hannover 1980; 68-72
- Rossmesl J.H. Effects of blood contamination on canine cerebrospinal fluid white blood cell counts and total protein concentrations. In: *Proceedings of annual congress of veterinary internal medicine 2002*
- Ruge H. *Encephalitozoon* in the guinea pig. *Z Bakteriologie und Parasitenkunde* 1951; 156:543-544
- Ryan N.J., Sutherland G., Coughlan K., Globan M., Doultree J., Marshall J., Baird R.W., Pederson J. and Dwyer B. A new trichrome-blue stain for detection of microsporidial species in urine, stool, and nasopharyngeal specimens. *J Clin Microbiol* 1993; 31(12):3264-3269
- Schall H. In: *Krankheiten der Heimtiere*. Gabrisch K. und Zwart P., 3. Aufl., Hrsg. Schlütersche Verlagsanstalt, Hannover 1995; 1-47
- Scharmman W., Reblin L. und Griem W. Untersuchungen über die Infektion von Kaninchen durch *Encephalitozoon cuniculi*. *Berl Münch Wschr* 1986; 99(1):20-25



- Schmidt E.C. and Shadduck J.A. Murine encephalitozoonosis model for studying the host-parasite relationship of a chronic infection. *Infect and Immun* 1983; 40(3):936-42
- Schottelius J., Shadduck F., Schmetz C., Schüler T. und Sobottka J. Encephalitozoon cuniculi infections in laboratory rabbits and elimination trials. Annual Scientific Report 1994; Bernhard Nocht Institute for tropical medicine; 69
- Schottelius J. and da Costa S.C. Microsporidia and acquired immunodeficiency syndrome. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000; 95(1):133-139
- Seibold H.R. and Fussell E.N. Intestinal microsporidiosis in *Callicebus moloch*. *Lab Anim Sci* 1973; 23:115-18
- Sedlák K. and Literák I., Faldyna M., Toman M. and Benák J. Fatal toxoplasmosis in brown hares (*Lepus europaeus*): possible reasons of their high susceptibility to the infection. *Vet Parasitol* 2000; 93(1):13-28
- Shadduck J.A. *Nosema cuniculi*: in vitro isolation. *Science* 1969; 166:516-517
- Shadduck J.A. and Pakes S.P. Encephalitozoonosis (nosematosis) and toxoplasmosis. *Am J Pathol* 1971; 64(3):657-673
- Shadduck J.A., Bendele R. and Robinson G.T. Isolation of the causative organism of canine encephalitozoonosis. *Vet Pathol* 1978; 15(4):449-60
- Shadduck J.A. and Geroulo M.J. A simple method for the detection of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits. *Lab Anim Sci* 1979; 29(3):330-34
- Shadduck J.A., Watson W.T., Pakes S.P. and Cali A. Animal infectivity of *Encephalitozoon cuniculi*. *J Parasitol* 1979; 65(1):123-9
- Shadduck J.A. and Baskin G. Serologic evidence of *Encephalitozoon cuniculi* infection in a colony of squirrel monkeys. *Lab Anim Sci* 1989; 39(4):328-330
- Shadduck J.A. Comparative pathology of microsporidiosis. *Arch Pathol Lab Med* 1993; 117:1215-1219
- Silbernagel und Despopoulos Taschenatlas der Physiologie. 4. Auflage, Hrsg. Georg Thieme Verlag Stuttgart 1991; 58,260
- Sebek Z. The finding of the genus *Nosema nägeli* 1857 (Microsporidia, Nosematidae) in the kidney of a guinea pig. *Fol Parasitol (Praha)* 1969; 16:165-169
- Smith T. and Florence L. *Encephalitozoon cuniculi* as a kidney parasite in the rabbit. *J Exp Med* 1925; 41:25-35

