

Untersuchung zum Vorkommen von *Encephalitozoon* spp. bei
Europäischen Wildkaninchen (*Oryctolagus cuniculus*) in
Süddeutschland (Bayern)

von Katharina Marlene Breuninger

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

Untersuchung zum Vorkommen von *Encephalitozoon* spp. bei
Europäischen Wildkaninchen (*Oryctolagus cuniculus*) in
Süddeutschland (Bayern)

von Katharina Marlene Breuninger
aus Stuttgart

München 2025

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

Lehrstuhl für aviäre Medizin und Chirurgie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Univ.-Prof. Dr. Rüdiger T. Korbel

Mitbetreuung durch: Prof. Dr. Monika Rinder

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Rüdiger T. Korbelt

Korreferent: Prof. Dr. Sebastian-U. Ulrich

Tag der Promotion: 8. Februar 2025

Meiner Familie

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden in folgender Publikation am

07. 10. 2024 veröffentlicht:

Katharina Breuninger, Monika Rinder und Rüdiger Korbel

Occurrence of *Encephalitozoon cuniculi* and *Encephalitozoon hellem* in European wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in Southern Germany (Bavaria)

Animals 2024, 14(19), 2880; <https://doi.org/10.3390/ani14192880>

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|------------|--|----------|
| I. | EINLEITUNG | 1 |
| II. | LITERATURÜBERSICHT | 2 |
| 1. | <i>Encephalitozoon cuniculi</i> | 2 |
| 1.1. | Systematische Einordnung | 2 |
| 1.2. | Entwicklung und Morphologie..... | 3 |
| 1.3. | Pathogenese | 5 |
| 1.4. | Immunologie | 8 |
| 1.5. | Wirtsspektrum und Genotypen..... | 12 |
| 1.6. | Übertragungswege..... | 13 |
| 1.7. | Klinische Symptomatik beim Kaninchen..... | 14 |
| 1.7.1. | Zentrales Nervensystem | 15 |
| 1.7.2. | Nieren | 15 |
| 1.7.3. | Augen | 16 |
| 1.8. | Diagnostik | 17 |
| 1.8.1. | Direkte Nachweisverfahren..... | 17 |
| 1.8.1.1. | Mikroskopischer Nachweis | 17 |
| 1.8.1.2. | Kultureller Nachweis..... | 18 |
| 1.8.1.3. | Polymerasekettenreaktion | 19 |
| 1.8.1.3.1. | Linse | 20 |
| 1.8.1.3.2. | Urin..... | 20 |
| 1.8.1.3.3. | Kot..... | 20 |
| 1.8.1.3.4. | Liquor | 20 |
| 1.8.1.3.5. | Organmaterial..... | 21 |
| 1.8.2. | Indirekte Nachweisverfahren | 21 |
| 1.8.2.1. | Serologischer Nachweis | 22 |
| 1.8.2.1.1. | Immunfluoreszenzantikörpertest | 22 |
| 1.8.2.1.2. | Enzyme-linked Immunosorbent Assay | 23 |
| 1.8.2.1.3. | Carbon Immunoassay | 23 |
| 1.8.2.1.4. | Immunoperoxidasetest | 24 |
| 1.8.2.1.5. | Komplementbindungsreaktion | 24 |
| 1.8.2.1.6. | Western Blot..... | 25 |

| | | |
|--------------|---|-----------|
| 1.8.2.1.7. | Intrakutantest..... | 25 |
| 1.8.2.1.8. | Nachweis aus Liquor..... | 25 |
| 1.9. | Therapie..... | 26 |
| 1.10. | <i>E. cuniculi</i> bei Wildkaninchen | 28 |
| 1.11. | Zoonotische Bedeutung..... | 31 |
| 2. | <i>Encephalitozoon hellem</i> | 33 |
| 2.1. | Wirtsspektrum und Genotypen..... | 33 |
| 2.2. | Klinische Symptomatik bei Tieren und Menschen | 34 |
| III. | PUBLIKATION | 35 |
| IV. | DISKUSSION | 51 |
| 1. | <i>Untersuchungsmaterial</i> | 51 |
| 1.1. | Herkunft der Proben | 51 |
| 1.2. | Probenentnahme | 52 |
| 1.3. | Stichprobenumfang | 54 |
| 2. | <i>Untersuchungsmethoden</i> | 55 |
| 3. | <i>Nachweisraten</i> | 57 |
| 3.1. | Immunfluoreszenzantikörpertest..... | 57 |
| 3.2. | PCR-Untersuchungen zu <i>E. cuniculi</i> | 60 |
| 3.2.1. | Genotypisierung von <i>E. cuniculi</i> | 62 |
| 3.3. | PCR-Untersuchungen zu <i>E. hellem</i> | 63 |
| 3.3.1. | Genotypisierung von <i>E. hellem</i> | 64 |
| 4. | <i>Erhobene Tierdaten</i> | 64 |
| 5. | <i>Schlussfolgerung</i> | 65 |
| V. | ZUSAMMENFASSUNG | 67 |
| VI. | SUMMARY | 69 |
| VII. | LITERATURVERZEICHNIS | 71 |
| VIII. | DANKSAGUNG | 99 |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|----------------|--|
| AIDS | Acquired Immune Deficiency Syndrome |
| BALB/c Mäuse | spezieller Maus-Inzuchtstamm |
| bzw. | beziehungsweise |
| CD | cluster of differentiation |
| CIA | Carbon Immunoassay |
| C57BL/6 Mäuse | spezieller Maus-Inzuchtstamm |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| E. cuniculi | Encephalitozoon cuniculi |
| E. hellem | Encephalitozoon hellem |
| ELISA | Enzyme-linked Immunosorbent Assay |
| et al. | et alii/et aliae/et alia |
| HIV | humanes Immundefizienz-Virus |
| IFAT | Immunfluoreszenzantikörpertest |
| IFN- γ | Interferon- γ |
| IgA | Immunglobulin A |
| IgG | Immunglobulin G |
| IgM | Immunglobulin M |
| IL-12 | Interleukin 12 |
| ITS | internal transcribed spacer |
| i. o. | intraokular |
| IP | Immunoperoxidase |
| i. p. | intraperitoneal |
| i. r. | intrarektal |
| i. t. | intratracheal |
| i. v. | intravenös |
| i. z. | intrazerebral |
| KBR | Komplementbindungsreaktion |
| kg | Kilogramm |
| n | Stichprobe |
| N | Grundgesamtheit |
| NF- κ B | nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells |
| nm | Nanometer |
| NSAID | nonsteroidal anti-inflammatory drug |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| pH | pondus hydrogenii |
| p. i. | post infectionem |
| p. o. | per os |
| PRRS | pattern recognition receptors |
| RHD | Rabbit Haemorrhagic Disease |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| s. c. | subkutan |
| SCID | severe combined immunodeficiency |
| sog. | sogenannt |
| TLR 2 | Toll-like-Rezeptor 2 |
| TLR 4 | Toll-like-Rezeptor 4 |
| tRNA | Transfer-RNA |
| u. a. | unter anderem |
| UK | United Kingdom |
| UV-Licht | ultraviolettes Licht |
| μ m | Mikrometer |
| WB | Western Blot |
| YOPI | young, old, pregnant, immunosuppressed |
| z. B. | zum Beispiel |
| ZNS | Zentralnervensystem |
| % | Prozent |

I. EINLEITUNG

Bei Wildtieren ist über Infektionskrankheiten, im Vergleich zu Menschen und Haustieren, bisher verhältnismäßig wenig bekannt. Da das Bewusstsein für die Rolle der Tierwelt als Quelle infektiöser Krankheiten für die menschliche und tierische Gesundheit gewachsen ist, ist es von besonderem Interesse, auch die Forschung auf diesem Gebiet zu intensivieren. Das heutzutage immer engere Zusammenleben von Menschen und (Wild-)Tieren begünstigt eine rasche Ausbreitung von Zoonosen. Frühzeitige epidemiologische Untersuchungen sind daher hilfreich und notwendig, um Mensch und Tier gegenseitig vor von sich ausbreitenden Infektionserregern zu schützen (Thompson 2013; Hinney et al. 2016).

Die Encephalitozoonose stellt eine besonders unter domestizierten Kaninchen weit verbreitete Infektionskrankheit dar, welche durch den Erreger *Encephalitozoon cuniculi* (*E. cuniculi*) verursacht wird. Bei *E. cuniculi* handelt es sich um einen obligat intrazellulären Infektionserreger, der den Mikrosporidien angehört. Sein äußerst breites Wirtsspektrum macht ihn, ebenso wie sein zoonotisches Potential, in vielerlei Hinsicht zu einem bedeutsamen Krankheitserreger. *Encephalitozoon hellem* (*E. hellem*), eine nahe verwandte Mikrosporidienart, ist am weitesten unter den Vögeln verbreitet, wird jedoch als potentieller Zoonoseerreger gelegentlich auch bei immunsupprimierten Menschen nachgewiesen.

Über die sylvatischen Zyklen von *Encephalitozoon*-Spezies ist bisher nur wenig bekannt. Epidemiologische Untersuchungen sind daher erforderlich, um diesbezüglich neue Erkenntnisse zu erlangen (Hinney et al. 2016).

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, das Vorhandensein von *E. cuniculi* und *E. hellem* bei Wildkaninchen in Bayern zu untersuchen, um einen aktuellen Einblick in die Zirkulation der Erreger in der Wildkaninchenpopulation zu erhalten. Anhand der Ergebnisse dieser Studie soll eingeschätzt werden, ob Wildkaninchen ein Erregerreservoir und somit eine potenzielle Infektionsquelle für andere Wildtiere, Haustiere sowie den Menschen darstellen.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. *Encephalitozoon cuniculi*

1.1. Systematische Einordnung

E. cuniculi wurde erstmals 1922 von Wright und Craighead beschrieben. Sie entdeckten den Erreger zufällig im Rahmen einer experimentellen Forschung als auslösendes Agens einer motorischen Paralyse bei jungen Kaninchen und vermuteten in ihm ein Zwischenstadium eines protozoischen Parasiten (Wright und Craighead 1922).

Ein Jahr später konnten Levaditi et al. (1923a) den Erreger im Gehirn eines an einer Enzephalitis erkrankten Kaninchens ebenfalls feststellen. Aufgrund der Lokalisation und der betroffenen Tierart benannten sie den Erreger daraufhin *Encephalitozoon cuniculi*. Zunächst konnten sie den Erreger nicht einordnen, nahmen jedoch an, dass es sich um ein Protozoon handelt. Noch im selben Jahr schrieben die Autoren *E. cuniculi*, basierend auf dessen Morphologie, den Mikrosporidien zu (Levaditi et al. 1923b). Weitere Wissenschaftler untersuchten nachfolgend den Erreger und diskutierten seine Zugehörigkeit zu den Mikrosporidien (Goodpasture 1924; Smith und Florence 1925; Nelson 1962). Eine zwischenzeitliche Umbenennung in *Nosema cuniculi* erfolgte ab dem Jahre 1964 durch Weiser und Lainson et al., da diese die Gattung *Encephalitozoon* für ein jüngeres Synonym der Gattung *Nosema* hielten (Weiser 1964; Lainson et al. 1964). Weitere Erkenntnisse hinsichtlich der Morphologie und des Entwicklungszyklus des Erregers führten jedoch 1971 zur Rückbenennung in *E. cuniculi* (Cali 1971; Shaddock und Pakes 1971; Sprague und Vernick 1971). Taxonomisch wurde *E. cuniculi*, basierend auf morphologischen Eigenschaften und Entwicklungszyklus, dem Stamm Microspora, der Klasse Haplopharea, der Ordnung Glugeida, der Familie Encephalitozoonidae sowie der Gattung *Encephalitozoon* zugeordnet (Sprague et al. 1992). Jedoch wurde anschließend empfohlen, den Stamm mit dem Begriff Microsporidia zu bezeichnen (Sprague und Becnel 1998). Zukünftige Änderungen bezüglich der taxonomischen Einordnung der Art sind auf Grundlage molekularbiologischer Untersuchungen durchaus denkbar.

