

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Prof. Dr. Andrea Fischer

Enzephalitozoonose beim Kaninchen - eine Therapiestudie

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

von
Jessica Christina Sieg
aus Wermelskirchen

München 2014

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Referent: Prof. Dr. Andrea Fischer

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Kaspar Matiasek

Tag der Promotion: 08. Februar 2014

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	2
II.	LITERATURÜBERSICHT	3
1.	Enzephalitozoon spp.	3
1.1.	Entdeckung und Taxonomie	3
1.2.	Morphologie und Entwicklung	4
1.3.	Übertragung und Verbreitung	6
1.4.	Wirtsspektrum und Genotypen	7
2.	Pathogenese und Manifestation	9
3.	Immunologie	11
4.	Klinik	14
4.1.	Kaninchen	14
4.1.1.	Zentralnervensystem	14
4.1.2.	Nieren	16
4.1.3.	Augen	17
4.2.	Hund	18
4.3.	Katze	19
4.4.	Mensch	20
4.5.	Andere Säugetiere	21
4.6.	Vögel	22
5.	Diagnostik	22
5.1.	Direkte Nachweisverfahren	22
5.1.1.	Polymerasekettenreaktion	23
5.1.2.	Morphologische und neuropathologische Untersuchung	25
5.1.3.	Sporennachweis im Urin	26
5.2.	Indirekte Nachweisverfahren	27
5.2.1.	Serologische Untersuchung	27
5.2.2.	Liquoruntersuchung	29
5.3.	Differentialdiagnosen beim Kaninchen	29
5.2.1.	Otitis interna/media	30
5.2.2.	Trauma	31
5.2.3.	Toxoplasmose	32

5.2.4.	Pasteurellose	32
5.2.5.	Herpes Enzephalitis beim Kaninchen	33
5.2.6.	weitere Differentialdiagnosen	33
6.	Therapie	34
6.1.	In vitro Daten zur Therapie	34
6.2.	Etablierte Therapieprotokolle beim Mensch	34
6.3.	Therapieprotokolle beim Kaninchen	34
6.4.	Therapieprotokolle bei Hund und Katze	35
6.5.	Interaktionen und Nebenwirkungen	35
7.	Bewertung als Infektionserreger	36
7.1.	Individuelle Prognose	36
7.2.	Zoonotisches Potential	37
III.	CLINICAL EVALUATION OF THERAPEUTIC SUCCESS IN RABBITS WITH SUSPECTED ENCEPHALITOZOONOSIS	39
IV.	DISKUSSION	54
V.	ZUSAMMENFASSUNG	65
VI.	SUMMARY	66
VII.	LITERATURVERZEICHNIS	67
VIII.	ANHANG	96
IX.	DANKSAGUNG	99

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

BALB/c	im Labor gezüchteter Stamm der Hausmaus, Albino
bzw.	beziehungsweise
Ca.	Calcium
ca.	circa
CIA	Carbon-Immuno-Assay
d	Tag
d. h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. cuniculi</i>	<i>Encephalitozoon cuniculi</i>
EIA	Enzym-Immuno-Assay
ELISA	Enzyme-linked-immunosorbend assay
etc.	et cetera
HIV	humanes Immunschwächevirus
IFAT	Immunfluoreszenztest
Ig	Immunglobulin
IIR	India-Ink-Reaktion
IL	Interleukin
kg	Kilogramm
l	Liter
mg	Milligramm
ml	Milliliter
PCR	Polymerase Kettenreaktion
<i>p. o.</i>	<i>per os</i>
<i>s. c.</i>	<i>subkutan</i>
SCID	Severe Combined Immunodeficiency
sog.	so genannt
spp.	Subspezies
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
u. s. w.	und so weiter
u. a.	und andere
z. B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem
%	Prozent

I. EINLEITUNG

Die Enzephalitozoonose ist eine durch *Encephalitozoon cuniculi* (*E. cuniculi*), ein weltweit verbreitetes Mikrosporidium, hervorgerufene Krankheit (HALÁNOVA et al., 2003; HARCOURT-BROWN & HOLLOWAY, 2003; KEEBLE & SHAW, 2006; DIPINETO et al., 2008; VALENCAKOVA et al., 2008; OKEWOLE, 2008; CRAY et al., 2009; OZKAN et al., 2011). Neben Kaninchen können auch andere Säugetiere, Vögel, Reptilien, Fische und auch der Mensch infiziert werden (BEDERNIK & VAVRA, 1972; ELSTON et al., 1987; KOUDELA et al., 1999; HALANOVA et al., 2003; SNOWDEN et al., 1999; BENZ et al., 2011; DITRICH et al., 2011; JAMSHIDI et al., 2011; KOUDELA et al., 2011; MALCEKOVA et al., 2011; SASAKI et al., 2011; SOKOLOVA et al., 2011). Bisher wurden drei Genotypen des Erregers identifiziert (XIAO et al., 2001; DIDIER et al., 1995). Die Diagnose wird mittels Anamnese und klinischer Untersuchung, Serologie, Urin- und Liquoruntersuchung und Pathologie gestellt (HARCOURT-BROWN & HOLLOWAY, 2003; JASS et al., 2004; GIORDANO et al., 2005; KUCEROVA et al., 2006; JASS et al., 2008; REUSCH et al., 2009; CRAY et al., 2009; JEKLOVA et al., 2010). Im Hinblick auf die Therapie sind in der Literatur, neben Therapieprotokollvorschlägen mit unterschiedlichem Erfolg (MEYER-BRECKWOLDT, 1996; EWRINGMANN & GÖBEL, 1999; SUTER et al., 2001; HARCOURT-BROWN & HOLLOWAY, 2003; KÜNZEL et al., 2008; KÜNZEL & JOACHIM, 2010), bisher nur zwei *in-vitro*-Studien (WALLER, 1979; BEAUVAIS, 1994) und eine kleinere *in-vivo*-Studie mit experimentell infizierten Kaninchen zu finden (SUTER, 2001), bei denen unter anderem Fenbendazol (SUTER, 2001) gegen *E. cuniculi* eingesetzt wurde. Beim Menschen ist der Wirkstoff Albendazol das Mittel der Wahl (DIDIER et al., 2005; RIDOUX & DRANCOURT, 1998), beim Kaninchen wird wegen seiner teratogenen und embryotoxischen Wirkung davon abgeraten (VENKATESAN, 1998). Ziel der vorliegenden Studie war es in einer *in-vivo*-Therapiestudie, die verschiedenen derzeit üblich verwendeten Therapieprotokolle (Oxytetracyclin plus/minus Fenbendazol plus/minus Dexamethason) zu vergleichen und zu bewerten. Die Beurteilung des therapeutischen Erfolgs wurde mit Hilfe eines neurologischen Scores, über die Überlebensrate am Tag 10, sowie des Langzeitüberlebens über den Tag 10 hinaus durchgeführt.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Enzephalitozoon spp.

Zu den Enzephalitozoon spp. zählen derzeit *Enzephalitozoon cuniculi*, *Enzephalitozoon hellem* und *Enzephalitozoon intestinalis* (WEISS et al., 1994; HARTSKEERL et al., 1995; ROMMEL, 1980).

1.1. Entdeckung und Taxonomie

Die erste Beschreibung des Erregers erfolgte 1922 durch WRIGHT und CRAIGHEAD, als diese Experimente an jungen Kaninchen durchführten, um dem Auslöser der spontanen Paralyse auf den Grund zu gehen. Der von Ihnen entdeckte Erreger ließ sich sowohl im zentralen Nervengewebe als auch im Urin nachweisen und hinterließ in Organen typische Veränderungen, wie z. B. Meningoencephalitis, chronische interstitielle Nephritis, phakoklastische Uveitis, Hepatitis, Myokarditis etc. (CSOKAI et al., 2009). Eine Namensgebung erfolgte erst 1923 durch LEVADITI, der *Encephalitozoon (E.) cuniculi* als Erreger einer Enzephalitis beim Kaninchen beschrieb. Die Zugehörigkeit zu den Mikrosporidien wurde in den Folgejahren von verschiedenen Autoren untersucht (GOODPASTURE, 1924; SMITH & FLORENCE 1925; NELSON, 1962).

Die Umbenennung des Erregers zu *Nosema (N.) cuniculi* durch LAINSON und Mitarbeiter (1964) und WEISER (1964) wurde aufgrund der erforschten Sporenstruktur und damit verbundenen angenommenen Verwandtschaft des Erregers mit dem Mikrosporidium *N. cuniculi* zunächst durchgesetzt. Aber weitere Forschungen in Bezug auf die Morphologie, Immunologie und des Entwicklungszyklus (CALI, 1970; SHADDUCK & PAKES, 1971; SPRAGUE & VERNICK, 1971) führten zur Rückkehr zur ursprünglichen Bezeichnung *E. cuniculi*. Seit 1977 wird *E. cuniculi* taxonomisch der Ordnung *Microsporida*, Familie *Nosematidae*, Gattung *Encephalitozoon* zugeordnet (CANNING, 1977).

Neben *E. cuniculi* gehören noch weiterer Erreger zur Gattung *Encephalitozoon*. 1992 wurde *E. hellem* und 1996 *E. intestinales* hinzugefügt, wobei *Septa intestinales* in *E. intestinales* umbenannt wurde aufgrund seiner genetischen Übereinstimmung von 90% zu *E. hellem* und *E. cuniculi* (WEISS et al., 1994; HARTSKEERL et al., 1995; ROMMEL, 1980). Laut der taxonomischen

Klassifikation nach SPARAGUE und Mitarbeiter (1992), nach BAKER (1974) und WILSON (1979), wird *E. cuniculi* aktuell in den Stamm der *Microspora*, Klasse *Microsporidia*, Familie *Gludeida*, Gattung *Encephalitozoon* zugeordnet (siehe Abb. 1).

Stamm: Microspora

Klasse: Microspora

Ordnung: Microsporida

Familie: Thelohania

Familie: Nosematidae

Gattung: Nosema

Art: *Nosema apis*

Art: *Nosema bombycis*

Art: *Nosema connori*

Art: *Nosema corneum*

Familie: Guleidae

Gattung: Encephalitozoon

Art: *Encephalitozoon cuniculi*

Art: *Encephalitozoon intestinalis*

Art: *Encephalitozoon hellem*

Abb. 1 Taxonomische Einteilung der Microspora (nach BAKER, 1974; WILSON, 1979 und SPARAGUE und Mitarbeiter, 1992)

1.2. Morphologie und Entwicklung

Gemäß Untersuchungen von WASSON & PEPER (2000) ist die *E.-cuniculi*-Spore ca. 1,5 – 2,5 µm x 1,5 – 4,0 µm groß, oval und besitzt eine dicke, dreischichtige, chitinhaltige Zellwand. Der Zellkern enthält ein Genom von 2,9 Megabasenpaaren (BIDERRE et al., 1995; KATINKA et al., 2001). Eine Anpassung an intrazelluläres, parasitäres Leben und damit verbundener Verlust von Organellen wird vermutet (PAKES & SHADDUCK, 1975; WASSON & PEPER, 2000; VIVARES & METENIER, 2001).

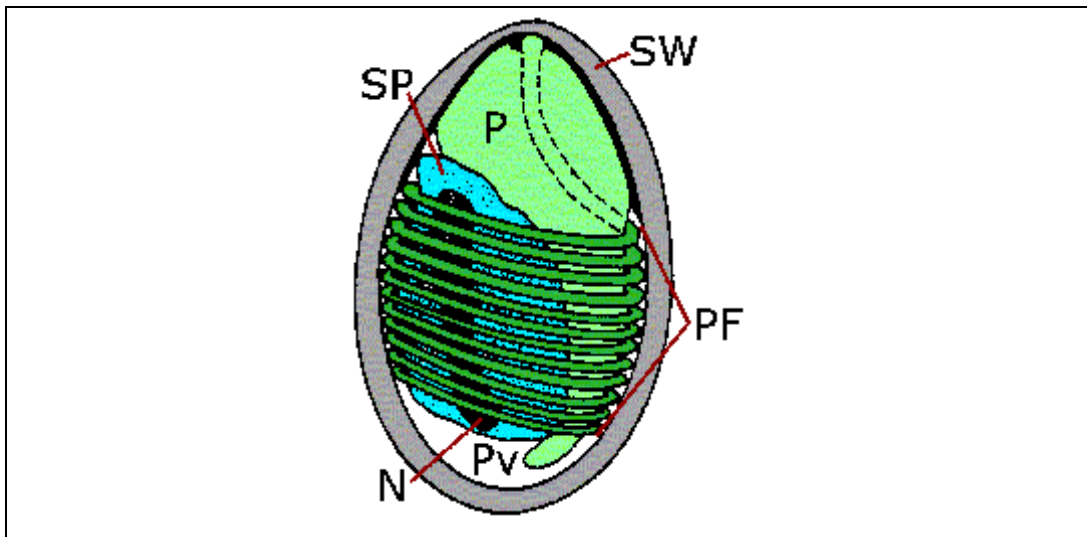


Abb. 2. Aufbau einer *E.-cuniculi*-Spore (nach VIVARES & METENIER, 2001) (Nukleus (N), Polaroplast (P), Polfilament (PF), posteriore Vakuole (PV), Sporenplasma (SP), Sporenwand (SW))

Wichtig für die Verbreitung und Vermehrung ist das sogenannte Polfilament (= Extrusionsapparat), das zur Kontaktherstellung zur Wirtszelle dient und harpunenartig vom Erreger ausgeschossen werden kann (PAKES et al., 1975; WILSON, 1979; KEOHANE & WEISS, 1998). Als Auslöser des Ausschusses werden verschiedene Ursachen diskutiert (osmotischer Druck innerhalb der Spore, Calcium-(Ca-)Kanäle, Elemente des Zytoskeletts) (UNDEEN, 1990; UNDEEN & VAN DER MEER, 1999). Ob dann eine direkte Übertragung des Zytoplasmas mittels Endozytose (COX et al., 1986) oder eine Übertragung durch Injektion durch den Polfilamentschlauch (Diazytose) erfolgt, ist nicht genau bekannt, aber beide Möglichkeiten sollen beobachtet worden sein (VIVARES & METENIER, 2001). Die weitere Entwicklung erfolgt dann rein asexuell und einwirtig (VAVRA et al., 1972). Zunächst entstehen um die Parasiten kleine Vakuolen, die zu sogenannten parasitophoren Vakuolen heranwachsen (VAVRA et al., 1972). Die Verteilung des Zytoplasmas erfolgt dann zusehends zugunsten der Parasitenvakuolen, die an Größe zunehmen (WEIDNER, 1975). Über weitere Schritte (Schizogonie und Sporogonie) kommt es zur Reifung der Erreger (VAVRA et al., 1972). Durch den Platzbedarf der Parasitenvakuolen wird die Wirtszellwand übermäßig beansprucht, wird brüchig und zerreißt schließlich (BAKER, 1974). Erreger unterschiedlicher Entwicklungsstadien werden freigesetzt und reife Sporen können erneut mittels Polfilament neue Wirtszellen

infizieren (VAVRA et al., 1972; SCHOTTELIUS & DA COSTA, 2000). Den Untersuchungen von PAKES und SHADDUCK zufolge beträgt die Dauer eines Entwicklungszyklus zwei bis fünf Tage je nach Aktivität der Wirtszelle. In Zellkulturen reichen ca. 48 Stunden aus (WEISER, 1993, PAKES & SHADDUCK, 1975).

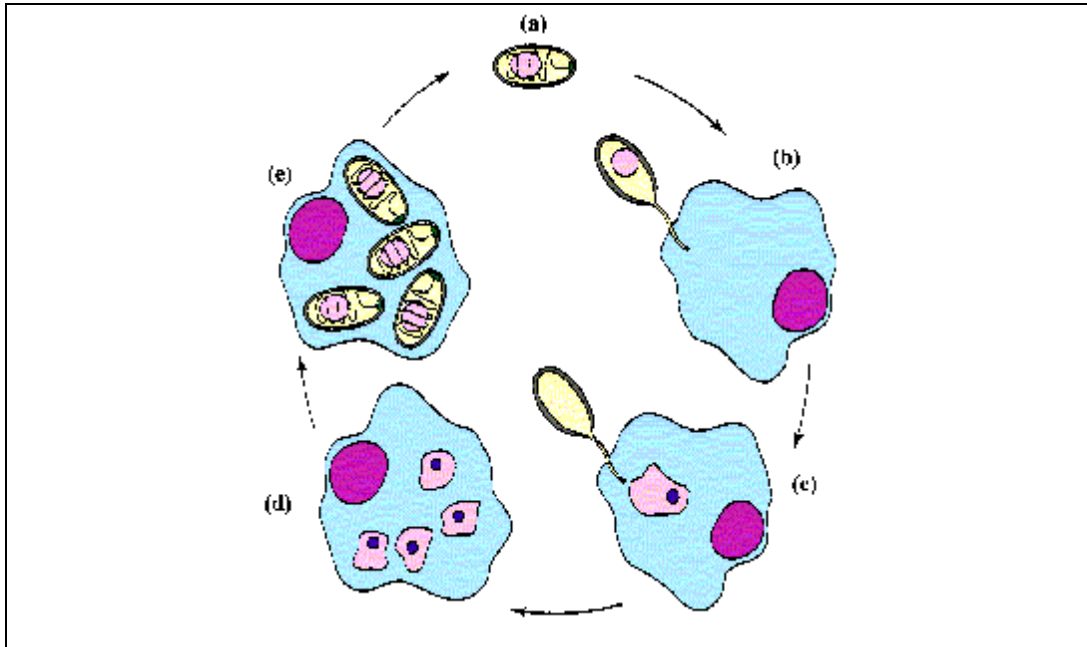


Abb. 3. Lebenszyklus von *E. cuniculi* (nach KEELING & McFADDEN, 1998) (a-c: Infektionsphase; d: Proliferationsphase; e: Sporogoniephase).

1.3. Übertragung und Verbreitung

Die Spore kann in Abhängigkeit von Temperatur und Feuchtigkeitsgehalt bis zu zwei Jahre außerhalb des Wirtes in der Umwelt persistieren (WALLER, 1979; KOUDELA et al., 1999). Die Sporenausscheidung über den Urin ist nach experimenteller Infektion ab Tag 31 Tagen nachgewiesen (SCHARMANN, 1986; COX et al., 1979). Zwischen dem 38. Und 63. Tag *post infectionem* ist das Maximum der Sporenausscheidung über den Urin, die danach wieder abnimmt. Ab dem 98. Tag *post infectionem* konnte keine Sporenausscheidung im Urin mehr nachgewiesen werden (COX & PYE, 1975). Während der gesamten Zeit ist die Ausscheidung inkonstant (COX & PYE, 1975). FEDORKO (1995) wies Sporen auch im Kot infizierter Menschen nach. Experimentell infizierte Kaninchen scheiden bis zu 10^6 Sporen/ml Urin aus (COX & PYE, 1975; HAMILTON & COX, 1981). Die Ausscheidung über den Urin erfolgt allerdings nicht kontinuierlich (WILSON, 1979). Über die Sporenausscheidung bei chronisch und/oder natürlich infizierten Kaninchen existiert bisher keine Studie. MÜLLER

(1989) geht davon aus jedoch, dass bei subklinisch infizierten Kaninchen kaum oder keine Sporen über den Urin ausgeschieden werden.

Die Infektion von Kaninchen mit *E. cuniculi* erfolgt vorwiegend (LEVANDITI et al., 1923) über orale Sporenaufnahme mit kontaminiertem Futter oder Einstreu (JUNGHER, 1955; LAINSON et al., 1964; SOLLI et al., 1994). Erstmals beschrieben wurde sie durch LEVADITI (1923), der Kaninchen mittels einer Magensonde mit Sporen infizierte. Bei Karnivoren besteht die Möglichkeit einer oralen Infektion auch über die Aufnahme infizierter Beute (BAKER, 1974). Die Infektion beim Kaninchen kann auch nasal (PERRIN, 1943), intratracheal (COX et al., 1979), intrazerebral (WOSU et al., 1977), parenteral (PERRIN, 1943), intraperitoneal (WALLER et al., 1978) und rektal (FUENTEALBA et al., 1992; HORVATH et al., 1999) erfolgen. Die vertikale Übertragung vom Muttertier ist ebenfalls möglich, scheint aber nur wenig Bedeutung zu haben (PLOWRIGHT, 1952; SHADDUCK & PAKES, 1971; NORDSTROGA et al., 1978; OWEN & GANNON, 1980; BOOT et al., 1988). Als weitere Übertragungswege werden Hautwunden (REETZ, 1993; KESTER et al., 1998), Geschlechtsverkehr (VON KÜCKEN et al., 1990) und Insekten als Vektoren vermutet (INNES et al., 1962; LAINSON et al., 1964). Auch Meerschweinchen, als subklinisch infizierte Träger, können für Infektionen bei Kaninchen verantwortlich sein (WAN et al., 1996).

Die Enzephalitozoonose ist weltweit bei Kaninchen nachgewiesen (GANNON, 1980; GREENSTEIN et al., 1991; WESONGA & MUNDA, 1992; THOMAS et al., 1995), wobei sich Verbreitung und Durchseuchung aber regional unterscheiden kann (KUNSTYR & NAUMANN 1985; MEYER-BRECKWOLDT, 1996; EWRINGMANN & GÖBEL, 1999). Bei Wildkaninchen in Deutschland (MEYER-BRECKWOLDT, 1996), der Schweiz (MÜLLER, 1998), England und Schottland (COX & ROSS, 1980) wurden bisher keine Erreger oder Antikörper nachgewiesen. In Australien (COX & PYE, 1975; COX & ROSS, 1980; THOMAS et al., 1995), der Tschechei (CHALUPSKY et al., 1979), Schweden (WALLER, 1977), Norwegen (LYNGSET, 1980; MATHIS et al., 1997) und der Türkei (EROKSUZ et al., 1999) wurden allerdings auch bei 20 bis 100 % der Wildkaninchen Antikörper gegen *E. cuniculi* nachgewiesen

1.4. Wirtsspektrum und Genotypen

Das Wirtsspektrum von *E. cuniculi* ist breit (siehe Tab. 1). Auf Grund

molekularbiologischer Untersuchungen werden aktuell drei verschiedene *E. cuniculi*-Stämme unterschieden (SHADDUCK et al., 1979; DIDIER et al., 1995; MULLER-DOBLIES et al., 2002), Typ I = Kaninchenstamm (vor allem bei Kaninchen, Mäusen und Menschen), Typ II = Mausstamm (vor allem bei Mäusen und Blaufüchsen) und Typ III = Hundetyp (bei Hunden und Menschen) (DIDIER et al., 1995). Sie unterscheiden sich lediglich in der Anzahl des 5'-GTTT-3'-Genabschnittes und dem damit verbundenen Molekulargewichtes. Der Wirt, aus dem der jeweilige Stamm isoliert wurde, trug zur jeweiligen Namensgebung bei (DIDIER et al., 1995). Die ursprüngliche Annahme, dass keine Wirtsspezifität vorhanden wäre, wurde durch MULLER-BOBLIES und Mitarbeitern (2002) revidiert.

Tab.1 Angaben in der Literatur zum Vorkommen von *E. cuniculi* bei verschiedenen Spezies

Tierart	Literaturquelle
Kaninchen	KÖTSCHKE & GOTTSCHALK, 1990; WESONGA & MUNDA, 1992; EL-RAZEK, 1993; WOLFER et al., 1993; DEEB & DI GIACOMO, 1994; SOMVANSI et al., 1994; DEEB & CARPENTER, 2004; LEVKUT et al., 1997; WAGNER, 2000
Wildkaninchen	JUNGHER, 1955; WILSON, 1979; CHALUPSKY et al., 1990; THOMAS et al., 1995
Meerschweinchen	RUNGE, 1951; CHALUPSKY et al., 1973; BOOT et al., 1988; ILLANES et al., 1993; WAN et al., 1996
Maus	INNES et al., 1962; BISMANN, 1970; HERSTEINSSON et al., 1993
Ratte	LAISON et al., 1964; CANNING, 1965; HULDT & WALLER, 1974
Hamster	LAISON et al., 1964; CANNING, 1965; HULDT & WALLER, 1974
Hund	PLOWRIGHT, 1952; BASSON & MC CULLY, 1966; SHADDUCK et al., 1978; COLE et al., 1982; HOLLISTER et al., 1989; BOTHAS et al., 1979; BOTHAS et al., 1986; STEWART et al., 1979; VAN HEERDEN et al., 1989

Blaufuchs	NORDSTOGA, 1972; ARNESEN & NORDSTOGA 1977; PERSIN & DOUSEK, 1986
Katze	VAN RENSBURG & DU PLESSIS, 1971; BUYUKMIHCI et al., 1977; PANG & SHADDUCK, 1985; GEVREY, 1993
Nerz	BJERKAS, 1990; ZHOU et al., 1992; ZHOU & NORDSTOGA, 1993
Leopard	VAVRA & BLAZEK, 1971
Ziege	KHANNA & IYER, 1971; CISLAKOVA et al., 2001
Schaf	PANG & SHADDUCK, 1985
Bulle	VON KÜCKEN et al., 1990; HALANOVA et al., 1999
Pferd	VAN RENSBURG et al., 1991; VON KÜCKEN et al., 1993; PATTERSON-KANE, 2003
Schwein	PANG & SHADDUCK, 1985
Primaten	ANVER et al., 1972; ZEMAN & BASKIN, 1985; SHADDUCK & BASKIN, 1989; REETZ et al., 2004
Lemming	RANDALL & DENNIS, 1993
Seekuh	DAO, 2004
Vogel	LEE et al., 2011; MALCEKOVA et al., 2011
Mensch	MATSUBAYASHI et al., 1959; SCHWARTZ, et al., 1994; GUNNARSON et al., 1995; WEBER & DEPLAZES, 1995

2. Pathogenese und Manifestation

Damit eine Infektion mit *E. cuniculi* nach oraler Aufnahme greifen kann, scheint eine Immunsuppression vorliegen zu müssen (COX & GALLICHIO, 1977). Dabei befallen die Sporen beim Kaninchen anders als beim Menschen die Darmzellen nicht primär (COX et al., 1979; FUENTEALBA et al., 1992), sondern gelangen entweder in freier Form oder phagozytiert, in vor allem Monozyten oder Lymphozyten, in den Blutkreislauf. Im weiteren Verlauf gelangen die Sporen mit dem Blutstrom in stark durchblutetes Gewebe, wie Lunge, Leber, Nieren, und befallen dort Zellen, wobei sie schnell teilende Zellen bevorzugen (WEIDNER, 1975; WILSON, 1979; WEISER, 1993; DIDIER, 1998; VIVARES & METENIER, 2001). Die ersten Erregeransammlungen und Läsionen sind ca. 30 Tage *post infectionem* in diesen Organen nachweisbar (COX et al., 1979).

Die Hauptmanifestation findet vor allem in Gehirn und Nieren statt (COX & PYE,

1975; COX, 1979). Folge der Manifestation im ZNS ist eine multifokale, nichteitrige, granulomatöse Meningoencephalitis mit Astrogliose und perivaskulären lymphozytären Infiltraten (COX & GALLICHIO, 1977; WASSON & PEPPER, 2000), die frühestens vier bis acht Wochen *post infectionem* nachgewiesen werden (COX & GALLICHIO, 1977; COX, 1979). Granulomatöse Herde mit nekrotischen Zentren (INNES et al., 1962) werden vor allem im Großhirn, aber auch im Stammhirn, Klein- und Zwischenhirn, sowie im Rückenmark gefunden (SCHARMANN et al., 1986). Die Manifestation in Kleinhirn, Medulla und Rückenmark ist im Vergleich zum Groß- und Stammhirn seltener (INNES et al., 1962; SHADDUCK & PAKES, 1971; WILSON, 1979; SCHARMANN et al., 1986).

Die Manifestation und Sporenvermehrung in den Nieren findet zunächst vor allem im Tubulusepithel statt (FLATT & JACKSON, 1970). Mit Ruptur der Tubulusepithelzellen kommt es zur weiteren Ausbreitung der Sporen in Niereninterstitium und Tubuluslumen. Sporen, die bis in die Sammelrohre gelangen, können mit dem Urin ausgeschieden werden (SMITH & FLORENCE, 1925; FLATT & JACKSON, 1970; COX & PYE, 1975; HAMILTON & COX, 1981). Histologisch zeigt sich das Bild einer interstitiellen, granulomatösen Nephritis mit Degeneration und Nekrose von Nierentubuli (LEVADITI et al., 1923; ROBINSON, 1954). Die Nieren können makroskopisch vergrößert sein (HARCOURT-BROWN, 2007). Während sich die Oberfläche glatt und mit blassen Arealen in der Rindenschicht darstellt (ROBINSON, 1954), finden sich darunter gräuliche narbige Einziehungen, die bis ins Mark reichen (SMITH & FLORENCE, 1925; KOLLER, 1969).

Auch in den Augen können Ansammlungen von Mikrosporidien in den Linsenepithelien nachgewiesen werden (ASHTON et al., 1976; WOLFER et al., 1993). Weitere Augenveränderungen, wie phakoklastische Uveitis (WODECKI, 1994), Keratokonjunktivitis (BEAUVAIS et al., 1994) und Keratitis (JOSEPH & SHARMA, 2009) wurden beschrieben.

Veränderungen in Lunge (COX et al., 1979; FUENTEALBA, 1991; GRUBER et al., 2009), Leber (COX et al., 1979; FUENTEALBA et al., 1992; GRUBER et al., 2009) und Herzmuskulatur (GRUBER et al., 2009), im Magen-Darm-Trakt (GEORGE & SOMVANSI, 1987), den Mesenteriallymphknoten sowie der Milz (PERRIN, 1943; VON KÜCKEN et al., 1987; SOMVANSI et al., 1994;

LEVKUT et al., 1997) sind ebenfalls beschrieben. Die Sporen sind histologisch meist nicht mehr im entzündeten Gebiet selbst sondern eher innerhalb noch intakt wirkender Nachbarzellen zu finden (FLATT & JACKSON, 1970; SHADDUCK & PAKES, 1971; WASSON & PEPER, 2000).