- Snowden K., Logan K. and Didier E.S. Encephalitozoon cuniculi strain III is a cause of encephalitozoonosis in both humans and dogs. *J Inf Dis* 1999; 180:2086-2088
- Snyder S.B., Fox J.G. and Soave O.A. Subclinical otitis media associated with *Pasteurella multocida* infections in New Zealand White rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Lab Anim Sci* 1973; 23(2):270-272
- Sobottka I., Iglauer F., Schuler T., Schmetz C., Visvesvara G.S., Albrecht H., Schwartz D.A., Pieniazek N.J., Bartsch K., Laufs R., und Schottelius J. Acute and long-term humoral immunity following active immunization with inactivated spores of various *Encephalitozoon* species. *Parsaitol Res* 2001; 87(1):1-6
- Somvanshi R., Biswas J.C., Shah N.L., Lal H. and Sharma R.L. Spontaneous encephalitozoonosis in angora rabbits. *Indian Vet J* 1994; 71:396-399
- Sprague V. and Vernick S.H. The ultrastructure of *Encephalitozoon cuniculi* (Microsporidia, Nosematidae) and its taxonomic significance. *J Protozool* 1971; 18:560-69
- Sprague V., Becnel J.J. and Hazard E.I. Taxonomy of phylum Microspora. *Critical Rev Microbiol* 1992; 18(5/6):285-395
- Stewart C.G., Botha W.S. and Van Dellen A.F. The prevalence of *Encephalitozoon* antibodies in dogs and an evaluation of the indirect fluorescent antibody test. *J S Afr Vet Assoc* 1979a; 50(3):169-172
- Stewart C.G., Van Dellen A.F. and Botha W.S. Canine encephalitozoonosis in kennels and the isolation of *Encephalitozoon* in tissue culture. *J S Afr Vet Assoc* 1979b; 50(3):165-168
- Suter C., Müller-Doblies U., Hatt J.-M. and Deplazes P. Prevention and treatment of *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbits with fenbendazole. *Vet Record* 2001; 148:478-480
- Szabo J.R. and Shaddock J.A. Experimental encephalitozoonosis in neonatal dogs. *Vet Pathol* 1987; 24:99-108
- Thomas C., Finn M., Twigg L., Deplazes P. and Thompson R. Microsporidia (*Encephalitozoon cuniculi*) in wild rabbits in Australia. *Aust Vet J* 1995; 75(11):808-810
- Tipold, A. Cerebrospinal Fluid. In *Clinical neurology in small animals – localization, diagnosis and treatment*, Braund K.G., eds. International

- Veterinary Information Service, Ithaka, New York, USA 2002 www.IVIS.org.  
Document No. B0235.0102
- Traub E. Über eine mit Listerien-ähnlichen Bakterien vergesellschaftete Meningo-Enzephalomyelitis der Kaninchen. Zentralbl Bakteriol Parasitenk Infektionskr, Abt.I:Orig.1942; 149:38-49
- Uhlíková M. and Hübner J. Congenital transmission of Toxoplasmosis in domestic rabbits. Folia Parasitol (Praha) 1973; 20:285-291
- Undeen A.H. A proposed mechanism for the germination of microsporidian (Protozoa: Microspora). J Theor Biol 1990; 142:223-235
- Undeen A.H. and Van der Meer R.K. Microsporidian intrasporal sugars and their role in germination. J Invert Pathol 1999; 73:294-302
- Van Dellen A.F., Botha W.S., Boomker J. and Warnes W.E.J. Light and electron microscopical studies on canine encephalitozoonosis: cerebral vasculitis. Onderstepoort J Vet Res 1978; 45:165-186
- Vandevelde M., Richard A. und Fankhauser R. Liquoruntersuchungen bei neurologisch kranken Hunden und Katzen. Schweiz Arch Tierheilk 1987; 129: 443-456
- Van Gool T., Snijders F., Reiss P., Eeftnick Schattenkerk J.K., Van den Bergh Weerman M.A., Bartelsman J.F., Bruis J.J., Canning E.U. and Dankert J. Diagnosis of intestinal and disseminated microsporidial infections in patients with HIV by a new rapid fluorescence technique. J Clin Pathol 1993; 46:694-699
- Van Heerden J., Bainbridge N., Burroughs R.E.J. and Kriek N.P.J. Distemper-like disease and encephalitozoonosis in wild dogs (*Lycaon Pictus*). J Wildlife Dis 1989; 25(1):70-75
- Van Rensburg I.B.J. and Du Plessis J.L. Nosematosis in a cat: a case report. J S Afr Vet Med Ass 1971; 42:327-231
- Van Rensburg I.B., Volkmann D.H., Soley J.T. and Stewart C.G. Encephalitozoon infection in a still-born foal. J S Afr Vet Assoc 1991; 62(3):130-132
- Vávra J. and Blažek K. Nosematosis in carnivores. J Parasitol 1971; 57:923-924
- Vavra J. and Chalupsky J. Fluorescence staining of microsporidian spores with the brightener Calcofluor White M2R. J Protozool 1982; 29(Suppl):503