Lange Zeit wurden Mikrosporidien als primitive, ursprüngliche Protozoen

angesehen (Han et al. 2021). Neuere phylogenetische Untersuchungen weisen jedoch darauf hin, dass Mikrosporidien mit den Pilzen verwandt sind (Capella-Gutiérrez et al. 2012). Diese Annahme wird mitunter durch die Identifizierung pilzähnlicher Chitinasen (Hinkle et al. 1997) und Trehalose (Undeen und Vander Meer 1999) sowie durch phylogenetische Analysen, u. a. von α - und β -Tubulin (Edlind et al. 1994; Edlind et al. 1996; Keeling und Doolittle 1996), Glutamyl-tRNA-Synthetase (Brown und Doolittle 1999), TATA-Box-Bindungsprotein (Fast et al. 1999), RNA-Polymerase II (Hirt et al. 1999), Hitzeschockprotein 70 (Germot et al. 1997; Hirt et al. 1997; Peyretailade et al. 1998) und α - und β -Untereinheiten der Pyruvat-Dehydrogenase E1 (Fast und Keeling 2001), bestärkt. Im Jahre 2001 konnten Katinka et al. mit der Genomsequenz von *E. cuniculi* die erste vollständige Genomsequenz einer Mikrosporidienspezies überhaupt publizieren. Auch die daraus gewonnenen Erkenntnisse stützen die Einordnung der Mikrosporidien in das Reich der Pilze (Katinka et al. 2001). Bislang wurden ungefähr 220 Gattungen mit etwa 1700 Arten von Mikrosporidien beschrieben (Han et al. 2021).

1.2. Entwicklung und Morphologie

Mikrosporidien weisen einen obligat intrazellulären Lebenszyklus auf. Der Lebenszyklus umfasst das Stadium der Merogonie und der nachfolgenden Sporogonie, aus der schließlich die reifen Sporen resultieren (Vávra 1976; Vávra und Larsson 1999). Die Vermehrung von *E. cuniculi* erfolgt einwirtig und asexuell (Vivarès und Méténier 2001).

Die Sporen stellen das infektiöse und das einzige außerhalb der Wirtszelle überlebensfähige Stadium der Mikrosporidien dar (Vávra und Larsson 1999). Bei *E. cuniculi* sind sie oval (Lainson et al. 1964) bis elliptisch (Schottelius et al. 2000) geformt und messen gemäß den Angaben von Visvesvara et al. 1.8 - 4 μm x 1 - 1.5 μm (Visvesvara et al. 1999). Umgeben werden sie von einer Sporenwand, bestehend aus einer äußeren, 20-30 nm dicken, elektronendichten Schicht (Exospore) und einer inneren, 25-35 nm dicken, elektronendurchlässigen Schicht (Endospore) (Bigliardi et al. 1997; Visvesvara et al. 1999). Während die Sporenwand die Spore mit einer gleichmäßigen Dicke von ungefähr 50-60 nm umgibt, zeigt sie sich im Bereich der anterior gelegenen Ankerscheibe mit nur 30 nm deutlich dünner (Pakes et al. 1975; Bigliardi et al. 1997). Im Inneren der Spore liegt die Plasmamembran der Sporenwand an (Bigliardi et al. 1997). Sie umschließt

die inneren Bestandteile der Spore (Pakes et al. 1975). Zu diesen Bestandteilen zählen der Kern, welcher das Genom von lediglich 2,9 Megabasenpaaren umfasst (Katinka et al. 2001), das infektiöse Sporoplasma, Ribosomen und der sogenannte Extrusionsapparat, bestehend aus Polfaden, Ankerscheibe, Polaroplast und posteriorer Vakuole (Weidner 1972; Bigliardi und Sacchi 2001) (Abbildung 1).

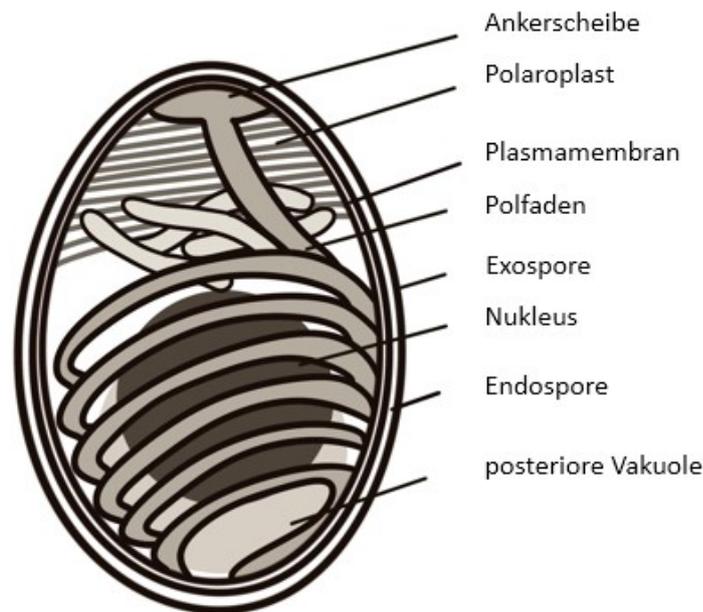


Abbildung 1: Grafische Darstellung einer *E. cuniculi*-Spore (nach Franzen 2004)

Das zentrale Element der Zellinvasion ist der Polfaden. Er entspringt am vorderen Pol der Spore aus der Ankerscheibe, verläuft von dort aus in Richtung der inneren Sporenwand und liegt dieser mit 5-7 gleichmäßigen Windungen an (Pakes et al. 1975; Visvesvara et al. 1999). Um eine Wirtszelle zu infizieren, kann der Polfaden handschuhfingerartig extrudiert werden, um diese zu penetrieren und infektiöses Sporoplasma in deren Zytoplasma zu injizieren (Lom und Vavra 1963; Weidner 1972; Pakes et al. 1975). Ausgelöst wird dieser Vorgang vermutlich durch verschiedene äußere Stimuli, wie beispielweise Änderungen des pH-Wertes oder der Ionenkonzentration. Unabhängig von der Art der Stimulation wird angenommen, dass Mikrosporidien gleichermaßen auf einen solchen Reiz mit einer Erhöhung des intrasporalen osmotischen Drucks reagieren. Durch die Steigerung des intrasporalen osmotischen Drucks kommt es zu einem Wassereinstrom in die Spore, welcher mit einem Anschwellen des Polaroplasten sowie der posterioren Vakuole einhergeht. Der daraus resultierende intrasporale Druck führt letztendlich

zur Extrusion des Polfadens (Lom und Vavra 1963; Weidner und Byrd 1982; Undeen 1990; Undeen und Vander Meer 1999). Alternativ kann der Erreger auch durch Phagozytose in die Wirtszelle gelangen und diese infizieren (Couzinet et al. 2000; Franzen et al. 2005).

In der Wirtszelle werden die unterschiedlichen Entwicklungsstadien des Erregers von einer parasitophoren Vakuole umgeben (Sprague und Vernick 1971; Pakes et al. 1975; Hamilton et al. 1977; Visvesvara et al. 1999). Während der proliferativen Phase, der sogenannten Merogonie, entwickeln sich aus dem Sporoplasma zunächst Meronten, welche sich durch Zwei- und Vielfachteilung vermehren. Die Meronten liegen dabei stets der Innenseite der parasitophoren Vakuole an (Sprague und Vernick 1971; Pakes et al. 1975; Visvesvara et al. 1999). Nach Abschluss der Merogonie kommt es zur Anlagerung von sekretiertem, elektronendichtem Material an der Außenseite der Plasmamembran der sodann als Sporonten bezeichneten Entwicklungsstadien, was als Zeichen für den Übergang in die sogenannte Sporogonie gilt (Lainson et al. 1964; Hamilton et al. 1977; Vávra und Larsson 1999). Bei der Sporogonie differenzieren sich die Sporonten zu Sporoblasten, aus denen schließlich reife Sporen entstehen. Die verschiedenen Stadien der Sporogonie liegen, ebenso wie die reifen Sporen, frei im Lumen der parasitophoren Vakuole (Pakes et al. 1975; Visvesvara et al. 1999). Die im Laufe der Infektion zunehmende Vergrößerung der parasitophoren Vakuole resultiert letztlich in einer Ruptur der Wirtszelle und somit in der Freisetzung der reifen Sporen (Lainson et al. 1964; Schottelius et al. 2000). Die Dauer des Entwicklungszyklus in der parasitophoren Vakuole wird in Zellkulturen mit etwa 48 (Pakes et al. 1975) bis 72 (Bismanis 1970) Stunden, bis hin zu 5 Tagen (Petri 1969) angegeben.

1.3. Pathogenese

Kaninchen infizieren sich hauptsächlich über die orale Aufnahme von Sporen. Nach der Aufnahme gelangen die Sporen in den Darm, wo sie das dortige Epithel infizieren, um anschließend über das darmassoziierte lymphatische Gewebe die Blutbahn zu erreichen. Über das Blut gelangt der Erreger zu diversen Organen - entweder als freie Spore oder innerhalb infizierter Monozyten (Marcato und Rosmini 1986). Nach frühestens 2 Wochen können proliferative Stadien oder reife Sporen des Erregers erstmals in Darm, Mesenteriallymphknoten, Milz, Leber,

Lunge, Nieren, Herz, Augen und Gehirn detektiert werden (Jeklová et al. 2019; Jeklova et al. 2020).

Nach den Untersuchungen von Cox et al. (1979) stellen im Frühstadium einer Infektion Nieren, Lunge und Leber, in selteneren Fällen auch das Herz, die Zielorgane von *E. cuniculi* dar. 14 Wochen nach der Infektion wird der Erreger hauptsächlich noch in Gehirn und Nieren, den Hauptprädispositionsorganen, vorgefunden (Cox et al. 1979). Jeklova et al. (2020) konnten über einen Zeitraum von 8 Wochen nach experimenteller Infektion das Persistieren des Erregers in mehreren Organen beobachten (Jeklova et al. 2020). Histopathologische Läsionen treten im Gewebe der Nieren früher auf als im Gehirn (Cox und Gallichio 1978; Cox et al. 1979).