3. Immunologie

Obwohl die zelluläre als auch die humorale Immunantwort an der Bekämpfung von *E. cuniculi* beteiligt sind, scheint die zelluläre Immunreaktion eine zentrale Rolle zu spielen (KAHN et al., 2001). Neben den phagozytierenden Zellen spielen v. a. die CD8(+)-T-Zellen eine signifikante Rolle (KAHN et al., 2001). Nachdem diese über mehrere Schritte über MHC-Klasse-I-Rezeptoren an der Membranoberfläche der *E.-cuniculi*-infizierten Zellen aktiviert werden, bewirken sie nach Ausschüttung von bestimmten Zytokinen eine direkte Zytolyse (KAHN et al., 2001). An der Aktivierung der CD8(+)-T-Zellen sind Makrophagen, dendritische Zellen und T-Zellen beteiligt, wobei Zytokine, u. a. IL-12, IFN- γ und IL-2, als wichtige Mediatoren fungieren (KHAN et al., 1999; EL-FAKHRI et al., 2001). Die Rolle der CD4(+)T-Zellen ist bei der *E.-cuniculi*-Immunabwehr nicht eindeutig geklärt (KHAN et al., 1999; NAAS et al., 1999; KHAN et al., 2001). Zumindest bei Menschen scheinen sie eine entscheidende Rolle zu spielen, da HIV-positive Patienten bei stark erniedrigten CD4(+)T-Zellzahlen besonders für *E.-cuniculi*- oder andere Mikrosporidien-Infektion anfällig sind (ASMUTH et al., 1994; KHAN et al., 1999; KOTLER & ORENSTEIN, 1998; KOTLER & ORENSTEIN, 1999). Laut SCHMIDT und SHADDUCK (1983) sowie DIDIER (1995) tragen die T-Zellen nicht nur direkt sondern auch als Vermittler zum Schutz gegen *E.-cuniculi*-Infektionen bei, indem sie über eine Ausschüttung von Zytokinen Makrophagen aktivieren, die letztendlich den Erreger abtöten.

Die humorale Immunabwehr führt je nach Infektionsroute zu unterschiedlichen Zeitpunkten zur Bildung von Antikörpern gegen *E. cuniculi* (WALLER et al., 1978).

So konnten WALLER und Mitarbeiter (1978) sieben bis zehn Tage nach intravenösen Sporen-Applikation die ersten Antikörper gegen *E. cuniculi* nachweisen. Maximale Antikörperkonzentrationen waren sieben bis acht Wochen *post infectionem* erreicht. Die orale Infektion mit *E.-cuniculi*-Sporen führte zwei bis drei Wochen *post infectionem* zur Antikörperbildung, wobei das Maximum

dann acht bis elf Wochen *post infectionem* erreicht war (WALLER et al., 1978). LEV (1982) wies erstmalig nach zwei bis vier Wochen nach intravenöser Infektion mit Sporen Antikörper nach mit einem Antikörpermaximum nach sechs bis acht Wochen. WOSU und Mitarbeiter (1977) fand nach interzerebralen Sporenokulation bereits ein bis zwei Wochen *post infectionem* Antikörper gegen *E.cuniculi*, mit Maximum ca. fünf Wochen *post infectionem*. Bei natürlichen Infektionen treten Antikörper vermutlich erst nach ca. sechs Wochen auf (COX et al., 1977).

Seit LEV (1982) gewinnt die Unterscheidung zwischen dem Verlauf von Immunglobulin G (IgG) und Immunglobulin M (IgM) zunehmend an Bedeutung in der Diagnostik von *E.-cuniculi*-Infektionen beim Kaninchen. Das gleichzeitige Vorhandensein von IgM- und IgG-Antikörpern spricht für das Vorliegen einer akuten Infektion (LEV, 1982). Ein IgM-Konzentrationsanstieg tritt zu Beginn der Immunantwort auf. Vier bis sechs Wochen *post infectionem* wird kein IgM mehr nachgewiesen (LEV, 1982). Die IgG-Bildung kann laut KUNSTYR und Mitarbeitern (1983) unterschiedlich verlaufen: (a) als lange Immunantwort, bei der ein IgG-Konzentrationsanstieg drei Wochen *post infectionem* beginnt und sich bis über die zehnte Woche hinaus fortsetzt, (b) als kurze Immunantwort, bei der es bereits sechs bis neun Wochen *post infectionem* zu einem IgG-Konzentrationsabfall kommt oder (c) als episodische Immunantwort, bei der zwei kurze IgG-Serokonversionen unterschieden werden, zum einen zwischen der zweiten und sechsten oder der vierten und achten Woche *post infectionem* (KUNSTYR et al., 1983). Wann welche Immunantwort auftritt ist noch unklar, man vermutet aber das Faktoren wie genetische Unterschiede, zusätzliche Infektionen, unterschiedliche Körpergewichte, vorangegangene Trächtigkeiten oder auch unterschiedliche Virulenz der Erreger eine Rolle spielen können (LEV, 1982).

Maternale Antikörper können bei Jungtieren infizierter Muttertiere nachgewiesen werden (LYNGSET, 1980; SCHARMANN et al., 1986). Die Konzentration der maternalen Antikörper sinkt etwa ab der vierten Lebenswoche und ist kurz vor dem Absetzen (ca. sechste Lebenswoche) bei null (LYNGSET, 1980; SCHARMANN et al., 1986). Die Gefahr der akuten Infektion besteht für die Jungtiere noch vor Absetzen durch das seropositive Muttertier (BYWATER & KELLET, 1979). Bei seronegativen Häsinnen ist die Infektionsgefahr erst nach

dem Absetzen gegeben, wenn die Jungtiere mit anderen Jungtieren aufgestellt werden (BYWATER & KELLET, 1979). Somit kann ein ab der achten Lebenswoche festgestellter Antikörper-Konzentrationsanstieg als Anzeichen einer akuten Infektion und Ausbildung einer aktiven Immunisierung gegen *E. cuniculi* gewertet werden (SCHARMANN et al., 1986).

Weder zelluläre noch humorale Immunantwort scheinen eine ausreichende Wirkung zu besitzen, um den Erreger zu eliminieren oder den Krankheitsverlauf der Enzephalitozoonose dauerhaft zu hemmen (WEIDNER, 1975). Antikörper gegen *E. cuniculi* wurden auch noch Jahre nach Primärinfektion nachgewiesen (CHALUPSKY et al., 1973; WOSU & SHADDUCK et al., 1977; WALLER et al., 1978; SCHARMANN et al., 1986). Das Überleben des Erregers in den Makrophagen, sowie allen anderen zur Verfügung stehenden Wirtszellen, vor allem in Gehirn (COX et al., 1979), Nieren (FLATT & JACKSON, 1975) und Augen (BUYUKMIHCI et al., 1977), wird durch die Unfähigkeit der Lysosomen, mit der parasitophoren Vakuole zu verschmelzen, ermöglicht (WEIDNER, 1975).

Der Immunstatus des Wirts scheint eine entscheidende Rolle beim Auftreten klinischer Symptome zu spielen (HORVATH et al., 1999; KOUDELA et al., 1993). So kam es bei HORVATH und Mitarbeiter (1999) nach cyclophosphamid-induzierter Immunsuppression bei *E.-cuniculi* infizierten Kaninchen zu starken Symptomen bis hin zum Tod der Tiere. Bei KOUDELA und Mitarbeiter (1993) verlief bei severe-combined-immunodeficiency-(SCID-)Mäusen die Infektion mit *E. cuniculi* tödlich. und auch bei LALLO und Mitarbeitern (2002) zeigten infizierte Mäuse nach einer Verabreichung von Kortikosteroiden in immunsupprimierender Dosierung chronische Aszites und granulomatöse Läsionen in verschiedenen Organen.

Dass Immunsuppression die Manifestation der *E.-cuniculi*-Infektion begünstigt, zeigen zahlreiche Publikationen aus der Humanmedizin, bei denen eine *E.-cuniculi*-Infektion vor allem bei HIV-Patienten im Rahmen von Transplantationen auftritt (ZENDER et al., 1989; GARVEY et al., 1995; GUNNARSON et al., 1995; FRANZEN et al., 1995; WEBER & DEPLAZES, 1995; GUNTINAS-LICHIUS, 1997; MERTENS et al., 1997; WEBER et al., 1997; GUMBO et al., 1999; DEL AGUILA et al., 2001; GAMBOA-DOMINGUEZ et al., 2003).

Die *E.-cuniculi*-Infektion selbst scheint aber auch selbst einen

immunsupprimierenden Effekt zu haben (VON KÜCKEN et al., 1987; MEYER-BRECKWOLD, 1996). So leiden Kaninchen mit Antikörpern gegen *E. cuniculi* häufiger an zusätzlichen Krankheiten als Tiere ohne Antikörper (VON KÜCKEN et al., 1987; MEYER-BRECKWOLDT, 1996). Nicht nur die durch den Erreger verursachten Schäden, sondern auch die Begünstigung von Sekundärinfektionen stellen eine Stresssituation dar (COHN, 1997). Stress führt zu einer Veränderung des Catecholamin-Spiegels im Blut und somit zu einer vermehrten Ausschüttung an endogenem Kortisol, was wiederum langfristig auch eine Beeinträchtigung des Immunsystems bewirkt (SILBERNAGEL & DESPOPOULUS, 1991; COHN, 1997). Die Vermutung liegt nahe, dass bei immunkompetenten Wirten eine Art immunologisches Gleichgewicht zwischen dem Erreger und dem Wirt entsteht (WEBER et al., 1994; SCHMIDT & SHADDUCK, 1983; DIDIER et al., 1994; DIDIER, 1998). Jegliche Art von Stress, wie beispielsweise schlechte Haltungsbedingungen, Zugluft, Ortsveränderungen, Tod eines anderen Tieres im Haushalt oder eine zusätzliche Krankheit, die das Immunsystem negativ beeinflusst, kann dieses Gleichgewicht zu Gunsten des Erregers verschieben, so dass es zum Ausbruch klinischer Symptome kommen kann (KIMMAN & AKKERMANS 1987; PACKHAM et al., 1992; MEYER-BRECKWOLDT, 1996; MÜLLER, 1998).

4. Klinik

Die Enzephalitozoonose wird als milde, chronisch verlaufende Erkrankung beschrieben, die auch ohne klinische Symptome verlaufen kann (SHADDUCK & PAKES, 1971; WILSON, 1979).

4.1. Kaninchen

Klinische Symptome entstehen in Abhängigkeit von der Lokalisation, wobei Zentralnervensystem (ZNS), Nieren und Augen besonders stark betroffen sind (COX et al., 1979; FLATT & JACKSON, 1970; WODECKI, 1995).

4.1.1. Zentralnervensystem

Es können nahezu **alle Anteile des Gehirns einschließlich des Rückenmarks** von der Infektion betroffen sein (COX & GALLICHIO, 1978; SCHARMANN et al., 1986; WICHER et al., 1991; ERÖKSÜZ et al., 1999; WASSON & PEPER, 2000; HARCOURT-BROWN, 2002; CSOKAI et al., 2009). Die häufigste

betroffene Region ist das Großhirn (Cortex und Medulla), aber entzündliche Läsionen können ebenso im Hirnstamm und Rückenmark gefunden werden, im geringeren Ausmaß im Kleinhirn. Die Leptomeninx sind auch häufig betroffen (SCHARMANN et al., 1986; CSOKAI et al., 2009). Histologisch können Läsionen meist im Gehirn und den Nieren gefunden werden, diese bestehen aus fokaler nicht-eitrige Meningoencephalitis mit Astrozytose und perivaskulären lymphozytären Infiltraten und fokal bis segmental lymphozytäre-plasmazytäre interstitielle Nephritis mit variablen Ausmaßen von Fibrosen (WASSON & PEPER, 2000). Erreger sind in diesen Bereichen der Endzündung nicht vorhanden (COX & GALLICHIO, 1978). Auch in der Studie von KÜNZEL & JOACHIM (2009) wurden die histologischen Befunde in einer Literaturstudie zusammengefasst. Das zerebrale Gewebe zeigt perivaskuläre Infiltrationen, die von diskreten Veränderungen zu nicht-eitriger, fokal oder multifokaler granulomatöser (Meningo-)Encephalitis reicht (COX & GALLICHIO, 1978; WICHER et al., 1991; ERÖKSÜZ et al., 1999; CSOKAI et al., 2009). Granulome enthalten Lymphozyten, Plasmazellen und Gliazellen und sind häufig im Zentrum nekrotisch (ERÖKSÜZ et al., 1999; HARCOURT-BROWN & HOLLOWAY, 2003). Die häufigsten vermerkten neurologischen **Symptome** sind Vestibularerkrankungen (KÜNZEL et al., 2007), wie auch in älterer Literatur berichtet wurde (KUNSTYR & NAUMANN, 1985; MEYER-BRECKWOLDT, 1996; HARCOURT-BROWN & HOLLOWAY, 2003). Diese setzten sich zusammen aus Kopfschiefhaltung (WILSON, 1979; KUNSTYR et al., 1986; NAUMANN, 1985), mit zum Teil Drehungen des Kopfes um bis zu 90 ° oder mehr nach links oder rechts bis hin zum Rollen um die Längsachse (KUNSTYR, 1986; NAUMANN & KAUP, 1986), Kreishoppeln, bis hin zum Drehen um die Längsachse, und Nystagmus (KÜNZEL et al., 2007). Bei KUNSTYR und NAUMANN (1985 und 1986) wurde die Kopfschiefhaltung, in unterschiedlicher Ausprägung bis hin zum Ophisthotonus, als Hauptsymptom der Enzephalitozoonose beschrieben. In der Studie von MEYER-BRECKWOLDT (1996) zeigten 21,4 % (18/84) der untersuchten und *E.-cuniculi*-Antikörpertiter positiven Kaninchen eine Kopfschiefhaltung, zudem wurde ein Nystagmus bei 45 % (8/18) von diesen Tieren beobachtet (MEYER-BRECKWOLDT, 1996). Bei EWRINGMANN und GÖBEL (1999) zeigten mehr als 61 % (17/28) der Kaninchen mit ZNS-Form der Enzephalitozoonose eine Kopfschiefhaltung und einen Nystagmus, nur bei 39% (11/28) wurden Paresen festgestellt. Eine Studie

von HARCOURT-BROWN und HOLLOWAY (2003) zeigt eine Häufigkeit der Kopfschiefhaltung von 91 % (21/23). In neueren Studien wird das Symptom der Kopfschiefhaltung bei Kaninchen mit Enzephalitozoonoseverdacht und neurologischen Symptomen mit Häufigkeiten von 88 % (95/108) (KÜNZEL et al., 2008), 89 % (111/124) (FLOCK, 2010) bis hin zu 95 % (20/21) (JASS, 2004) angegeben. Bei KÜNZEL und Mitarbeitern (2008) wird zudem ein Nystagmus in Kombination mit einer Kopfschiefhaltung bei einer Häufigkeit von 28 % (27/95) vermerkt.

Paresen oder Paralysen betreffen meist die Hintergliedmaßen, können sich aber auch im weiteren Verlauf auf die Vordergliedmaßen ausbreiten, wo es zum Ausgrätschen in verschiedenen Ausmaßen kommen kann (KUNSYR & NAUMANN, 1985; EWRINGMANN & GÖBEL, 1998). Sie sind als Schädigung des Rückenmarkes anzusehen (WRIGHT & CRAIGHEAD, 1922; COX & WALDEN, 1972; KIMMAN & AKKERMANS 1987; EWRINGMANN & GÖBEL, 1999). Bei EWRINGMANN und GÖBEL (1999) zeigten lediglich 39 % (11/28) der Kaninchen mit neurologischen Symptomen und Enzephalitozoonose-Verdacht Paresen, bei JASS (2004) waren es nur 5 % (1/21) der *E.-cuniculi*-verdächtigen Kaninchen. In der Studie von FLOCK (2010) zeigten 19 % (24/124) der Kaninchen mit Enzephalitozoonose-Verdacht das Symptom der Parese.

Selten tritt eine Kombination von Vestibularsyndrom und Paresen auf (SOMVANSI et al., 1994), was auch die Studie von FLOCK (2010) zeigt. In der Studie zeigten lediglich 18 % (11/124) der Kaninchen mit Enzephalitozoonose-Verdacht und positivem *E.-cuniculi*-Antikörper-Titer eine Kombination von Vestibularsyndrom und Parese (FLOCK, 2010).

4.1.2. Nieren

Histologisch zeigt sich eine fokale bis segmentale lymphozyto-plasmazytäre interstitielle Nephritis mit variablen Ausmaßen von Fibrose ohne Nachweis des Erregers in den Entzündungsbereichen (COX & GALLICHIO, 1978). Als Symptome der geschädigten Nieren infolge einer Enzephalitozoonose werden häufig Anzeichen einer Niereninsuffizienz wie Polyurie, Polydipsie, Pollakisurie und Azotämie (KÜNZEL et al., 2007). Bei EWRINGMANN & GÖBEL (1999) zeigten 16,8% (21/125) der seropositiven Kaninchen eine erhöhte Harnstoffkonzentration sowie eine erhöhte Kreatininaktivität im Blut. Als weitere

Laborbefunde konnten bei diesen Tieren eine Hyperkaliämie bei 62 % (13/21), eine Hyponatriämie bei 52 % (11/21) und/oder eine Anämie bei 29 % (6/21) festgestellt werden. Desweiteren wurde mittels einer Röntgenuntersuchung bei 19 % (4/21) deutliche Mineralisierungsstörungen aufgezeigt werden, die sich bei zwei Tieren aus dieser Gruppe in der pathologischen Untersuchung als sekundäre renale Osteodystrophie diagnostiziert werden konnte. Bei FLOCK (2010) konnte bei 46 % (12/26) enzephalitozoonoseverdächtiger Kaninchen eine Azotämie festgestellt werden, 54 % (14/26) zeigten Polyurie und Polydipsie als Hauptsymptom. Insgesamt wurden Niereninsuffizienzen bei 18% (26/144) der enzephalitozoonoseverdächtigen Kaninchen dokumentiert (FLOCK, 2010). Die Mehrheit der Fälle mit chronischer interstitieller Nephritis aufgrund einer Infektion mit *E. cuniculi* sind subklinisch (KÜNZEL & JOACHIM, 2009). Die Kaninchen zeigen häufig unspezifische Symptome wie Inappetenz, Gewichtsverlust, Lethargie und Dehydratation (EWRINGMANN & GÖBEL, 1999; HARCOURT-BROWN & HOLLOWAY, 2003, KÜNZEL et al., 2008). Bei KÜNZEL und Mitarbeitern wurden diese enzephalitozoonoseverdächtigen Kaninchen durch die Ermittlung des Vorliegens einer Azotämie aufgedeckt.

4.1.2. Augen

Die Augenveränderungen bei Kaninchen mit Enzephalitozoonose-Verdacht werden in den aktuelleren Studien mit Häufigkeiten von 8 % (10/125) (EWRINGMANN & GÖBEL, 1999), 10 % (9/87)(HARCOURT-BROWN & HOLLOWAY, 2003), 17 % (25/144) (KÜNZEL, 2008) und 11 % (16/144) (FLOCK, 2010) benannt. Die Symptome variieren je nach Studie, wobei immer als Hauptsymptom die phakoklastische Uveitis genannt wird (KÜNZEL & JOACHIM, 2009). Die Mehrheit der betroffenen Kaninchen sind Jungtiere (WOLFER et al., 1993; KÜNZEL et al., 2008). Augenveränderungen treten in der Regel einseitig auf, beidseitiges Auftreten ist eher seltener (ASHTON et al., 1976; HARCOURT-BROWN & HOLLOWAY, 2003). Häufig berichten die Besitzer über eine sichtbare weiße Masse im Auge (EWRINGMANN & GÖBEL, 1999; GIORDANO et al., 2005).

In der Studie von EWRINGMANN und GÖBEL (1999) zeigten die seropositiven Kaninchen mit Augenveränderungen unterschiedliche Ausprägungen der phakoklastischen Uveitis. Die Besitzer berichteten bei (7/10) über plötzlich aufgetretene weiße Massen im Auge, wobei die Tiere keinerlei

Verhaltensänderungen oder Störungen des Allgemeinbefindens aufwiesen. Die Augen selbst erschienen völlig reaktionslos. Während bei sechs Kaninchen (6/10) die Veränderungen einseitig waren, waren beide Augen bei einem Kaninchen betroffen. Weitere Begleitsymptome am betroffenen Auge waren eine deutliche Iritis mit starker Gefäßinjektion, Konjunktivitis. Bei einem Kaninchen trat eine Keratokonjunktivitis mit Korneaödem auf (EWRINGMANN & GÖBEL, 1999). Die Kaninchen in der Studie von HARCOURT-BROWN und HOLLOWAY (2003) Katarakt, Uveitis und Hypopyon (Eiteransammlungen in der vorderen Augenkammer). Bei KÜNZEL und Mitarbeitern (2008) zeigten 80% (20/25) Katarakt, 64 % (16/25) weiße intraokulare Massen (Granulome) und/oder 84 % (21/25) eine Uveitis. Eine Kombination dieser drei ophthalmologischer Symptome wurde bei 64 % (16/25) diagnostiziert. Bei allen Patienten zeigten sich einseitige Augenprobleme (KÜNZEL et al., 2008). In der Studie von FLOCK (2010) wurden Symptome wie Uveitis bei 44% (7/16), Kornealer Ulcus bei 56% (9/16) und Konjunktivitis bei 31 % (5/16) dokumentiert.

4.2. Hund

Studien über die *E.-cuniculi*-Infektion beim Hunden ergaben Prävalenzen in Norwegen 0% (0/1104; AKERSTEDT, 2003), England 13,3 % (33/248; HOLLISTER et al., 1989), Südafrika 18 % (40/220; STEWART et al., 1979), USA 21,6 % (27/125; CRAY & RIVAS, 2013), Japan 21,8% (103/472; SASAKI et al., 2011) und Slowakei 37,8 % (73/193; HALANOVA et al., 2003). Bei Hunden wird zumeist der *E.-cuniculi*-Genotyp III nachgewiesen (DIDIER et al., 1996; SNOWDEN, et al., 2009). Die transplazentare Übertragung gilt beim Hund als der wichtigste Übertragungsweg (MOHN et al., 1974).

In einer Studie von SNOWDEN und Mitarbeitern (2009) wurden 19 Hunde mit Enzephalitozoonoseverdacht pathologisch untersucht. Davon zeigten vorberichtlich 17 Hunde progressiv fortschreitende neurologische Symptome innerhalb von 4 Tagen bis 2 Wochen. Meist wurden Symptome wie reduziertes Allgemeinbefinden, Inappetenz, Gewichtsverlust, Ataxie, Hypermetrie, zentrale Blindheit und Kreislaufen genannt. Histopathologisch waren die Befunde sehr ähnlich bei allen 19 untersuchten Hunden (SNOWDEN et al., 2009) und belegten in allen Fällen das bereits in der älteren Literatur als „Encephalitis-Nephritis-Syndrom“ bezeichnete Bild (PLOWRIGHT 1952; SHADDUCK et al., 1978; DIDIER et al., 2006). Die Nieren zeigten sich in der pathologischen Untersuchung

als das Hauptorgan der Läsionen. Hierbei zeigten sich Verlust der normalen Rinden und Mark Struktur mit extensiven interstitiellen Ansammlungen von Lymphozyten und Plasmazellen, sowie viele Makrophagen und fokale Einblutungen oder Nekrosen. Kleine Erreger – die *E. cuniculi* morphologisch ähnelten – waren weit verteilt im Schwerpunkt der Entzündung oder im Zytoplasma der renalen Tubulusepithelzellen. Das Gehirn war das zweite Organ mit signifikanten Veränderungen. Läsionen waren sowohl in der grauen wie in der weißen Substanz auffindbar ohne feststellbare regionale Verteilung. Eine diffuse, lymphozytäre und plasmazytäre Enzephalitis wurde dokumentiert mit einem Bereich aber nicht ausschließlich perivaskulärer Verteilung. Perivaskuläre Ansammlungen von Lymphozyten und Plasmazellen sowie Makrophagen konnten ebenfalls dokumentiert werden (SNOWDEN et al., 2009).

In den Studien von ARNESEN und NORSTOGA (1977) wurden Augenveränderungen wie schwere Kataraktformationen, entzündliche vaskuläre Läsionen in den hinteren Ziliararterien und nekrotische Bereiche der Retina beschrieben.

4.3. Katze

Nach experimenteller Infektion können Läsionen in den Nieren und Gehirn dokumentiert werden (PANG & SHADDUCK, 1985). In der älteren Literatur finden sich nur zwei Fallberichte über die klinische Form der Enzephalitozoonose bei Katzen, wobei es bei diesen Berichten zu keiner eindeutigen Erregerbestimmung gekommen ist (VAN RENSBURG & DU PLESSIS, 1971; BUYUKMIHCI et al., 1977). In dem einen Fall handelte es sich um eine generalisierte Infektion, die zu neurologischen Ausfällen führte und Läsionen im Gehirn und den Nieren hinterließ, die denen von *E. cuniculi* entsprechen. Desweiteren fanden sich *Encephalitozoon*-artige Sporen im Gehirn, den Nieren, der Milz und einigen Lymphknoten (VAN RENSBURG & DU PLESSIS, 1971). Der andere Fallbericht, diesmal von BUYUKMICI und Mitarbeiter (1977), handelte von einer 3-jährige Katze mit einem Blepharospasmus, sowie einer Keratitis, Konjunktivitis und einer Uveitis anterior. Bei dieser Katze konnten außerdem zahlreiche Mikrosporidien-Sporen nachgewiesen werden, die morphologische Ähnlichkeit zu *E. cuniculi* vorweisen konnten (BUYUKMIHCI et al., 1977).

In einer neueren Studie von BENZ und Mitarbeitern (2011) wurde bei 19 Augen von 11 untersuchten Katzen *E. cuniculi* als Ursache für fokalen, vorderen, kortikalen Katarakt und anteriorer Uveitis nachgewiesen werden. Laut BENZ und Mitarbeiter wird eine horizontale Übertragung – oral und nasal – von einem Tier aufs andere Tier angenommen, wie bei anderen Tierarten beschrieben (WASSON & PEPER, 2000). Allerdings wird eine vertikale Übertragung als hauptsächlicher Weg bei Augensymptomen diskutiert, wobei der exakte Zeitpunkt der Infektion mit *E. cuniculi* während der Trächtigkeit bei Kaninchen und Katzen unbekannt ist, da es hierrüber keinerlei Studie gibt (BENZ et al., 2011). Es wird angenommen, dass während der embryonalen Entwicklung von der Imaginalscheibe zur Linsenkapsel der Erreger die Möglichkeit hat, in die Linse einzutreten, was allerdings auch noch nicht durch Studien bestätigt werden konnte (BENZ et al., 2011).

4.4. Mensch

Seit der Mitte der 80iger Jahre wurde die Enzephalitozoonose selten dokumentiert und trat gewöhnlich in Verbindung mit immuninkompetenten Kindern auf, die neurologische Symptome zeigten (MATSUBYASCHI et al., 1959; BERGQUIST et al., 1984). Mit dem vermehrten Auftreten von HIV und der Entwicklung ausgereifterer Diagnostikmöglichkeiten, stieg das Spektrum von Mikrosporidien an, eine verbreiterte Infektion von Menschen und Berichte von Menschen, die infiziert wurden, trat auf (WASSON & PEPER, 2000).

Die meisten dokumentierten Fälle von klinischer Infektion mit *E. cuniculi* werden bei immunsuppressiven Personen beschrieben (MERTENS et al., 1997; TOSONI et al., 2002; WEBER et al., 1997). Meist ist der *E. cuniculi* Genotyp III (Hundetyp) die Ursache für symptomatische Infektion (DIDIER et al., 1996; SNOWDEN et al., 1999; TOSONI et al., 2002). Aber auch der Genotyp I (Kaninentyp) kann sowohl in erkrankten Menschen (DEPLAZES et al., 1996) als auch in Gesunden (SAK et al., 2011) nachgewiesen werden.

Bei Menschen mit Immunsuppression, z.B. bei AIDS-Patienten, kann es zu chronischen Durchfällen und Malabsorptionen kommen (WAYWA et al., 2001). Aber auch Gewichtsverlust bis hin zur erhöhten Sterblichkeit wurden beschrieben (WAYWA et al., 2001). Immunkompetente Menschen haben eher milde bis selbstlimitierende Erkrankungen (WAYWA et al., 2001; TUMWINE et al., 2005; NKININ et al., 2007; SAMIE et al., 2007).

In einem Fallbericht von DITRICH und Mitarbeitern (2011) wurde ein Patient mit geschwächtem Immunsystem und Typ II Diabetes vorgestellt. Seine initialen Symptome reichten von generalisierten Krämpfen über anhaltender Lähmung der linken Seite bis hin zur Wahrnehmungsbeeinträchtigung mit Fiebersymptomatik. Nach der ersten Verdachtsdiagnose virale Enzephalitis mit Sinusitis verschlimmerten sich die neurologischen Symptome bis hin zum Status epilepticus, so dass er intubiert und künstlich beatmet werden musste. Verbesserte die Symptome nach Intensivstation und –Management und erholte sich bis auf milde Symptome in den linken Extremitäten. In Kontroll-CTs konnte ein Abszess im Gehirn nachgewiesen werden, durch Punktion und Anzuchtung sowie PCR-Untersuchung konnte neben *Streptococcus intermedius* auch *E. cuniculi* Genotyp I als Ursache identifiziert werden (DITRICH et al., 2011).

Neben Symptomen des Magen-Darm-Traktes oder neurologischen Symptomen wurden auch Fälle mit Keratokonjunktivitis, Keratitis, Uveitis und Endophthalmitis bei immungeschwächten Patienten beschrieben (PINNOLIS et al., 1981; FRIEDBERG et al., 1990; MIETZ et al., 2002; YOKEN et al., 2002; FRONT et al., 2003; RAUZ et al., 2004; KODIJKIAN et al., 2005).

4.5. Andere Säugetiere

Neben Kaninchen, Hunden, Katzen und Menschen, können auch andere Säugetiere durch *E. cuniculi* infiziert werden (PERRIN, 1942; WAN et al., 1996; FOX et al., 2002; GAVIER-WIDEN et al., 2004). Beim Meerschweinchen verlaufen Infektionen mit *E. cuniculi* in der Regel subklinisch ab (FOX et al., 2002). Allerdings konnten auch multifokale Nekrosen vom Gehirn mit granulomatöser Enzephalitis und interstitieller Nephritis mit Tubulusnekrosen, Regeneration und Fibrose nachgewiesen werden (WAN et al., 1996). Bei **Mäusen, Ratten und anderen Nagern** sind die klinischen Symptome abhängig vom Immunstatus. Während immunkompetente Mäuse einen subklinischen Infekt durchleben (GANNON, 1980), kommt es bei immunsuppressiven Mäusen (SICD) zu Lethargie, Verfall und Tod (PERRIN, 1942). **Nerze** zeigen sowohl neurologische Symptome (GAVIER-WIDEN et al., 2004) als auch Augenveränderungen (BJERKAS, 1990). Zu den neurologischen Symptomen zählen Unruhe, Schütteln, Tremor bis hin zu Krämpfen, Ataxie, nicht Stillstehen, Schreien und Speicheln. Der Appetit scheint unbeeinträchtigt, aber eingeschränkt durch den Tremor (GAVIER-WIDEN et al., 2004). Im Endstadium sind die

infizierten Nerze paraplegisch und geräuschempfindlich (GAVIER-WIDEN et al., 2004). Eine Erholung von den neurologischen Symptomen ist möglich. Die intrauterine Infektion mit *E. cuniculi* wird als Übertragungsweg bei jungen **Füchsen** angesehen (MOHN et al., 1974). Klinische Symptome sind reduzierter Appetit und Kümmerer, Ataxie, Tremor, Schwäche in der Hinterhand und Blindheit mit der Steigerung zum Kreislaufen, aggressiven Verhaltens und Krämpfen (McINNES & STEWART, 1991; SZABO & SHADDUCK, 1987).