- Von Kücken U., Ludwig H.-J., Lange S., Günther H., Dix B., Lange M. und Müller D. Eine generalisierte Erkrankung des Kaninchens durch Encephalitozoon cuniculi. Mh Vet Med 1987; 42:781-784
- Von Kücken U., Dix B., Ludwig E. und Ludwig H.J. Vorkommen von Einzellern im Ejakulat von Besamungsbullen (Kurzmitteilung). Mh Vet Med 1990; 45:92
- Von Kücken U., Kreusel S., Müller D., Ludwig H.-J., Geelhaar D., Wagner C. und Mokros M. Beitrag zur Mikrosporidieninfektion des Pferdes – ein Fallbericht. Tierärztl Umschau 1993; 48:203-210
- Venkatesan P. Albendazole. J Antim Chem 1998; 41:145-147
- Visvesvara G.S. In vitro cultivation of microsporidia of clinical importance. Clin Microbiol Rev 2002; 15(3):401-413
- Vivares C.P. and Méténier G. The microsporidian Encephalitozoon. Bio Essays 2001; 23:194-202
- Von Bergmann V., Heidrich R. and Kiupel H., Akute Toxoplasmose-Ausbrüche in Kaninchenbeständen. Angew Parasitol 1980; 21:1-6
- Von Müller D., Kücken U., Wagner C. und Mokros M. Hämatologische und klinisch-chemische Untersuchungen bei Schlachtkaninchen. Mh Vet-Med 1990; 45:792-796
- Vossbrinck C.R., Maddox J.V., Friedmann S., Debrunner-Vossbrinck B.A. and Woese C.R. Ribosomal RNA sequence suggests microsporidia are extremely ancient eukaryotes. Nature 1987; 326(26):411-414
- Wagner F. Einseitige Blindheit bei einem Kaninchen. Tierärztliche Praxis 2000; 28(4):216,260-262
- Waller T. Growth of Nosema cuniculi in established cell lines. Lab Anim 1975; 9:61-68
- Waller T. The india-ink immunoreaction: a method for the rapid diagnosis of encephalitozoonosis. Lab Anim 1977; 11:93-97
- Waller T. and Morein B. Fabiansson E. Humoral immune response to infection with Encephalitozoon cuniculi in rabbits. Lab Anim 1978; 12:145-148
- Waller T. Sensitivity of Encephalitozoon cuniculi to various temperatures, disinfectants and drugs. Lab Anim 1979; 13:227-230
- Waller T. and Bergquist N. Rapid simultaneous diagnosis of toxoplasmosis and encephalitozoonosis in rabbits by carbon immunoassay. Lab Anim Sci 1982; 16:515-517