Im Gehirn kann der Erreger frühestens 2 Wochen p. i. vorgefunden werden, wobei sich mit fortlaufender Infektion die Wahrscheinlichkeit eines Nachweises erhöht (Jeklova et al. 2020). Auch wenn sich die Ergebnisse verschiedener Untersuchungen hinsichtlich der Lokalisation histologischer Läsionen im Zentralnervensystem teilweise unterscheiden, so stimmen sie doch meist insofern überein, als dass das Cerebrum mit am häufigsten betroffen ist (Shaddock et al. 1979; Scharmann et al. 1986; Eröksüz et al. 1999; Csokai et al. 2009a; Rodríguez-Tovar et al. 2016; Özkan und Alcigir 2018; Morsy et al. 2020). Veränderungen werden zudem auch an den (Lepto-)Meningen (Shaddock et al. 1979; Csokai et al. 2009a), dem Hirnstamm bzw. der Medulla oblongata (Scharmann et al. 1986; Eröksüz et al. 1999; Csokai et al. 2009a; Rodríguez-Tovar et al. 2016; Özkan und Alcigir 2018; Morsy et al. 2020), dem Zwischenhirn (Scharmann et al. 1986), dem Cerebellum (Scharmann et al. 1986; Csokai et al. 2009a; Özkan und Alcigir 2018) und dem Rückenmark (Scharmann et al. 1986; Csokai et al. 2009a) beschrieben.

Bei den Veränderungen des Hirngewebes zeigen sich typischerweise nicht-eitrige, multifokale granulomatöse (Meningo-)Enzephalitiden mit Gliose und perivaskulären lymphozytären Infiltrationen (Cox und Gallichio 1977; Rodríguez-Tovar et al. 2016; Özkan und Alcigir 2018; Morsy et al. 2020). Gliaknoten mit zentraler Nekrose, neuronaler Degeneration und Neuronophagie können vorgefunden werden (Morsy et al. 2020). In den nekrotischen Zentren von Granulomen können sich Sporen des Erregers ansammeln (Cox und Gallichio 1977; Leipzig et al. 2013). Des Weiteren können sich Sporen frei im Gewebe oder

innerhalb von Pseudozysten befinden (Cox und Gallichio 1977; Rodríguez-Tovar et al. 2016; Morsy et al. 2020). Makroskopisch stellen sich die meningealen und zerebralen Gefäße gelegentlich hyperämisch dar. Außerdem können Teile des Gehirns ödematisiert sein (Özkan und Alcigir 2018).

In den Nieren manifestiert und vermehrt sich *E. cuniculi* vor allem in den Tubulusepithelzellen. Reife Sporen können durch Ruptur der dort lokalisierten sporenhaltigen Pseudozysten in das Tubuluslumen und in das interstitielle Nierengewebe freigesetzt werden. Erreicht der Erreger die Sammelrohre, kann dieser über den Urin ausgeschieden werden beziehungsweise weitere Bereiche der Niere infizieren (Smith und Florence 1925; Flatt und Jackson 1970; Wilson 1979b; Hamilton und Cox 1981; Morsy et al. 2020). Histologisch zeigt sich an den Nieren typischerweise eine fokale bis multifokale interstitielle granulomatöse Nephritis mit Makrophagen- und Lymphozyteninfiltrationen sowie Fibrosen (Flatt und Jackson 1970; Eröksüz et al. 1999; Rodríguez-Tovar et al. 2016; Rodríguez-Tovar et al. 2017). Dabei ist meist bereits makroskopisch das durch die Fibrosen verursachte Narbengewebe sichtbar, welches eine Retraktion der Nierenkapsel bewirkt (Flatt und Jackson 1970; Maestrini et al. 2017). Auch ist makroskopisch teilweise eine Vergrößerung und Aufhellung der Nieren zu erkennen (Morsy et al. 2020). Histologisch können zudem degenerative, nekrotische Veränderungen des Tubulusepithels und der Sammelrohre festgestellt werden (Özkan und Alcigir 2018; Morsy et al. 2020).

Jeklová et al. (2019) konnten den Erreger nach experimenteller oraler Infektion adulter Kaninchen in diversen ophthalmologischen Strukturen (periokuläres Bindegewebe, Sklera, Kornea, Chorioidea, Iris, Retina), darunter auch in der Linse, nachweisen. Dies deutet darauf hin, dass für eine Infektion der Linse nicht nur der intrauterine oder hämatogene Infektionsweg in Frage kommt (Jeklová et al. 2019). An den Augen zeigen sich Veränderungen typischerweise in Form einer (phakoklastischen) Uveitis und Katarakten. Die Veränderungen treten meist uni-, teilweise aber auch bilateral auf (Ewringmann und Göbel 1999; Harcourt-Brown und Holloway 2003; Künzel et al. 2008; Csokai et al. 2009a; Morsy et al. 2020). Histologische Läsionen werden an der Kornea, dem Ziliarkörper, der Linse, der Iris und der Retina beobachtet (Özkan und Alcigir 2018; Morsy et al. 2020). Es können Ulzerationen des Epithels, Nekrosen des Endothels oder auch Korneaödeme auftreten. An der Linsenkapsel kann es zu Brüchen der Linsenfasern und Nekrosen

des Linsenepithels kommen. Die Iris kann ödematisieren und Degenerationen des posterioren Epithels aufweisen. Auch Retinaatrophien und –ablösungen wurden beobachtet (Morsy et al. 2020).

Histologische Veränderungen konnten bei Kaninchen zudem auch in der Leber (Cox et al. 1979; Wicher et al. 1991; Fuentealba et al. 1992; Eröksüz et al. 1999; Csokai et al. 2009a; Jeklova et al. 2010a; Leipig et al. 2013; Rodríguez-Tovar et al. 2016; Morsy et al. 2020; Jeklova et al. 2020), der Lunge (Cox et al. 1979; Wicher et al. 1991; Eröksüz et al. 1999; Csokai et al. 2009a; Jeklova et al. 2010a; Leipig et al. 2013; Jeklova et al. 2020), dem Herz (Cox et al. 1979; Csokai et al. 2009a; Leipig et al. 2013) und der Milz (Jeklova et al. 2020) beobachtet werden.

Der Grad der histopathologischen Läsionen liefert keinen Beweis dafür, dass *E. cuniculi* tatsächlich ursächlich für eine klinische Symptomatik ist. Es können auch schwerwiegende Läsionen vorliegen, ohne dass das Tier klinische Auffälligkeiten zeigt (Csokai et al. 2009a).

1.4. Immunologie

Sowohl das angeborene als auch das erworbene Immunsystem sind an der Abwehr von Infektionen mit *E. cuniculi* beteiligt. Studien der letzten Jahre konnten zeigen, dass vor allem die zellvermittelte Immunität eine entscheidende Rolle für den Schutz vor Encephalitozoon-Infektionen spielt.

Makrophagen sind ein wichtiges Bindeglied zwischen dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem. Sie sind Teil der initialen Immunantwort, da sie an den potenziellen Eintrittspforten von Erregern lokalisiert sind. Das Eindringen von Krankheitserregern wie *E. cuniculi* wird von den lokalen Makrophagen zügig durch diverse Rezeptoren, darunter sogenannte Mustererkennungsrezeptoren (PRRs), erkannt. Dabei könnte es sich um die Toll-like Rezeptoren TLR 2 und TLR 4 handeln. Diese aktivieren den spezifischen Transkriptionsfaktor NF- κ B und regen die Sekretion von Chemokinen an, während weitere Makrophagen rekrutiert werden. Das Erkennen des Erregers durch Makrophagen bewirkt zudem eine Produktion von Verteidigungsmediatoren, einschließlich Zytokinen und reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies (Didier 1995; Texier et al. 2010). Mikrosporidien wie *E. cuniculi* sind in der Lage, diese Schutzreaktion zu umgehen, während die Makrophagen indes den Erreger wie ein trojanisches Pferd durch den Körper transportieren und somit neue Zellen infiziert werden können (Mathews et al.

2009). Bei dieser Immunevasion spielt wahrscheinlich eine Ausnutzung der Efferozytose sowie eine Polarisierung der Makrophagen zu anti-inflammatorischen M2-Makrophagen zur Begünstigung des Überlebens und der Vermehrung des Erregers innerhalb der Makrophagen eine entscheidende Rolle (Dalboni et al. 2021). Zudem ermöglicht das Fehlen von Wirtszell-Markerproteinen in der parasitophoren Vakuole, dass diese in den Zellen unbemerkt bleibt und dadurch der lysosomalen Verdauung entgeht (Fasshauer et al. 2005; Bohne et al. 2011).

Die T-Zell-vermittelte Immunantwort des Wirts ist ein wichtiger Bestandteil, um eine Infektion mit *E. cuniculi* abzuwehren. Besonders die CD8⁺ T-Zellen gelten hierbei als essentiell (Khan et al. 1999; Moretto et al. 2000). Neben der Produktion von protektiven Zytokinen (Ramshaw et al. 1997) sind CD8⁺ T-Zellen in der Lage, die Erregerlast bei intrazellulären Infektionen vor allem durch die Perforin-vermittelte Zytolyse im betroffenen Zielgewebe zu senken (Khan et al. 1999). Verschiedene Studien konnten die Wichtigkeit der CD8⁺ T-Zellen bei Infektionen mit *E. cuniculi* unterstreichen. So konnten SCID Mäuse, welche mit CD4⁺ T-Lymphozyten-depletierten naiven BALB/c Splenozyten rekonstituiert wurden, eine intraperitoneale Infektion mit *E. cuniculi* bewältigen, während SCID Mäuse, welche hingegen mit CD8⁺ T-Lymphozyten-depletierten naiven BALB/c Splenozyten rekonstituiert wurden, letztlich der Infektion erlagen (Braunfuchsová et al. 2001; Salát et al. 2006). Damit übereinstimmend erlagen auch Knockout-Mäuse mit herbeigeführtem genetischem Mangel an CD8⁺ T-Zellen der intraperitonealen Infektion, während Knockout-Mäuse mit genetischem Mangel an CD4⁺ T-Zellen die Infektion überlebten (Khan et al. 1999). Auch ein genetischer Mangel an Perforin resultiert in einem letalen Ausgang bei intraperitoneal infizierten Tieren (Khan et al. 1999). Allerdings konnte bei weiteren Studien an SCID Mäusen festgestellt werden, dass bei einer oralen Infektion mit *E. cuniculi*, welche gleichzeitig auch den natürlichen Infektionsweg darstellt, eine Depletion der CD8⁺ T-Zellen allein nicht zu einem letalen Krankheitsverlauf führt. Jedoch bewirkt eine Depletion von sowohl CD8⁺ T-Zellen als auch CD4⁺ T-Zellen bei einer oralen Infektion eine ausgeprägte Symptomatik und führt schließlich zum Tode. Dies deutet darauf hin, dass sowohl CD8⁺ T-Zellen als auch CD4⁺ T-Zellen eine protektive Rolle bei der oralen Infektion spielen (Braunfuchsová et al. 2002; Moretto et al. 2004).

Ergänzend zu diesen Beobachtungen bei Tieren ist bei HIV-infizierten Menschen

vermutlich die verminderte CD4⁺ T-Lymphozytenanzahl mit ausschlaggebend hinsichtlich der Anfälligkeit für eine Mikrosporidien-Infektion (Asmuth et al. 1994; Han et al. 2021).