4.6. Vögel

Derzeit laufen viele Studien, in denen Kotproben von verschiedenen Vogelpopulationen, wie z. B. von Tauben (HARO et al., 2004; BART et al., 2008) untersucht werden. *E. cuniculi* konnte bisher bei Wellensittichen (SAK et al., 2010), Geierfalken (MALCEKOVA et al., 2011), Nymphensittichen (KASICKOVA et al., 2007) sowie weiteren Papageien, Kanarien- und Taubenvögeln (KASICKOVA et al., 2009) nachgewiesen werden. Während bei MALCEKOVA und Mitarbeitern (2011) nur der Genotyp II eine Rolle spielte, differenzierten KASICKOVA und Mitarbeiter (2009) nochmals zwischen den Genotypen I 2,4 % (7/287), Genotyp II 8 % (23/287) und Genotyp III 0,7 % (2/287). Allerdings konnten trotz chronischer Infektion keine Krankheitsanzeichen während der Überwachung der Vögel und auch keine Veränderungen in der Sektion nachgewiesen werden (SAK et al., 2010). Somit stellen auch Vögel ein Microsporidien-Reservoir dar, welches vor allem bei der Infektion beim Menschen berücksichtigt werden sollte (KASICKOVA et al., 2009). In einer älteren Studie wurden klinische Symptome wie Anorexie, Lethargie und Entwicklungsstörungen beobachtet, wobei *E. cuniculi* nie der alleinige Erreger bei diesen Vögeln war (BLACK et al., 1997).

5. Diagnostik

Zum Nachweis einer klinisch manifesten Enzephalitozoonose stehen sowohl direkte als auch indirekte Nachweisverfahren zur Verfügung, wobei eine Kombination zur eindeutigen Diagnosefindung ratsam ist (KÜNZEL et al., 2007).

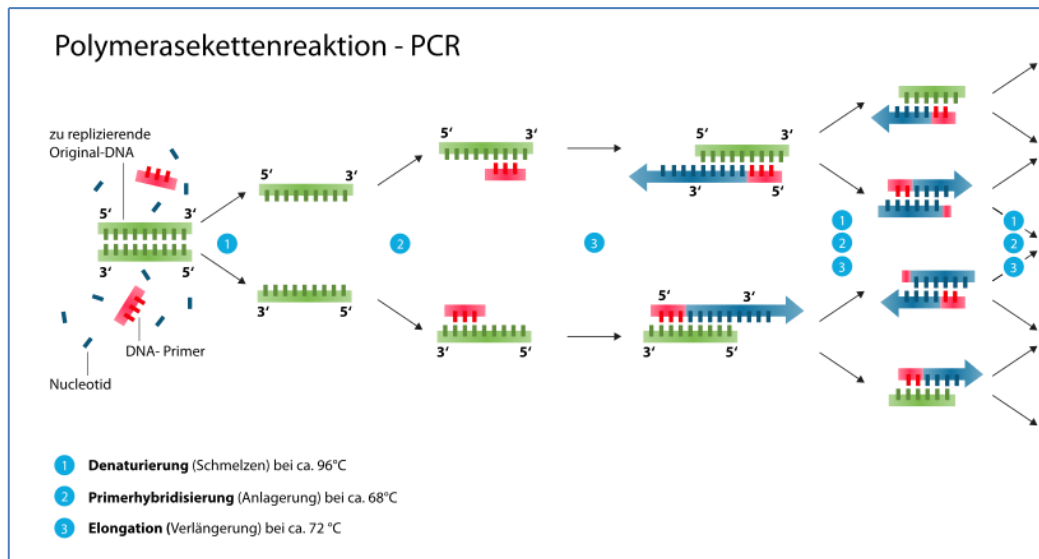
5.1. Direkte Nachweisverfahren

Zu den direkten Nachweisverfahren gehören neben der Polymerasekettenreaktion (PCR) (JASS et al., 2006; CSOKAI et al., 2009), der Sporennachweis mittels

Trichromfärbung (COX & GALLICHIO, 1978; SCHARMANN et al., 1986; CSOKAI et al., 2009) sowie die morphologisch und neuropathologische Untersuchung (DIDIER et al., 1995; COX & GALLICHIO, 1978; CSOKAI et al., 2009).

5.1.1. Polymerasekettenreaktion

Immer häufiger wird versucht mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) die Enzephalitozoonose nachzuweisen (JASS, 2004 und 2006; KÜNZEL et al., 2008). Für diese Methode wurden von mehreren Autoren unterschiedliche Primer-Sets entwickelt und getestet, um eine eindeutige Zuordnung zu Mikrosporidien oder auch direkt zur Identifikation von *E. cuniculi* zu ermöglichen (FEDORKO et al., 1995; DIDIER et al., 1996; FRANZEN et al., 1998; FURUYA et al., 2001). Bei der Durchführung wird zunächst die zu amplifizierenden DNA aus der zu untersuchenden Probe extrahiert. Die Isolierung kann mit z. B. QIAmp DNA Mini KitTM von QIAGEN (Deutschland), einer speziellen DNA-bindenden Silikamembran, in mehreren Waschschritten erfolgen. Der als Matrize vorhandene DNA-Doppelstrang wird zunächst durch Erhitzung denaturiert und somit in seine Einzelstränge aufgetrennt. Im sog. Annealing erfolgt die Hybridisierung der Starter (Primer) an die komplementären Einzelstränge. Die kurzen doppelsträngigen Abschnitte dienen nun als Startstelle zur Polymerisierung zum erneuten DNA-Doppelstrang mittels vorhandener dNTPs und Polymerase-Enzym. Die PCR kann nun beliebig oft wiederholt werden (Reaktionszyklus), indem zunächst die Doppelstränge durch Erhitzung in die Einzelstränge aufgeteilt werden und nach erneutem Annealing eine Verdopplung der Matrize erfolgen kann. Letztendlich führt der Vorgang zur exponentiellen Anreicherung der zwischen den Primern liegenden DNA-Sequenz. Die amplifizierten Produkte können anschließend auf ein Agarosegel aufgetragen, mittels Elektrophorese kammer aufgetrennt und durch z. B. Ethidiumbromid im UV-Licht durch Fluoreszenz sichtbar gemacht werden (KATZWINKEL-WLADARSCHE et al., 1996).



Schematische Darstellung der Polymerasekettenreaktion (KLEPPE et al., 1971)

Die PCR ermöglicht eine schnelle und sichere Speziesdifferenzierung. Es können Sequenzen von Erbinformation gezielt vervielfältigt werden und nach Gelelektrophorese mit bekannten Mustern verglichen werden. Somit können auch kleinste Mengen auch an fraktionierter DNA sicher nachgewiesen und die Subtypen von *E. cuniculi* identifiziert werden (VOSSBRINCK et al., 1993; WEBER et al., 1994; DIDIER et al., 1995; WEITZEL et al., 2001). Eine Einschränkung dieser Methode ist, dass keinerlei Korrelation zwischen DNA-Präsenz und Erkrankung besteht und bei klinisch kranken Tieren, die PCR auch negativ ausfallen kann (JASS et al., 2006; CSOKAI et al., 2009). Somit zeigten bei JASS (2004) nur 2 von 19 Tieren (10,5 %) einen positiven DNA-Nachweis mittels PCR, aber 11 der 19 euthanasierten Tiere waren in der histopathologischen Untersuchung positiv. Somit ist der Nachweis weniger sensitiv als die histopathologische Sporenidentifikation, was auch CSOKAI (2009) dokumentieren konnte.

Beschrieben ist der Nachweis von *E.-cuniculi*-Antigen mittels PCR bisher in Urin (JASS, 2004), Liquor (JASS, 2004) und Linsenmaterial (JASS, 2004; KÜNZEL et al., 2008.). Die PCR aus Linsenmaterial hat laut KÜNZEL und Mitarbeitern (2008) die beste Aussagekraft. So wurden in der Studie von KÜNZEL und Mitarbeitern bei 32 Kaninchen Urin, bei 12 Tieren Liquor und bei 5 Kaninchen Linsenmaterial mittels PCR untersucht. Weder im Urin noch im Liquor konnte *E.-cuniculi*-Antigen nachgewiesen werden. Lediglich bei 4 von 5 Kaninchen waren

die PCR Untersuchungen auf *E. cuniculi*-Antigen positiv im untersuchten Linsenmaterial.

Durch eine manuelle Entleerung der Blase oder mittels Zystozentese wurde die DNA aus dem Urin extrahiert und mittels PCR amplifiziert (DE GROOTE et al., 1995; KATZWINKEL-WLADARSCH et al., 1996; FRANZEN et al., 1998). Bei JASS und Mitarbeitern (2004) waren nur 40 % (15/38) der untersuchten enzephalitozoonoseverdächtigen Kaninchen in der Urin-PCR positiv. KÜNZEL und Mitarbeitern (2009) gelang dies bei keinem der 32 getesteten Kaninchen. Zudem konnten bei nur zwei von 19 Liquorproben in der Studie von JASS (2004) *E. cuniculi* mittels PCR nachgewiesen werden, wobei sich im histopathologischen Präparat bei weiteren elf Kaninchen das für *E. cuniculi* charakteristische Entzündungsbild im Gehirn oder Rückenmark, sowie bei acht Tieren sog Pseudozysten mit Sporen nachgewiesen werden konnte.

Lediglich aus Linsen nach Phacoemulsifikation kann sicher zu untersuchendes Erreger-Material für die PCR und somit zur 100%igen Identifikation von *E. cuniculi* bei Kaninchen mit phakoklastischer Uveitis (KÜNZEL et al., 2008; CSOKAI et al., 2009) gewonnen werden.

5.1.2. Morphologische und neuropathologische-Untersuchung

Die elektronenmikroskopische Untersuchung von Organproben gilt immer noch als „Gold-Standard“ in der *E.-cuniculi*-Diagnostik (DIDIER et al., 1995, KOTLER & ORENSTEIN, 1998; WASSON & PEPER, 2000) kann aber erst *post mortem* durchgeführt werden (COX et al., 1979). Bei dieser Untersuchung werden Organproben von Gehirn oder Nieren zunächst in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet (COX & GALLICHIO, 1977). Aus diesen Proben werden Ultradünnschnitte angefertigt, die unter dem Elektronenmikroskop untersucht werden können. Es kann auch Goldstaub eingesetzt werden, um die Sporen besonders hervorzuheben. Nun kann aufgrund bestimmter morphologischer Kriterien die jeweiligen Sporen spezies-spezifisch differenziert werden. Die Anzahl der Windungen des Polschlauchs, die Kernzahl der reifen Spore etc. lassen es manchmal zu, die Erreger zu einer Gattung oder sogar einer einzelnen Art zuzuordnen (COX & GALLICHIO, 1977; CANNING & LOM, 1986; CALI et al., 1991).

Laut COX und GALLICHIO (1978) können *E.-cuniculi*-Sporen histologisch bereits vier Wochen *post infectionem* in den Nieren und acht Wochen *post*

infectionem im Gehirn nachgewiesen werden (COX & GALLICHIO, 1978). Bei natürlich infizierten Tieren sind Sporen des Erregers eher in den Nieren als im Gehirn auffindbar (CSOKAI et al., 2009). Eine Differenzierung zwischen *E. cuniculi* und *E. hellem*, die v. a. in der Humanmedizin von Bedeutung ist, ist mit der elektronenmikroskopischen Untersuchung allerdings nicht möglich (DIDIER et al., 1991). Eine Übereinstimmung von positiven Ergebnissen in serologischer und histologischer Untersuchung (WALLER, 1977; COX & GALLICHIO, 1977; KUNSTYR et al., 1986; SCHARMANN et al., 1986) ist stark davon abhängig, wann die Proben untersucht werden, da Antikörper früher nachweisbar sind als histologisch Sporen (PAKES et al., 1984).

5.1.3. Sporennachweis im Urin

Es gibt verschiedene Methoden Sporen im Urin nach zu weisen, wie z. B. speziell gefärbte Ausstriche, direkt unter dem Elektronenmikroskop (WILSON, 1979), dem Phasenkontrastmikroskop (VON KÜCKEN et al., 1994) oder mittels Immunfluoreszenz (COX & PYE, 1975; COX et al., 1977). Für den Sporennachweis wird Urin durch manuelle Blasenentleerung oder mittels Zystozentese gewonnen. Aufgrund des alkalischen pH-Wertes scheiden Kaninchen große Mengen anorganischer Kristalle, primär Kalziumoxalat- und Kalziumphosphatkristalle aus, die den Nachweis von Zellen und Organismen erheblich einschränken. Somit muss der Urin zunächst zentrifugiert, der Überstand abdekantiert und das Sediment anschließend auf einem Objektträger ausgestrichen werden. Der Sporennachweis erfolgt dann nach spezieller Färbung (GOODMAN & GARNER, 1972; WEBER et al., 1992; MOURA et al., 1996; GREEN et al., 2000).

Häufig werden modifizierte Trichrom-Färbungen und Einsatz von fluoreszierenden Stoffen durchgeführt (WEBER et al., 1992; DIDIER et al., 2000). Der Vorteil dieser Methode liegt daran, dass es am lebenden Tier erfolgen kann und leicht durchzuführen ist. Negative Befunde schließen wegen der inkonstanten Sporenausscheidung über den Urin eine Infektion aber nicht aus (PYE & COX, 1977).

Die Ausscheidung der Sporen über den Urin erfolgt in der Regel drei bis fünf Wochen *post infectionem* (COX & GALLICHIO, 1978; SCHARMANN et al., 1986). Die Sporenausscheidung erfolgt intermittierend (COX et al., 1979;

CSOKAI et al., 2009). Die Sporenausscheidung erreicht zwischen Tag 38 und 63 *post infectionem* ein Maximum von bis zu 10^4 Sporen/ml (COX & PYE, 1975; COX et al., 1979). Nach dem 63. Tag *post infectionem* geht die Sporenausscheidung deutlich zurück, so dass ab dem 98. Tag *post infectionem* keine Sporen mehr nachgewiesen werden konnten bei COX und Mitarbeitern (1979).

5.2. Indirekte Nachweisverfahren

Zu den indirekten Nachweisverfahren gehören neben der serologischen Untersuchung (COX, 1979; SCHARMANN et al., 1986, MEYER-BRECKWOLDT, 1996; EWRINGMANN & GÖBEL, 1999; KÜNZEL et al., 2008) die Liquoruntersuchung (JASS et al., 2004 & 2006).

5.2.1. Serologische Untersuchung

Der Nachweis von *E.-cuniculi*-Antikörpern kann mittels Immunfluoreszenz-Antikörper-Tests (IFAT), Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (BOOT et al., 2000; JORDAN et al., 2006) oder Carbonimmunoassay (CIA) (MEYER-BRECKWOLDT, 1996) erfolgen. Bei dem IFAT werden in Kultur gezüchtete *E.-cuniculi*-Sporen gereinigt und auf einen Objektträger aufgetragen, getrocknet und fixiert (CHALUPSKY, 1971; CHALUPSKY et al., 1973; COX & PYE, 1975). Das zu prüfende Serum wird in unterschiedlichen Verdünnungsstufen zu den auf dem Objektträger fixierten Sporen aufgetragen. Nach einer gewissen Reaktionszeit werden die nicht am Antigen gebundenen Antikörper abgewaschen. Im nächsten Schritt werden Antikörper hinzugefügt, die zum einen gegen die aufgetragenen Serumantikörper wirken und zum anderen einen fluoreszierenden Farbstoff angekoppelt haben. Das Ergebnis kann nun mittels Fluoreszenzmikroskop beurteilt werden. Die höchste Verdünnungsstufe, bei der noch eine positive Reaktion auftritt, wird als Ergebnis angegeben (B. 1:1280). Positiv bedeutet in dem Fall, dass die Sporen grün-gelb leuchtend dargestellt werden. Ein negatives Ergebnis ist dann vorhanden, wenn sich die Sporen purpurrot anfärben ohne zu leuchten (CHALUPSKY, 1971; CHALUPSKY et al., 1973; COX & PYE, 1975).

Der Antikörper-ELISA nutzt ein bekanntes Antigen und Detektor-Antikörper, die spezifisch am zu untersuchenden Antikörper binden können. Zunächst wird das Antigen an eine feste Phase, z. B. Mikrotiterplatte, fixiert. Anschließend wird die

Probe mit dem zu untersuchenden Antikörper hinzugefügt und inkubiert. Die Platte wird gewaschen und die nicht gebundenen Antikörper der Probe entfernt. Zurück bleiben nur das Antigen und die daran gebundenen Antikörper. Im nächsten Schritt werden Detektions-Antikörper hinzugegeben, der sich am gebundenen Antigen festsetzen können. Nach einer erneuten Waschung können die im Serum vorkommenden Antikörper detektiert und quantifiziert werden (COX et al., 1981; MÜLLER, 1998).

In einer Vergleichsstudie wurde der Nachweis von Antikörpern mittels ELISA als 10mal sensitiver als mittels IFAT bewertet (COX et al., 1981). Eine weitere Vergleichsstudie ergab mittels ELISA zum Teil höhere Antikörper-Titer als beim IFAT bei chronischer Infektion (MÜLLER, 1998). Die Ergebnisse des ELISA stimmten in dieser Studie mit denen vom IFAT zu 98,2 % überein, so dass der ELISA als zuverlässiger Test bewertet werden konnte (MÜLLER, 1998).

Bei dem CIA oder auch sog. „Tusche“-Test wird die Fähigkeit spezieller Schwarztusche an IgG zu binden ausgenutzt (GECK, 1971; WALLER, 1977). Diese Methode wurde 1971 von GECK zur Identifizierung von Enterobacteriaceae beschrieben und 1977 von WALLER zum Nachweis von *E.-cuniculi*-Antikörper weiterentwickelt. Nach Waller (1977) wird 1 Tropfen Blut auf Filterpapier gebunden und mit 1 ml einer salinen gepufferten Phosphatlösung herausgelöst. Das gewonnene Extrakt wird im Wasserbad erhitzt und anschließend zentrifugiert. Der Überstand wird zur weiteren Untersuchung verwendet. Für eine Testdurchführung ist eine Verdünnung von 1:10 notwendig. Dann gibt man 10 µl der verdünnten *E.-cuniculi*-Antigen-Suspension auf einen Objektträger und lässt alles trocknen. Zusätzlich werden 10 µl inaktive Antikörper-Suspension und 20 µl Tusche-Suspension hinzugefügt. Da sich die Tusche an die gebundenen Antikörper bindet, kann nach Spülung und Trocknung eine lichtmikroskopische Beurteilung erfolgen (WALLER, 1977, KELLET & BYWATER, 1978). Ein positives Ergebnis liegt dann vor, wenn eine Schwarzfärbung der *E.-cuniculi*-Sporen ab einer Verdünnung von 1:25 vorhanden ist (WALLER, 1979). Diese Methode gilt als schnell, einfach und sehr spezifisch. Der „Tusche“-Test wurde auch schon empfindlicher als IFAT beurteilt (LEV, 1982). Der Nachteil der Methode liegt darin, dass nur IgG nachgewiesen werden und keine quantitative Bestimmung möglich ist. Bei noch kürzlich neu infizierten Tieren und negativem „Tusche“-Test wird eine Wiederholung des Tests nach zwei

bis vier Wochen empfohlen (WALLER et al., 1978; WALLER & BERGQUIST, 1982).

5.2.2. Liquoruntersuchung

Neben dem Sporennachweis mittels PCR (s. o.) kann Liquor auch auf Zellzahl, Zelldifferenzierung und Proteingehalt bei Kaninchen mit Enzephalitozoonose-Verdacht untersucht (JASS, 2004). Nach JASS (2004) wird das zu untersuchende Tier unter Vollnarkose in Seitenlage gebracht und der Kopf im 90°-Winkel zur Wirbelsäule abgeknickt. Nach Desinfektion erfolgt die Punktion der Zisterna Magna. In der Studie von JASS (2004) war die Leukozytenzahl bei neurologisch erkrankten Kaninchen (Median 15,3 Leukozyten/ μ l) deutlich höher als bei gesunden Tieren (Median 1,5 Leukozyten/ μ l). Ebenso der Proteingehalt zeigte signifikante Unterschiede (Median 0,69 g/l bei den kranken Tieren, 0,24 g/l bei den gesunden Tieren). Die bei der Zellbeurteilung auffällige Pleozytose muss allerdings kritisch gewertet werden, da diese Zellveränderungen nicht spezifisch für *E. cuniculi* ist (JASS, 2004).

5.3. Differentialdiagnosen beim Kaninchen

Die klinischen Symptome der Enzephalitozoonose beim Kaninchen lassen zunächst viele verschiedene Erkrankungen in Betracht ziehen. Nur mit Ausschluss der häufigsten Differentialdiagnosen, kann der Verdacht der Enzephalitozoonose formuliert werden (KÜNZEL et al., 2008).

Tabelle 2: VETAMIN D zum zentralem Vestibularsyndrom beim Kaninchen
(GRUBER et al., 2008)

V = vaskulär	ZNS-Hypoxie durch Myokarditis oder myokardiale Fibrose
E = entzündlich	Enzephalitozoonose; Otitis media/interna, Ohrmilben, Toxoplasmose, Herpes simplex, Listeriose, Borna virus
T = traumatisch	Schädeltraumata
A = angeboren/Anomalie	Hydrozephalus
M = metabolisch/toxisch	hepatoenzephalales Syndrom

I = idiopathisch	Möglich
N = neoplastisch	Lymphom, Teratom
D = degenerativ	nicht bekannt

Tabelle 3: VETAMIN D zu Paresen/Paralysen beim Kaninchen
(GRUBER et al., 2008)

V = vaskulär	Möglich
E = entzündlich	Enzephalitozoonose; Toxoplasmose, Zystitis, Nephritis
T = traumatisch	Traumata der Wirbelsäule oder der Gliedmaßen
A = angeboren/Anomalie	Fehlstellungen (Splay legs (JIRMANOVA, 1983))
M = metabolisch/toxisch	nutritive Mangelerscheinungen oder Imbalancen (Hypoglykämie, Hypocalcämie, etc.)
I = idiopathisch	Möglich
N = neoplastisch	Lymphom
D = degenerativ	Muskelatrophie und –malazie

5.3.1. Otitis interna/media

Zur Abgrenzung der Kopfschiefhaltung bei einer Enzephalitozoonose sollte die Otitis interna oder media untersucht werden (KUNSTYR et al., 1986). Als Ursache hierfür kommt zum einen die Ohrräude, verursacht durch *Psoroptes cuniculi*, zum anderen eine bakterielle Otitis, meist durch *Pasteurella multocida* hervorgerufen, in Frage (KUNSTYR et al., 1986). Bei der Ohrräude kommt es im fortgeschrittenen Stadium und bei bakterieller oder mykotischer Sekundärinfektion zunächst zu einer Otitis externa und später zu einer Otitis media oder interna (SCHALL, 1995). Mittels otoskopischer und mikroskopischer Ursache lassen sich die Milben sehr gut nachweisen. Charakteristisch sind bei diesen Tieren ein starker Juckreiz und eine rein reflektorische Kopfschiefhaltung aufgrund der starken Hautirritationen vor allem im äußeren Gehörgang (KUNSTYR et al., 1986). Bei der bakteriellen Otitis media und interna gelangen

z. B. *Pasteurella multocida* über die Eustachische Röhre ins Mittelohr und verursachen dort ein Empyem (KUNSTYR et al., 1986). Ein Pasteurellennachweis aus dem Sekret des Mittelohre oder der Nasenschleimhaut führt meist zu keiner eindeutigen Diagnosestellung, da dieses Bakterium häufig auch auf der Schleimhaut gesunder Kaninchen nachgewiesen werden kann (SNYDER et al., 1973; DEEB, 1997). In der Regel haben Kaninchen bei einer Pasteurellen-Infektion meist dann auch Symptome der oberen Atemwege (Niesen, Nasenausfluss, Stridor) bis hin zur Pneumonie, desweiteren erhöhte Körpertemperatur, Peritonitis sowie multiple Abszesse in verschiedenen Organen (KPODEKON, 1983; BJOVEDT et al., 1979). Andere Erreger wie beispielsweise Staphylokokkusarten, *Bordetella bronchiseptica*, *E. coli* oder *Pseudomonas aeruginosa* kommen ebenso für eine bakterielle Otitis in Frage (DEEB, 1994). Grundsätzlich kann eine Röntgenuntersuchung der Bullae zur Diagnosefindung beitragen (SNYDER et al., 1973). In einer neueren Studie von KNIPEEN und FEHR (2001) wurde mittels EAEPs (early auditory evoked potentials) versucht, ein neues diagnostisches Mittel zu finden, die Otitis media frühzeitig aufzudecken. Es konnten allerdings keine signifikanten Unterschiede bewiesen werden. EATWELL und Mitarbeiter (2013) führten eine computertomographische Untersuchung (CT) zum Nachweis einer Otitis media durch. Die 6 Kaninchen mit einer nachgewiesenen Otitis media wurden chirurgisch versorgt mittels lateraler Bullaosteotomie oder partieller Gehörgangsentfernung. Bei den parallel eingeleiteten bakteriellen Untersuchungen konnten in keinem Fall Pasteurellen nachgewiesen werden. Stattdessen fanden sich *Staphylococcus pseudointermedius*, *Corynebacterium* und *Bordetella bronchiseptica*. Einen weiteren Hinweis zur Differenzierung der Otitis kann die neurologische Untersuchung beitragen, da eine Otitis im Gegensatz zu einer Enzephalitozoonose lediglich ein peripheres Vestibularsyndrom auslösen kann, während bei der Enzephalitozoonose Symptome eines zentralen Vestibularsyndroms vorhanden sind.

5.3.2. Trauma

Gerade beim Symptom der Hinterhandparese müssen Traumata als Hauptdifferentialdiagnosen ausgeschlossen werden (WEISBROTH et al., 1974; WENZEL & ALBERT, 1996; DEEB & CARPENTER, 2004). Beim Kaninchen kann es aufgrund seiner niedrigen Knochendichte sehr schnell zu Frakturen

kommen. Vor allem Traumata der Wirbelsäule (Wirbelfrakturen oder -luxationen) können mittels Röntgenuntersuchung bestätigt oder ausgeschlossen werden. Die Ermittlung der Kreatinkinase kann zur Diagnosefindung beitragen (HEIN & HARTMANN, 2001).

Desweiteren werden Schädeltraumata beschrieben, wobei es vor allem zu neurologischen Ausfällen im Kopfbereich kommt (DEEB & CARPENTER, 2004).

5.3.3. Toxoplasmose

Die Toxoplasmose wird immer wieder als Differentialdiagnose zur Enzephalitozoonose herangezogen. In seltenen Fällen können zentralnervöse Erscheinungen mit Ataxie, Muskeltremor und Lähmungserscheinungen hervorgerufen (GENTZ & CARPENTER, 1997) werden. Auch Krampfanfälle und Nachhandlähmungen sind möglich (LÖLINGER, 1985). Ansonsten ist es eher ein unüblicher Erreger von neurologischen Symptomen beim Kaninchen. Unspezifische Symptome wie Lethargie, Inappetenz und Fieber sind eher zu beobachten (DUBEY et al., 1992). Eine Kopfschiefhaltung wird in der Regel nicht verursacht, aber es kann zur Granulombildung im ZNS kommen und in Folge dessen auch zur Meningoenzephalitis. Die beiden Erreger sind serologisch unterscheidbar, Kreuzreaktion treten nicht auf (WOSU et al., 1977; WALLER & BERQUIST, 1982). Eine Abgrenzung der Toxoplasmen zu Enzephalitozoon ist allein lichtmikroskopisch schon möglich (FRANK, 1976; SHADDUCK & PAKES, 1971). Die Zysten unterscheiden sich nicht nur in Form und Größe sondern auch im Gram-Färbeverhalten (LAISON, 1954).

5.3.4. Pasteurellose

Als Erreger der Pasteurellose wird die Subspezies *multocida* genannt (KUNSTYR et al. 1986). Typische klinische Symptome für diese Erkrankung ist eine Kopfschiefhaltung aus der resultierenden Otitis interna/media (s.o.). Daher muss diese Differentialdiagnose immer ausgeschlossen werden, bei der vermutlich vorliegenden Enzephalitozoonose beim Kaninchen. Zusätzlich kann es zu einer Rhinitis und Infektion des unteren Respirationstraktes kommen (KPODEKON, 1983; BJOVEDT, et al., 1979). Eine eindeutige Diagnose ist nicht möglich, da der Erreger auch auf der Schleimhaut gesunder Kaninchen nachgewiesen werden kann (SNYDER et al., 1973; DEEB, 1997).

5.3.5. Herpes Enzephalitis beim Kaninchen

Eine *Herpes simplex* Infektion kann beim Kaninchen neurologische Symptome wie Unkoordiniertheit, Ataxie, Krämpfe und Opisthotonus hervorrufen (MÜLLER et al., 2009). Dabei wird der enge Kontakt zum Menschen mit *Herpes simplex* Virus als Hauptübertragungsweg angesehen (MÜLLER et al., 2009). In den neuesten Studien wird nicht nur ein *E.-cuniculi*-Antikörper-Titer oder *Toxoplasma-gondii*-Antikörper-Titer ermittelt, das *Herpes simplex* Virus gerät immer mehr in den Vordergrund in der Ausschlussdiagnostik (KÜNZEL et al., 2008).

5.3.6. Weitere Differentialdiagnosen

In der Literatur werden Paresen der Hintergliedmaßen auch im Rahmen massiver Zystitiden und Nephritiden beschrieben (GÖBEL, 1995). Die Ausschlussdiagnose von Urolithiden kann mittels Röntgen- oder Ultraschalluntersuchung durchgeführt werden. Auch werden nutritive Probleme, vor allem ein gestörtes Natrium-Kalium-Verhältnis im Futter (KÖTSCHKE & GOTTSCHALK, 1983) als weitere Ursachen für eine Ataxie genannt.

Differentialdiagnosen die für die Kopfschiefhaltung in Frage kommen, sind alle Erkrankungen, die eine Meningoencephalitis hervorrufen können. GENTZ und CARPENTER (1997) nennen hierfür die Listeriose, NETTLES und Mitarbeiter (1975) identifiziertes *Ascaris columnaris* und DEEB und DIAGIACOMO (1994) zeigten *Baylisascaris procyonis* auf. Wobei es bei den beiden letztgenannten Erregern vor allem durch die zerebrale Larva migrans zu Schädigungen im Gehirn kommen kann. Ein histologischer Nachweis der Larva migrans ist möglich. Auch bakterielle Meningoencephalitiden sind beschrieben (MURRAY et al., 1985; GRUBER et al., 2009). Desweiteren werden diverse virale Infektionen in diesem Zusammenhang genannt, wie beispielsweise noch Borna Virus und Tollwut (METZLER et al., 1978; WEISSENBOCK et al., 1997; KARP, 1999; GREY et al., 2002; MÜLLER et al., 2009).