- Wan C.H., Franklin C., Riley L.K., Hook R.R. Jr. and Besch-Williford C. Diagnostic exercise: granulomatous encephalitis in guinea pigs. *Lab Anim Sci* 1996; 46(2):228-230
- Wasson K. and Peper R. Mammalian microsporidiosis. *Vet Pathol* 2000; 37:113-128
- Weber R., Bryan R.T., Owen R.L., Wilcox C.M., Gorelkin L. and Visvesvara G.S. Improved light-microscopical detection of Microsporidia spores in stool and duodenal aspirates. eds. *The Enteric Opportunistic Infectious Working Group*, *New Engl J Med* 1992; 326:161-166
- Weber R., Bryab R.T., Schwartz D.A. and Owen R.L. Human microsporidial infections. *Clin Microbiol Rev* 1994; 7:426-461
- Weber R. und Deplazes P. Neue parasitäre Erkrankungen beim Menschen: Infektionen durch Mikrosporidien und Cyclospora spezie. *Schweiz Med Wochenschr* 1995; 125(18):909-922
- Weber R., Deplazes P., Flepp M., Mathis A., Baumann R., Sauer B., Kuster H. and Lüthy R. Cerebral microsporidiosis due to *Encephalitozoon cuniculi* in a patient with human immunodeficiency virus infection. *New England J Med* 1997; 336:474-478
- Weidner E. Interactions between *Encephalitozoon cuniculi* and macrophages. *Z Parasitenk* 1975; 47:1-9
- Weisbroth S.H., Flatt R.E., Kraus A.L. *The Biology of the laboratory rabbit*. eds. Academic Press, New York 1974; 62,65
- Weiser J. On the taxonomic position of the genus *Encephalitozoon*. (Protozoa: Microsporidia). *Parasitol* 1964; 54:749-51
- Weiser J. Early experiences with microsporidia of man and mammals. *Fol Parasitol* 1993; 40:257-260
- Weiss L.M., Michalakakis E., Coyle C.M., Tanowitz H.B. and Wittner M. The in vitro activity of albendazole against *Encephalitozoon cuniculi*. *J Euk Microbiol* 1994; 41(5):65S
- Weitzel T., Wolff M., Dabanch J., Levy I., Schmetz C., Visvesvara G.S. and Sobottka I. Dual microsporidial infection with *Encephalitozoon cuniculi* and *Enterocytozoon bieneusi* in an HIV-positive patient. *Infection* 2001; 29(4):237-239

- Wenzel U.D. und Albert G. Kaninchenkrankheiten, Hrsg. Dt. Landwirtschaftsverl. Berlin, 1996
- Wesonga H.O. and Munda M. Rabbit encephalitozoonosis in Kenya. *Lab Anim* 1992; 26:219-221
- Wiesner E. und Ribbeck R. Lexikon der Veterinärmedizin, Hrsg. Enke Verlag, Stuttgart 2000
- Wilson J.M. Encephalitozoon cuniculi in wild European rabbits and a fox. *Res Vet Sci* 1979; 26:114
- Wodecki J.J. Linseninduzierte Uveitis bei einem Kaninchen. *Tierärztliche Prax* 1994; 22:498-501
- Wolfer J., Grahn B., Wilcock B. and Percy D. Phacoclastic uveitis in the rabbit. *Prog Vet Comp Ophthalmol* 1993; 3:92-97
- Wosu J.N., Shaddock J.A., Pakes S.P., Frenkel J.K., Todd K.S. and Conroy J.D. Diagnosis of encephalitozoonosis in experimentally infected rabbits by intradermal and immunofluorescence tests. *Lab Anim Sci* 1977a; 27(2):210-216
- Wosu J.N., Olsen R., Shaddock J.A., Koestner A. and Pakes S.P. Diagnosis of experimental encephalitozoonosis in rabbits by complement fixation. *J Infect Dis* 1977b; 135(6):944-948
- Wright J.H. and Craighead E.M. Infectious motor paralysis in young rabbits. *J Exp Med* 1922; 36:135-140
- Zeman D.H. and Baskin G.B. Encephalitozoonosis in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). *Vet Pathol* 1985; 22(1):24-31
- Zender H.O., Arrigoni E., Eckert J. and Kapanci Y. A case of Encephalitozoon cuniculi peritonitis in a patient with AIDS. *AJCP* 1989; 92(3):352-356
- Zhou Z.Y., Nordstoga K., Bjerkas I. and Zhi-Young Z., Extraglomerular lesions in kidneys of mink with encephalitozoonosis. *Acta Vet Scand* 1992; 33:33-41
- Zhou Z.Y. and Nordstoga K. Mesangioproliferative glomerulonephritis in mink with encephalitozoonosis. *Acta Vet Scand* 1993; 34:69-76