Des Weiteren spielen diverse Zytokine, darunter IFN- γ und IL-12, eine wichtige Rolle bei der Abwehr des Erregers (Braunfuchsova et al. 1999; Khan und Moretto 1999; Salat et al. 2004). So konnte exemplarisch der Transfer von CD4⁺ T-Zellen immunkompetenter Mäuse das Überleben von peroral mit *E. cuniculi* infizierten SCID Mäusen verlängern, während das Überleben durch den Transfer von CD4⁺ T-Lymphozyten IFN- γ -defizienter Mäuse nicht verlängert wurde (Salat et al. 2008). Auch eine durch monoklonale Antikörper herbeigeführte Depletion von IFN- γ oder IL-12, dem für die Induktion von IFN- γ wichtigen Zytokin, führt zum Versterben bei infizierten C57BL/6 Mäusen (Khan und Moretto 1999).

Im Rahmen der humoralen Immunabwehr können Infektionen mit *E. cuniculi* eine starke Antikörperantwort auslösen (Jeklova et al. 2020). Nach oraler Infektion konnte bei Mäusen der Anstieg von IgA, IgM und IgG beobachtet werden (Sak und Ditrich 2005). Allerdings konnten Antikörper athymische BALB/c Mäuse nicht vor dem Versterben durch eine Infektion mit *E. cuniculi* schützen, woraus sich ableiten lässt, dass Antikörper alleine nicht ausreichen, um eine Infektion mit dem Erreger zu überstehen (Schmidt und Shaddock 1983).

Der Zeitpunkt der Antikörperbildung ist mitunter abhängig von dem jeweiligen Infektionsweg (Tabelle 1) und der aufgenommenen Sporenmenge (Waller et al. 1978). Das zeitgleiche Testen von IgM und IgG kann Aufschluss hinsichtlich des Infektionsstatus geben. Der ausschliebliche Nachweis von Antikörpern des Isotyps IgM dient als Hinweis auf ein frühes akutes Infektionsgeschehen. Lassen sich sowohl Antikörper des Isotyps IgM als auch des Isotyps IgG feststellen, spricht dies für eine akute Infektion. Sind lediglich Antikörper des Isotyps IgG vorhanden, gilt dies als ein Indiz für eine latente oder chronische Infektion (Cox et al. 1979; Kunstyr et al. 1986). Allerdings konnten Jeklova et al. ein Persistieren von sowohl IgG als auch IgM über 18 Wochen dokumentieren (Jeklova et al. 2010a), wodurch die tatsächliche Aussagekraft vorsichtig zu beurteilen ist.

Tabelle 1: Infektionsweg und erstmaliger Antikörpernachweis bei Kaninchen (i. z. = intrazerebral, s. c. = subkutan, i. v. = intravenös, p. o. = per os; i. t. = intratracheal; i. r. = intrarektal; i. o. = intraokular; p. i. = post infectionem; - = nicht untersucht/nachweisbar/aufgeführt)

| Infektionsweg | Erstmaliger AK-Nachweis, ab Tag p. i. | | | Autor (Jahr) |
|---------------|---------------------------------------|-------|-------|------------------------|
| | IgG | IgM | IgA | |
| i. z. | 8-15 | - | - | Wosu et al. (1977) |
| s. c. | 7-11 | - | - | Waller et al. (1978) |
| i. v. | 7 | - | - | Waller et al. (1978) |
| p. o. | 14-21 | - | - | Waller et al. (1978) |
| p. o. | 17 | - | - | Cox et al. (1979) |
| i. v. | 10 | - | - | Cox et al. (1979) |
| i. t. | 17 | - | - | Cox et al. (1979) |
| i. v. | 13-28 | 17-31 | - | Kunstýř et al. (1986) |
| i. r. | 15-30 | - | 15-60 | Wicher et al. (1991) |
| p. o. | 14 | 7 | - | Jeklova et al. (2010a) |
| i. o. | 14 | 7 | - | Jeklova et al. (2010a) |
| p. o. | <14 | <14 | - | Jeklova et al. (2020) |

Zu bedenken gilt, dass ein hoher Antikörpertiter keinen Beweis dafür liefert, dass *E. cuniculi* ursächlich für das Auftreten einer klinischen Symptomatik ist. Antikörpertiter können nach einer Infektion monatelang hoch sein und über Jahre mit schwankenden Werten persistieren, ohne dass die betroffenen Tiere je klinisch auffällig werden (Waller et al. 1978; Bywater und Kellett 1979; Scharmann et al. 1986). Nach den Untersuchungen von Lyngset (1980) weisen 95 % aller neugeborenen Kaninchen seropositiver Muttertiere bis zu einem Alter von 4 Wochen maternale Antikörper auf. Nach Scharmann et al. (1986) können maternale Antikörper nach einem vorherigen kontinuierlichen Abfall maximal bis zur 6.-7. Lebenswoche nachgewiesen werden. Ein bei Jungtieren ab der 8. Lebenswoche oftmals steil ansteigender Serumantikörpertiter spricht daher für eine akute Infektion (Scharmann et al. 1986).

Eine Immunsuppression, beispielsweise experimentell induziert durch Dexamethason oder Cyclophosphamid, kann eine subklinische latente Encephalitozoonose reaktivieren und eine klinische Symptomatik bis hin zu Todesfällen verursachen (Leng et al. 1999; Jeklova et al. 2010a). Daraus wird ersichtlich, dass die immunologische Konstitution des Individuums eine entscheidende Rolle hinsichtlich des Auftretens klinischer Symptomatik spielt. Dem entsprechend treten auch beim Menschen klinisch apparente *E. cuniculi*-Infektionen hauptsächlich bei immunsupprimierten Personen auf (siehe Kapitel 6). Auch der Erreger selbst führt zu einer gewissen Immunsuppression (Valencakova et al. 2003). Bei immunkompetenten Tieren macht sich eine Infektion allerdings nicht klinisch bemerkbar, solange Erreger und Wirt im immunologischen Gleichgewicht stehen (Schmidt und Shaddock 1983). Meyer-Breckwoldt (1996) konnte bei seinen Untersuchungen feststellen, dass seropositive Kaninchen häufiger von anderweitigen Erkrankungen betroffen sind als seronegative Kaninchen (Meyer-Breckwoldt 1996).

1.5. Wirtsspektrum und Genotypen

E. cuniculi weist ein sehr breites Wirtsspektrum auf und wurde bereits bei vielen verschiedenen Säugetierarten einschließlich Menschen, aber auch bei Vögeln nachgewiesen. Es ist insbesondere bei Kaninchen von einer weltweiten Verbreitung auszugehen. Zu den Säugetierarten, bei denen *E. cuniculi*-Infektionen nachgewiesen wurden, zählen unter anderem Hasenartige, Nagetiere (z. B. Mäuse, Ratten, Hamster, und Meerschweinchen), Carnivore (z. B. Hunde, Katzen und Füchse), Pferde, Wiederkäuer, Schweine und Primaten (Hinney et al. 2016; Deplazes et al. 2000).

Bisher konnten vier verschiedene Genotypen (als I, II, III, und IV bezeichnet) von *E. cuniculi*, anhand molekulargenetischer Untersuchungen der ITS-Region der rRNA, differenziert werden. Benannt wurden die Genotypen bzw. Stämme nach dem jeweiligen Wirt, aus dem sie erstmals isoliert wurden. Dementsprechend werden sie auch als „Kaninchenstamm“ (I), „Mausstamm“ (II), „Hundestamm“ (III) und „Menschenstamm“ (IV) bezeichnet (Didier et al. 1995b; Talabani et al. 2010). Alle vier Genotypen weisen lediglich eine geringe Wirtsspezifität auf. So konnten beispielsweise bei Kaninchen neben Infektionen mit dem Genotyp I auch natürliche Infektionen mit den Genotypen II und III nachgewiesen werden

(Valencakova et al. 2012; Deng et al. 2020).

Bei wildlebenden Ratten konnte ein rattenspezifisches Isolat festgestellt werden. Dieses zeigt zwar eine Übereinstimmung mit der ITS-Sequenz des Mausstammes (II), bei der Western-Blot-Analyse konnten allerdings geringfügige Antigenunterschiede im Vergleich zu den bisherigen Isolaten des Stammes aus Mäusen und Blaufüchsen beobachtet werden (Müller-Doblies et al. 2002).

Eine Methode als Alternative für die ITS-Genotypisierung von *E. cuniculi* basiert auf der Anwendung von zwei PCR-Tests, die auf der Grundlage eines Längenpolymorphismus und der Sequenzvielfalt der Gene für das Protein des Polfadens und der Sporenwand entwickelt wurde (Xiao et al. 2001b).

1.6. Übertragungswege

E. cuniculi kann sowohl horizontal als auch vertikal übertragen werden.

Kaninchen infizieren sich hauptsächlich über die orale Aufnahme von Sporen (Deplazes et al. 2000). Diese werden von infizierten Tieren vor allem mit dem Urin (Wright und Craighead 1922), aber auch über die Faeces (Kimura et al. 2013; Rodríguez-Tovar et al. 2016) ausgeschieden. Dementsprechend stellt beispielsweise mit Sporen kontaminiertes Futter oder Einstreu eine potenzielle Infektionsquelle dar (Wilson 1979b). Die Sporen können unter geeigneten Bedingungen bis zu 2 Jahre lang in der Umwelt überdauern. Eine entscheidende Rolle spielen hierbei Temperatur und Feuchtigkeit (Waller 1979; Koudela et al. 1999; Li et al. 2003). Hohe Temperaturen (60-70° C) können bereits nach wenigen Minuten dazu führen, dass in Wasser gelöste Sporen ihre Infektiosität verlieren. Niedrige Temperaturen und Frost überstehen die Sporen hingegen deutlich besser (Koudela et al. 1999). Die Ausscheidung der Sporen mit dem Urin durch infizierte Kaninchen erfolgt sporadisch (Cox und Pye 1975; Cox et al. 1979) und findet auch bei Tieren, die keine klinische Symptomatik aufzeigen, statt (Csokai et al. 2009b; Kimura et al. 2013). Im Rahmen experimenteller parenteraler Infektionen von Kaninchen konnten Sporen ab der 4. (Abu-Akkada und Oda 2016) bis 5. Woche (Cox et al. 1979; Jeklova et al. 2010a) p. i. im Urin nachgewiesen werden. Die Sporenausscheidung stagnierte in der 13. Woche p. i. (Cox et al. 1979) bzw. hielt bis zur Schlachtung nach 8 Wochen (Abu-Akkada und Oda 2016) oder Euthanasie in der 18. Woche p. i. an (Jeklova et al. 2010a). Wie lange natürlich infizierte Kaninchen Sporen ausscheiden können, ist bislang unbekannt.

In weiteren Studien konnten Kaninchen unter anderem intrazerebral (Levaditi et al. 1924; Wosu et al. 1977), intratracheal (Cox et al. 1979), intraperitoneal (Horváth et al. 1999), intravenös (Waller et al. 1978; Kunstýř et al. 1986), subkutan (Waller et al. 1978), rektal (Wicher et al. 1991; Fuentealba et al. 1992) und okulär (Jeklova et al. 2010a) mit dem Erreger infiziert werden. Jeklova et al. (2010a) gehen davon aus, dass die okuläre Infektion, obwohl sie nicht als üblicher Infektionsweg angesehen wird, bei Kaninchen durchaus von Relevanz sein könnte. Dies sei damit zu begründen, dass vor allem bei domestizierten Kaninchen sowohl die männlichen als auch die weiblichen Tiere durch Verspritzen ihres Urins ihr Revier markieren (Harcourt-Brown 2002), wodurch okuläre wie auch orale Infektionen möglich erscheinen (Jeklova et al. 2010a).