Nicht zu vernachlässigen sind auch neoplastisch bedingte Schäden, vor allem durch Lymphome verursacht, die in einer pathologischen Studie identifiziert wurden (GRUBER et al., 2009).

Bei den weiteren Symptomen der Enzephalitozoonose müssen bei Azotämie Nephrolitiasis mittels Röntgen- oder Ultraschalldiagnostik ausgeschlossen

werden. Bei phakoklastischer Uveitis darf eine bakterielle bedingte Uveitis durch *Pasteurella multocida* (WILLAMS, 1999) oder auch sekundäre infolge von Keratitis, traumatisch bedingte Uveitis oder durch Fremdkörper verursachte Uveitis nicht übersehen werden (HARCOURT-BROWN, 2002).

6. Therapie

Bisher ist keine 100%ig erfolgreiche Therapie bei Kaninchen mit klinisch manifester Enzephalitozoonose bekannt (WALLER, 1979; KÜNZEL, 2007).

6.1. In vitro Daten zur Therapie

WALLER (1979) testete sieben Antibiotika, wobei sich keines davon als wirksam herauskristallisierte. Chloroquinphosphat galt als potentester Wirkstoff, gefolgt von Oxytetracyclin, Spiramycin, Dimetridazol, Sulfadoxin/Trimethoprim, Chloramphenicol und Sulfonamide. BEAUVAIS und Mitarbeiter (1994) suchten von 22 antimikrobiellen Wirkstoffen nach dem potentesten Wirkstoff. Dabei zeigten sich Fumagillin, Albendazol, Fluorouracil und Sparfloxacin als wirksam. Als teilweise wirksam in hoher Konzentration konnten Pefloxycin, Azithromycin, Rifabutin und Chloroquine ermittelt werden. Der Einsatz von Aprinocid, Metronidazol, Minocyclin, Itrakonazol, Doxycyclin und DFMO (Difluoromethylornithin) konnte nur in einer toxischen Konzentration eine Wirksamkeit gegen *E. cuniculi* nachweisen. Als unwirksam erwiesen sich Pyrimethamine, Piritrexim, Sulfonamide, Paromomycin, Roxithromycin, Atovaquone und Flucytosine.

6.2. Etablierte Therapieprotokolle beim Mensch

In der Literatur finden sich in der Regel Therapieprotokolle mit Albendazol 400 mg 1 – 2 x täglich über vier Wochen lang (KATIYAR & EDLIND, 1997; DIDIER, 2005; TALABANI et al., 2010). Teilweise wird auch eine Kombination entweder mit Fumagillin (DIDIER, 2005) oder Chloramphenicol (KATIYAR & EDLIND, 1997) berichtet. Alle verwendeten Wirkstoffe beziehen sich auf die *in vitro* Studie von BEAUVAIS und Mitarbeitern (1994).

6.3. Therapieprotokolle beim Kaninchen

In den in der Literatur beschriebenen Therapieprotokollen finden sich immer eine Kombination aus einem Antibiotikum, einem Benzimidazol und einem Glukokortikoid, meist Dexamethason. Dabei richtet sich die Kombination in der

Regel nach dem vorherrschenden Leitsymptom der Enzephalitozoonose des erkrankten Kaninchens (EWRINGMANN & GÖBEL, 1999; KÜNZEL et al., 2008). So werden bei EWRINGMANN und GÖBEL (1999) sowie KÜNZEL und Mitarbeitern (2008) bei Kaninchen mit neurologischen Symptomen Oxytetracyclin, Dexamethason, Infusion und Vitamin B verwendet. Wenn zudem oder das Leitsymptom eine Niereninsuffizienz darstellt, wird auf die Gabe von Oxytetracyclin verzichtet und stattdessen Enrofloxacin verabreicht (HARCOURT-BROWN & HOLLOWAY, 2003; KÜNZEL et al., 2008). Nach der Studie von SUTER und Mitarbeiter (2001), in der die Wirksamkeit von Fenbendazol nachgewiesen werden konnte, wurden Benzimidazole (Fenbendazol oder Albendazol) in die Therapieprotokolle mit aufgenommen (HARCOURT-BROWN & HOLLOWAY, 2003; KÜNZEL et al., 2008). Bei Augenveränderungen wurden die Protokolle mit Augensalben oder Tropfen ergänzt, die entweder oxytetracyclin- oder dexamethasonhaltig waren (EWRINGMANN & GÖBEL, 1999; HARCOURT-BROWN & HOLLOWAY, 2003; KÜNZEL et al., 2008).

6.4. Therapieprotokolle bei Hund und Katze

Bisher ist keine eindeutige Behandlung beim Hund beschrieben (SNOWDEN et al., 2009). Das beim Menschen verwendete Albendazol (400 mg alle 12 Stunden über drei Wochen (FOURNIER et al., 2000; DIDIER et al., 2006) ist für den Hund nicht zugelassen. Eine Umwidmung wäre möglich und nötig, aber bisher sind keine Erfahrungswerte darüber bekannt (SNOWDEN et al., 2009). Katzen mit einem positiven *E.-cuniculi*-Antikörpertiter wurden bei BENZ und Mitarbeitern (2011) mit Fenbendazol (20 mg/kg einmal täglich über drei Wochen) behandelt. Katzen mit Uveitis wurden zusätzlich dexamethason- und oxytetracyclinhaltiger Augensalbe dreimal täglich appliziert. BENZ und Mitarbeiter (2011) behandelten die *E.-cuniculi*-infizierten Katzen mit Augenveränderungen mit Fenbendazol sowie lokal und systemisch wirksamen Kortikosteroiden. Dabei wurde der Einsatz von Fenbendazol auf die Behandlung von *E. cuniculi* beim Kaninchen begründet (SUTER et al., 2001).

6.5. Interaktionen und Nebenwirkungen

Bei der Wahl des Antibiotikums sollte zu Beginn der Therapie eine Entscheidung getroffen werden, da es bei der Kombination von Enrofloxacin mit Tetracyclinen

zu antagonistischen Effekten kommen kann (KROKER, 1999). Durch die kombinierte Anwendung von Dexamethason und Benzimidazolen kann es zu einem reduzierten Wirkspiegels des Benzimidazols kommen (JUNG, 1990; VENKATESAN, 1998).

7. Bewertung als Infektionserreger

Aufgrund der hohen Seroprävalenzen weltweit (HALANOVA et al., 2003; HARCOURT-BROWN & HOLLOWAY, 2003; KEEBLE & SHAW, 2006; DIPINETO et al., 2007; VALENCAKOVA et al., 2008; OKEWOLE, 2008; CRAY et al., 2009; FEE et al., 2011; OZKAN et al., 2011) und der zunehmenden Übertragung auf den Menschen mit supprimiertem Immunsystem, z.B. durch HIV oder Chemotherapie sowie bei Organtransplantationen (TALABANI et al., 2010) gewinnt *E. cuniculi* und seine Behandlung immer mehr an Bedeutung.

7.1. Individuelle Prognose

Die Erfolgsquote der bisher verwendeten kombinierten Therapieprotokolle bei neurologischen Symptomen reicht von 16,7 % – 80,0 % (MEYER-BRECKWOLDT, 1996; EWRINGMANN & GÖBEL, 1999; HARCOURT-BROWN & HOLLOWAY, 2003; KÜNZEL et al., 2008). Während bei Augenveränderungen eine 100%ige Heilungschance nach chirurgischem Eingriff nachgewiesen werden konnte (EWRINGMANN & GÖBEL, 1999; HARCOURT-BROWN & HOLLOWAY, 2003; KÜNZEL et al., 2008), ist eine nahezu 100%ige Sterberate bei chronischer Niereninsuffizienz belegt worden (EWRINGMANN & GÖBEL, 1999; HARCOURT-BROWN & HOLLOWAY, 2003; KÜNZEL et al., 2008). Bei MEYER-BRECKWOLDT (1996) zeigten 18 Tiere neurologische Symptome. Während des stationären Aufenthaltes mussten acht euthanasiert werden, sieben weitere Kaninchen wurden nach vier bis sechs Wochen eingeschläfert. Nur drei Kaninchen zeigten eine Besserung, wovon ein Tier ein Rezidiv erlitt. Einen deutlich besseren Erfolg konnten EWRINGMANN und GÖBEL (1999) bei Kaninchen mit neurologischen Symptomen ermitteln. Von den 20 Tieren galten elf als geheilt und fünf Kaninchen zeigten eine deutliche Besserung der Symptome. Bei drei Kaninchen konnte keine Verbesserung und bei einem Tier eine Verschlechterung nachgewiesen werden. Eine nahezu 50%ige Überlebenschance konnte bei HARCOURT-BROWN und HOLLOWAY (2003) sowie bei KÜNZEL und Mitarbeitern (2008) nachgewiesen werden. Bei

Kaninchen mit Augenveränderungen liegt die Überlebenschance bei 100%, während eine chronische Niereninsuffizienz nahezu 100%ig infaust ist (EWRINGMANN und GÖBEL, 1999; KÜNZEL et al., 2008).

7.2. Zoonotisches Potential

Die erste *E. cuniculi* Infektion beim Menschen wurde 1959 von MATSUBAYASHI und Mitarbeitern beschrieben. Weitere Fälle wurden mittels immunologischen oder molekularen Methoden in Europa und den USA aufgedeckt, als die Ansteckungsfähigkeit von *E. cuniculi* überprüft wurde. Prävalenzen von 42% wurden mittels ELISA und IFAT ermittelt bei Patienten aus tropischen Ländern oder Tropenkrankheiten, die über Niereninsuffizienz, psychische oder neurologische Beschwerden klagten (BERGQUIST et al., 1984; HOLLISTER & CANNING, 1987; HOLLISTER et al., 1996; SINGH et al., 1982). Viele der serologischen Studien zeigten auf, dass Microsporidien beim Mensch im Allgemeinen vorhanden sind, aber ohne klinische Bedeutung auftreten können (CISLAKOVA & HALANOVA, 2003; GOMEZ et al., 1995; HALANOVA et al., 2003; KUCEROVA-POSPISILOVA & DITRICH, 1998; POSPISILOVA et al., 1997; VAN GOOL et al., 1997). In einer Studie aus der Schweiz konnte bei zwei von sechs mit Genotyp I infizierten Patienten der Kontakt zu Kaninchen in der Vergangenheit aufgedeckt werden (MATHIS et al., 1997; WEBER et al., 1997). Bei zwei Patienten in den USA, die sich mit dem Genotyp III infiziert hatten, konnte die Infektion nicht bei den im Haushalt lebenden Hunden nachgewiesen werden (DIDIER et al., 1996; TEACHEY et al., 2004). Eine Serokonversion konnte bei einem von drei Kindern dokumentiert werden, die Kontakt zu Welpen mit Enzephalitozoonose hatten (DIDIER et al., 2000). In einer weiteren *E.-cuniculi*-Infektion beim Menschen konnte der Genotyp nicht ermittelt werden, aber es wird angenommen, dass es sich um Genotyp III handelte, da bei dieser HIV-infizierten Person ein erhöhtes Risiko aufgrund seiner Tätigkeit als Hundezüchter bestand (WEITZEL et al., 2001). Die hohe Resistenz in der Umwelt lässt den Erreger über Monate unter humanen Bedingungen überleben (LI et al., 2003, WALLER, 1979), so dass der direkte Kontakt nicht notwendig ist, sondern über Wasserinfektionen möglich wäre. Menschen können sich mit dem Genotyp I und III infizieren (DEPLAZES et al., 1996; MATHIS et al., 1997), keiner dieser Genotypen konnte in Oberflächengewässern nachgewiesen werden, im Gegensatz zu Genotyp II

(Mäusety).

III. CLINICAL EVALUATION OF THERAPEUTIC SUCCESS IN RABBITS WITH SUSPECTED ENCEPHALITOZOONOSIS

**Jessica Sieg_a, Jutta Hein_a, Ariane Jass_a, Carola Sauter-Louis_b, Katrin
Hartmann_a, Andrea Fischer_a***

^aClinic of Small Animal Medicine Department of Veterinary Clinical Sciences,
Ludwig Maximilians University Munich, Veterinärstr. 13, 80539 Munich,

^bClinic for Ruminants, Department of Veterinary Clinical Sciences, Ludwig
Maximilian University, Sonnenstr. 16, 84764 Oberschleißheim

*Corresponding author: Dr. Andrea Fischer Current addresses: J. Sieg:
Christophorusweg 10, 45659 Recklinghausen; J. Hein: Kleintierklinik Augsburg
e. K., Klinkerberg 1 – 3 , 86152 Augsburg

Address for correspondence: Dr. A. Fischer, Clinic of Small Animal Medicine
Department of Veterinary Sciences, Ludwig Maximilians University Munich,
Veterinärstr. 13, 80539 Munich, a.fischer@medizinische-kleintierklinik.de

Abstract

Between 2000 and 2008, 95 rabbits with suspected encephalitozoonosis and neurological symptoms were treated at the Clinic of Small Animal Medicine, Ludwig Maximilian University Munich. Standard treatment consisted of oxytetracycline (from 2000 – 2003; n = 50) or fenbendazole and oxytetracycline (from 2004 – 2008; n = 45), and the rabbits were randomly assigned to treatment groups with or without dexamethasone. Each therapeutic regime was given for 10 days, with fluids, B vitamins and nutritional support added as needed. Therapeutic success was evaluated by assessing the survival rate on day 10, the neurological score of the surviving rabbits and Kaplan-Meier curves for long-term survival past 10 days. Inclusion of fenbendazole in the treatment protocol was associated with increased survival rates on day 10 ($p = 0.043$), better neurological scores ($p = 0.008$), and improved long-term survival ($p = 0.025$) based on the results of univariate analyses. Treatment with dexamethasone showed no effect on neurological score or on short- or long-term survival. The study did not provide any evidence that dexamethasone is an effective component of the treatment scheme.

Keywords: rabbit, *Encephalitozoon cuniculi*, neurological symptoms, dexamethasone, fenbendazole

Introduction

Encephalitozoon cuniculi (*E. cuniculi*), a globally distributed obligate intracellular microsporidium, can infect a wide range of mammals, including humans, dogs and rodents. Three genotypes (I, II and III) have been identified based on the number of GTTT repeats in the internal transcribed spacer (ITS) of the rRNA. The main host of *E. cuniculi* genotype I is the rabbit (Xiao et al., 2001; Halánová et al., 2003; Harcourt-Brown and Holloway, 2003; Keeble and Shaw, 2006; Dipineto et al., 2007; Valencakova et al., 2008; Okewole, 2008; Cray et al., 2009; Snowden et al., 2009). The manifestation and the formation of lesions within the central nervous system result in commonly described neurological symptoms. These symptoms include signs of vestibular disease, such as head tilt, ataxia, circling, nystagmus and rotational movements around the body length axis (Robinson, 1954; Kunstyr and Naumann, 1985; Pakes and Gerrity, 1994; Wasson and Peper, 2000; Jass et al., 2006, 2008). *Intra vitam* diagnostics are mainly restricted to the exclusion of other CNS (central nervous system) diseases (Künzel et al., 2008; Jass et al., 2008). Positive antibody titers or CSF analysis can indicate *E. cuniculi* infection but do not prove that *E. cuniculi* is the causative agent in the diseased rabbits. However, PCR-based spore identification in urine or histopathology can confirm encephalitozoonosis (Meyer-Breckwoldt, 1996; Ewringmann and Göbel, 1999; Suter et al., 2001; Harcourt-Brown and Holloway, 2003; Jass et al., 2006; Künzel et al., 2008; Jass et al., 2008).

To date, a large number of therapeutic agents have been tested in two *in vitro* studies (Waller, 1979; Beauvais et al., 1994). Among the compounds tested *in vitro*, albendazole and fumagillin are the most effective and the least toxic to cells, while tetracycline derivatives are only partially effective or required toxic concentrations (Waller et al., 1979; Beauvais et al., 1994). Albendazole remains the preferred drug in humans with encephalitozoonosis (Weber et al., 1997), but use of another benzimidazole agent, fenbendazole, is pursued in rabbits (Suter et al., 2001). Several therapeutic protocols have been published in the past for treatment of rabbit encephalitozoonosis: sulphonamide/trimethoprim, furosemide and dexamethasone (Meyer-Breckwoldt, 1996); oxytetracycline in combination

with dexamethasone (Ewringmann and Göbel, 1999); oxytetracycline, betamethasone and fenbendazole (Harcourt-Brown and Holloway, 2003); and, most recently, oxytetracycline or enrofloxacin, combined with fenbendazole and dexamethasone (Künzel et al., 2008). However, none of these studies focussed on unequivocal documentation of therapeutic success. Consequently, the aim of the current study was to investigate the therapeutic success obtained with treatment protocols commonly used at the Clinic of Small Animal Medicine, LMU Munich, for treatment of rabbits with clinically suspected encephalitozoonosis.

Materials and methods

1. Animals

Ninety-five rabbits with vestibular symptoms and/or paresis were included in the study (conducted from 2000 – 2008). The age of these mixed breed rabbits, kept in private households, ranged between 0.3 and 8.4 years (median: 3.4 years), and their weight ranged between 0.5 and 4.8 kg (median: 1.6 kg). Fifty-three of the rabbits were male, 41 were female, and one was of unknown gender.

2. Diagnostic tests

Encephalitozoonosis was suspected based on several criteria: clinical signs; the exclusion of other diseases associated with the ear; haematological and biochemical evaluation in all rabbits; CSF (cerebrospinal fluid) puncture and bulla radiographs in selected cases ($n = 20$); and positive *E. cuniculi* serum antibody titers (india-ink immunoreactions (IIR) or indirect immunofluorescence antibody tests (IFAT) (Tierärztliches Labor Freiburg, Germany, 89 of 95 tested). Encephalitozoonosis was confirmed if spores were detected in urine by PCR (18 of 37 tested) or if characteristic microscopic lesions were detected in *post mortem* histopathological examination of the brain and spinal cord (40 of 40). Details of CSF, IIR, IFAT and PCR testing procedures, including primers, are published in Jass et al. (2006). Six seronegative rabbits were included in the present study, as they were seropositive for encephalitozoonosis based on PCR or histopathology results.

3. Treatment protocols

The rabbits were hospitalised for 10 days and treated according to the following therapy protocols. From 2000 to 2003, the rabbits were treated with oxytetracycline 20 mg/kg sc, once a day for 10 days with ($n = 27$; group TET 1)

or without ($n = 23$; group TET 2) dexamethasone 0.2 mg/kg sc, once a day for 10 days. From 2004 to 2008, the rabbits were treated with oxytetracycline and fenbendazole 20 mg/kg po, once a day for 10 days with ($n = 20$; group FEN 1) or without ($n = 25$; group FEN 2) dexamethasone according to the above dosage schedule ($n = 25$; group FEN 2). Assignment to dexamethasone treatment was prospective and blinded from 2000 to 2003 and was non-blinded but random from 2004 to 2008. All rabbits received additional treatment with fluids (Sterofundin[®], Braun, Melsungen, Germany; 50 cc/kg/d sc for 10 days) and B vitamins (Vitamin-B-Complex[®], Serumwerk, Bernburg, Germany; 1 cc/rabbit, sid sc for 10 days). In cases of anorexia, nutritional support was provided (Critical Care[®], Albrecht, Aulendorf, Germany; 50 cc/kg per day).

4. Evaluation of therapeutic success

Detailed neurological examinations were conducted on the day of admission to the hospital and on day 10. Signs of vestibular disease (head tilt, presence of nystagmus, and the degree of ataxia, circling or rotational movements around the body length axis) or severity of paresis (normal motion up to para- or tetraplegia) were graded using a neurological score. The magnitude of the score represented the severity of the disease symptoms and had a maximum score of 18 (Table 1). Therapeutic success was evaluated using the survival rate (%) on day 10 in all rabbits and the neurological score on day 10 in the surviving rabbits. For this purpose, neurological scores were calculated on the day of admission and the day of discharge (day 10 in surviving rabbits), and improvements in scores (delta scores) were calculated for each surviving animal. In 2008, the owners of the discharged rabbits were interviewed by phone to assess the long-term outcome.

5. Statistics

Prior to the commencement of the study, a sample size determination was conducted using PASS 2008. To detect a difference of 4 points in the neurological score between two groups (assuming a standard deviation of 5 points, $\alpha = 0.05$ and a power of 80%), at least 26 animals would be required per group. Data analysis was performed using Microsoft Excel and SPSS (version 18.0). Statistical comparison between groups was performed using the t-test (age, weight), the chi-square test (gender), the Kruskal-Wallis test (initial neurological score), and the Mann-Whitney-U-test (delta score on day 10). For a two-factor analysis of

variance of the neurological scores, the Scheirer-Ray-Hare method was used (Dytham, 2003). For survival (yes/no) at day 10, a logistic regression was used (Hosmer and Lemeshow, 2000). Survival rates beyond day 10 were assessed with Kaplan-Meier curves and log-rank tests. Statistical significance was set at $p < 0.05$, and 95.0 % confidence intervals were calculated.

Results

1. Animals (age, weight, gender, clinical signs, and laboratory results)

Individual treatment groups did not differ regarding age ($p = 0.409$), weight ($p = 0.957$), gender ($p = 0.109$), and neurological score at day 0 ($p = 0.146$). The majority of the rabbits (84.2%, 95.0% confidence interval (CI): 75.6% – 90.2%) showed vestibular symptoms. Rabbits with paresis were equally distributed between the treatment groups. None of the animals showed signs of ocular disease, e.g., phacoclastic uveitis, cataracts, granulomas or uveitis. Increased renal values (urea, creatinine) were found in 16.8% (95.0 % CI: 10.6 % – 25.6 %) of all rabbits, and no significant differences in occurrence in renal disease ($p = 0.824$) were observed between the groups.

2. Diagnostic tests (serologic testing, spore identification, and histopathological investigation)

A positive *E. cuniculi* antibody titer could be detected in 93.7 % (95 % CI: 86.9% – 97.1%) of the diseased rabbits. Furthermore, PCR identified spores of *E. cuniculi* in urine of 48.7 % (18 of 37 tested; 95 % CI: 33.5% – 64.1%) of the examined samples. Forty-six animals were either euthanized due to worsening neurologic disease or died during hospitalisation, and 40 of these animals underwent complete *post mortem* examination including histopathological examination of brain and spinal cord. In all 40 animals showing lesions within the central nervous system, *E. cuniculi* was identified as the causal agent. Additional findings in *post mortem* investigation were evident in 12 rabbits: myocarditis ($n = 6$), malignant lymphoma ($n = 2$), and individual cases of otitis media, pneumonia, gastric ulcer, abscess, coccidiosis, mammary gland inflammation and urolithiasis.

3. Therapeutic success (neurological score, short- and long-term survival)

In a comparison of the four different therapeutic groups, no significant differences were demonstrated in the neurological score ($p = 0.065$) or in short- ($p = 0.170$) or

long-term survival ($p = 0.907$). In summary, 84.6% (22/26) of the rabbits were still alive six months after leaving the clinic, with individual rabbits showing markedly different clinical courses. Among all animals treated with fenbendazole (FEN1 and FEN2), independent of other medications, a statistically significant improvement of the neurological score was observed at day 10 ($p = 0.008$). The median neurological score of animals treated with fenbendazole (groups FEN1, FEN2) decreased from 8.5 at day 0 to 3.0 at day 10 (delta score 5.5); in comparison, the score of animals not receiving fenbendazole decreased from 8.5 at day 0 to 5.0 at day 10 (delta score 3.5) (groups TET1, TET2; Figure 1). Rabbits treated with fenbendazole were 1.6 times more likely to survive until at least day 10 compared to rabbits without fenbendazole in their therapeutic protocol ($p = 0.043$). In addition, a significant effect of fenbendazole was demonstrated on long-term survival ($p = 0.025$, Figure 2). No statistically significant effect of dexamethasone (groups TET1, FEN 1) was evident based on the neurological score ($p = 0.469$) or on short- ($p = 0.527$) or long-term ($p = 0.452$) survival. In a multivariate analysis of variance using the Scheirer-Ray-Hare method, neither fenbendazole nor dexamethasone was a statistically significant factor (fenbendazole: $p = 0.351$; dexamethasone: $p = 0.715$). In the logistic regression analysis using survival (yes/no), dexamethasone was not significant ($p = 0.958$) but fenbendazole showed a positive trend ($p = 0.060$ with a reduced odds ratio of 0.258 for death; 95% CI: 0.063 – 1.059).

Discussion

Since 1991, therapeutic treatment of microsporidia in humans is limited to albendazole based on *in vitro* and *in vivo* evidence in humans (Canning and Hollister, 1991; Gamboa-Dominguez et al., 2003). Albendazole reduces the number of causative organisms without eliminating the infection. Accordingly, in a study of 125 rabbits (1997 – 2002), Harcourt-Brown and Holloway (2003) initially used albendazole but later switched to fenbendazole therapy because of the embryotoxic and teratogenic effects of albendazole. Subsequently, the prophylactic and therapeutic efficacy of fenbendazole was demonstrated (Suter et al., 2001). Rabbits treated with fenbendazole following experimental infection remained seronegative, and fenbendazole resulted in neurological improvement in a small group of diseased rabbits (Suter et al., 2001). Consequently, fenbendazole was recommended for the treatment of rabbits with suspected

encephalitozoonosis. Most recently, combined treatment with fenbendazole, oxytetracycline or enrofloxacin, and dexamethasone or prednisone achieved a 54.2% recovery rate (Künzel et al., 2008).

In the present study, neither fenbendazole nor dexamethasone showed significant effects when the four groups were compared. However, each group consisted of only small numbers of animals. If all animals treated with fenbendazole were considered, fenbendazole treatment appeared to be superior for therapy for rabbits with clinically suspected encephalitozoonosis. Fenbendazole is an agent of the benzimidazole group, and it is assumed to pass the blood-brain-barrier in infected animals, as albendazole does (Venkatesan, 1998). After long-lasting resorption (Short, 1987; McKellar and Scott, 1990; Lanusse and Prichard, 1993), albendazole acts by interfering with the polymerisation of *E. cuniculi* by binding to its β -tubulin (Venkatesan, 1998), thus lowering the parasite's glucose intake and hampering the construction of its cytoskeleton. However, persistence of the parasite remains a problem even after drug treatment. Low parasitostatic effects and an impaired immune system of the diseased rabbits are possible explanations. In the current study, dexamethasone does not appear to have any therapeutic effect. However, most treatment protocols recommend dexamethasone or other glucocorticoids at various dosages for encephalitozoonosis treatment (Meyer-Breckwoldt, 1996; Ewringmann and Göbel, 1999; Künzel et al., 2008), with the notable exception of Suter et al. (2001). Dexamethasone is often recommended as part of treatment protocols for CNS inflammation because of its anti-inflammatory and anti-oedematous actions (Messer et al., 2006). Previously, dexamethasone was also used in rabbits because craniocerebral trauma was frequently not excluded as a cause for the neurological symptoms. However, corticosteroids are no longer recommended for the treatment of acute head injury (Lancet, 2005). On the other hand, it is a concern that immunosuppression with dexamethasone may promote persistence and shedding of *E. cuniculi* (Lallo et al., 2002; Herich et al., 2006). Thus, these effects could impose a zoonotic risk on immunosuppressed owners or people in close contact with their pets (Schwartz et al., 1994; Gunnarson et al., 1995; Weber and Deplazes, 1995). Combined treatment with fenbendazole and dexamethasone might even reduce the serum concentration of fenbendazole, as has been demonstrated for albendazole (Jung et al., 1990). Similarly, a rat model showed decreased efficacy of fenbendazole when combined with dexamethasone (Duncombe et al., 1977). Furthermore, rabbits are

known to be corticosteroid-sensitive species, and toxicity changes have been reported in lymphoid organs, the liver and the adrenal gland (Borgmann et al., 1976).

This study was not designed to document the efficacy of oxytetracycline. Yet, oxytetracycline has been included in many treatment protocols of rabbits with neurological signs from clinically suspected encephalitozoonosis (Ewringmann and Göbel, 1999; Harcourt-Brown and Holloway, 2003; Künzel et al., 2008). This approach was based on a moderate effect of oxytetracycline against *E. cuniculi* demonstrated in one *in vitro* study. However, controlled *in vivo* studies are lacking (Waller et al., 1979). Tetracyclines are broad-spectrum antibiotics that are highly effective against rickettsia and gram-positive and gram-negative bacteria; therefore, they may be effective against bacterial co-infections (Griffin, 2011). Co-infections such as otitis media or bacterial pneumonia were found in only a few rabbits in the present study. Furthermore, tetracyclines have potent anti-inflammatory and anti-apoptotic properties, inhibit matrix-metalloproteinases and act as scavengers of reactive oxygen species; all of these characteristics should be useful for adjunct treatment of CNS inflammation (Griffin, 2011).

An obvious limitation of this study is that only part of the sample selection was conducted in a prospective and blinded manner. Another limitation is that no advanced imaging was applied to exclude otitis media/interna as a cause of vestibular disease. However, the fact that only one of the 40 rabbits that underwent post mortem examination was affected by otitis media/interna (in addition to CNS encephalitozoonosis) makes a high number of false diagnoses unlikely. The study was also limited by the use of a novel and not yet validated vestibular score and by the fact that an untreated control group was not included for comparison. Some rabbits may have improved with supportive care only. The study had low power to detect differences in survival, e.g., to detect a difference in survival rate of 30% between two treatment groups of 20 and 23 animals, the power would be only 0.56. Thus far, only a limited number of studies have investigated long-term outcome in rabbits with encephalitozoonosis. Harcourt-Brown and Holloway (2003) reported a six-month survival rate of 53.6%, compared to 84.6% reported in the present study. More detailed long-term monitoring of rabbits may be indicated to further define the clinical course of encephalitozoonosis.

Conflict of interest statement

The authors state that there is no conflict of interest.