Sehr herzlich bedanke ich mich

- bei Frau PD Dr. A. Fischer für die Überlassung des Themas, die ausdauernde und stets freundliche Unterstützung und hilfreiche Betreuung bei der Durchführung der Arbeit sowie Ausarbeitung der Veröffentlichungen. Im besonderen danke ich ihr dafür, dass sie mich stets gefördert und gefordert hat und immer an mich glaubte.
- bei Frau Prof. Dr. K. Hartmann für ihre konstruktiven Anregungen bei der Planung und Auswertung der PCR-Diagnostik und der Ausarbeitung der Veröffentlichung zu diesem Abschnitt der Arbeit.
- bei Herrn Dr. Dr. H. Rinder und seinen Mitarbeitern aus der Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin der Medizinischen Klinik Innenstadt der LMU München, insbesondere A. Thomschke, Max Wiedemann und zahlreichen weiteren Doktoranden, für ihre geduldige Hilfe, Einarbeitung und fachkompetente Unterstützung bei der praktischen Durchführung und Auswertung der PCR und Trichromfärbung. Außerdem danke ich Herrn Rinder darüberhinaus für die Bereitstellung des Arbeitsmaterials und eines Arbeitsplatzes während dieser Zeit.
- bei Prof. Dr. W. Erhardt und im speziellen seinen Mitarbeitern der wissenschaftlichen Arbeitsgruppe für experimentelle Kardiologie der Technischen Universität München (Institut für experimentelle Onkologie und Therapieforschung, Klinikum Rechts der Isar), die mir die Praxis der Intubation bei Kaninchen nahe brachten, mir gesunde Kontrollkaninchen bereitstellten und diese während meiner Liquorpunktion überwachten.
- bei Angelika Kopp, Tanja Steinberg und Irene Böttcher, die zu jeder Zeit bereit waren, mich bei der praktischen Durchführung der Liquorpunktion tatkräftig zu unterstützen und ohne deren Hilfe, Kreativität und moralische Unterstützung dieser praktische Abschnitt der Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

- bei Dr. K. Matiasek und seinen Kollegen aus dem Institut für Tierpathologie und Neuropathologie der Tierärztlichen Fakultät der LMU München für die Durchführung der Sektionen und pathohistologischen Untersuchungen der Kaninchen. Ein spezieller Dank geht an Dr. K. Matiasek für seine fachlichen Anregungen und konstruktiven Beiträge bei der Auswertung der Ergebnisse für beide Veröffentlichungen.
- bei Prof. Dr. H. Küchenhoff und Mitarbeitern aus dem Institut für Statistik der LMU München für die freundliche statistische Beratung und Erstellung der Diagramme.
- bei der Stiftung zur Förderung des künstlerischen und wissenschaftlichen Nachwuchses der LMU München für die Gewährung des Stipendiums.
- bei den Mitarbeitern aus dem Labor und allen Tierpflegern/innen für die geduldige Hilfe bei der Untersuchung der kleinen Patienten sowie deren liebevolle Pflege.
- bei Carmen Heide, Karola Petschow, Philipp Bernhard, Ewan Bryce, Mathias Gindler und allen weiteren Freunden und Verwandten für die Hilfe bei allen Computerfragen, beim Korrekturlesen dieser Arbeit, dem sprachlichen Ausdruck im Englischen sowie für ihre moralische Unterstützung.



## Tabellarischer Lebenslauf

<b>Persönliche</b>	Name:	Ariane Jaß
<b>Angaben:</b>	Familienstand:	ledig
	Staatsangehörigkeit:	deutsch
	Geburtsdatum:	03.04.75
	Geburtsort:	Gräfelfing
	Eltern:	Dr. Wieland Jaß, Diplom-Physiker Renate Jaß-Harjung, Buchhändlerin
	Geschwister:	Harald Jaß, Student
<b>Ausbildung:</b>	1981 – 1985	Grundschule an der Brucker Lerche, Erlangen-Bruck
	1985 – 1994	Gymnasium Vaterstetten, Vaterstetten
	1994 – 2000	Studium der Tiermedizin an der Ludwig- Maximilians-Universität, München Tierärztliche Prüfung am 28.08.2000
	Frühjahr 1998	6 - wöchiges Pflichtpraktikum an einer Kleintierpraxis in Cornwall, England
	Herbst 1999	2 - monatiges Praktikum in Onderstepoort, Südafrika
	seit Jan. 2000	Doktorandin an der I. Medizinischen Tierklinik der LMU München, gefördert durch das Stipendium der LMU München zur Unterstützung des künstlerischen und naturwissenschaftlichen Nachwuchses
	Juli – Sept. 2003	Beschäftigung als wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Medizinischen Kleintierklinik der veterinärmedizinischen Fakultät, LMU München
	seit Jan. 2004	Internship an der Medizinischen Kleintierklinik, LMU München