Auch die vertikale Übertragung des Erregers gilt mittlerweile als bewiesen. Jungtiere können sich bereits transplazentar über das Muttertier infizieren (Baneux und Pognan 2003; Ozkan et al. 2019). Des Weiteren wird eine Übertragung des Erregers durch Arthropoden (Nelson 1967; Ribeiro und Guimarães 1998) und Geschlechtsverkehr (Yost 1958; Kücken et al. 1990) diskutiert. Da auch bei Meerschweinchen Infektionen mit *E. cuniculi* nachgewiesen wurden (Chalupský et al. 1979; Gannon 1980; Boot et al. 1988; Wilczyńska et al. 2023), können Kaninchen und Meerschweinchen bei einer gemeinsamen Haltungsform eine gegenseitige potenzielle Infektionsquelle darstellen.

Karnivore infizieren sich hauptsächlich oral über den Verzehr von infizierten Beutetieren (Barker 1974).

1.7. Klinische Symptomatik beim Kaninchen

Häufig verlaufen Infektionen mit *E. cuniculi* asymptomatisch. Durch Stressoren (wie zum Beispiel Änderungen der Haltungsbedingungen) und Immunsuppression kann es allerdings zum Auftreten klinischer Symptomatik bis hin zu letalen Krankheitsverläufen kommen (Meyer-Breckwoldt 1996; Leng et al. 1999; Jeklova et al. 2010a).

Die Klinik der Encephalitozoonose beim Kaninchen lässt sich grundsätzlich in drei verschiedene Symptomkomplexe, entsprechend den Hauptprädiaktionsorganen des Erregers, einteilen: Anzeichen einer Erkrankung des zentralen Nervensystems, Anzeichen einer Nierenerkrankung und Anzeichen einer Augenerkrankung. Auch eine Kombination der genannten Krankheitsformen ist möglich (Ewringmann und

Göbel 1999; Künzel et al. 2008). Manche Autoren erwähnen zusätzlich anderweitige Symptome wie beispielsweise Veränderungen des Haarkleids, Wachstumshemmung, Parametritiden (Yost 1958) oder wiederholt auftretende Aborte (Morsy et al. 2020).

1.7.1. Zentrales Nervensystem

Die neurologische Symptomatik stellt das am häufigsten auftretende klinische Erscheinungsbild der Encephalitozoonose beim Kaninchen dar.

Meist zeigen die Tiere dabei plötzlich einsetzende Symptome einer vestibulären Dysfunktion. Hierzu zählen: Kopfschiefhaltung, Ataxie, Nystagmus, Kreisbewegungen und Rotationen um die Längsachse (Meyer-Breckwoldt 1996; Ewringmann und Göbel 1999; Harcourt-Brown und Holloway 2003; Künzel et al. 2008).

Bei den Untersuchungen von Ewringmann und Göbel (1999) zeigten die Tiere am häufigsten eine Ataxie, gefolgt von Kopfschiefhaltung und Nystagmus. Seltener traten verzögerte Pupillarreflexe, Paresen und Krampfanfälle auf. Bei den Untersuchungen von Meyer-Breckwoldt (1996) sowie Harcourt-Brown und Holloway (2003) zeigte sich als Hauptsymptom eine Kopfschiefhaltung. Im weiteren Krankheitsverlauf konnten bei einigen Tieren anfallsartige Rotationen um die Längsachse, welche vor allem durch Berührung oder Erschütterung provoziert werden konnten, sowie ein deutlicher Nystagmus beobachtet werden. Die Futter- und Wasseraufnahme erfolgt auch bei Tieren mit ausgeprägter Kopfschiefhaltung selbstständig (Meyer-Breckwoldt 1996).

Als weitere neurologische Symptome können Krampfanfälle (bis hin zu tonisch-klonischen Krämpfen, teils mit Opisthotonus), Paresen und Paralysen, Kopfzittern, Schwanken und Nicken mit dem Kopf in Ruhe beobachtet werden. Teilweise treten auch Verhaltensänderungen wie Aggressionen, Springen oder Rennen gegen Käfiggitter oder Wände sowie Automutilationen (Beißen in Beine und Rücken) auf (Ewringmann und Göbel 1999; Harcourt-Brown und Holloway 2003; Künzel et al. 2008).

1.7.2. Nieren

Im Rahmen einer Infektion mit *E. cuniculi* kommt es oftmals zu einer Nierenschädigung und einer daraus resultierenden chronischen Niereninsuffizienz.

Die auftretenden Symptome sind dabei meist unspezifisch und äußern sich durch Apathie, Anorexie, Exsikkose, Polydypsie, Polyurie, Harninkontinenz, Hautirritationen durch frequentierten Harnabsatz und Gewichtsverlust (Ewringmann und Göbel 1999; Harcourt-Brown und Holloway 2003; Künzel et al. 2008). Bei den Untersuchungen von Ewringmann und Göbel (1999) konnten bei einzelnen Tieren röntgenologisch Mineralisationsstörungen des Skeletts, bedingt durch eine sekundäre renale Osteodystrophie, festgestellt werden, welche teilweise pathologische Frakturen nach sich zogen.

1.7.3. Augen

Meist treten Veränderungen an den Augen unilateral, in seltenen Fällen aber auch bilateral auf (Ewringmann und Göbel 1999; Harcourt-Brown und Holloway 2003; Künzel et al. 2008; Csokai et al. 2009a; Morsy et al. 2020).

Das charakteristische klinische Bild einer Augenmanifestation stellt die phakoklastische Uveitis dar, welche vom Tierbesitzer häufig über das Auftauchen einer "weißen Masse" im Auge bemerkt wird (Ewringmann und Göbel 1999; Felchle und Sigler 2002; Giordano et al. 2005). Diese entsteht durch eine Ruptur der Linsenkapsel, wodurch es zu einem Austritt von Linsenprotein kommt. Zudem kann bei den betroffenen Tieren dabei eine ausgeprägte Iritis mit Gefäßinjektion festgestellt werden (Ewringmann und Göbel 1999). Die phakoklastische Uveitis tritt häufig bei jüngeren Tieren auf (Giordano et al. 2005; Künzel et al. 2008). Meist zeigen die betroffenen Kaninchen keine weiteren klinischen Auffälligkeiten (Ewringmann und Göbel 1999; Felchle und Sigler 2002; Giordano et al. 2005; Künzel et al. 2008). Neben Uveitiden werden Katarakte als häufigste Veränderungen beschrieben (Harcourt-Brown und Holloway 2003; Giordano et al. 2005; Künzel et al. 2008; Morsy et al. 2020). Harcourt-Brown und Holloway (2003) ergänzen hierzu außerdem das Hypopyon.

Als weitere mögliche Befunde bei der ophthalmologischen Untersuchung können konjunktivale und episklerale Hyperämien, Anisokorie mit Miosis, Konjunktivitis, Keratokonjunktivitis mit Korneaödem, Korneaulzera sowie Synechien auftreten (Ewringmann und Göbel 1999; Felchle und Sigler 2002; Giordano et al. 2005). Der Pupillenlichtreflex kann beeinträchtigt sein (Felchle und Sigler 2002). Bei einzelnen Tieren wird von einem vollständigen Visusverlust berichtet (Ewringmann und Göbel 1999).

1.8. Diagnostik

Die sichere Diagnose einer Encephalitozoonose, insbesondere ante mortem, erweist sich als äußerst schwierig. In der Regel wird für die Diagnosefindung eine Kombination aus Serologie, klinischen, neurologischen und ophthalmologischen Untersuchungen sowie der Ausschluss möglicher Differenzialdiagnosen genutzt (Künzel und Joachim 2010).

1.8.1. Direkte Nachweisverfahren

Mit direkten Nachweisverfahren lässt sich der Erreger, besonders post mortem, in Geweben, Körperflüssigkeiten oder nach Anzucht in Kulturen detektieren.

1.8.1.1. Mikroskopischer Nachweis

Der mikroskopische Erregernachweis kann mittels Licht-, Fluoreszenz- oder Elektronenmikroskop erfolgen. Dabei werden Sporen, Sporoblasten oder Pseudozysten zumeist in Organmaterial (Morsy et al. 2020), Körperflüssigkeiten oder Kot (Rodríguez-Tovar et al. 2016) beobachtet. Es gilt allerdings zu bedenken, dass auch bei serologisch positiven Kaninchen mit histologischen Veränderungen in Gehirn und Nieren teilweise keine Sporen vorzufinden sind (Cox und Gallichio 1977; Shaddock et al. 1979; Eröksüz et al. 1999; Csokai et al. 2009a; Leipzig et al. 2013). Andererseits können Sporen auch ohne das Vorhandensein einer Entzündungsreaktion in Organen festgestellt werden (Cox und Gallichio 1977; Eröksüz et al. 1999; Csokai et al. 2009a; Leipzig et al. 2013; Morsy et al. 2020).

Lichtmikroskopisch kann der Erreger mit Hilfe spezieller Färbetechniken dargestellt werden. Die Detektion von Sporen unter Einsatz von Routinefärbungen wie Hämatoxylin-Eosin gestaltet sich, vor allem wenn Gewebeschädigungen oder Entzündungsreaktionen vorliegen, schwierig. Leicht kann es außerdem zu einer Verwechslung mit anderen Mikroorganismen wie Bakterien, Protozoen oder Pilzen kommen (Rodríguez-Tovar et al. 2017).

Zu den am häufigsten verwendeten speziellen Färbetechniken gehört die modifizierte Trichrom-Färbung nach Weber. Bei dieser Färbetechnik werden die Sporen mit dem Farbstoff Chromotrop R2 angefärbt, der diese rosarot erscheinen lässt, während sich Bakterien blassgrün färben (Weber et al. 1992).

Rodríguez-Tovar et al. (2017) verglichen in einer aktuellen Studie 14 verschiedene Spezialfärbungen miteinander: Alzianblau, Calcofluor-white, Giemsa, Gram,

Grocott, Hämatoxylin-Eosin, Luna, Luxol-Fast-Blue, Masson Trichrom, modifizierte Trichromfärbung, periodic acid-Schiff, van Gieson, Warthin-Starry und Ziehl-Neelsen. Laut den Autoren eignen sich für die Untersuchung mit dem Lichtmikroskop die modifizierte Trichromfärbung und Gramfärbung, für die Untersuchung mittels Ultraviolett-mikroskopie die Calcofluor-white-Färbung am besten für den Nachweis von *E. cuniculi*-Sporen im Gewebe (Rodríguez-Tovar et al. 2017).

Für den direkten Erregernachweis mittels Fluoreszenzmikroskop wird Fluoreszeinisothiocyanat-markiertes Anti-*E. cuniculi*-Immunglobulin, das an das entsprechende Antigen bindet, verwendet. Sporen stellen sich unter dem Fluoreszenzmikroskop leuchtend gelb-grün dar (Cox und Pye 1975).

Bis heute gilt, vor allem in der Humanmedizin, der Nachweis von Mikrosporidien mit dem Elektronenmikroskop aus Gewebe oder Körperflüssigkeiten als Goldstandard (Weber et al. 1999; Han et al. 2021).

Für den Nachweis aus Gewebe werden die zuvor entsprechend aufbereiteten Proben in einen speziellen Kunststoff eingebettet. Aus den Kunststoffblöcken können anschließend mit einem Mikrotom Ultradünnschnitte angefertigt werden, welche auf einen Objektträger aufgebracht und mit dem Elektronenmikroskop untersucht werden (Hamilton und Cox 1981).