References

- Beauvais, B., Sarfati, C., Challier, S., Derouin, F., 1994. In vitro model to assess effect of antimicrobial agents on *Encephalitozoon cuniculi*. *Antimicrob. Agent. Chemother.* 38, 2440–2448.
- Borgmann A. R., Bogle, D., Robb, C. A., McDonald, T. O., 1976. Comparative toxicity of two dexamethasone derivatives following topical ocular instillation to rabbits. II. Systemic histopathological changes. *Toxicology.* 6, 77–84.
- Canning, E. U., Hollister, W. S., 1991. In vitro and in vivo investigations of human microsporidia. *J. Protozool.* 38, 631–635.
- Cray, C., Arcia, G., Schneider, R., Kelleher, S. A., Arheart, K. L., 2009. Evaluation of the usefulness of an ELISA and protein electrophoresis in the diagnosis of *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbits. *Am. J. Vet. Res.* 70, 478–482.
- Dipineto, L., Rinaldi, L., Santaniello, A., Sensale, M., Cuomo, A., Calabria, M., Menna, L. F., Fioretti, A., 2008. Serological survey for antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in pet rabbits in Italy. *Zoonoses. Publ. Health.* 55, 173–175.
- Duncombe, V. M., Bolin, T. D., Davis, A. E., Kelly, J. D., 1977. *Nippostrongylus brasiliensis* infection in the rat: effect of iron and protein deficiency and dexamethasone on the efficacy of benzimidazole anthelmintics. *Gut.* 18, 892–896.
- Dytham, C., 2003. *Choosing and using statistics: a biologist's guide.* Blackwell, Berlin.
- Ewringmann, A., Göbel, T., 1999. Untersuchungen zur Klinik und Therapie der *Encephalitozoonose* beim Heimtierkaninchen. *Kleintierpraxis* 44, 357–372.
- Fitch, M. T., van de Beek, D., 2008. Drug Insight: steroids in CNS infectious diseases – new indications for an old therapy. *Nat. Clin. Pract. Neurol.* 4, 97–104.
- Gamboa-Dominguez, A., De Anda, J., Donis, J., Ruiz-Maza, F., Visvesvara, G. S., Diliz, H., 2003. Disseminated *encephalitozoon cuniculi* infection in a Mexican kidney transplant recipient. *Transplantation* 75, 1898–1900.
- Graczyk, T. K., Johansson, M. A., Tamang, L., Visvesvara, G. S., Moura, L. S., Da Silva, A. J., Girouard, A. S., Matos, O., 2007. Retrospective species

identification of microsporidian spores in diarrheic fecal samples from human immunodeficiency virus/AIDS patients by multiplexed fluorescence in situ hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 45, 1255–1260.

Griffin, M. O., Ceballos, G., Villarreal, F. J. 2011. Tetracycline compounds with non-antimicrobial organ protective properties: possible mechanisms of action. *Pharmacol. Res.* 63, 102 – 107.

Gunnarson, G., Hurlbut, D., De Girolami, P. C., Federmann, M. and Wanke, C. 1995. Multiorgan microsporidiosis: report of five cases and review. *Clin. Inf. Dis.* 21, 37 – 44.

Halánová, M., Cisláková, L., Valencáková, A., Bálent, P., Adam, J., Trávnicek, M., 2003. Serological screening of occurrence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in humans and animals in Eastern Slovakia. *Ann. Agric. Environ. Med.* 10, 117–120.

Harcourt-Brown, F. M., Holloway, H. K. R., 2003. *Encephalitozoon cuniculi* in pet rabbits. *Vet. Rec.* 152, 427–431.

Herich, R., Levkutová, M., Kokincáková, T., Reiterová, K., Hipíková, V., Levkut, M. 2009. Diagnosis and manifestation of encephalitozoonosis in mice after experimental infection with different species and application of dexamethasone. *J. Vet. Med. A. Physiol. Pathol. Clin. Med.* 53, 340 – 345.

Hosmer, D., Lemeshow, S. 2000. *Applied Logistic Regression*, 2nd Edition. John Wiley & Sons, Toronto.

Jass, A., Matiassek, K., Hartmann, K., Küchenhoff, H., Fischer, A., 2006. Evaluierung von Liquoruntersuchung und PCR zur Diagnose der Encephalitozoonose beim Kaninchen. *Prakt. Tierarzt* 87, 518–524.

Jass, A., Matiassek, K., Henke, J., Küchenhoff, H., Hartmann, K., Fischer, A., 2008. Analysis of cerebrospinal fluid in healthy rabbits and rabbits with clinically suspected encephalitozoonosis. *Vet. Rec.* 162, 618–622.

Jung, H., Hurtado, M., Medina, M. T., Sanchez, M., Sotelo, J., 1990. Dexamethasone increases plasma levels of albendazole. *J. Neurol.* 237, 279–280.

Keeble, E. J., Shaw, D. J., 2006. Seroprevalence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in domestic rabbits in the United Kingdom. *Vet. Rec.* 158, 539–544.

Künzel, F., Gruber, A., Tichy, A., Edelhofer, R., Nell, B., Hassan, J., Leschnik, M., Thalhammer, J. G., Joachim, A., 2008. Clinical symptoms and diagnosis of encephalitozoonosis in pet rabbits. *Vet. Parasitol.* 151, 115–124.

Kunstýř, I., Naumann, S., 1985. Head tilt in rabbits caused by pasteurellosis and

encephalitozoonosis. *Lab. Anim.* 19, 208–213.

Lallo, M. A., dos Santos, M. J., Bondan, E. F. 2006. Experimental Encephalitozoon cuniculi infection in dexamethasone-immunosuppressed mice. *Rev. Saude. Publica.* 36, 621 – 626.

Lancet, 2005. Final results of MRC Crash, a randomised placebo-controlled trial of intravenous corticosteroid in adults with head injury – outcomes at 6 months. *Research letters* 365: 1957–1959.

Lanusse, C. E., Prichard, R. K., 1993. Relationship between pharmacological properties and clinical efficacy of ruminant anthelmintics. *Vet. Parasitol.* 49, 123–158.

Mathis, A., Weber, R., Deplazes, P., 2005. Zoonotic potential of the microsporidia. *Clin. Microbiol. Rev.* 18, 423–445.

McKellar, Q. A., Scott, E. W., 1990. The benzimidazole anthelmintic agents – a review. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 13, 223–247.

Messer, J. S., Kegge, S. J., Cooper, E. S., Colitz, C. M., Abramson, C. J., 2006. Meningoencephalomyelitis caused by *Pasteurella multocida* in a cat. *J. Vet. Intern. Med.* 20, 1033–1036.

Meyer-Breckwoldt, A., 1996. Epidemiologische und klinische Untersuchungen zur Encephalitozoonose beim Zwergkaninchen. Dissertation, Veterinary University, Hannover.

Okewole, E. A., 2008. Seroprevalence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in domestic rabbits in Nigeria. *Onderstepoort. J. Vet. Res.* 75, 33–38.

Pakes, S. P., Gerrity, L. W., 1994. Protozoal Diseases. In: Manning, P. J., Ringler, D. H., Newcomer, C. E. (eds.). *The biology of the laboratory rabbit*, Academic, London, pp. 205–224

Robinson, J. J., 1954. Common infectious disease of laboratory rabbits questionably attributed to *Encephalitozoon cuniculi*. *AMA. Arch. Pathol.* 58, 71–84.

Rosenthal, K. L., 2004. Therapeutic Contraindications in Exotic Pets. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, Vol 13, No 1, 44-48.

Schwartz, D. A., Bryan, R. T., Weber, R., Visvesvara, G. S. 1994. Microsporidiosis in HIV positive patients: current methods for diagnosis using biopsy, cytologic, ultrastructural, immunological, and tissue culture techniques. *Folia Parasitol. (Praha).* 41, 101 – 109.

Short, C. R., 1987. Disposition of fenbendazole in the goat. *Am. J. Vet. Res.* 48,

811–815.

Shumway-Cook, A., Gruber, W., Baldwin, M., Liao, S., 1997. The effect of multidimensional exercises on balance, mobility and fall risk in community-dwelling older adults. *Phy. Ther.* 77, 46–57.

Snowden, K. F., Lewis, B. C., Hoffmann, J., Mansell, J. 2009. Encephalitozoon cuniculi infections in dogs: a case series. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 45, 225 – 231.

Suter, C., Müller-Doblies, U. U., Hatt, J. M., Deplazes, P., 2001. Prevention and treatment of Encephalitozoon cuniculi infection in rabbits with fenbendazole. *Vet. Rec.* 148, 478–480.

Talabani, H., Sarfati, C., Pillebout, E., van Gool, T., Derouin, F., Menotti, J., 2010. Disseminated infection with a new genovar of Encephalitozoon cuniculi in a renal transplant recipient. *J. Clin. Microbiol.* 48, 2651–2653.

Valencakova, A., Balent, P., Petrovova, E., Novotny, F., Luptakova, L., 2008. Encephalitozoonosis in household pet Nederland Dwarf rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Vet. Parasitol.* 153, 265–269.

Venkatesan, P., 1998. Albendazole. *J. Antimicrob. Chemother.* 41, 145–147.

Waller, T., 1979. Sensitivity of Encephalitozoon cuniculi to various temperatures, disinfectants and drugs. *Lab. Anim.* 13, 227–230.

Wasson, K., Peper, R. L., 2000. Mammalian Microsporidiosis. *Vet. Pathol.* 37, 113–128.

Weber, R., Deplazes, P., Flepp, M., Mathis, A., Baumann, R., Sauer, B., Kuster, H., Lüthy, R., 1997. Cerebral microsporidiosis due to Encephalitozoon cuniculi in a patient with human immunodeficiency virus infection. *N. Engl. J. Med.* 336, 474–478.

Whitney, S., Wrisley, D., Furman, J., 2003. Concurrent validity of the Berg Balance Scale and the Dynamic Gait Index in people with vestibular dysfunction. *Physiother. Res.* 8, 178–186.

Xiao, L. Li, L., Visvesvara, G. S., Moura, H., Didier, E. S., Lal, A. A., 2001. Genotyping Encephalitozoon cuniculi by multilocus analyses of genes with repetitive sequences. *J. Clin. Microbiol.* 39, 2248–2253.

Tables

Table 1. Treatment protocols used in rabbits with clinically suspected encephalitozoonosis (n = 95). So-called group Fen combined group 3 and 4 according to this group Tet combined group 1 and 2. Correspondingly group D combined group 1 and 3 and group D-0 combined group 2 and 4.

Years	group	oxytetracycline (20 mg/kg sc, once a day, for a period of ten days)	dexamethasone (0,2 mg/kg sc, once a day, for a period of ten days)	fenbendazole (20 mg/kg po, once a day, for a period of 21 days)
2000 –	1 (n = 27)	X	X	
2003	2 (n = 23)	X		
2004 –	3 (n = 20)	X	X	X
2008	4 (n = 25)	X		X

Table 2. Score system

A) Vestibular disorders	points
head tilt not present	0
minimal	2
moderate	4
massive	6
nystagmus not present	0
only positional	1,5
in response to stress	3
constant	4,5
constant with head movements	6
vestibular ataxia not present	0
unilateral hopping deficit	1
sometimes circling	2
constantly circling	3
sometimes turnover	4
sometimes rolling	5
constantly rolling/lateral position	6
	possible maximum score 18
B) Lesions of the spinal cord	points
normal motion	0
minimal neurological failing	3
short time physiological stress with movement	6
short time physiological stress while sitting	9
movement without physiological stress	12
tetra/paraparesis	15
tetra/para-paralysis	18
	possible maximum score 18

Figures

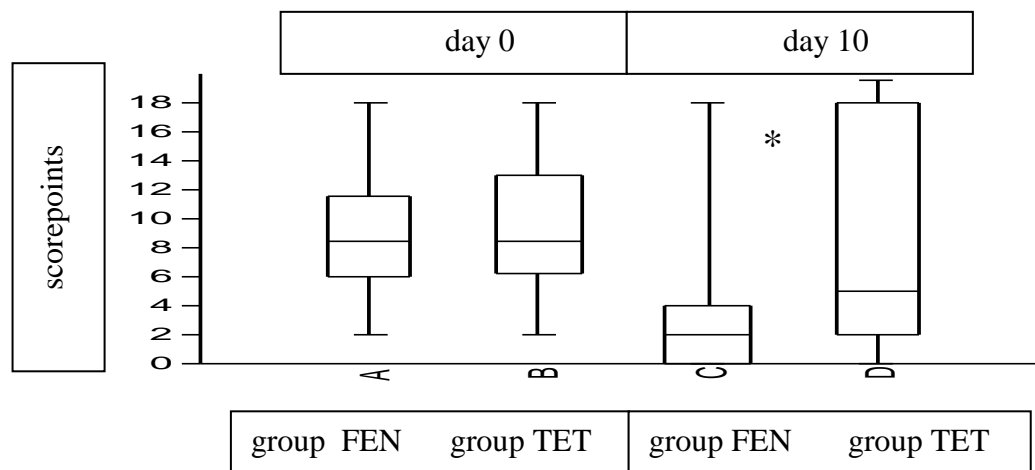


Figure 1. Comparison of the scorepoints assessing neurological symptoms of group FEN and TET at day 0 and day 10. At day 10 rabbits treated with fenbendazole and oxytetracycline had statistically significant lower scorepoints and fewer neurological symptoms in contrast to rabbits treated without fenbendazole ($p = 0.008$).

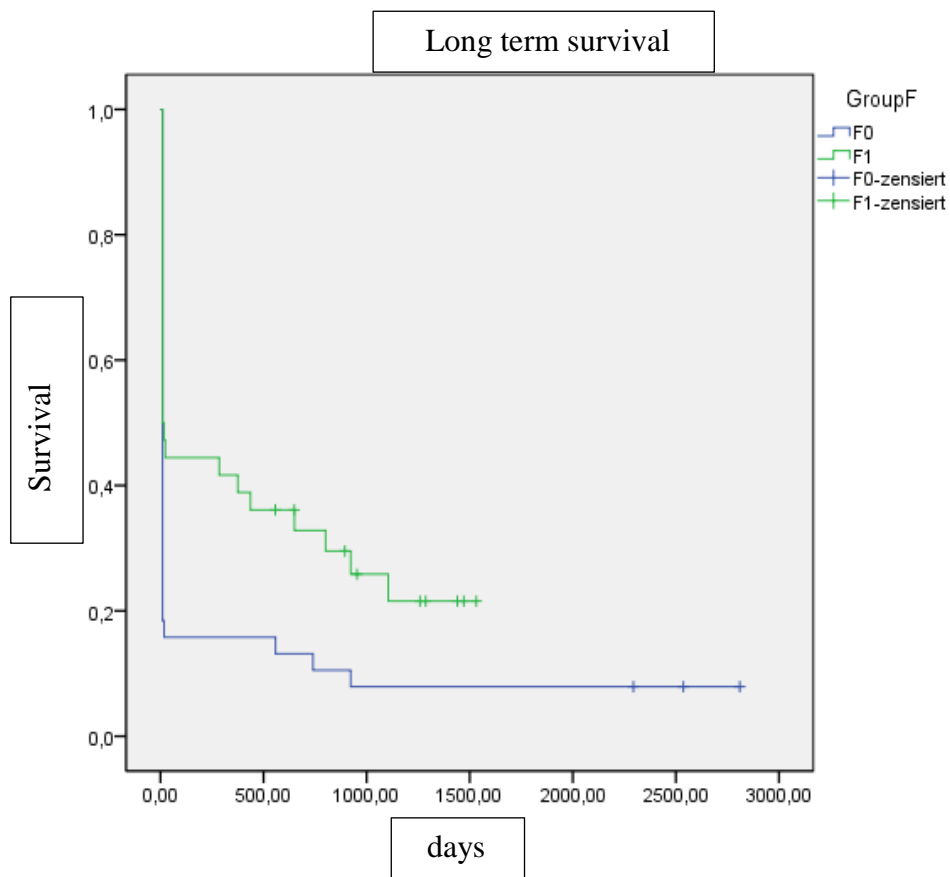


Figure 2. Comparison of the long term survival of group F (blue line) and F-0 (green line).

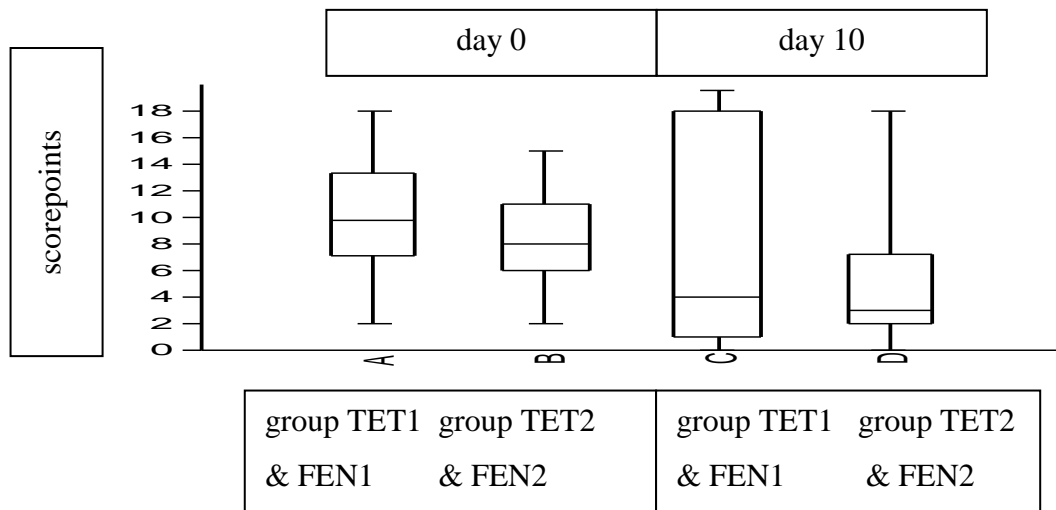


Figure 3. Comparison of the scorepoints of group 1 (TET and FEN with dexamethasone) and group 2 (TET and FEN without dexamethasone) at day 0 and day 10. At day 10 no statistically significant improvements were observed.

IV. DISKUSSION

Nach aktuellem Stand der Wissenschaft ist die **Diagnose** der Enzephalitozoonose bei Kaninchen *in vivo* nur selten sicher möglich. Steht die PCR nicht zur Verfügung oder ist ihr Ergebnis negativ, kann bei anamnestischem und klinischem Verdacht auf Enzephalitozoonose nur die kombinierte Betrachtung des Antikörperuntersuchungsbefundes und der Ausschluss von Differentialdiagnosen durch weiterführende Untersuchungen, bei der Diagnosestellung helfen (Künzel, 2008). Die pathohistologische Untersuchung ist zwar beweisend aber erst *post mortem* durchführbar.

Die **PCR**-Untersuchung des Urins auf *E.-cuniculi*-Sporen liefert aufgrund der inkonstanten Sporenausscheidung nur im positiven Fall eine sichere Diagnose (COX et al., 1979; CSOKAI et al., 2009). Von den 37 (37/95) in dieser Studie mittels Urin-PCR untersuchten Kaninchen konnte nur bei 18 Tieren eine Sporenausscheidung nachgewiesen werden. Die Ergebnisse von JASS (2004; 2008) der durchgeführten Liquorpunktion und –untersuchung (12) konnte von KÜNZEL (2008) nicht bestätigt werden. Bei den von KÜNZEL und Mitarbeiter (2008) untersuchten Kaninchen mittels PCR konnte *E. cuniculi* nur im Linsenmaterial (4/5), nicht aber im Liquor (0/12), nachgewiesen werden. In der vorliegenden Studie wurde bei keinem Kaninchen Linsenmaterial untersucht. Da diese Untersuchungsmethode noch nicht reproduzierbar war und einen größeren Aufwand und Kostenfaktor mit sich zieht, sind die Nutzung und der Einsatz in der Praxis als vorsichtig zu beurteilen.

Nur in der **histopathologischen Untersuchung** lassen sich zum einen die typischen Veränderungen in Form von granulomatöser Meningoencephalitis (JASS et al., 2004; KÜNZEL et al., 2008; JASS et al., 2008; CSOKAI et al., 2009) als auch der Erreger selbst nachweisen (COX et al., 1979; CSOKAI et al., 2009). Von den in der vorliegenden Studie untersuchten 95 Kaninchen wurden 40 Tiere *post mortem* histopathologisch untersucht und so die Enzephalitozoonose bestätigt. Bei EWRINGMANN und GÖBEL wurden 15 Kaninchen histopathologisch untersucht, wovon zehn Tiere Symptome einer Enzephalitozoonose gezeigt hatten (vier mit Niereninsuffizienz und sechs mit neurologischen Symptomen). Alle 15 untersuchten Kaninchen zeigten

Veränderungen im ZNS und den Nieren auf, die bisher symptomfreien Kaninchen zeigten die Veränderungen in milderer Form. In der neuesten Studie von GRUBER (2008) konnte die Enzephalitozoonose bei 83 von 118 Kaninchen mit neurologischen Symptomen als Ursache bewiesen werden. Die pathohistologische Untersuchung gilt nach wie vor als Goldstandard für den Nachweis der Enzephalitozoonose, kann aber nur post mortem durchgeführt werden, was ihren Einsatz stark limitiert.

Die **Antikörperbestimmung** ist beweisend für den Kontakt des Kaninchens mit dem Erreger (CSOKAI et al., 2009), nicht aber für eine klinische Manifestation und auch nicht für eine akute Infektion. In der vorliegenden Studie wurden alle Kaninchen (95) auf das Vorliegen von Antikörpern untersucht, wobei bei 89 Tieren der Antikörpertiter gegen *E. cuniculi* positiv war. Die anderen 6 Kaninchen hatten zwar einen negativen AK-Titer, aber in der histopathologischen Untersuchung konnte *E. cuniculi* nachgewiesen werden. Somit lag die Sensitivität der Antikörper-Bestimmung bei 93 %. MEYER-BRECKWOLDT untersuchte 200 Kaninchen in einer Feldstudie, wobei 116 einen negativen und 84 einen positiven Antikörper-Titer aufzeigten. Von den 84 Tieren wiesen 34 Tiere ein ungestörtes Allgemeinbefinden, 32 Tiere ein gestörtes Allgemeinbefinden und 18 Tiere typische klinische Symptome der Enzephalitozoonose auf. Die Studie von EWRINGMANN und GÖBEL (1999) deckte 125 seropositive Kaninchen auf in einer Studie von 277 getesteten Tieren. Hiervon zeigten 46 seropositive Tiere keinerlei Symptome der Enzephalitozoonose auf und waren von ungestörtem Allgemeinbefinden und 46 seropositive Tiere Symptome der Enzephalitozoonose (23 mit ZNS-Symptomen, 16 mit Niereninsuffizienz und 7 mit phakoklastischer Uveitis). KÜNZEL und Mitarbeiter (2008) untersuchten 191 Kaninchen mit klinischen Symptomen einer Enzephalitozoonose. Davon wurden 184 Tiere serologisch untersucht, wobei 144 Kaninchen einen positiven Antikörper-Titer aufwiesen. 108 dieser Kaninchen zeigten neurologische Symptome, 21 Kaninchen eine phakoklastische Uveitis und 5 Kaninchen Symptome einer Niereninsuffizienz. In einer aktuellen Studie von FLOCK (2010) wurden 773 Kaninchen getestet, wovon 48 % (266/555) der kranken Kaninchen einen positiven Antikörper-Titer gegen *E. cuniculi* aufwiesen. Von den Kaninchen mit bewiesener Enzephalitozoonose hatten 96 % einen positiven Antikörper-Titer gegen *E. cuniculi*. Die Sensitivität der Antikörperbestimmung in der vorliegenden

Studie ähnelt der Sensitivität des Testes von FLOCK (2010). Es zeigt auf, dass die Antikörperbestimmung gegen *E. cuniculi* wichtiger ist, als ursprünglich angenommen. Da in älteren Studien mit dem positiven Antikörper-Titer gegen *E. cuniculi* immer nur der Erregerkontakt, nicht unbedingt die aktuelle Erkrankung in Verbindung gebracht wurde. Der serologische Test ist einfach und recht kostengünstig durchzuführen und ist somit ein wichtiges Element in der Diagnostik zur Enzephalitozoonose. Insgesamt ist die Diagnose aus einer Kombination von hinweisenden Befunden inkl Liquoruntersuchung und Ausschluss von Differentialdiagnose zu stellen.

Zum **Ausschluss von Differentialdiagnosen** sind neben ausführlicher Anamnese und klinischer und neurologischer Untersuchung weiterführende Untersuchungen wie Blutuntersuchungen, zum Ausschluss der Toxoplasmose, und bildgebende Diagnostik wie Röntgen oder auch moderne Schnittbildverfahren nötig.

In der **Anamnese** werden häufig plötzlich aufgetretene neurologische Symptome, Apathie, Anorexie ohne Traumaverdacht erwähnt. Nach genauerer Anamnese können Vorerkrankungen oder Stressoren ermittelt werden, die diese Kaninchen zwei bis drei Wochen zuvor geschwächt haben könnten. Bei allen in der vorliegenden Studie untersuchten Kaninchen berichteten die Besitzer über plötzlich aufgetretene neurologische Symptome wie Kopfschiefhaltung, Ataxien, Kreishoppeln bis hin zum Umfallen und mangelndem Stehvermögen. Nicht immer wurden Erkrankungen wie Schnupfen oder Blasenentzündung sowie andere Stressoren wie Umzüge oder Aufenthalt in fremder Gruppe wenige Wochen zuvor erwähnt. Ein Trauma konnte nicht immer 100%ig ausgeschlossen werden. In manchen Fällen zeigten die Kaninchen eine reduzierte Futteraufnahme und Apathie.

Wenn die **neurologische Form** der Enzephalitozoonose vorliegt, können häufig Symptome des Vestibularsyndroms oder auch vestibuläre Ataxien beobachtet werden (KUNSTYR & NAUMANN, 1985; HARCOURT-BROWN & HOLLOWAY, 2003; KÜNZEL et al., 2008; JASS et al., 2008; CRAY et al., 2009). In der vorliegenden Studie zeigten 76,0 % (80/95) Symptome des Vestibularsyndroms und 24,0 % (15/95) vestibuläre Ataxien. Diese Verteilung der neurologischen Symptome spiegelt sich auch in älteren Studien wieder. So zeigten 18 von 84 der untersuchten Tiere bei MEYER-BRECKWOLDT (1996) eine Kopfschiefhaltung. Bei 11 der 18 Kaninchen konnten im Vorbericht

Stressoren (fremde Pflegeperson (5/11), weiteres Kaninchen im Haushalt (3/11), Umzug (3/11)) ermittelt werden, die vor dem Auftreten erster klinischer Symptome auf die Tiere eingewirkt hatten. Als weitere klinische Symptome wurden Nystagmus (8/18) sowie Rotation um die eigene Längsachse vermerkt. In der Studie von EWRINGMANN und GÖBEL (1999) zeigten 54,9 % (28/51) neurologische Symptome wie Ataxie (n = 19), Kopfschiefhaltung (n = 17) und Nystagmus (n = 17) auf. Angaben über vorangegangene Erkrankungen oder Stressoren wurden nicht gemacht. Die Studie von KÜNZEL und Mitarbeitern (2008) zeigt eine Untersuchung von 191 Kaninchen mit Enzephalitozoonoseverdacht. Davon konnten 140 Tiere mit neurologischen Symptomen untersucht werden. Symptome des Vestibularsyndroms konnten bei 87,9 % ermittelt werden, wobei am häufigsten vestibuläre Ataxien (90,9 %), gefolgt vom Kreishoppeln (48,8 %) und Rotation um die Längsachse (46,7 %) sowie Nystagmus bei 28,3 % auftraten. Nähere Informationen zum Vorbericht und vorangegangenen Stressoren oder Erkrankungen fehlen. Die Studien ähneln sich in der Häufigkeit und Verteilung der neurologischen Symptome. Eher treten Kopfschiefhaltung, Kreishoppeln und Rotation um die Längsachse auf, im Vergleich zu Ataxien, Krämpfen und Lähmungen. Das lässt Rückschlüsse auf die bevorzugte Lokalisation der Läsionen im Vestibularbereich zu.

Röntgenaufnahmen von Wirbelsäule und Schädel dienen der Diagnose von Differentialdiagnosen wie Frakturen, Luxationen und der Diagnose raumfordernder Prozesse oder Veränderungen im Ohr, wie bei der Otitis. Röntgenbilder wurden in der vorliegenden Studie nicht durchgeführt, was mit als Limitation der Studie anzusehen ist. Bei KÜNZEL und Mitarbeitern (2007) wurden bei 65 Kaninchen ein Röntgenbild der Bulla tympanica angefertigt, was bei 51 Kaninchen unverändert war. Die Otitis scheint somit bei Kopfschiefhaltung und neurologischen Symptomen im Vergleich zur Enzephalitozoonose weniger häufig von Bedeutung zu sein.

Ausschluss weiterer Differentialdiagnosen

In einer retrospektiven Untersuchung von GRUBER (2008) wurde anhand der pathohistologischen Untersuchung bei 118 zuvor neurologisch erkrankten Kaninchen bei 5 Tieren ein Trauma als Ursache der neurologischen Symptome identifiziert. Zwei von den fünf Kaninchen zeigten Myelomalazien infolge von Hundebissen, bei einem Tier kam es zu Malazie infolge einer Fraktur und

Luxation auf Höhe des 5. und 6. Lendenwirbels, ein Kaninchen hatte einen Bandscheibenvorfall zwischen dem 6. und 7. Halswirbel und ein Kaninchen hatte intrakranielle Blutungen infolge eines Traumas unbekannter Genese. Weitere Erkrankungen, die möglicherweise zur Enzephalitozoonose geführt haben, konnten in der Studie von GRUBER (2008) bei 10 von 78 Tieren nachgewiesen werden. Von diesen 10 Kaninchen hatten vier ein Lymphom im ZNS, zwei hatten zusätzliche metabolische Erkrankungen, zwei hatten Otitis media, eins zeigte eine degenerative Erkrankung, die mit weitläufiger Malazie einherging und ein weiteres Kaninchen hatte eine idiopathische Meningoencephalitis, deren neurologische Läsionen nicht mit Enzephalitozoonose vereinbar waren. In der vorliegenden Studie wurden nur Kaninchen mit Enzephalitozoonose-Verdacht untersucht. In der histopathologischen Untersuchung wurde die Enzephalitozoonose bei allen euthanasierten Tieren bestätigt. Bei 5 % (2/40) der Kaninchen konnte zusätzlich ein Lymphom nachgewiesen werden. Lediglich eine Antikörper-Titer-Bestimmung gegen Toxoplasmose wurde bei einigen Tieren durchgeführt und war in jedem Fall negativ. Bei KÜNZEL und Mitarbeitern (2008) wurden bei 157 Antikörper-Bestimmungen gegen *Toxoplasma gondii* durchgeführt und waren bei 5,1 % (8/157) positiv, wobei von diesen 8 Tieren 7 ebenfalls einen positiven E.-cuniculi-Antikörpertiter aufwiesen.

Sowohl in der Human- als auch der Tiermedizin werden diverse Protokolle zur **Therapie** der Enzephalitozoonose diskutiert. Die meisten Protokolle bestehen aus Kombinationen von Benzimidazolen und/oder Antibiotika und/oder Glukokortikoiden ergänzt durch symptomatische Therapie. In Anlehnung an die Humanmedizin werden **Benzimidazole** auch in der Tiermedizin als das Mittel der Wahl in der Therapie gegen Mikrosporidien empfohlen (CANNING & HOLLISTER, 1991; GAMBOA-DOMINGUEZ et al., 2003). In *in-vitro*-Studien zeigte sich Albendazol mit als potentestes Präparat gegen *E. cuniculi* (BEAUVAIS et al., 1994). Die Wirkstoffgruppe der Benzimidazole kann eine Bindung zum Tubulin der Parasitenzelle ausbilden (LACEY, 1990; LANUSSE, 1993). Es kommt zu einer Hemmung der Polymerisation vom Tubulin zum Mikrotubuli, wobei gleichzeitig die Depolymerisation am anderen Ende der Mikrotubuli unverändert weitergeht (LACEY, 1990). Somit gehen Länge und Struktur der Mikrotubuli verloren (FRIEDMANN, 1978; IRELAND, 1979; LACEY, 1990). Lebenswichtige strukturelle und funktionelle Vorgänge innerhalb

der Erregerzelle werden beeinträchtigt (LANUSSE, 1993). Es kommt zu einer gestörten Ausbildung des Zytoskeletts, auch die Aufnahme und der intrazelluläre Transport von Nährstoffen und Stoffwechselsubstraten wird vermindert (RAHMAN, 1977). Nachdem alle Reserven aufgebraucht sind, stirbt der Erreger ab und kann nach zwei bis drei Tagen ausgeschieden werden (UNGEMACH, 1994). Während der Ausgangswirkstoff nur kurzzeitig und in minimaler Konzentration im Plasma zu messen ist (MARRIER, 1980; GYURIK, 1981), sind seine in der Leber verstoffwechselten Metaboliten länger im Plasma nachzuweisen (HENNESSY, 1989; LACY, 1990; LANUSSE, 1995). Während Albendazol in der Humanmedizin sehr gute Erfolge erzielen kann (RIDOUX & DRANCOURT, 1998; DIDIER et al., 2005), wird der Einsatz bei Kaninchen aber aufgrund seiner embryotoxischen und teratogenen Wirkung vermieden (VENKATESAN, 1998). Hierbei gilt Albendazolsulfoxid verantwortlich für die teratogene Wirkung, da es das Mikrotubulin blockiert (DELATOUR, 1984). Als Alternative zu Albendazol wurde Fenbendazol bereits bei SUTER und Mitarbeitern (2001) in einer therapeutischen und prophylaktischen Studie mit acht Kaninchen erfolgreich eingesetzt, so dass bei diesen Tieren kein Antikörper-Titer gegen *E. cuniculi* und auch keine Sporen im Gehirn nach 4 Wochen nachgewiesen werden konnten. HARCOURT und HOLLOWAY (2003) wechselten von Albendazol zu Fenbendazol während einer laufenden Studie, wobei keinerlei Aussage über die bessere oder schlechtere Wirksamkeit der jeweiligen Wirkstoffe getroffen wurde. Fenbendazol wirkt wie die Gruppe der Benzimidazole durch Bindung am Tubulin der Parasitenzelle und somit Hemmung der Mikrotubuli (LACEY, 1990; LANUSSE, 1993). Dabei wird angenommen, dass Fenbendazol wie Albendazol die Blut-Hirn-Schranke bei infizierten Kaninchen passieren kann (VENKATESAN, 1998). In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass Fenbendazol eine statistisch signifikante Besserung der neurologischen Symptome gemäß des neurologischen Scores in der Behandlung von Kaninchen mit Enzephalitozoonoseverdacht erzielen kann. SUTER und Mitarbeiter (2001) erforschten die prophylaktische und therapeutische Wirkung von Fenbendazol, wobei jeweils nur vier Tiere miteinander verglichen wurden und die Kaninchen, anders als in der vorliegenden Studie experimentell infiziert wurden. Bei SUTER und Mitarbeitern (2001) konnte vier Wochen nach der Therapie weder ein Antikörper-Titer gegen *E. cuniculi* noch Sporen im Gehirn nachgewiesen werden. In den Therapieprotokollen von EWRINGMANN und GÖBEL (1999),

HARCOURT-BROWN & HOLLOWAY (2003) sowie KÜNZEL (2008) wurde Fenbendazol kombiniert verwendet. Inwiefern die Therapieerfolge von durchschnittlich 60% Heilungschance der klinischen Symptome vom Fenbendazoleinsatz abhängig sind, kann nicht beurteilt werden. Allerdings wäre diese vergleichbar mit der vorliegenden Studie, insbesondere der Therapiegruppe mit Oxytetracyclin und Fenbendazol.

Obwohl Kaninchen eine zum Teil sehr deutliche Verbesserung oder gar Heilung der klinischen Symptome zeigen, gilt *E. cuniculi* als nicht aus dem Körper eliminierbar (SHADDUCK & PAKES, 1971; AKERSTEDT, 2003). So konnten KOTKOVA und Mitarbeiter (2013) in einem Experiment mit immunkompetenten BALB/c und SCID Mäusen zum einen die Wirksamkeit von Albendazol sowie die Reaktivierung der Erreger bei Immunsuppression belegen. Hierfür wurden BALB/c und SCID Mäuse experimentell infiziert und Teilgruppen der infizierten Tiere mit Albendazol therapiert. Bei den BALB/c-Mäusen konnte zwei Wochen nach Therapie kein Erreger mehr in den Organen mehr nachgewiesen werden. Nach einer Immunsuppression mit Dexamethason bei diesen Tieren konnten wieder Erreger in allen Organen nachgewiesen werden. Der Verbreitungsumfang zeigte sich bei den mit Albendazol behandelten BALB/c-Mäusen weitaus geringer als bei den unbehandelten BALB/c-Mäusen.

Als weitere Wirkstoffgruppe werden immer wieder **Antibiotika** in der Therapie gegen *E. cuniculi* genannt. Die jeweilige Wirksamkeit liegt zwei in vitro Studien zugrunde (WALLER, 1979; BEAUVAIS, 1994). BEAUVAIS und Mitarbeiter (1994) untersuchten 21 Wirkstoffe in unterschiedlicher Konzentration auf ihre in vitro Wirksamkeit auf *E. cuniculi*. Wobei sich kein Antibiotikum als effektiver Wirkstoff herausstellte. Lediglich Doxyzyklin zeigte eine Wirksamkeit gegen Mikrosporidien aber auch gegen Fibroblasten. In einer früheren Studie konnte WALLER (1979) eine im Vergleich bessere Wirksamkeit von Doxyzyklin beweisen. Einen 100%igen Therapieerfolg durch Antibiotikagabe konnte auch WALLER (1979) in seiner in vitro Studie nicht nachweisen. Oxytetracyclin wird häufiger in kombinierten Therapieprotokollen erwähnt, obwohl eine objektive Evaluierung seiner Wirksamkeit auch in vivo fehlt (EWRINGMANN & GÖBEL, 1999; HARCOURT-BROWN, 2003; KÜNZEL et al., 2007). Die vorliegende Studie war nicht darauf ausgelegt, die Wirksamkeit von Oxytetracyclin zu belegen oder revidieren. Dazu wäre eine weitere Therapiestudie notwendig.

Doxyzyklin gehört zu den Tetracyklinen. Es ist lipophiler, weshalb es eine bessere Penetration, ein größeres Verteilungsvermögen und eine langsamere Elimination aufweist (RIOND, 1990; McEVOY, 1992; KROKER, 1999). Durch energieabhängige Transportsysteme gelangt es in die Bakterienzelle. Dort bindet es an die ribosomale 30-S-Untereinheit und behindert die Bindung von Aminoacyl-tRNA an der Akzeptorstelle am mRNA-Ribosomen-Komplex. Die Proteinsynthese wird unterbrochen und es bleiben Polypeptidstücke zurück. Doxyzyklin kann auch reversibel an die ribosomale 50-S-Untereinheit binden (RIVIERE, 1995c; KAPUSNIK-UNER, 1995; ROSIN, 1998; PLUMB 1999;). Während eine gute Wirksamkeit gegen grampositive und –negative Bakterien sowie Protozoen und Mycoplasmen nachgewiesen werden konnten (WILSON, 1988; MEIJER, 1993; EMEA, 1997; PLUMB, 1999), gelten *E. coli*, *Klebsiellen*, *Bacteroides*, *Enterobacter*, *Proteus* und *Pseudomonas aeruginosa* resistent gegenüber Doxyzyklin (McEVOY, 1992; PLUMB, 1999). Da Doxyzyklin die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden kann, ist der direkte Einsatz gegen *E. cuniculi* fraglich, sondern bietet eher eine Ergänzung zur Vorbeugung gegenüber Sekundärerregern bei den immunsuppremierten, erkrankten Tieren mit Enzephalitozoonose.

Als unwirksame Antibiotika konnten Pyrimethamine und Sulfonamide ermittelt werden (BEAUVAIS et al., 1994). Trimethoprim wirken bakteriostatisch indem sie die Tetrahydrofolsäuresynthese blockieren (PRESCOTT, 1988). Diese ist die aktive Form der Folsäure und wichtig als Cofaktor bei diversen Biosynthesereaktionen (MINKOWSKI, 2001). Da Bakterien die Folsäurederivate und Folsäure des Wirtes nicht aufnehmen können, sind sie auf die Eigensynthese angewiesen (DEVER, 1991). Durch die kombinierte Anwendung von Trimethoprim und Sulfonamiden wird die bakterielle Folsäuresynthese an zwei aufeinanderfolgenden Schritten gehemmt und die Wirksamkeit beider Substanzen damit potenziert (KROKER, 2003). Zudem wird die Resistenzentwicklung vermindert (DOWLING, 2004). Die verschiedenen Sulfonamide haben alle den gleichen Wirkungsmechanismus. Sie unterscheiden sich jedoch in ihrer Löslichkeit, Proteinbindung, Gewebeverteilung, Metabolisierungs- und Eliminationsrate. Die bakteriostatische Wirkung kommt durch die kompetitive Hemmung der Dihydropteroinsäure-Synthetase zustande, was zu einer Hemmung der Folsäuresynthese führt (McEVOY, 1992). Trimethoprim/Sulfonamid-

Kombinationen haben eine synergistische und bakterizide Wirkung (SPOO, 2001). Die Rolle des Eingreifens in die Folsäuresynthese bei *E. cuniculi* ist in der Literatur nicht weiter erwähnt. Könnte allerdings die Unwirksamkeit erklären.

Viele bekannte Enzephalitozoonose-Therapieprotokolle verwenden zusätzlich **Glukokortikoide** in der Behandlung gegen die Enzephalitozoonose (MEYER-BRECKWOLDT, 1996; EWRINGMANN & GÖBEL, 1999; KÜNZEL et al., 2008). Dabei wird die entzündungshemmende Wirkung genutzt und durch Dosisreduzierung versucht, die immunsuppressive Wirkung nicht zu erreichen (EWRINGMANN & GÖBEL, 1999). Gerade immunsupprimierte Kaninchen gelten als anfällig, Symptome aufgrund von *E. cuniculi* auszubilden (KOUDELA et al., 1993; HORVATH et al., 1999; LALLO et al., 2002). BORGMANN und Mitarbeiter (1976) raten allerdings von selbst niedriger und einmaliger Dosierung von Glukokortikoiden bei Kaninchen ab. Sie konnten nachweisen, dass es selbst bei lokaler einmaliger Anwendung zu Schäden in lymphatischen Organen, der Leber und den Nebennieren kommen kann. Die vorliegende Studie konnte auch keinen positiven Therapieerfolg aufgrund des Einsatzes von Dexamethason als Glukokortikoidvertreter nachweisen. Weder die neurologischen Symptome noch die Überlebensrate sowie das Langzeitüberleben, konnten einen signifikanten Unterschied bei der Verwendung von Dexamethason aufzeigen. Inwieweit Dexamethason einen Einfluss auf den Wirkstoffspiegel des Fenbendazols hatte, wurde in der vorliegenden Studie nicht weiter untersucht. Wie auch schon von KOTKOVA und Mitarbeitern (2013) aufgezeigt, ist eine Kortisonbehandlung fragwürdig, da selbst bei immunkompetenten Tieren eine Reaktivierung des Erregers nachgewiesen werden konnte.

Fazit zu Kombinationen

Lediglich die Auswertung der **Überlebensquote** lässt sich mit älteren Studien vergleichen. Diese lag in der vorliegenden Studie bei 60,0 %, wenn die Kaninchen Fenbendazol erhalten hatten. Vergleicht man dieses Ergebnis mit der Studie von EWRINGMANN und GÖBEL (1999) scheint die Quote niedriger zu sein, allerdings wurden 1999 nur 20 Tiere und deren weiterer Verlauf benannt, was die Aussagekraft etwas mindert. Eher vergleichbar sind die Studien von HARCOURT-BROWN und HOLLOWAY (2003) sowie von KÜNZEL und Mitarbeitern (2008). Wo 125 oder 108 Kaninchen mit neurologischen Symptomen ausgewertet wurden und eine Überlebensquote von 52,6 % oder 54,2 % ermittelt

werden konnte. Beide Studien verwendeten noch Dexamethason in der Kombination. Hierbei könnte kritisch hinterfragt werden, ob die Serumkonzentration von Fenbendazol durch das Dexamethason gesenkt und somit seine Wirksamkeit reduziert wurde (DUNCOMBE et al., 1977; JUNG et al., 1990).

In Bezug auf das **Langzeitüberleben** gibt es sehr wenige Angaben in der Literatur. Nur HARCOURT-BROWN und HOLLOWAY (2003) ermittelten 6 Monate nach Diagnosestellung eine Überlebensquote von 53,6 %. Alle anderen Studien veröffentlichten keinerlei Aussage über ein Überleben über den stationären Aufenthalt hinaus. Die vorliegende Studie zeigte eine Überlebensquote von mindestens 24,2% (23/95) nach 6 Monaten. Eine genauere Aussage ist nicht möglich, da bei 43,5 % (20/46) keine weiteren Daten zum Überleben nach Klinikentlassung erhoben werden konnten.

Limitation der Studie

Bei der objektiven Evaluierung der vorliegenden Studie wurde ein **neurologischer Score** verwendet, der noch nicht unabhängig geprüft wurde. Er basiert auf den häufigsten neurologischen Symptomen von enzephalitozoonoseverdächtigen Kaninchen, wie Kopfschiefhaltung, Nystagmus und Bewegung oder Grad der Belastung und spinalen Reflexe. Der beim Menschen verwendete Dynamic Gait Index (DGI) (SHUMWAY-COOK et al., 1997; WITHNEY et al., 2003) lässt sich nicht auf das Kaninchen übertragen. Hierbei werden Tempowechsel, Richtungswechsel und verschiedene Untergründe genutzt um die Orientierung oder auch das Gleichgewichtsempfinden zu überprüfen. Die jeweilige Punktevergabe im verwendeten Score und deren Wichtung kann sicherlich nochmal überdacht werden.

Die vorliegende Studie ist die **erste *in vivo* Therapiestudie**, in der die weitverbreiteten Therapieprotokolle gegenübergestellt und objektiv ausgewertet wurden. Sie zeigt, dass enzephalitozoonoseverdächtige Kaninchen mit einer Kombinationstherapie aus Fenbendazol und Oxytetracyclin ohne Dexamethason signifikant bessere Erfolge in der Behandlung der klinischen Symptome, der Überlebensquote und des Langzeitüberlebens erzielen können. Inwieweit die Antibiose bei der Therapie das Ergebnis positiv beeinflusst, muss in weiteren Studien evaluiert werden. Gerade im Hinblick auf das zoonotische Potential von *E. cuniculi* ist eine effektive Therapie mit Elimination der Erreger wünschenswert,

um das Risiko der Übertragung weiter zu minimieren und so zur Schaffung *E.-cuniculi*-freier Bestände beizutragen.

V. ZUSAMMENFASSUNG

In dem Zeitraum von 2000 bis 2008 wurden 95 Kaninchen mit Enzephalitozoonoseverdacht und neurologischen Symptomen an der Medizinischen Kleintierklinik, der Ludwig-Maximilians Universität München, behandelt. Die Standardbehandlungen bestanden aus Oxytetracyclin (von 2000 – 2003; n = 50) oder Fenbendazol und Oxytetracyclin (von 2004 – 2008; n = 45), und die Kaninchen wurden zufällig ausgewählt um mit oder ohne Dexamethason behandelt zu werden. Jedes Therapiesystem wurde über zehn Tage gegeben, mit Infusionen, Vitamin B und, wenn nötig ergänzender Zwangsernährung. Der Therapieerfolg wurde anhand der Überlebensrate bis Tag zehn, einem neurologischen Score und dem Langzeitüberleben mittels Kaplan-Meier-Kurven bestimmt. Der Einsatz von Fenbendazol im Behandlungsprotokoll war mit einer erhöhten Überlebensquote am Tag zehn ($p = 0,043$), besseren neurologischen Scores ($p = 0,008$) und einer besseren Langzeitüberlebensrate ($p = 0,025$), basierend auf den Ergebnissen einer univariaten Analyse, verbunden. Eine Behandlung mit Dexamethason zeigte keinerlei Wirkung auf den neurologischen Score, das Kurzzeit- oder Langzeitüberleben. Die vorliegende Studie lieferte keinen Beweis dafür, dass Dexamethason eine effektive Komponente im Behandlungsschema darstellt. Inwiefern Oxytetracyclin in der kombinierten Therapie notwendig und sinnvoll ist, konnte in der vorliegenden Studie nicht ermittelt werden, da alle Tiere Oxytetracyclin erhalten hatten. Hierfür wären weitere Studien notwendig.

VI. SUMMARY

Between 2000 and 2008, 95 rabbits with suspected encephalitozoonosis and neurological symptoms were treated at the Clinic of Small Animal Medicine, Ludwig Maximilian University Munich. Standard treatment consisted of oxytetracycline (from 2000 – 2003; $n = 50$) or fenbendazole and oxytetracycline (from 2004 – 2008; $n = 45$), and the rabbits were randomly assigned to treatment groups with or without dexamethasone. Each therapeutic regime was given for 10 days, with fluids, B vitamins and nutritional support added as needed. Therapeutic success was evaluated by assessing the survival rate on day 10, the neurological score of the surviving rabbits and Kaplan-Meier curves for long-term survival past 10 days. Inclusion of fenbendazole in the treatment protocol was associated with increased survival rates on day 10 ($p = 0.043$), better neurological scores ($p = 0.008$), and improved long-term survival ($p = 0.025$) based on the results of univariate analyses. Treatment with dexamethasone showed no effect on neurological score or on short- or long-term survival. The study did not provide any evidence that dexamethasone is an effective component of the treatment scheme. The present study could not illustrate in what way oxytetracycline is necessary and reasonable in combined therapy against *E. cuniculi*, because all rabbits were treated with oxytetracycline. Further studies were necessary.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

- Akerstedt J. An indirect ELISA for detection of *Encephalitozoon cuniculi* infection in farmed blue foxes (*Alopex lagopus*). *Acta Vet Scand* 2002; 43(4): 211-20.
- Arnesen K, Nordstoga K. Ocular encephalitozoonosis (nosematosis) in blue foxes. Polyarteritis nodosa and cataract. *Acta Ophthalmol (Copenh)*. 1977 ; 55(4): 641-51.
- Ashton N, Cook C, Clegg F. Encephalitozoonosis (nosematosis) causing bilateral cataract in a rabbit. *Br J Ophthalmol*. 1976; 60(9): 618-31.
- Asmuth DM, DeGirolami PC, Federman M, Ezratty CR, Pleskow DK, Desai G, Wanke CA. Clinical features of microsporidiosis in patients with AIDS. *Clin Infect Dis*. 1994; 18: 819-25.
- Anver MR, King NW, Hunt RD. Congenital encephalitozoonosis in a squirrel monkey (*Aimiri sciureus*). *Vet Path*. 1972; 9: 474-80.
- Baker RJ. Studies on the life cycle and transmission of *Encephalitozoon cuniculi*. Thesis of the Univ. of London. 1974.
- Baneux PJ, Pognan F. In utero transmission of *Encephalitozoon cuniculi* strain type I in rabbits. *Lab Anim*. 2003; 37: 132-38.
- Bart A, Wentink-Bonnema EM, Heddema ER, Buijs J, van Gool T. Frequent occurrence of human-associated microsporidia in fecal droppings of urban pigeons in amsterdam, the Netherlands. *Appl Environ Microbiol*. 2008; 74: 7056-8.
- Basson PA, McCully RM. Nosematosis. Report of a canine case in the Republic of South Africa. *J S Af. Med Assoc*. 1966; 37: 3-9.
- Beauvais B, Sarfaty C, Chillier S, Derouin F. In vitro model to assess the effect of antimicrobial agents on *Encephalitozoon cuniculi*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1994; 38: 2440-8.
- Bedernik P, Vavra J. Further observations on the maintenance of *Encephalitozoon cuniculi* in tissue culture. *J Protozool*. 1972; 19: Suppl. 229.
- Bender L. Spontaneous Central Nervous System Lesions in the Laboratory Rabbit. *Am J Pathol*. 1925; 1: 653-6.
- Benz P, Maass G, Csokai J, Fuchs-Baumgartinger A, Schwendenwein I, Tichy A, Nell B. Detection of *Encephalitozoon cuniculi* in the feline cataractous lens. *Vet Ophthalmol*. 2011; 14 Supp 1: 37-47.

- Bergquist NR, Stintzing G, Smedman L, Waller T, Andersson T. Diagnosis of encephalitozoonosis in man by serological tests. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1984; 288: 902.
- Biderre C, Pages M, Metenier G, Canning EU, Vivares CP. Evidence for the smallest nuclear genome (2.9 mb) in the microsporidium *Encephalitozoon cuniculi*. *Mol Biochem Parasitol* 1995; 74: 229-31.
- Bismanis JE. Detection of latent murine nosematosis and growth of *Nosema cuniculi* in cell cultures. *Can J Microbiol*. 1970; 16: 237-42.
- Bjerkås I. Brain and spinal cord lesions in encephalitozoonosis in mink. *Acta Vet Scand*. 1990; 31: 423-32.
- Bjotvedt G, Bertke EM, Hendricks GM. Peritonitis due to *Pasteurella multocida* in a rabbit. *Vet Med Small Anim Clin*. 1979; 74: 215-6.
- Black SS, Steinohrt LA, Bertucci DC, Rogers LB, Didier ES. *Encephalitozoon hellem* in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *Vet Pathol*. 1997; 34: 189-98.
- Borgmann AR, Bogle D, Robb CA, McDonald TO. Comparative toxicity of two-dexamethasone derivatives following topical ocular instillation to rabbits. II. Systemic histopathological changes. *Toxicology*. 1976; 6: 77-84.
- Boot R, Van Knapen F, Krijt BC, Walvoort HC. Serological evidence for *Encephalitozoon cuniculi* infection (nosematosis) in gnotobiotic guineapigs. *Lab Anim*. 1988; 22: 337-42.
- Boot R, Hansen C, Nozari N, Thuis H. Comparison of assays for antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits. *Lab Anim*. 2000; 34(3): 281-9.
- Botha WS, Van Dellen AF, Stewart CG. Canine encephalitozoonosis in South Africa. *J S Afr Vet Med Ass*. 1979; 50: 135-44.
- Botha WS, Dormehl IC, Goosen DJ. 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: 62-5.
- Buyukmihci N, Bellhorn RW, Hunziger J, Clinnton J. *Encephalitozoon* (*Nosema*) infection of the cornea in a cat. *J Am Vet Med*. 1977; 171: 355-7.

- Bywater JE, Kellett BS. Humoral immune response to natural infection with *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits. *Lab Anim.* 1979; 13: 2937.
- Cali A. Morphogenesis in the genus *Nosema*. *Proc. 4th Int. Colloquium on Infect. Pathology Maryland (USA).* 1970. 431-8.
- Canning EU. An unusually heavy natural infection of *Nosema cuniculi* in a laboratory rat. *Trans Soc Trop Med Hyg.* 1965; 59: 371.
- Canning EU. Microsporidia. In: Kreier. J. P. (Hrsg.) *Parasitic protozoa.* Acad Press, New York. 1977.
- Canning EU, Hollister WS. In vitro and in vivo investigations of human microsporidia. *J Protozool.* 1991; 38: 631-5.
- Chalupský J, Vavra J, Bedrník P. Detection of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits by the indirect immunofluorescence antibody test. *Folia Parasitol. (Praha).* 1973; 20: 281-4.
- Chalupský J, Vavra J, Bedrník P. *Encephalitozoonosis* in laboratory animals – a serological survey. *Folia Parasitol. (Praha).* 1979; 26: 1-8.
- Chalupský J, Vavra J, Gaudin JC, Vandewalle P, Arthur CP, Guenezan M, Launay H. Serological evidence of the occurrence of *encephalitozoonosis* and toxoplasmosis in the European wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) in France. *Bull. Soc. Parasitol.* 1990; 8: 91-5.
- Cisláková L, Literák I, Balent P, Hipíková V, Levkutová M, Travníček M, Novotná 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.
- Cisláková L, Halánová M. Microsporidial infections in immunocompromised hospitalized patients. *Epidemiol Mikrobiol Imunol.* 2003; 52: 81-3.
- Cohn LA. Glucocorticosteroids as immunosuppressive agents. *Semin Vet Med Surg (Small Anim).* 1997; 12: 150-6.
- Cole JR, Sangster LT, Sulzer CR, Pursell AR, Ellinghausen CH. Infections with *Encephalitozoon cuniculi* and *Leptospira interrogans*, serovars grippotyphosa and ballum, in a kennel of foxhounds. *J Am Vet Med Assoc.* 1982; 180(2): 435-7.
- Cox JC, Walden NB. Presumptive diagnosis of *Nosema cuniculi* in rabbits by immunofluorescence. *Res Vet Sci.* 1972; 13: 595-7.
- Cox JC, Pye D. Serodiagnosis of *nosematosis* by immunofluorescence using cell culture-grown organisms. *Lab. Anim.* 1975. 2; 297-304.

- Cox JC, Gallichio HA, Pye D, Walden NB. Application of immunofluorescence to the establishment of an *Encephalitozoon cuniculi*-free rabbit colony. *Lab Anim Sci.* 1977; 27(2): 204-9.
- Cox JC, Hamilton C, Attwood HD. An investigation of the route and progression of *Encephalitozoon cuniculi* in adult rabbits. *J Protocool.* 1979; 26: 260-5.
- Cox JC, Ross I. A serological survey of *Encephalitozoon cuniculi* infection in the wild rabbit in England and Scotland. *Rex Vet Sci.* 1980; 28: 396.
- Cox JC, Hamilton RC, Pye D, Edmonds JW. The infectivity of *Encephalitozoon cuniculi* in vivo and in vitro. *Z Parasitenkd.* 1986; 72: 65-72.
- Cray C, Arcia G, Schneider R, Kelleher SA, Arheart KL. Evaluation of the usefulness of an ELISA and protein electrophoresis in the diagnosis of *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbits. *Am J Vet Res.* 2009; 70: 478-82.
- Cray C, Rivas Y. Seroprevalence of *Encephalitozoon cuniculi* in dogs in the United States. *J Parasitol.* 2013; 99(1): 153-4.
- Csokai J, Gruber A, Künzel F, Tichy A, Joachim A. *Encephalitozoonosis* in pet rabbits (*Oryctolagus cuniculus*): pathohistological findings in animals with latent infection versus clinical manifestation. *Parasitol Res.* 2009; 104: 629-35.
- Dao ML. Detection of disseminated microsporidiosis in manatees (*Trichechus manatus latirostris*). Biology, University of California, Tampa FL USA, 2004.
- Deeb BJ, Carpenter JW. In: *Ferrets, Rabbits and Rodents: Clinical Medicine and Surgery*, Chapter 20, 2nd ed., Hillyer E.V. and Quesenberry K.E., eds. W.B. Saunders Company 2004; 203-210.
- Deeb BJ, Di Giacomo RF. Cerebral larva migrans caused by *Baylisascaris* sp. in pet rabbits. *J Am Vet Med Assoc.* 1994; 205: 1744-7.
- De Groote MA, Visvesvara G, Wilson ML, Pieniazek NJ, Slemenda SB, daSilva AJ, Leitch GJ, Bryan RT, Reves R. Polymerase chain reaction and culture confirmation of disseminated *Encephalitozoon cuniculi* in a patient with AIDS: successful therapy with albendazole. *J Infect Dis.* 1995; 171(5): 1375-8.

- del Aguila C, Rueda C, De la Camara C, Fenoy S. Seroprevalence of anti-Encephalitozoon antibodies in Spanish immunocompetent subjects. *J Eukaryot Microbiol.* 2001; Suppl: 75-78.
- Deplazes P, Mathis A, Müller C, Weber R. Molecular epidemiology of Encephalitozoon cuniculi and first detection of Enterocytozoon bieneusi in faecal samples of pigs. *J Eukaryot Microbiol.* 1996; 43(5): 93.
- Didier ES, Varner PW, Didier PJ, Aldras AM, Millichamp NJ, Murphey-Corb M, Bohm R, Shadduck JA. Experimental microsporidiosis in immunocompetent and immunodeficient mice and monkeys. *Folia Parasitol.* 1994; 41: 1-11.
- Didier ES. Reactive nitrogen intermediates implicated in the inhibition of Encephalitozoon cuniculi (phylum Microspora) replication in murine peritoneal macrophages. *Parasitol Immunol.* 1995; 17: 405-12.
- Didier ES, Orenstein JM, Aldras A, Bertucci D, Rogers LB, Janney FA. Comparison of three staining methods for detecting microsporidia in fluids. *J Clin Microbiol.* 1995; 33(12): 3138-45.
- Didier E, Visvesvara G, Baker M, Rogers L, Bertucci D, De Groote M, 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): 2835-7.
- Didier ES. Microsporidiosis. *J Clin Inf Dis.* 1998; 27: 1-8.
- Didier ES, Bessinger GT. 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; 225-57.
- Didier ES, Didier PJ, Snowden KF, Shadduck JA. Microsporidiosis in mammals. *Microb Infect.* 2000; 2: 709-20.
- Didier ES, Maddry JA, Brindley PJ, Stovall ME, Didier PJ. Therapeutic strategies for human microsporidia infections. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2005; 3: 419-34.
- Didier ES, Weiss LM. Microsporidiosis: current status. *Curr Opin Infect Dis.* 2006; 19(5): 485-92.
- Dipineto L, Rinaldi L, Santaniello A, Sensale M, Cuomo A, Calabria M, Menna LF, Fioretti A. Serological survey for antibodies to Encephalitozoon cuniculi in pet rabbits in Italy. *Zoonoses Public Health.* 2008; 55: 173-5.