Mit dem Elektronenmikroskop lassen sich Ultrafeinstrukturen beurteilen, wodurch eine Differenzierung von Mikrosporidienspezies möglich ist. Eine Artenunterscheidung von *E. cuniculi* und *E. hellem* ist allerdings nicht möglich (Didier et al. 1991b). Zudem ist dieses Verfahren zeitaufwendig, kostspielig und erfordert viel Erfahrung (Didier et al. 1995a).

1.8.1.2. Kultureller Nachweis

Erstmals wurde 1960 über eine Vermehrung von *E. cuniculi* in inkubierten Hühnereiern berichtet (Iino 1960). Wenige Jahre später konnte der Erreger erfolgreich in Chorioid-Plexus-Zellen von Kaninchen vermehrt werden (Shaddock 1969).

Mittlerweile liegen in der Literatur diverse Nachweise über die Anzucht in unterschiedlichen Zellkulturen vor, darunter Embryozellen von Mäusen (Bismanis 1970) und Hunden (Cox und Pye 1975), Choroid-Plexus-Zellen von Kaninchen

(Shaddock 1969; Vávra et al. 1972) und Schafen (Mohn und Ødegaard 1977), Lungenzellen von Katzen (Waller 1975), Nierenzellen von Kaninchen (Montrey et al. 1973; Waller 1975; Hamilton und Cox 1981), Hunden, Rindern (Waller 1975), Hamstern (Montrey et al. 1973) und Affen (De Groote et al. 1995; Mohindra et al. 2002), Gliazellen von Kaninchen, Mäusen und Hamstern (Montrey et al. 1973) sowie menschliche Fibroblasten (Desser et al. 1992; Mathis et al. 1997).

1.8.1.3. Polymerasekettenreaktion

Mit diesem Verfahren können ausgewählte DNA-Sequenzen gezielt vervielfältigt werden. Der Ablauf besteht grundsätzlich aus 3 Schritten: der Denaturierung, der Primerhybridisierung und der Elongation.

Bevor diese Schritte durchgeführt werden können, muss die zu amplifizierende DNA aus dem vorliegenden Probenmaterial, beispielweise mit Hilfe einer speziellen DNA-bindenden Silikamembran (z. B. QIAmp DNA Mini Kit™), isoliert werden.

Dann wird bei der eigentlichen Polymerasekettenreaktion der als Matrize vorliegende DNA-Doppelstrang durch Erhitzung denaturiert und dadurch in Einzelstränge aufgetrennt. Anschließend folgt die Primerhybridisierung, auch als Annealing bezeichnet, bei der sich spezifische Primer an die 3' Enden der komplementären DNA-Einzelstränge anlagern. Bei der nachfolgenden Elongation werden durch DNA-Polymerase (meist die sog. Taq-Polymerase) komplementäre Nukleotide angefügt, um so wiederum DNA-Doppelstränge zu erhalten. Anschließend werden diese Doppelstränge durch erneutes Erhitzen wieder in Einzelstränge zerlegt und es folgt somit ein erneuter Reaktionszyklus. Durch die Wiederholung dieser Zyklen werden die Matrizen und somit die Ziel-DNA im Optimalfall mit jedem Zyklus verdoppelt.

Die amplifizierten Produkte der Polymerasekettenreaktion können schließlich auf Agarosegel aufgetragen und mittels Elektrophorese aufgetrennt werden. Sichtbar gemacht werden können sie dabei beispielsweise durch Ethidiumpromid, wodurch sie im UV-Licht fluoreszieren.

Mit der Polymerasekettenreaktion können auch kleinste Mengen an DNA amplifiziert und erfasst werden. Je nach verwendetem Protokoll können die Erregerspezies differenziert sowie die Subtypen von *E. cuniculi* identifiziert werden

(Vossbrinck et al. 1993; Didier et al. 1995b).

Neben der konventionellen PCR werden für eine bessere Sensitivität vor allem nested- oder real-time PCRs für die Detektion von *E. cuniculi* eingesetzt (Csokai et al. 2009b; Leipzig et al. 2013).

1.8.1.3.1. Linse

Linsenmaterial eignet sich wegen des meist sehr hohen Erregergehaltes sehr gut, um *E. cuniculi* mittels konventioneller PCR als auslösendes Agens einer phakoklastischen Uveitis zu detektieren (Künzel et al. 2008; Csokai et al. 2009b).

1.8.1.3.2. Urin

Der PCR-Nachweis aus dem Urin ist aufgrund der intermittierenden Sporenausscheidung des Erregers nur im positiven Falle beweisend. Jass et al. (2006) konnten lediglich bei 39,5 % der Tiere, welche eine neurologische Form der Encephalitozoonose aufwiesen, Erreger-DNA im Urin feststellen. Csokai et al. (2009b) konnten nur bei 29,5 % serokonvertierter Kaninchen oder Kaninchen mit bestätigter Infektion durch Sporennachweis Erreger-DNA im Urin nachweisen. Künzel et al. (2008) konnten den Erreger in keiner von 32 Urinproben ausmachen. Es gilt generell zu bedenken, dass die Sporen erst ca. 5 Wochen nach der Infektion über den Urin ausgeschieden werden (Cox et al. 1979; Jeklova et al. 2010a). Da Kaninchen sowohl mit als auch ohne klinische Symptomatik Sporen ausscheiden, ist der Nachweis außerdem nicht beweisend für eine klinische Manifestation (Csokai et al. 2009b).

1.8.1.3.3. Kot

Aus den Faeces von Kaninchen konnte *E. cuniculi* bereits erfolgreich mittels PCR nachgewiesen werden (Valencakova et al. 2008; Kimura et al. 2013; Askari et al. 2015; Deng et al. 2020).

1.8.1.3.4. Liquor

Der Erregernachweis aus Liquor mittels PCR hat sich als ungeeignet für die Diagnostik von *E. cuniculi* herausgestellt (Jass et al. 2006; Künzel et al. 2008; Csokai et al. 2009b; Jeklova et al. 2010a; Jeklova et al. 2020). Csokai et al. (2009b) konnten in ihrer Studie bei keiner von 25 Liquorproben serokonvertierter Kaninchen oder Kaninchen mit bestätigter Infektion durch Sporennachweis

positive Testergebnisse verbuchen. Damit übereinstimmend gelangen auch Künzel et al. (2008) bei der Untersuchung von 12 Liquorproben, Jeklova et al. (2010a) bei der Untersuchung von 14 Liquorproben sowie nachfolgend weiteren 5 Liquorproben (Jeklova et al. 2020) mittels PCR kein Erregernachweis. Jass et al. (2006) konnten lediglich bei 2 von 19 Liquorproben positive Ergebnisse verzeichnen, obwohl 11 dieser 19 Kaninchen histopathologische Anzeichen einer Encephalitozoonose aufwiesen.

1.8.1.3.5. Organmaterial

Für den Nachweis mittels PCR post mortem aus Organmaterial werden vor allem das Gehirn und die Nieren, die Hauptzielorgane des Erregers (Cox et al. 1979), verwendet. Nach den Untersuchungen von Csokai et al. (2009b) gelingt der Nachweis von Erreger-DNA möglicherweise aufgrund der höheren Sporenkonzentration aus dem Gehirn häufiger als aus den Nieren.

Aus anderem Organmaterial (Herz, Lunge, Leber, Milz) gelingt der Nachweis hingegen deutlich seltener (Csokai et al. 2009b). Eine Biopsie der Nieren mittels Laparoskopie könnte eine mögliche Option zur Untersuchung von Organmaterial ante mortem bieten (Keeble 2011), allerdings wird dies bisher nicht im Rahmen der gängigen Diagnostik durchgeführt.

In einer Studie von Leipzig et al. (2013) zeigte sich die real-time PCR aus Organmaterial im Vergleich zu Immunohistochemie und Histologie überlegen.

Csokai et al. (2009b) konnten mittels einer nested-PCR aus Organmaterial gute Ergebnisse, besonders bei chronischen Infektionen, erzielen, wobei sich bei ihren Untersuchungen die histologische Untersuchung in Kombination mit Spezialfärbung als die sensitivste Methode für den Erregernachweis post mortem erwies. Falsch-negative PCR-Ergebnisse aus Organmaterial könnten aufgrund einer sehr geringen Sporenkonzentration und/oder einer ungleichmäßigen Verteilung im zu untersuchenden Gewebe auftreten. Ein weiterer Grund könnte eine sich noch in der Frühphase befindliche Infektion darstellen (Csokai et al. 2009b).

1.8.2. Indirekte Nachweisverfahren

Indirekte Nachweisverfahren werden hauptsächlich für die Diagnostik ante mortem eingesetzt.

1.8.2.1. Serologischer Nachweis

Der serologische Nachweis von Antikörpern kann mittels Immunfluoreszenzantikörpertest (IFAT), Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA), Carbon Immunoassay (CIA), Immunoperoxidasetest (IP), Komplementbindungsreaktion (KBR) oder Western Blot (WB) erfolgen.

Aktuell werden der IFAT und der ELISA, welche gut miteinander korrelieren, am häufigsten als serologische Testverfahren angewendet (Boot et al. 2000).

Vereinzelte kommt es vor, dass Kaninchen serologisch negativ getestet werden, obwohl histologisch dennoch Sporen von *E. cuniculi* vorzufinden sind (Csokai et al. 2009b; Hein et al. 2014). Ursachen könnten eine für eine Serokonversion zu geringe Aufnahme an Sporen, eine noch nicht begonnene Antikörperproduktion (Csokai et al. 2009b) oder immunsuppressive Effekte anderweitiger Erkrankungen, welche eine Antikörperproduktion verhindern, sein (Csokai et al. 2009b; Hein et al. 2014). Auch eine Bindung aller Antikörper durch den Erreger könnte eine Rolle spielen (Hein et al. 2014).

1.8.2.1.1. Immunfluoreszenzantikörpertest

1971 wurde der IFAT von Chalupsky et al. zum indirekten Nachweis von *E. cuniculi*-Antikörpern entwickelt (Chalupsky et al. 1971). Antikörper des Typs IgG und IgM können mittels IFAT detektiert werden.

Für die Durchführung werden Objektträger (in der Regel spezielle Objektträger mit Vertiefungen als Reaktionsfelder) mit Sporen von *E. cuniculi* beschichtet. Die Sporen trocknen an den Objektträger an und werden fixiert. Anschließend werden die zu testenden serologischen Proben in unterschiedlichen Verdünnungsstufen auf die Vertiefungen des Objektträgers bzw. die Sporen aufgetragen und inkubiert. Antikörper der zu testenden Probe binden dabei an das Antigen (die Sporen des Erregers). Nicht gebundene Antikörper werden bei einem nachfolgenden Waschschrift entfernt. Im nächsten Schritt werden fluoreszinmarkierte, sekundäre Antikörper hinzugegeben, welche an die Antigen-Antikörperkomplexe binden. Die Beurteilung erfolgt nach einem weiteren Waschschrift mittels Fluoreszenzmikroskop. Im positiven Fall stellen sich die Sporen gelb-grün fluoreszierend dar. Die höchste noch als positiv zu bewertende Verdünnungsstufe wird als Ergebnis (Titer) aufgeführt (Chalupský et al. 1973; Cox und Pye 1975).

Der IFAT gilt als ein zuverlässiges und einfach durchführbares Testverfahren mit einer hohen Sensitivität (Cox und Pye 1975; Cox und Gallichio 1977; Hein et al. 2014) und Spezifität (Künzel et al. 2014; Cray et al. 2020).

1.8.2.1.2. Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Mittels ELISA können *E. cuniculi*-Antikörper des Typs IgG und IgM nachgewiesen werden.

1981 entwickelten Cox et al. (1981) einen ELISA zur Detektion von Antikörpern des Typs IgG gegen *E. cuniculi*. Als vorteilhaft beschreiben die Autoren dabei besonders die einfache Praktikabilität, da kein spezielles Equipment oder Mikroskop dafür notwendig ist. Im Vergleich mit einem indirekten Immunfluoreszenztest konnte außerdem eine höhere Sensitivität des Testverfahrens festgestellt werden; die letztendlichen Ergebnisse beider Verfahren glichen sich jedoch (Cox et al. 1981).

Für die Durchführung des Testverfahrens werden Lochplatten verwendet, an deren Oberfläche der Vertiefungen erregerspezifische Antigene gebunden sind. Verschiedene Verdünnungsstufen des zu untersuchenden Serums werden in die Vertiefungen der Platte pipettiert und inkubiert. Bei einem nachfolgenden Waschschrift wird das Serum mit den nicht gebundenen Antikörpern entfernt. Anschließend werden sekundäre Antikörper, welche z. B. mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase markiert sind, hinzugegeben und inkubiert. Durch einen weiteren Waschschrift werden ungebundene sekundäre Antikörper entfernt. Nach der Zugabe eines Enzymsubstrats führt das gebundene Enzym bei positiven Proben zu einem Farbumschlag, dessen Intensität proportional zur gebundenen Antikörpermenge ist. Die Intensität des Farbumschlags kann mit Hilfe eines Spektrophotometers gemessen werden (Cox et al. 1981).

1.8.2.1.3. Carbon Immunoassay

Der Carbon Immunoassay wird auch als Tusche-Test oder India-Ink-Immunoreaktion bezeichnet. Erstmals wurde solch ein Testverfahren 1971 zum Nachweis von humanen Enterobacteriaceae konzipiert (Geck 1971) und anschließend 1977 von Waller zum Nachweis von Antikörpern gegen *E. cuniculi* entsprechend abgewandelt (Waller 1977).

Das Testprinzip basiert darauf, dass eine Schwarztusche an IgG bindet und dieses

somit sichtbar macht. Für die Durchführung wird ein Ausstrich einer Antigensuspension angefertigt, getrocknet und fixiert. Danach wird je ein Tropfen Schwarztusche sowie verdünntes Serum aufgetragen. Der Ausstrich wird anschließend für 5 Minuten in eine feuchte Kammer gegeben. Nachfolgend wird die überschüssige Tusche bei einem Waschschrift entfernt.

Die Auswertung erfolgt mit Hilfe eines Lichtmikroskops. Bei einem positiven Nachweis zeigt sich eine Schwarzfärbung durch Anlagerung von Kohlenstoffpartikeln der Tusche, welche die Antikörper umgeben (Waller 1977).

Kellett und Bywater (1978) modifizierten dieses Testverfahren dahingehend, dass sie alle genannten Komponenten (Antigensuspension, Tusche, Antikörpersuspension) direkt im feuchten Zustand miteinander vermengten und nach kurzer Reaktionszeit, ohne Benötigung einer feuchten Kammer, auswerteten.

Das Testverfahren ist schnell und unkompliziert, außerdem korreliert es sehr gut mit dem IFAT (Waller 1977; Boot et al. 2000; Hein et al. 2014) und ELISA (Dipineto et al. 2008). Allerdings werden lediglich Antikörper des Typs IgG nachgewiesen (Waller 1977).

1.8.2.1.4. Immunoperoxidasetest

Der Immunoperoxidasetest wurde von Gannon im Jahre 1978 entwickelt. Das Testprinzip gleicht dem des IFAT. Anstelle fluoreszierender Antikörper wird Anti-Kaninchen-IgG, konjugiert an Meerrettich-Peroxidase für den Nachweis verwendet, welches nach Zugabe von Wasserstoffperoxid als Substrat im positiven Fall zu einem Farbumschlag führt. Für die Auswertung wird lediglich ein Lichtmikroskop benötigt. Im positiven Fall färben sich die Sporen dunkelbraun. Das Testverfahren wird als sensitiv und vergleichbar mit dem IFAT beschrieben, jedoch gilt die Spezifität der Sporenfärbung als nicht hoch (Gannon 1978).

1.8.2.1.5. Komplementbindungsreaktion

Wosu et al. (1977) schildern die Komplementbindungsreaktion als einfache und zuverlässige Nachweismethode für *E. cuniculi*. Bei der Durchführung werden Sporen des Erregers mit unterschiedlichen Verdünnungsstufen der zu testenden Serumproben gemeinsam mit Komplement inkubiert. Bilden sich hierbei Antigen-Antikörper-Komplexe, wird das beigefügte Komplement verbraucht. In einem nächsten Schritt werden Schaf-Erythrozyten sowie gegen diese gerichtete

Antikörper hinzugegeben.

Sind im zu testenden Serum keine Antikörper gegen *E. cuniculi* enthalten, kommt es nicht zur Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen. Folglich steht in diesem Fall ausreichend Komplement für die Hämolyse der Schaf-Erythrozyten zur Verfügung. Sind in der Serumprobe Antikörper gegen *E. cuniculi* enthalten, erfolgt die Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen, wodurch die Hämolyse der Schaf-Erythrozyten in diesem Fall ausbleibt (Wosu et al. 1977).

1.8.2.1.6. Western Blot

Für die Durchführung des Western Blot werden *E. cuniculi*-Proteine auf einem Polyacrylamidgel mit Hilfe von Gel-Elektrophorese in Proteinbanden aufgetrennt. Dann werden diese Banden elektrophoretisch mittels eines Blottingsystems auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Unspezifische Bindungsstellen werden blockiert. Anschließend folgt eine Inkubation mit den zu testenden Proben. Die Nitrozellulosemembran wird nach einem Waschschriff entweder mit Meerrettichperoxidase-konjugiertem Anti-Kaninchen-IgG oder -IgM inkubiert. Nach einem weiteren Waschschriff können positive Banden durch Zugabe von Peroxidase-Substrat identifiziert werden. Besonders aufgrund des hohen Arbeits- und Zeitaufwandes ist dieses Verfahren derzeit anderen Techniken für die alltägliche Diagnostik unterlegen, allerdings liefert es einen wichtigen Ansatz, die humorale Reaktion im Laufe einer Infektion genauer zu untersuchen (Desoubeaux et al. 2017).

1.8.2.1.7. Intrakutantest

Der Intrakutantest für den Nachweis von *E. cuniculi* wurde 1972 von Pakes et al. entwickelt. Das Testprinzip basiert auf einer allergischen Reaktion vom Spättyp (Typ IV), welche durch intrakutane Applikation von *E. cuniculi*-Sporen ausgelöst wird (Pakes et al. 1972). Bei einem positiven Nachweis kommt es innerhalb von 3 Tagen zu einer Hyperämie und Verdickung im Bereich der Injektionsstelle (Waller 1977). Heutzutage wird dieses Testverfahren nicht mehr für die routinemäßige Diagnostik verwendet.

1.8.2.1.8. Nachweis aus Liquor

Aus dem Liquor lassen sich nicht nur die Sporen von *E. cuniculi* mittels PCR oder Antikörper mittels der beschriebenen serologischen Verfahren nachweisen, sondern

es lassen sich auch die Zellzahl, die Zelldifferenzierung sowie der Proteingehalt bestimmen. Diese Parameter können auf eine Infektion mit *E. cuniculi* hinweisen. Die Entnahme des Liquors erfolgt unter Vollnarkose. Die Zisterna magna wird dafür bei den auf der Seite liegenden Kaninchen, deren Kopf im 90 Grad Winkel zur Wirbelsäule gebeugt wird, punktiert. Eine erhöhte Leukozytenzahl und ein erhöhter Proteingehalt können im Vergleich zu gesunden Individuen festgestellt werden. Auch eine lymphomonozytäre Pleozytose kann vorliegen. Alle diese dargestellten Veränderungen sind nicht spezifisch, da auch eine virale, protozoische oder immunvermittelte Enzephalitis zu ähnlichen Veränderungen im Liquor führen könnte (Jass et al. 2008).

1.9. Therapie

Eine vollständige Eradikation von *E. cuniculi* ist nach heutigem Forschungsstand nicht möglich. Viele unterschiedliche Arzneimittel wurden bereits hinsichtlich ihrer in-vitro-Wirksamkeit gegen den Erreger erprobt.

Waller (1979) testete verschiedene Antibiotika auf ihre Wirksamkeit, wobei keines der Antibiotika das Wachstum von *E. cuniculi* vollständig hemmen konnte. Den noch am größten inhibitorischen Effekt zeigte Chloroquine, gefolgt von Oxytetracyclin, Spiramycin, Dimetridazol, Sulfadoxin + Trimethoprim, Chloramphenicol und Sulfonamid.

Beauvais et al. (1994) konnten bei ihren Untersuchungen eine Wachstumshemmung des Erregers von über 90 % bei der Anwendung von Albendazol, Fumagilin, 5-Fluorouracil und Sparfloxacin erzielen. Chloroquine, Pefloxycin, Azithromycin und Rifabutin zeigten zumindest in hohen Konzentrationen eine gewisse Wirkung.

Franssen et al. (1995) konnten mit Fumagillin, Thiabendazol, Albendazol, Oxibendazol und Propamidinisetionat eine Hemmung der Sporenbildung erreichen.

Sobottka et al. (2002) konnten die Anzahl an parasitären Herden unter Einsatz der Chitin-Synthase-Inhibitoren Polyoxin D und Nikkomycin Z signifikant mindern.

Der Vergleich der Studien wird durch die unterschiedlichen Studiendesigns erschwert. Da eine vollständige Erregereliminierung bislang nicht möglich ist, sollte die Therapie auf eine Verringerung der Sporenbildung und -vermehrung

sowie auf die Verminderung von sporenbedingten Entzündungsreaktionen abzielen. Gleichzeitig sollten Begleiterkrankungen und schwere neurologische Symptome behandelt werden (Latney et al. 2014).

Albendazol wurde im Rahmen der AIDS Pandemie als wirksames Medikament bei Infektionen mit Mikrosporidien bei Menschen eingesetzt (De Groote et al. 1995) und entsprechend auch bei Kaninchen angewandt. Allerdings wurde schließlich festgestellt, dass Albendazol eine embryotoxische sowie teratogene Wirkung bei Kaninchen und Ratten entfalten kann (Kotler und Orenstein 1999). Daher wird seitdem auf ein anderes Benzimidazol, Fenbendazol, zurückgegriffen, welches laut den Untersuchungen von Suter et al. (2001) mit einer täglich einmaligen oralen Verabreichung von 20 mg/kg Körpermasse über einen Zeitraum von 4 Wochen gute Wirksamkeit hinsichtlich der Vorbeugung und Behandlung von Infektionen mit *E. cuniculi* bei Kaninchen zeigt.