- Ditrich O, Chrdle A, Sak B, Chmelík V, Kubále J, Dyková I, Kvác M. Encephalitozoon cuniculi genotype I as a causative agent of brain abscess in an immunocompetent patient. J Clin Microbiol. 2011; 49: 2769-71.
- Dubey JP, Brown CA, Carpenter JL, Moore JJ 3rd. Fatal toxoplasmosis in domestic rabbits in the USA. Vet Parasitol. 1992; 44: 305-9.
- Duncombe VM, Bolin TD, Davis AE, Kelly JD. Nippostrongylus brasiliensis infection in the rat: effect of iron and protein deficiency and dexamethasone on the efficacy of benzimidazole anthelmintics. Gut. 1977; 18: 892-6.
- El-Fakhri G, Moore SC, Maksud P, Aurengo A, Kijewski MF. Absolute activity quantitation in simultaneous 123I/99m Tc brain SPECT. J Nucl Med. 2001; 42(2): 300-8.
- El-Razek I. Clinicopathological studies on the renal infections in rabbits. Vet Med J. 1993; 28: 318.
- Elston RA, Kent ML, Harrell LH. An intranuclear microsporidium associated with acute anemia in the chinook salmon, Oncorhynchus tshawytscha. J Protozool. 1987; 34: 274-7.
- Eatwell K, Mancinelli E, Hedley J, Keeble E, Kovalik M, Yool DA. Partial ear canal ablation and lateral bulla osteotomy in rabbits. J Small Anim Pract. 2013; 54: 325-30.
- Eroksuz Y, Eriksuz H, Ozer H, Cevik A, 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): 73-7.
- Ewringmann A, Göbel T. Untersuchung blutchemischer Parameter bei Heimtierkaninchen. Kleintierpraxis 1998; 43(6): 411-92.
- Ewringmann A, Göbel T. Untersuchungen zur Klinik und Therapie der Enzcephalitozoonose beim Heimtierkaninchen. Kleintierpraxis 1999; 44: 357-72.
- Fedorko D, Nelson N, Cartwright C. Identification of microsporidia in stool specimens by using PCR and restriction endonucleases. J Clin Microbiol. 1995; 33(7): 1739-41.
- Flatt RE, Jackson SJ. Renal nosematosis in young rabbits. Pathol Vet. 1970; 7: 492-7.

- Flock U. Enzephalitozoonose beim Kaninchen – eine retrospective Auswertung. Diss med vet, München. 2010.
- Fournier S, Liguory O, Sarfati C, David-Ouaknine F, Derouin F, Decazes JM, Molina JM. Disseminated infection due to *Encephalitozoon cuniculi* in a patient with AIDS: case report and review. *HIV Med.* 2000; 1: 155-61.
- Frank RK. An outbreak of toxoplasmosis in farmed mink (*Mustela vison* S.). *J Vet Diagn Invest.* 2001; 13: 245-9.
- Franzen C, Schwartz DA, Visvesvara GS, Müller A, Schwenk A, Salzberger B, Fätkenheuer G, Hartmann P, Mahrle G, Diehl V. Immunologically confirmed disseminated, asymptomatic *Encephalitozoon cuniculi* infection of the gastrointestinal tract in a patient with AIDS. *Clin Infect Dis.* 1995; 21: 1480-4.
- Friedberg DN, Stenson SM, Orenstein JM, Tierno PM, Charles NC. Microsporidial keratoconjunctivitis in acquired immunodeficiency syndrome. *Arch Ophthalmol.* 1990; 108: 504-8.
- Front P, Dauguet C, Mitrovic DR. Effect of cytochrome c concentration on the ultrastructural appearance of bovine nasal cartilage proteoglycans. *Stain Technol.* 1989; 64: 113-9.
- Fuentealba IC, Mahoney NT, Shaddock JA, Harvill J, Wicher V, Wicher K. Hepatic lesions in rabbits infected with *Encephalitozoon cuniculi* administered per rectum. *Vet Pathol.* 1992; 29: 536-40.
- Furuya K, Fukui D, Yamaguchi M, Nakaoka Y, Bando G, Kosuge M. Isolation of *Encephalitozoon cuniculi* using primary tissue culture techniques from a rabbit in a colony showing encephalitozoonosis. *J Vet Med Sci.* 2001; 63(2): 203-6.
- Gamboa-Dominguez A, De Anda J, Donis J, Riuz-Maza F, Visvesvara GS., 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: 125-7.
- Gannon J. A survey of *Encephalitozoon cuniculi* in laboratory animal colonies in the United Kingdom. *Lab Anim.* 1980; 14: 91-4.
- Garvey M, Ambrose P, Ulmer J. Keratoconjunktivitis in AIDS. *Ann Pharmacother.* 1995; 29(9): 872-4.

- Gavier-Widén D, Bröjer C, Dietz HH, Englund L, Hammer AS, Hedlund KO, Hård af Segerstad C, Nilsson K, Nowotny N, Puurula V, Thorén P, Uhlhorn H, Weissenböck H, Agren E, Klingeborn B. Investigations into shaking mink syndrome: an encephalomyelitis of unknown cause in farmed mink (*Mustela vison*) kits in Scandinavia. *J Vet Diagn Invest.* 2004; 16: 305-12.
- Geck P. India-ink immuno-reaction for the rapid detection of enteric pathogens. *Acta Microbiol Acad Sci Hung.* 1971; 18: 191-6.
- Gentz EJ, Carpenter JW. In: *Ferrets Rabbits and Rodents: Clinical Medicine and Surgery.* Chapter 21, 2nd ed., Hillyer E.V. and Quesenberry K.E., eds. W.B. Saunders Company 1997; 220-226.
- George KC, Somvanshi R. Gastric ulcerations in rabbits: A histomorphological study. *Indian J Anim Sci.* 1987; 57(5): 416-20.
- Gevrey J. Encephalitozoonosis in domestic dogs and cats. *Rec Med Vet.* 1993; 169: 477-81.
- Giordano C, Weigt A, Vercelli A, Rondena M, Grilli G, Giudice C. Immunohistochemical identification of *Encephalitozoon cuniculi* in phacoclastic uveitis in four rabbits. *Vet Ophthalmol.* 2005; 8: 271-5.
- Gomez Morales MA, Atzori C, Ludovisi A, Rossi P, Scaglia M, Pozio E. Opportunistic and non-opportunistic parasites in HIV-positive and negative patients with diarrhoea in Tanzania. *Trop Med Parasitol.* 1995; 46(2): 109-14.
- Goodman DG, Garner FM. A comparison of methods for detecting *nosema cuniculi* in rabbit urine. *Lab Anim Sci.* 1972; 22(4): 568-72.
- Goodpasture EW. Spontaneous encephalitis in rabbits. *J Inf Dis.* 1924; 34: 428-32.
- Green LC, Le Blanc PJ, Didier ES. 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): 3811-4.
- Greenstein G, Drozdowicz CK, Garcia FG, Lewis LL. The incidence of *Encephalitozoon cuniculi* in a commercial barrier-maintained rabbit breeding colony. *Lab Anim.* 1991; 25: 287-90.

- Grest P, Albicker P, Hoelzle L, Wild P, Pospischil A. Herpes simplex encephalitis in a domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *J Comp Pathol*. 2002; 126: 308-11.
- Gruber A, Pakozdy A, Weissenböck H, Csokai J, Künzel F. A retrospective study of neurological disease in 118 rabbits. *J Comp Pathol*. 2009; 140: 31-7.
- Grundmann E. Einführung in die allgemeine Pathologie. 9. Auflage, Gustav Fischer Verlag. 1994.
- Gumbo T, Hobbs RE, Carlyn C, Hall G, Isada CM. Microsporidia infection in transplant patients. *Transplantation*. 1999; 67: 482-4.
- Gunnarson G, Hurlbut D, DeGirolami PC, Federmann M, 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): 640-1.
- Guscetti F, Mathis A, Hatt JM, Deplazes P. Overt fatal and chronic subclinical *Encephalitozoon cuniculi* microsporidiosis in a colony of captive emperor tamarins (*Sanguinus omeator*). *J Med Primatol*. 2003; 32(2): 111-9.
- Halanova M, Letkova V, Macak V, Stefkovic M, Halan M. The first finding of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in cows in Slovakia. *Vet Parasitol*. 1999; 82(2): 167-71.
- Halánová M, Cisláková L, Valencáková A, Bálent P, Adam J, Trávnicek M. Serological screening of occurrence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in humans and animals in Eastern Slovakia. *Ann Agric Environ Med*. 2003; 10: 117-20.
- Hamilton RC, Cox JC. The ultrastructure of *Encephalitozoon cuniculi* growing in renal tubules of rabbits. *Z Parasitenkd* 1981; 64: 271-8.
- Harcourt-Brown FM, Holloway HKR. *Encephalitozoon cuniculi* in pet rabbits. *Vet Rec*. 2003; 152(5): 427-31.
- Hartskeerl RA, Van Gool T, Schuitema AR, Didier ES, Terpstra WJ. Genetic and immunological characterization of the microsporidian *Septata intestinalis* Cali, Kotler and Orenstein: reclassification to *Encephalitozoon intestinalis*. *Parasitology*. 1995; 110: 277-85.
- Hersteinsson P, Gunnarson E, Hjartardottir S, Skirnisson K. Prevalence of *Encephalitozoon cuniculi* antibodies in terrestrial mammals in Iceland, 1986 to 1989. *J Wildlife Dis*. 1993; 29: 341-4.

- Hollister WS, Canning EU. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* and its use in determination of infections in man. *Parasitology*. 1987; 94: 209-19.
- Hollister WS, Canning EU, Viney M. Prevalence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in stray dogs as determined by an ELISA. *Vet Record*. 1989; 124: 332-6.
- Hollister WS, Canning EU, 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.
- Hollister WS, Canning EU, Anderson CL. Identification of Microsporidia causing human disease. *J Eukaryot Microbiol*. 1996; 43: 104S-105S.
- Horvath M, Leng L, Stefkovic M, Revajova V, Halanova M. Lethal encephalitozoonosis in cyclophosphamide-treated rabbits. *Acta Vet Hing*. 1999; 47(1): 85-93.
- Huldt G, Waller T. Accidental nosematosis in mice with impaired immunological competence. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 1974; 82B: 451-2.
- Hunt RD, King NW. Encephalitozoonosis: evidence for vertical transmission. *J Inf Dis*. 1972; 126(2): 212-4.
- Illanes OG, Tiffani-Castiglioni E, Edwards JF, Shaddock JA. Spontaneous encephalitozoonosis in an experimental group of guinea pigs. *J Vet Diagn Invest*. 1993; 5(4): 649-651
- Innes JRM, Zeman W, Frenkel JK, Borner G. Occult endemic encephalitozoonosis of the central nervous system of mice. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1962; 21: 519-33.
- Jamshidi S, Tabrizi AS, Bahrami M, Momtaz H. Microsporidia in household dogs and cats in Iran; a zoonotic concern. *Vet Parasitol*. 2011; 8.
- Jass A., Evaluierung von Liquorpunktion und PCR zur klinischen Diagnose der Encephalitozoonose beim Kaninchen. *Diss med vet, München*. 2004.
- Jass A, Matiassek K, Henke J, Kuchenhoff H, Hartmann K, Fischer A. Analysis of cerebrospinal fluid in healthy rabbits and rabbits with clinically suspected encephalitozoonosis. *Vet Rec*. 2008; 162: 618-22.
- Jeklova E, Jekl V, Kovarcik K, Hauptman K, Koudela B, Neumayerova H, Knotek Z, Faldyna M. Usefulness of detection of specific IgM and IgG antibodies for diagnosis of clinical encephalitozoonosis in pet rabbits. *Vet Parasitol*. 2010; 170: 143-8.

- Jeklova E, Leva L, Kovarcik K, Matiasovic J, Kummer V, Maskova J, Skoric M, Faldyna M. Experimental oral and ocular *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbits. *Parasitology*. 2010; 137: 1749-57.
- Joseph J, Sharma S. In vitro culture of various species of microsporidia causing keratitis: evaluation of three immortalized cell lines. *Indian J Med Microbiol*. 2009; 27(1): 35-9.
- Jordan CN, Dicristina JA, Lindsay DS. Activity of bleach, ethanol and two commercial disinfectants against spores of *Encephalitozoon cuniculi*. *Vet Parasitol*. 2006; 136: 343-6.
- Joste NE, Rich JD, Busam KJ, Schwartz DA. Autopsy verification of *Encephalitozoon intestinalis* (microsporidiosis) eradication following albendazole therapy. *Arch Pathol Lab Med*. 1996; 120(2): 199-201.
- Jung H, Hurtado M, Sanchez M, Medina MT, Sotelo J. Plasma and CSF levels of albendazole and praziquantel in patients with neurocysticercosis. *Clin Neuropharmacol*. 1990; 13: 559-64.
- Jungherr E. *Encephalitozoon* encephalomyelitis in a rabbit. *J Am Vet Med Assoc*. 1955; 127: 518.
- Karp BE, Ball NE, Scott CR, Walcoff JB. Rabies in two privately owned domestic rabbits. *J Am Vet Med Assoc*. 1999; 215: 1824-7.
- Kasicková D, Sak B, Kvác M, Ditrich O. Detection of *Encephalitozoon cuniculi* in a new host--cockateel (*Nymphicus hollandicus*) using molecular methods. *Parasitol Res*. 2007; 101: 1685-8.
- Kasicková D, Sak B, Kvác M, Ditrich O. Sources of potentially infectious human microsporidia: molecular characterisation of microsporidia isolates from exotic birds in the Czech Republic, prevalence study and importance of birds in epidemiology of the human microsporidial infections. *Vet Parasitol*. 2009; 165: 125-30.
- Katinka MD, Duprat S, Cornillot E, Metenier G, Thomarat F, Prensier G, Barbe V, Peyrettaillade E, Brottier P, Wincker P, Delbac F, El Alaoui H, Peyret P, Saurin W, Gouy M, Weissenbach J, Vivares CP. Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *encephalitozoon cuniculi*. *Nature* 2001; 414: 450-3.
- Katiyar SK, Gordon VR, McLaughlin GL, Edlind TD. Antiprotozoal activities of benzimidazoles and correlations with β -tubulin sequence. *Antimicrob Agents Chemother*. 1994; 38(9): 2086-90.

- Katiyar SK, Edlind TD. In vitro susceptibilities of the AIDS-associated microsporidian *Encephalitozoon intestinalis* to albendazole, its sulfoxide metabolite, and 12 additional benzimidazole derivatives. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997; 41(12): 2729-32.
- Katzwinkel-Wladarsch S, Lieb M, Heise W, Löscher T, Rinder H. Direct amplification and species determination of microsporidian DNA from stool specimen. *Trop Med Intern Health.* 1996; 1(3): 373-8.
- Katzwinkel-Wladarsch S, Deplazes P, Weber R, Löscher T, 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.
- Keeble EJ, Shaw DJ. Seroprevalence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in domestic rabbits in the United Kingdom. *Vet Rec.* 2006; 158: 539-44.
- Keeling PJ, McFadden GI. Origins of microsporidia. *Trends Microbiol.* 1998; 6(1): 19-23.
- Keester KE, Turiansky GW, McEvoy PL. Nodular cutaneous microsporidiosis in a patient with AIDS and successful treatment with long-term oral clindamycin therapy. *Ann Intern Med.* 1998; 128(11): 911-4.
- Kellet BS, Bywater JEC. A modified india-ink immunoreaction for the detection of encephalitozoonosis. *Lab Anim.* 1978; 12: 59-60.
- Kemp RL, Kluge JP. *Encephalitozoon* sp. in the blue-masked lovebird *Agapornis personata* (Reichenow): First confirmed report of microsporidian infection in birds. *J Protozool.* 1975; 22: 489-91.
- Keohane EM, Weiss LM. Characterization and function of the microsporidian polar tube: A review. *Folia Parasitol (Praha)* 1998; 45: 117-27.
- Khan I, Schwartzmann J, Kasper L, Moretto M. CD8+CTLs are essential for protective immunity against *Encephalitozoon cuniculi* infection. *J Immunol.* 1999; 162(10): 6086-91.
- Khan I, Moretto M, Weiss L. Immune response to *Encephalitozoon cuniculi* infection. *Microbes Infect.* 2001; 3(5): 401-5.
- Khanna RS, Iyer PKR. A case of *Nosema cuniculi* infection in a goat. *Indian J Med Res.* 1971; 59: 993.

- Kimman TG, Akermanns JP. Encephalitozoon cuniculi in a rabbit-breeding colony. Tijdschr Diergeneeskd. 1987; 112(24): 1405-9.
- Kniepen A, Fehr M. Frühe akustisch evozierte Potentiale (FAEP) in der klinischen Diagnostik der Otitis media beim Kaninchen. Dtsch Tierärztl Wschr 2001; 108(2): 43-8.
- Kodjikian L, Garweg JG, Nguyen M, Schaffner T, Deplazese P, Zimmerli S. Intraocular microsporidiosis due to Encephalitozoon cuniculi in a patient with idiopathic CD4+ T-lymphocytopenia. Int J Med Microbiol. 2005; 294: 529-33.
- Koller LD. Spontaneous Nosema cuniculi infection in laboratory rabbits. J Am Vet Med Assoc. 1969; 155: 1108-14.
- Kotler DP, Orenstein JM. Clinical syndromes associated with microsporidiosis. Adv Parasitol. 1998; 40: 321-47.
- Kotler DP, Orenstein JM. Clinical syndromes associated with microsporidiosis. In: The Microsporidia and Microsporidiosis, Wittner M. and Weiss L.M., ed. Washington DC, ASM Press 1999; 285-92.
- Kötsche W, Gottschalk C. Krankheiten der Kaninchen und Hasen. Hrsg. Gustav Fischer Verlag, Jena 1990; 240-2.
- Koudela B, Vitovec J, Kučerová Z, Ditrich O, Trávníček J. The severe combined immunodeficient mouse as a model for Encephalitozoon cuniculi microsporidiosis. Fol Parasitol. 1993; 40: 297-86.
- Koudela B. In vivo efficiency of albendazole against Encephalitozoon cuniculi in SCID mice. Euk Microbiol. 1994; 41(5): 49-50.
- Koudela B., Kucerova S. and Hudcovic T. Encephalitozoon cuniculi spores suspended in water. Fol Parasitol (Praha). 1999; 46(3): 171-4.
- Koudela B, Harna J, Pijáček M. Monitoring of animal trichinellosis in the Czech Republic--the past and present. Klin Mikrobiol Infekc Lek. 2011; 17(2): 55-61.
- Kpodékon M. Étude expérimentale de la pathogénie des méningites et encéphalites lors de la Pasteurellose du lapin. Ann Rech Vét. 1983a; 14(3): 217-24.
- Kpodékon M. Pathologie et pathogénie des complications auriculaires et encéphaliques de la Pasteurellose du lapin d'élevage. Ann Rech Vét. 1983b; 14(3): 225-32.

- Kucerová-Pospíšilová Z, Ditrich O. The serological surveillance of several groups of patients using antigens of *Encephalitozoon hellem* and *E. cuniculi* antibodies to microsporidia in patients. *Folia Parasitol (Praha)*. 1998; 4: 108-12.
- Kucerova Z, Priest JW, Delbac F, Visvesvara GS, Secor WE. Expression and serologic assessment of a recombinant polar tube protein from *Encephalitozoon cuniculi* (PTP3). *J Eukaryot Microbiol*. 2006; 53 Suppl 1: S70-1.
- Künzel F, Gruber A, Tichy A, Edelhofer R, Nell B, Hassan J, Leschnik M, Thalhammer JG, Joachim A. Clinical symptoms and diagnosis of encephalitozoonosis in pet rabbits. *Vet Parasitol*. 2008; 151: 115- 24.
- Künzel F, Joachim A. Encephalitozoonosis in rabbits. *Parasitol Res*. 2010; 106: 299-309.
- Kunstýř I, Jíra J, Princová D, Míka J. Survey of toxoplasma antibodies in domestic rabbits. *Folia Parasitol (Praha)*. 1970; 17: 277-80.
- Kunstyr I, Lev L, Naumann S. Experimentelle und spontane Infektion mit *Encephalitozoon cuniculi* beim Kaninchen. *Dtsch Tierärztl Woschr*. 1983; 90(11): 492.
- Kunstyr I, Naumann S. Head tilt in rabbits caused by pasteurellosis and encephalitozoonosis. *Lab Anim*. 1985; 19: 208-13.
- Kunstyr I, Naumann S, Kaup F-J. Tortikollis bei Kaninchen: Ätiologie, Pathologie, Diagnose und Therapie. *Berl Münch WSchr*. 1986; 99(1): 14-19.
- Kusumi RK, Plouffe JF. Cerebrospinal fluid glucose and protein values in normal rabbits. *Lab Anim*. 1980; 14: 41-2.
- Lainson RL, Garnham PCC, Killick-Kendrick R, Bird RG. Nosematosis, a microsporidial infection of rodents and other animals, including man. *Brit Med J*. 1964; 2: 470-2.
- Lallo MA, Santos MJ, Bondan EF. Experimental *Encephalitozoon cuniculi* infection in dexamethasone-immunosuppressed mice. *Rev Saude Publica*. 2002; 36(5): 621-6.
- Le Couter RA, Vernau KM. Feline vestibular disorders. Part I: anatomy and clinical signs. *J Fel Med Surg*. 1999a; 1: 71-80.
- Le Couter RA, Vernau KM. Feline vestibular disorders. Part II: diagnostic approach and differential diagnosis. *J Fel Med Surg*. 1999b; 1: 81-8.

- Lee DR. A case of eosinophilic gastrointestinal disorders presenting with chronic diarrhea and abdominal pain. *Korean J Fam Med*. 2011; 32: 257-62.
- Leland MM, Hubbard GB, Dubey JP. Clinical toxoplasmosis in domestic rabbits. *Lab Anim Sci*. 1992; 42: 318-9.
- Lev L. Untersuchungen von experimentellen und spontanen Enzephalitozooncuniculi-Infektionen bei Kaninchen mit drei serologischen Methoden. *Diss med vet*, Hannover. 1982.
- Levaditii C, Nicolau S, Schoen R. L'Ätiologie d' nc phalite. *C R Acad Sci (Paris)*. 1923; 177: 987.
- Levaditii C, Nicolau S, Schoen R. L'Ätiologie de l' nc phalite  pizootique du lapin dans ses rapports avec l'étude expérimentale de l' nc phalite léthargique *Encephalitozoon cuniculi*. *N sp Ann Inst Pasteur (Paris)*. 1924; 38: 651-712.
- Levkut M, Le nik F, B lent P, Zajak V, Sl vikov  K. Bovine leukemia virus-induced clinical signs and morphological changes of encephalitozoonosis in rabbits. *Fol Parasitol*. 1997; 44: 249-54.
- 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): 576-7.
- Li T, Qiao GL, Hu GZ, Meng FD, Qiu YS, Zhang XY, Guo WX, Yie SF, Li SY. Comparative plasma and tissue pharmacokinetics and drug blood profiles of different chemotherapeutics in fowls and rabbits. *J Vet Pharmacol Ther*. 1995; 18(4): 260-73.
- Li J, Santosh KK, Hamelin A, Visvesvara GS, Edlind TD. Tubulin genes from AIDS-associated microsporidia and implications for phylogeny and benzimidazole sensitivity. *Mol Biochem Parasitol*. 1996; 78: 289-98.
- Li X, Tate KW, Dunbar LA, Huang B, Atwill ER. Efficiency for recovering *Encephalitozoon intestinalis* spores from waters by centrifugation and immunofluorescence microscopy. *J Eukaryot Microbiol*. 2003; 50 Suppl: 579-80.
- Ludwig H, Koester V, Pauli G, Rott R. The cerebrospinal fluid of rabbits infected with Borna disease virus. *Arch Virol*. 1977; 55: 209-23.
- Lyngset A. A survey of serum antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in breeding rabbits and their young. *Lab Anim Sci*. 1980; 30: 558-61.

- Lyngset A. Enzephalitozoon-Infektionen beim Kaninchen – Diagnose und Ausmerzungen. 4. Tagung über Krankheiten der Pelztiere, Kaninchen und Heimtiere. Dtsch Vet-Med Ges 1981, Celle
- Mader DR. Rabbits - basic approach to veterinary care. In: Ferrets, Rabbits and Rodents Clinical Medicine and Surgery, chapter 14, Hillyer E.V. and Quesenberry K.E., 2nd ed., eds. Philadelphia, W.B. Saunders Company 2004; 152.
- Malcekova B, Valencakova A, Luptakova L, Molnar L, Ravaszova P, Novotny F. First detection and genotyping of Encephalitozoon cuniculi in a new host species, gyrfalcon (*Falco rusticolus*). Parasitol Res. 2011; 108: 1479-82.
- Margileth AM, Strano AJ, Chandra R, Neafie R, Blum M, McCully RM. Disseminated nosematosis in an immunologically compromised infant. Arch Pathol. 1973; 95: 145-50.
- Mathis A, Michel M, Kuster H, Muller C, Weber R, 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, Magiwaru S. A case of encephalitozoon-like body infection in man. Arch Pathol. 1959; 67: 1817.
- McCully RM, van Dellen AF, Basson PA, Lawrence J. Observations on the pathology of canine microsporidiosis. Onderstepoort J Vet Res. 1978; 45: 75-92.
- McCartney JE, Olitsky PK. Studies on the etiology of snuffles in stock rabbits: paranasal sinusitis a factor in the interpretation of experimental results. J Exp Med. 1923; 38: 591-604.
- McInnes EF, Stewart CG. The pathology of subclinical infection of Encephalitozoon cuniculi in canine dams producing pups with overt encephalitozoonosis. J S Afr Vet Assoc. 1991; 62(2): 51-4.
- Mertens R, Didier E, Fishbein M, Bertucci D, Rogers L, 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.
- Metzler A, Ehrensperger F, Wyler R. Natural borna virus infection in rabbits. Zentralbl Veterinarmed B. 1978; 25: 161-4.

- Meyer-Breckwoldt A. Epidemiologische und klinische Untersuchungen zur Enzephalitozoonose beim Zwergkaninchen. Diss med vet, Hannover. 1996.
- Mietz H, Franzen C, Hoppe T, Bartz-Schmidt KU. Microsporidia-induced sclerouveitis with retinal detachment. Arch Ophthalmol. 2002; 120: 864-5.
- Mohindra AR, Lee MW, Visvesvara G, Moura H, Parasuraman R, Leitch GJ, Xiao L, Yee J, del-Busto R. Disseminated microsporidiosis in a renal transplant recipient. Transpl Infect Dis. 2002; 4(2): 102-7.
- Mohn SF, Nordstoga K, Krogsrud J, 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, 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): 6223-32.
- Moura H, Da Silva G, Sodre F, Brasil P, Wallmo K, Wahlquist S, Wallace S, Croppo GP, Visvesvara GS. 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 UU, Herzog K, Tanner I, Mathis A, Deplazes P. First isolation and characterisation of *Encephalitozoon cuniculi* from a freeranging rat (*Rattus norvegicus*). Vet Parasitol. 2002; 107(4): 279-85.
- Murray KA, Hobbs BA, Griffith JW. Acute meningoencephalomyelitis in a rabbit infected with *Pasteurella multocida*. Lab Anim Sci. 1985; 35(2): 169-71.
- Naas A, Revajova V, Letkova L, Halanova M. Immune response to *Encephalitozoon cuniculi* infection in laboratory mice. Vet Parasitol. 1999; 82: 137-43.
- Nast R., Middleton D.M. and Wheler C.L. Generalized encephalitozoonosis in a Jersey woolly rabbit. Can Vet J. 1996; 37:303-305
- Naumann R, Behbehani AA, Hochstrasser K. Clinical relevance of protease inhibitors in nasal secretions. Laryngol Rhinol Otol (Stuttg). 1985; 64: 571-4.

- Nelson JB. An Intrazellular parasite resembling a microsporidian associated with ascites in Swiss mice. *Proc Soc Exp Biol (N.Y.)* 1962; 109: 714.
- Nelson JB. Experimental transmission of a murine microsporidian in Swiss mice. *J Bacteriol.* 1967; 94: 1340-45.
- Neuschl J, Čonkova E, Krokavec P, Čelarova E, Halanova M, Hipikova V, Balent P, Šutiak V. The development of encephalitozoonosis in rabbits after infection by *Encephalitozoon cuniculi* and treatment with albendazole. *Acta Vet (Beograd).* 1999; 49(4): 327-34.
- Nettles VF, Davidson WR, Fisk SK, Jacobson HA. An epizootic of cerebrospinal nematodiasis in cottontail rabbits. *J Am Vet Med Assoc.* 1975; 167: 600-2.
- Niederkorn J, 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 JY, Brieland JK, Mayhew E. Enhanced natural killer cell activity in experimental murine encephalitozoonosis. *Infect Immun.* 1983; 41: 302-7.
- Nkinin SW, Asonganyi T, Didier ES, Kaneshiro ES. Microsporidian infection is prevalent in healthy people in Cameroon. *J Clin Microbiol.* 2007; 45: 2841-6.
- Nordstoga K. Nosematosis in blue foxes. *Nord Vet Med.* 1972; 24: 21-4.
- Nordstoga K, Mohn SF, Loftsgaard G. Nosematose hos blårev. (Nosematosis in the blue foxes). *Proc. 12th Nord Vet Congr, Reykjavik* 1974: 183-6.
- Nordstoga K, Westbye K. Polariteritis nodosa associated with nosematosis in blue foxes. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 1976; 84: 291-6.
- Nordstoga K, Mohn SF, Aamdal J, Helgebostad A. Nosematosis (encephalitozoonosis) in a litter of blue foxes after intrauterine infection of nosema spores. *Acta Vet Scand.* 1978; 19: 150-2.
- Okewole EA. Seroprevalence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in domestic rabbits in Nigeria. *Onderstepoort J Vet Res.* 2008; 75: 33-8.
- Oliver JE, Lorenz MD, Kornegay JN. *Handbook of Veterinary Neurology.* Chapter 1 and 2, 3rd ed. W.B. Saunders Company, 1997; 3-63.
- Owen DG, Gannon J. Investigation into the transplazental transmission of *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits. *Lab Anim.* 1980; 14: 35-8.

- Ozkan O, Ozkan AT, Zafer K. Encephalitozoonosis in New Zealand rabbits and potential transmission risk. *Vet Parasitol.* 2011; 179: 234-7.
- Packham DK, Hewitson TD, Whitworth JA, Kincaid-Smith PS. Glomerulosclerosis and hyalinosis in rabbits. *Pathol.* 1992; 24: 164-9.
- Pakes SP, Shadduck JA, Olsen RG. A diagnostic skin test for encephalitozoonosis (nosematosis) in rabbits. *Lab Anim Sci.* 1972; 22(6): 870-7.
- Pakes SP, Shadduck JA, Cali A. Fine structure of Encephalitozoon cuniculi from rabbits, mice and hamster. *J Protozool.* 1975; 22(4): 481-8.
- Pakes S, Shadduck J, Feldmann D, Moore J. Comparison of tests for the diagnosis of spontaneous encephalitozoonosis in rabbits. *Lab Anim Sci.* 1984; 34(4): 356-9.
- Pang VF, Shadduck JA. Susceptibility of cats, sheep, and swine to a rabbit isolate of Encephalitozoon cuniculi. *Vet Res.* 1985; 46(5): 1071-7.
- Patterson-Kane JC. Encephalitozoon cuniculi placentitis and abortion in a quarterhorse mare. *J Vet Diagn Invest.* 2003; 15(1): 579.
- Perrin TL. Spontaneous and experimental encephalitozoon infection in laboratory animals. *Arch Pathol.* 1943; 36: 559-67.
- Persin M, Dousek J. Encephalitozoonosis in farm- bred arctic blue foxes (*Alopex lagopus*). *Vet Med (Praha).* 1986; 31(1): 49-54.
- Peters M, Scheele G. Listeriose in einem Kaninchenbestand. *Dtsch Tierärztl Wschr* 1996; 103: 460-2.
- 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.
- Pinnolis M, Egbert PR, Font RL, Winter FC. Nosematosis of the cornea. Case report, including electron microscopic studies. *Arch Ophthalmol.* 1981; 99: 1044-7.
- Platt SR. 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 KB, William BS, Stamper RD. Encephalitozoonosis in a parrot. J Am Vet Med Assoc. 1985; 186:700-2.
- Pospíšilová Z, Ditrich O, Stanková M, Kodým P. Parasitic opportunistic infections in Czech HIV-infected patients--a prospective study. Cent Eur J Public Health. 1997; 5: 208-13.
- Pye D, Cox J. Isolation of Encephalitozoon cuniculi from urine samples. Lab Anim. 1977; 11: 233-4.
- Pyretailade E, Biderre C, 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: 3513-20.
- Quesenberry K.E. Rabbits. In: Saunders Manual of small animal practice. Brichard S.J. and Sherding R.G. eds., WB Saunders, Philadelphia 1994; 1346.
- Randall CC, Dennis ED. Retrospective study of diseases in a captive lemming colony. J Wildlife Dis. 1993; 29(4): 620-2.
- Rauz S, Tuft S, Dart JK, Bonshek R, Luthert P, Curry A. Ultrastructural examination of two cases of stromal microsporidial keratitis. J Med Microbiol. 2004; 53: 775-81.
- Reetz J. Natürliche Mikrosporidien-(Encephalitozoon cuniculi-) Infektionen bei Hühnern. Tierärztl Prax. 1993; 21: 429-35.
- 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, 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.
- Reusch B, Murray JK, Papasouliotis K, Redrobe SP. Urinary protein:creatinine ratio in rabbits in relation to their serological status to Encephalitozoon cuniculi. Vet Rec. 2009; 164: 293-5.
- Ribeiro M, Guimaraes A. Encephalitozoon-like microsporidia in the ticks Amblyomma cajennense and Anocentor nitens (Acari: Ixodidae). J Med Entomol. 1998; 35(6): 1029-33.
- Ridoux O, 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): 3301-3.
- Rinder H, Janitschke K, Aspöck K, Da Sila AJ, Deplazes P, Fedorko DP, Franzen C, Futh U, Hüniger F, Lehmacher A, Meyer CG, Molina J-M, Sandfort J, Weber R, 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): 1814-8.
- Risch-Laasch W. Immunhistologische sowie lichtmikroskopische Untersuchungen zur Pathogenese der experimentellen Bornaschen Krankheit beim Kaninchen. *Diss vet med, Gießen.* 1981; 4-5.
- Robinson JJ. Common infectious disease of laboratory rabbits questionably attributed to *Encephalitozoon cuniculi*. *AMA Arch Pathol.* 1954; 58(1): 71-84.
- Rogowska-Szadkowska 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.
- Rossmeißl JH. 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 Parasitenkd* 1951; 156: 543-4.
- Ryan NJ, Sutherland G, Coughlan K, Globan M, Doultree J, Marshall J, Baird RW, Pederson J, Dwyer B. A new trichrome-blue stain for detection of microsporidial species in urine, stool, and nasopharyngeal specimens. *J Clin Microbiol.* 1993; 31(12): 3264-69.
- Sak B, Kvác M, Petrzeltková K, Kvetonová D, Pomajbíková K, Mulama M, Kiyang J, Modrý D. Diversity of microsporidia (Fungi: Microsporidia) among captive great apes in European zoos and African sanctuaries: evidence for zoonotic transmission? *Folia Parasitol (Praha).* 2011; 58: 81-6.
- Samie A, Obi CL, Tzipori S, Weiss LM, Guerrant RL. Microsporidiosis in South Africa: PCR detection in stool samples of HIV-positive and HIV-negative individuals and school children in Vhembe district, Limpopo Province.

- Trans R Soc Trop Med Hyg. 2007; 101: 547-54.
- Sasaki Y, Kodama R, Iwashige S, Fujishima J, Yoshikawa T, Kamimura Y, Maeda H. Bilateral cataract in a cynomolgus monkey. J Toxicol Pathol. 2011; 24: 69-73.
- Schall H. In: Krankheiten der Heimtiere. Gabrisch K. und Zwart P., 3. Aufl., Hrsg. Schlütersche Verlagsanstalt, Hannover 1995; 1-47.
- Scharmann W, Reblin L, Griem W. Untersuchungen über die Infektion von Kaninchen durch Encephalitozoon cuniculi. Berl Münch Tierärztl Wschr 1986; 99(1): 20-5.
- Schmidt EC, Shadduck JA. Murine encephalitozoonosis model for studying the host-parasite relationship of a chronic infection. Infect Immun. 1983; 40(3): 936-42.
- Schottelius J, Shadduck F, Schmetz C, Schüler T, Sobottka J. Encephalitozoon cuniculi infections in laboratory rabbits and elimination trials. Annual Scientific Report 1994; Bernhard Nocht institute for tropical medicine; 69.
- Schottelius J, da Costa SC. Microsporidia and acquired immunodeficiency syndrome. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2000; 95(1): 133-9.
- Schwartz DA, Bryan RT, Weber R, Visvesvara GS. Microsporidiosis in HIV positive patients: current methods for diagnosis using biopsy, cytologic ultrastructural, immunological, and tissue culture techniques. Folia Parasitol (Praha). 1994; 41(2): 101-9.
- Sedlák K, Literák I, Faldyna M, Toman M, 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.
- Seibold HR, Fussell EN. Intestinal microsporidiosis in *Callicebus moloch*. Lab Anim Sci. 1973; 23: 115-8.
- Shadduck JA. *Nosema cuniculi*: in vitro isolation. Science. 1969; 166: 516-7.
- Shadduck JA, Pakes SP. Encephalitozoonosis (nosematosis) and toxoplasmosis. Am J Pathol. 1971; 64(3): 657-73.
- Shadduck JA, Bendele R, Robinson GT. Isolation of the causative organism of canine encephalitozoonosis. Vet Pathol. 1978; 15(4): 449-60.
- Shadduck JA, Geroulo MJ. A simple method for the detection of antibodies to Encephalitozoon cuniculi in rabbits. Lab Anim Sci. 1979; 29(3): 330-4.
- Shadduck JA, Watson WT, Pakes SP, Cali A. Animal infectivity of Encephalitozoon cuniculi. J Parasitol. 1979; 65(1): 123-9.

- Shadduck JA, Baskin G. Serologic evidence of *Encephalitozoon cuniculi* infection in a colony of squirrel monkeys. *Lab Anim Sci*. 1989; 39(4): 328-30.
- Shadduck J.A. Comparative pathology of microsporidiosis. *Arch Pathol Lab Med*. 1993; 117: 1215-19.
- Shumway-Cook A, Gruber W, Baldwin M, Liao S. The effect of multidimensional exercises on balance, mobility, and fall risk in community-dwelling older adults. *Phys Ther*. 1997; 77: 46-57.
- Silbernagel und Despopoulos Taschenatlas der Physiologie. 4. Auflage, Hrsg. Georg Thieme Verlag Stuttgart. 1991; 58: 260.
- Singh M, Kane GJ, Mackinlay L, Quaki I, Yap EH, Ho BC, Ho LC, Lim KC. Detection of antibodies to *Nosema cuniculi* (Protozoa : Microsporidia) in human and animal sera by the indirect fluorescent antibody technique. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1982; 13: 110-3.
- Sebek Z. The finding of the genus *Nosema năgeli* 1857 (Microsporidia, Nosematidae) in the kidney of a guinea pig. *Fol Parasitol (Praha)*. 1969; 16: 165-9.
- Smith T, Florence L. *Encephalitozoon cuniculi* as a kidney parasite in the rabbit. *J Exp Med*. 1925; 41: 25-35.
- Snowden KF, Didier ES, Orenstein JM, Shadduck JA. Animal models of human microsporidial infections. *Lab Anim Sci*. 1998; 48: 589-92.
- Snowden K, Logan K, Didier ES. *Encephalitozoon cuniculi* strain III is a cause of encephalitozoonosis in both humans and dogs. *J Inf Dis*. 1999; 180: 2086-8.
- Snowden KF, Lewis BC, Hoffman J, Mansell J. *Encephalitozoon cuniculi* infections in dogs: a case series. *J Am Anim Hosp Assoc*. 2009; 45(5): 225-31.
- Snyder SB, Fox JG, Soave OA. Subclinical otitis media associated with *Pasteurella multocida* infections in New Zealand White rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Lab Anim Sci*. 1973; 23(2): 270-2.
- Sobottka I, Iglauer F, Schuler T, Schmetz C, Visvesvara GS, Albrecht H, Schwartz DA, Pieniazek NJ, Bartsch K, Laufs R, und Schottelius J. Acute and long-term humoral immunity following active immunization with inactivated spores of various *Encephalitozoon* species. *Parasitol Res*. 2001; 87(1): 1-6.

- Sokolova OI, Demyanov AV, Bowers LC, Didier ES, Yakovlev AV, Skarlato SO, Sokolova YY. Emerging microsporidian infections in Russian HIV-infected patients. *J Clin Microbiol*. 2011; 49: 2102-8.
- Solli A, Sanson G, Fougner J. Nosematosis – a current disease in Norwegian fur farms. *Norsk Pelsdyrblad*. 1994; 68: 10-1.
- Somvanshi R, Biswas JC, Shah NL, Lal H, Sharma RL. Spontaneous encephalitozoonosis in angora rabbits. *Indian Vet J*. 1994; 71: 396-9.
- Sprague V, Vernick SH. The ultrastructure of *Encephalitozoon cuniculi* (Microsporidia, Nosematidae) and its taxonomic significance. *J Protozool*. 1971; 18: 560-9.
- Sprague V, Becnel JJ, Hazard EI. Taxonomy of phylum Microspora. *Critical Rev Microbiol*. 1992; 18(5/6): 285-395.
- Stewart CG, Botha WS, Van Dellen AF. The prevalence of *Encephalitozoon* antibodies in dogs and an evaluation of the indirect fluorescent antibody test. *J S Afr Vet Assoc*. 1979a; 50(3): 169-72.
- Stewart CG, Van Dellen AF, Botha WS. Canine encephalitozoonosis in kennels and the isolation of *Encephalitozoon* in tissue culture. *J S Afr Vet Assoc*. 1979b; 50(3): 165-8.
- Suter C, Müller-Doblies U, Hatt J-M, Deplazes P. Prevention and treatment of *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbits with fenbendazole. *Vet Record*. 2001; 148: 478-80.
- Szabo JR, Shadduck JA. Experimental encephalitozoonosis in neonatal dogs. *Vet Pathol*. 1987; 24: 99-108.
- Talabani H, Sarfati C, Pillebout E, van Gool T, Derouin F, Menotti J. Disseminated infection with a new genovar of *Encephalitozoon cuniculi* in a renal transplant recipient. *J Clin Microbiol*. 2010; 48: 2651-3.
- Teachey DT, Russo P, Orenstein JM, Didier ES, Bowers C, Bunin N. Pulmonary infection with microsporidia after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2004; 33: 299-302.
- Thomas C, Finn M, Twigg L, Deplazes P, Thompson R. Microsporidia (*Encephalitozoon cuniculi*) in wild rabbits in Australia. *Aust Vet J*. 1995; 75(11): 808-10.
- 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
- Tosoni A, Nebuloni M, Ferri A, Bonetto S, Antinori S, Scaglia M, Xiao L, Moura H, Visvesvara GS, Vago L, Costanzi G. Disseminated microsporidiosis caused by *Encephalitozoon cuniculi* III (dog type) in an Italian AIDS patient: a retrospective study. *Mod Pathol.* 2002; 15: 577-83.
- Traub E. Über eine mit Listerien-ähnlichen Bakterien vergesellschaftete Meningo-Enzephalomyelitis der Kaninchen. *Zentralbl Bakteriол Parasitenk Infektionskr, Abt. I: Orig.* 1942; 149: 38-49.
- Tumwine JK, Kekitiinwa A, Bakeera-Kitaka S, Ndeezi G, Downing R, Feng X, Akiyoshi DE, Tzipori S. Cryptosporidiosis and microsporidiosis in ugandan children with persistent diarrhea with and without concurrent infection with the human immunodeficiency virus. *Am J Trop Med Hyg.* 2005; 73: 921-5.
- Uhlíková M, Hübner J. Congenital transmission of Toxoplasmosis in domestic rabbits. *Folia Parasitol (Praha).* 1973; 20: 285-91.
- Undeen AH. A proposed mechanism for the germination of microsporidian (Protozoa: Microspora). *J Theor Biol.* 1990; 142: 223-35.
- Undeen AH, Van der Meer RK. Microsporidian intrasporal sugars and their role in germination. *J Invert Pathol.* 1999; 73: 294-302.
- Valencakova A, Balent P, Petrovova E, Novotny F, Luptakova L. Encephalitozoonosis in household pet Nederland Dwarf rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Vet Parasitol.* 2008; 153: 265-9.
- Van Dellen AF, Botha WS, Boomker J, Warnes WEJ. Light and electron microscopical studies on canine encephalitozoonosis: cerebral vasculitis. *Onderstepoort J Vet Res.* 1978; 45: 165-86.
- Vandeveld M, Richard A, Fankhauser R. Liquoruntersuchungen bei neurologisch kranken Hunden und Katzen. *Schweiz Arch Tierheilk.* 1987; 129: 443-56.
- Van Gool T, Snijders F, Reiss P, Eeftnick Schattenkerk JK, Van den Bergh Weerman MA, Bartelsman JF, Bruijs JJ, Canning EU, Dankert J. Diagnosis of intestinal and disseminated microsporidial infections in patients with HIV by a new rapid fluorescence technique. *J Clin Pathol.* 1993; 46: 694-9.

- van Gool T, Vetter JC, Weinmayr B, Van Dam A, Derouin F, Dankert J. High seroprevalence of *Encephalitozoon* species in immunocompetent subjects. *J Infect Dis.* 1997; 175: 1020-4.
- Van Heerden J, Bainbridge N, Burroughs REJ, Kriek NPJ. Distemper-like disease and encephalitozoonosis in wild dogs (*Lycaon Pictus*). *J Wildlife Dis.* 1989; 25(1): 70-5.
- Van Rensburg IBJ, Du Plessis JL. Nosematosis in a cat: a case report. *J S Afr Vet Med Ass.* 1971; 42: 327-31.
- Van Rensburg IB, Volkmann DH, Soley JT, Stewart CG. Encephalitozoon infection in a still-born foal. *J S Afr Vet Assoc.* 1991; 62(3): 130-2.
- Vávra J, Blažek K. Nosematosis in carnivores. *J Parasitol.* 1971; 57: 923-4.
- Vávra J, Bedrník P, Cinátl J. Isolation and in vitro cultivation of the mammalian microsporidian *Encephalitozoon cuniculi*. *Folia Parasitol (Praha).* 1972; 19: 349-54.
- Vavra J, Chalupsky J. Fluorescence staining of microsporidian spores with the brightener Calcofluor White M2R. *J Protozool.* 1982; 29(Suppl): 503.
- Venkatesan P. Albendazole. *J Antim Chem.* 1998; 41: 145-7.
- Visvesvara GS. In vitro cultivation of microsporidia of clinical importance. *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15(3): 401-13.
- Vivares CP, Méténier G. The microsporidian *Encephalitozoon*. *Bio Essays.* 2001; 23: 194-202.
- Von Bergmann V, Heidrich R, Kiupel H., Akute Toxoplasmose-Ausbrüche in Kaninchenbeständen. *Angew Parasitol.* 1980; 21: 1-6.
- Von Kücken U, Ludwig HJ, Lange S, Günther H, Dix B, Lange M, Müller D. Eine generalisierte Erkrankung des Kaninchens durch *Encephalitozoon cuniculi*. *Mh Vet Med.* 1987; 42: 781-4.
- Von Kücken U, Dix B, Ludwig E, Ludwig HJ. Vorkommen von Einzellern im Ejakulat von Besamungsbullen (Kurzmitteilung). *Mh Vet Med.* 1990; 45: 92.
- Von Kücken U, Kreusel S, Müller D, Ludwig HJ, Geelhaar D, Wagner C, Mokros M. Beitrag zur Mikrosporidieninfektion des Pferdes – ein Fallbericht. *Tierärztl Umschau.* 1993; 48: 203-10.
- Von Müller D, Kücken U, Wagner C, Mokros M. Hämatologische und klinisch-chemische Untersuchungen bei Schlachtkaninchen. *Mh Vet-Med.* 1990; 45: 792-6.

- Vossbrinck CR., Maddox JV, Friedmann S, Debrunner-Vossbrinck BA, Woese CR. Ribosomal RNA sequence suggests microsporidia are extremely ancient eukaryotes. *Nature*. 1987; 326(26): 411-4.
- Wagner F. Einseitige Blindheit bei einem Kaninchen. *Tieraerztl Prax*. 2000; 28(4): 216, 260-2.
- Waller T. Growth of *Nosema cuniculi* in established cell lines. *Lab Anim*. 1975; 9: 61-8.
- Waller T. The india-ink immunoreaction: a method for the rapid diagnosis of encephalitozoonosis. *Lab Anim*. 1977; 11: 93-7.
- Waller T, Morein B, Fabiansson E. Humoral immune response to infection with *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits. *Lab Anim*. 1978; 12: 145-8.
- Waller T. Sensitivity of *Encephalitozoon cuniculi* to various temperatures, disinfectants and drugs. *Lab Anim*. 1979; 13: 227-30.
- Waller T, Bergquist N. Rapid simultaneous diagnosis of toxoplasmosis and encephalitozoonosis in rabbits by carbon immunoassay. *Lab Anim Sci*. 1982; 16: 515-7.
- Wan CH, Franklin C, Riley LK, Hook RR Jr, Besch-Williford C. Diagnostic exercise: granulomatous encephalitis in guinea pigs. *Lab Anim Sci*. 1996; 46(2): 228-30.
- Wasson K, Peper R. Mammalian microsporidiosis. *Vet Pathol*. 2000; 37: 113-28.
- Waywa D, Kongkriengdaj S, Chaidatch S, Tiengrim S, Kowadisaiburana B, Chaikachonpat S, Suwanagool S, Chaiprasert A, Curry A, Bailey W, Suputtamongkol Y, Beeching NJ. Protozoan enteric infection in AIDS related diarrhea in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2001; 32 Suppl 2: 151-5.
- Weber R, Bryan RT, Owen RL, Wilcox C M, Gorelkin L and Visvesvara GS. 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: 161-6.
- Weber R, Bryab RT, Schwartz DA, Owen RL. Human microsporidial infections. *Clin Microbiol Rev*. 1994; 7: 426-61.
- Weber R, Deplazes P. Neue parasitäre Erkrankungen beim Menschen: Infektionen durch Mikrosporidien und *Cyclospora* spezie. *Schweiz Med Wochenschr*. 1995; 125(18): 909-22.

- Weber R, Deplazes P, Flepp M, Mathis A, Baumann R, Sauer B, Kuster H, Lüthy R. Cerebral microsporidiosis due to *Encephalitozoon cuniculi* in a patient with human immunodeficiency virus infection. *New England J Med.* 1997; 336: 474-8.
- Weidner E. Interactions between *Encephalitozoon cuniculi* and macrophages. *Z Parasitenk.* 1975; 47: 1-9.
- Weisbroth SH, Flatt RE, Kraus AL. *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: 257-60.
- Weiss LM, Michalakakis E, Coyle CM, Tanowitz HB, Wittner M. The in vitro activity of albendazole against *Encephalitozoon cuniculi*. *J Euk Microbiol.* 1994; 41(5): 65S.
- Weissenböck H, Holzmann H. Tick-borne encephalitis in Austrian dogs. *Vet Rec.* 1996 Dec 7; 139: 575-6.
- Weitzel T, Wolff M, Dabanch J, Levy I, Schmetz C, Visvesvara GS, Sobottka I. Dual microsporidial infection with *Encephalitozoon cuniculi* and *Enterocytozoon bieneusi* in an HIV-positive patient. *Infection.* 2001; 29(4): 237-9.
- Wenzel UD, Albert G. *Kaninchenkrankheiten*, Hrsg. Dt. Landwirtschaftsverl. Berlin, 1996.
- Wesonga HO, Munda M. Rabbit encephalitozoonosis in Kenya. *Lab Anim.* 1992; 26: 219-21.
- Wicher V, Baughn RE, Fuentealba C, Shaddock JA, Abbruscato F, Wicher K. Enteric infection with an obligate intracellular parasite, *Encephalitozoon cuniculi*, in an experimental model. *Infect Immun.* 1991; 59(7): 2225-31.
- Wiesner E, Ribbeck R. *Lexikon der Veterinärmedizin*, Hrsg. Enke Verlag, Stuttgart. 2000.
- Wilson JM. *Encephalitozoon cuniculi* in wild European rabbits and a fox. *Res Vet Sci.* 1979; 26: 114.
- Wodecki JJ. Linseninduzierte Uveitis bei einem Kaninchen. *Tierärztliche Prax.* 1994; 22: 498-501.

- Wolfer J, Grahn B, Wilcock B, Percy D. Phacoclastic uveitis in the rabbit. *Prog Vet Comp Ophthalmol*. 1993; 3: 92-7.
- Wosu JN, Shaddock JA, Pakes SP, Frenkel JK, Todd KS, Conroy JD. Diagnosis of encephalitozoonosis in experimentally infected rabbits by intradermal and immunofluorescence tests. *Lab Anim Sci*. 1977a; 27(2): 210-16.
- Wosu JN, Olsen R, Shaddock JA, Koestner A, Pakes SP. Diagnosis of experimental encephalitozoonosis in rabbits by complement fixation. *J Infect Dis*. 1977b; 135(6): 944-8.
- Wright JH, Craighead EM. Infectious motor paralysis in young rabbits. *J Exp Med*. 1922; 36: 135-40.
- Xiao L, Li L, Visvesvara GS, Moura H, Didier ES, Lal AA. Genotyping *Encephalitozoon cuniculi* by multilocus analyses of genes with repetitive sequences. *J Clin Microbiol*. 2001; 39: 2248-53.
- Yoken J, Forbes B, Maguire AM, Prenner JL, Carpentieri D. Microsporidial endophthalmitis in a patient with acute myelogenous leukemia. *Retina*. 2002; 22: 123-5.
- Zeman DH, Baskin GB. Encephalitozoonosis in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). *Vet Pathol*. 1985; 22(1): 24-31.
- Zender HO, Arrigoni E, Eckert J, Kapanci Y. A case of *Encephalitozoon cuniculi* peritonitis in a patient with AIDS. *AJCP*. 1989; 92(3): 352-56.
- Zhou ZY, Nordstoga K, Bjerkas I, Zhi-Young Z. Extraglomerular lesions in kidneys of mink with encephalitozoonosis. *Acta Vet Scand*. 1992; 33: 33-41.
- Zhou ZY, Nordstoga K. Mesangioproliferative glomerulonephritis in mink with encephalitozoonosis. *Acta Vet Scand*. 1993; 34: 69-76.

VIII. ANHANG

1. Neurologischer Score

Intrakranielle Läsionen		Punkte
Kopfschiefhaltung		
	nicht vorhanden	0
	ggr.	2
	mgr./keine Wertung	4
	hgr.	6
Nystagmus		
	nicht vorhanden	0
	nur positionell	1,5
	in Brustlage bei Aufregung	3
	ständig in Brustlage	4,5
	in Brustlage mit Kopfbewegung	6
vestibuläre Ataxie		
	nicht vorhanden	0
	seitenbetontes hoppeln	1
	zeitweise Kreishoppeln	2
	ständiges Kreishoppeln	3
	ggtl. Umfallen	4
	ggtl. Rollen	5
	dauerndes Rollen/Seitenlage	6
insgesamt möglich		18

Läsionen des Rückenmarks		
	normaler Gang	0
	hoppeln mit geringen Defiziten in Haltungs- u. Stellreaktionen	3
	Gewichtsbelastung mit Hoppeln möglich	6
	kurze Gewichtsbelastung im Sitzen möglich	9
	Bewegung der Gliedmaßen ohne Gewichtsbelastung	12
	Tetra-/Paraparese	15
	Tetraplegie/Paralyse	18
insgesamt möglich		18

2. Neurologischer Score Gruppe F, F0, D und D0 am Tag 0 und 10

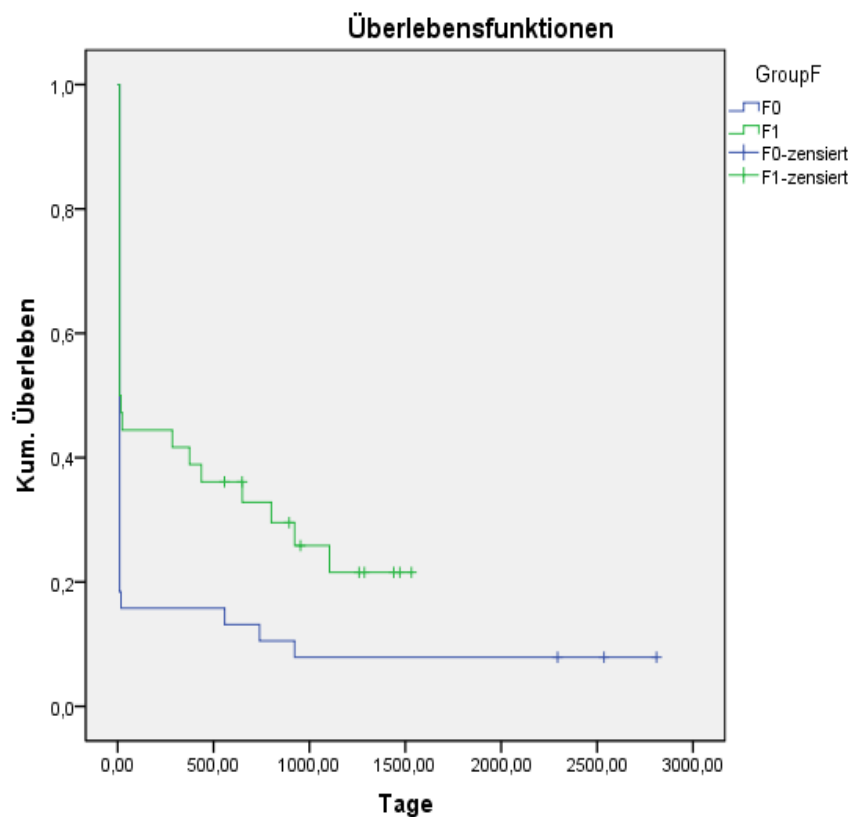
Gruppe D			Gruppe D-0		
Tier	Score Tag 0	Score Tag 10	Tier	Score Tag 0	Score Tag 10
1	7	3	1	2	1
2	9,5	18	2	11	18
3	15	18	3	13	2
4	7	17,25	4	11	16,25
5	8	4	5	7	7,25
6	5,25	1	6	8,25	18
7	4	1	7	8,75	4
8	14,25	18	8	6,25	2
9	14,25	18	9	11,5	9,5
10	15,5	18	10	7,75	3
11	10,25	18	11	14,5	18
12	10,5	18	12	12,25	17,25
13	14,75	18	13	8,5	8,75
14	10	18	14	13,25	18
15	15,25	18	15	3	0
16	5	0	16	4	0
17	6,25	1	17	15	18
18	7	14,5	18	14	18
19	8,25	5	19	4	3
20	5	4	20	6	18
21	17,25	18	21	6	5
22	8,25	2	22	15	18
23	18	17	23	6	0
24	7,25	0			
25	17	8			
26	15	0			
27	15	3			

Gruppe F			Gruppe F-0		
Tier	Score Tag 0	Score Tag 10	Tier	Score Tag 0	Score Tag 10
1	8,5	2	1	5	0
2	11,5	2	2	4	2
3	2	0	3	12,5	18
4	18	0	4	7	2
5	12,5	9	5	8	2
6	8	0	6	8	4
7	12	4	7	6	5
8	12,5	0	8	6	2
9	15	0	9	11,5	4
10	9	2	10	9	18

11	10,5	3	11	11,5	4
12	8	4	12	8	4
13	15	18	13	10,5	0
14	9	18	14	8	2
15	6	18	15	7	2
16	9	18	16	6	2
17	10	18	17	9	18
18	8,5	18	18	4,5	0
19	11,5	18	19	8	18
20	10	0	20	10,5	18
			21	6	0
			22	8,5	0
			23	15	3
			24	9	18
			25	7	18

Die neurologischen Symptome wurden anhand des zuvor genannten neurologischen Scores in die Tabelle eingetragen. Diese Werte wurden für die statistische Auswertung verwendet.

3. Langzeitüberleben (Gruppe F und D)



Tiere, die Fenbendazol in ihrer kombinierten Therapie erhalten haben (grün), lebten signifikant länger, als die Tiere, die nicht mit Fenbendazol therapiert wurden (blau).

IX. DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei den Menschen bedanken, die diese Arbeit überhaupt ermöglicht haben.

An erster Stelle meinen Betreuern Jutta Hein und Andrea Fischer, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen. Jutta mit ihrem Perfektionismus, wodurch ich die Formatfehler – vor allem bei anderen – von weitem her sehen kann. Andrea, die mich in ihr Haus bis mitten in der Nacht eingeladen hat, um den Artikel noch fristgerecht einreichen zu können. Desweiteren einen großen Dank an Carola Sauter-Louis, die mich in der Statistik unterstützt hat, wenn ich nur noch Zahlenchaos zustande gebracht habe.

Danke auch an Ariane Jass, die die Vorarbeit und den Anstoß für diese Studie gegeben hat.

Meinen Eltern kann ich gar nicht genug danken. Sie haben mich immer wieder unterstützt und motiviert, die Dissertation nicht an den Nagel zu hängen, sondern abzuschließen, damit die ganze Mühe nicht umsonst war. Auch meine Freunde und Kollegen möchte ich nicht vergessen, die ich versetzt habe und sie es mir trotzdem nie übel genommen haben. Sie alle hier namentlich zu nennen, würde den Rahmen sprengen.