Sieg et al. (2012) konnten bei ihren Untersuchungen bezüglich des Einsatzes von Fenbendazol eine erhöhte Überlebensquote an Tag 10 der Behandlung, eine Besserung der neurologischen Symptome und einen signifikanten Effekt auf das Langzeitüberleben feststellen. Abu-Akkada und Oda (2016) konnten keinen signifikanten therapeutischen Effekt im Hinblick auf die klinische Symptomatik unter der Anwendung von Fenbendazol verzeichnen, dafür aber einen gewissen präventiven Schutz vor einer experimentellen Infektion mit *E. cuniculi*.

Bei den meisten in der Literatur beschriebenen Therapieprotokollen werden ein Benzimidazol, ein Antibiotikum und ein Glukokortikoid kombiniert (Harcourt-Brown und Holloway 2003; Künzel et al. 2008; Sieg et al. 2012). Teilweise werden zudem unterstützende Maßnahmen, wie beispielsweise eine Infusionstherapie oder Vitaminsubstitution, entsprechend der vorherrschenden klinischen Symptomatik, vorgenommen (Ewringmann und Göbel 1999; Harcourt-Brown und Holloway 2003; Künzel et al. 2008; Sieg et al. 2012). Harcourt-Brown und Holloway (2003) beschreiben bei Fällen mit schweren vestibulären Symptomen außerdem den Einsatz von Prochlorperazin und Midazolam.

Bei einer Augenmanifestation werden die Therapieprotokolle durch eine lokale Behandlung mit antibiotika- und glukokortikoidhaltigen Augenpräparaten (sowie teilweise einer vorherigen chirurgischen Intervention) ergänzt (Ewringmann und Göbel 1999; Harcourt-Brown und Holloway 2003; Künzel et al. 2008).

Künzel et al. (2008) überprüften in ihren Untersuchungen die therapeutische Wirksamkeit einer Kombination aus Fenbendazol, Oxytetracyclin oder Enrofloxacin (bei Kaninchen mit Nierenversagen) und Dexamethason oder Prednison. 54,2 % der Kaninchen, welche eine neurologische Symptomatik aufzeigten, konnten unter Anwendung dieser Therapie erfolgreich behandelt werden. Allerdings mussten fast alle Kaninchen, welche unter Nierenversagen litten, euthanasiert werden, oder sie verstarben von selbst. Alle Kaninchen mit einer Augenmanifestation überlebten (Künzel et al. 2008).

Sieg et al. (2012) konnten bei ihrer Studie keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der kurzfristigen oder langfristigen Überlebenszeit sowie der Verringerung von neurologischen Symptomen unter der Anwendung von Dexamethason verzeichnen. Zudem besteht bei der Anwendung von Glukokortikoiden die Gefahr einer steroid-induzierten Immunsuppression, welche eine klinische Manifestation begünstigen kann (Jeklova et al. 2010a). Aufgrund der aktuellen Forschungslage wird der Einsatz von Glukokortikoiden nicht mehr empfohlen. Latney et al. (2014) schlagen anstelle von Glukokortikoiden den Einsatz von NSAIDs (nonsteroidal antiinflammatory drugs) als entzündungshemmende Komponente einer Therapie vor. Klinische Studien hierzu fehlen bislang.

Äußert sich eine Infektion mit *E. cuniculi* in einer okulären Form, kann neben einer systemischen und lokalen medikamentösen Therapie eine Phakoemulsifikation (Felchle und Sigler 2002) oder Enukleation (Wolfer et al. 1993) notwendig sein.

1.10. *E. cuniculi* bei Wildkaninchen

Weltweit gibt es zahlreiche Studien, die die Prävalenz von *E. cuniculi* bei domestizierten Kaninchen untersucht haben (Magalhães et al. 2022). Bei Hauskaninchen in Deutschland wurden hierbei Prävalenzen zwischen 41-45 % ermittelt (Neuwirt 1988; Meyer-Breckwoldt 1996; Ewringmann und Göbel 1999; Hein et al. 2014). Bei Wildkaninchen wurden im Vergleich deutlich weniger Studien durchgeführt (Tabelle 3, Tabelle 4).

Tabelle 3: Prävalenzen von *E. cuniculi* bei wildlebenden Kaninchen basierend auf serologischen Untersuchungsverfahren

(CIA: Carbon Immunoassay, IFAT: Immunfluoreszenzantikörpertest, ELISA: Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

| Land | Art | Test | Stichproben | positiv | | Autor (Jahr) |
|-------------|---------------|-------|-------------|---------|------|-------------------------|
| | | | | N | % | |
| UK | Wildkaninchen | CIA | 3 | 3 | 100 | Wilson (1979a) |
| Australien | Wildkaninchen | IFAT | 823 | 0 | 0 | Cox et al. (1980) |
| Neuseeland | Wildkaninchen | IFAT | 57 | 0 | 0 | Cox et al. (1980) |
| UK | Wildkaninchen | IFAT | 175* | 0 | 0 | Cox und Ross (1980) |
| Deutschland | Wildkaninchen | IFAT | 155 | 28 | 18,1 | Neuwirt (1988) |
| Frankreich | Wildkaninchen | IFAT | 204 | 8 | 3,9 | Chalupský et al. (1990) |
| Deutschland | Wildkaninchen | CIA | 100 | 0 | 0 | Meyer-Breckwoldt (1996) |
| Australien | Wildkaninchen | IFAT | 81 | 20 | 24,7 | Thomas et al. (1997) |
| Slowakei | Wildkaninchen | ELISA | 47** | 21 | 44,7 | Balent et al. (2004) |
| UK | Wildkaninchen | ELISA | 27 | 0 | 0 | Blevins (2007) |
| UK | Wildkaninchen | IFAT | 60 | 0 | 0 | Bose et al. (2015) |

* 94 davon als Jungtier gefangen und 2-3 Monate in Gefangenschaft gehalten vor der Testung

** Wildkaninchen für die Wiederansiedlung

Tabelle 4: Prävalenzen von *E. cuniculi* bei wildlebenden Kaninchen basierend auf molekularbiologischen Untersuchungsverfahren (PCR)

(PCR: Polymerasekettenreaktion)

| Land | Art | Test | Stichproben | positiv | | Autor (Jahr) |
|---------|------------------------------------|------|-------------|---------|------|--------------------------------|
| | | | | N | % | |
| Italien | Östliches Baumwollschwanzkaninchen | PCR | 144 | 14 | 9,72 | Zanet et al. (2013) |
| Spanien | Wildkaninchen | PCR | 383 | 0 | 0 | Martínez-Padilla et al. (2020) |
| Spanien | Wildkaninchen | PCR | 50* | 2 | 4 | Baz-González et al. (2022) |
| Spanien | Wildkaninchen | PCR | 438 | 0 | 0 | (Rego et al. 2023) |

* 20 der Wildkaninchen stammen von landwirtschaftlichen Betrieben

Ergänzend konnten bei zwei Studien aus Spanien an 34 Wildkaninchen (Espinosa

et al. 2020) und aus England an 62 Wildkaninchen (Lamalle et al. 2023) mittels histologischer Untersuchungen bei keinem der Tiere *E. cuniculi*-Sporen in den untersuchten Geweben nachgewiesen werden. In der spanischen Studie wurden alle Organe der Wildkaninchen untersucht, in der englischen Studie nur die Nieren der Wildkaninchen. In beiden Studien wurden die Gewebeprobe mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt und unter einem Lichtmikroskop untersucht (Espinosa et al. 2020; Lamalle et al. 2023). Auch mit einer zusätzlichen Gram Färbung bei Gewebeschnitten mit pathologischen Auffälligkeiten gelang kein Sporennachweis (Lamalle et al. 2023).

Bei einem weiteren Vertreter der Ordnung der Hasenartigen, dem Feldhasen, konnten in Tschechien, Österreich, der Slowakei und der Türkei *E. cuniculi*-Antikörper nachgewiesen werden (Bártová et al. 2015; Özkan et al. 2021).

In Deutschland wurden Wildkaninchen in der Vergangenheit im Rahmen von zwei serologischen Studien auf *E. cuniculi* untersucht (Tabelle 3).

Bei der ersten Untersuchung aus dem Jahre 1988 wurden 155 Wildkaninchen, welche auf zwei Grundstücken im Norden Münchens aufgefunden wurden, auf *E. cuniculi* untersucht und es konnte serologisch eine Prävalenz von 18,1 % festgestellt werden (Neuwirt 1988). Bei einer späteren Untersuchung im Jahre 1996, bei der 100 Wildkaninchen von verschiedenen Orten im Norden Deutschlands (Hannover, Raum Wolfsburg, nördlich von Hamburg, Norderney) auf den Erreger untersucht wurden, konnte jedoch kein einziges Tier serologisch positiv getestet werden (Meyer-Breckwoldt 1996). Anhand dieses Ergebnisses kam der Autor zu der Ansicht, dass Wildkaninchen deutschlandweit keine Bedeutung hinsichtlich der Verbreitung von *E. cuniculi* zukommt. Gleichzeitig erwähnte dieser allerdings, dass die Ergebnisse der Untersuchung eventuell verfälscht sein könnten, da an einer Encephalitozoonose erkrankte Wildkaninchen möglicherweise verenden oder von Prädatoren erlegt werden, wodurch sie nicht unter die untersuchten Individuen gelangten (Meyer-Breckwoldt 1996).

PCR-Untersuchungen bei Wildkaninchen aus Deutschland fehlen bisher vollständig.

Meyer-Breckwoldt (1996) sowie Keeble und Shaw (2006) äußerten aufgrund der meist hohen Prävalenzen unter den Hauskaninchen die Vermutung, dass der Erreger

womöglich von Hauskaninchen auf Wildkaninchen übertragen wird. Grund für die im Vergleich zu Hauskaninchen niedrigeren Prävalenzen bei Wildkaninchen könnte auch eine geringere Populationsdichte darstellen, da hohe Prävalenzen im Zusammenhang mit Überbesatz und damit vermutlich höherem Infektionsdruck durch Urinkontamination bei domestizierten Kaninchen festgestellt werden konnten (Gannon 1980). Andere Forscher vermuteten im Gegensatz dazu, dass Wildkaninchen das natürliche Reservoir des Erregers sind, da *E. cuniculi* bei Wildkaninchen nachgewiesen wurde, bei denen ein Kontakt mit Hauskaninchen praktisch ausgeschlossen werden konnte (Chalupský et al. 1990).

1.11. Zoonotische Bedeutung

Laut einer Literaturübersicht gelten mindestens 17 Mikrosporidienarten als humanpathogen, darunter auch *E. cuniculi* (Stentiford et al. 2016).

Der Mensch kann sich mit allen der vier Genotypen von *E. cuniculi* infizieren (Mathis et al. 2005; Sokolova et al. 2011). Vermutlich bleiben jedoch viele Mikrosporidien-Infektionen unerkannt oder werden bei der Diagnostik nicht berücksichtigt (Didier und Weiss 2011).

Erstmals wurde 1959 ein Fall einer *E. cuniculi*-Infektion bei einem 9-jährigen, aus Japan stammenden Jungen, beschrieben (Matsubayashi et al. 1959). Eine genaue Encephalitozoon-Artenunterscheidung war zu dieser Zeit noch nicht möglich, weshalb der Fall aus heutiger Sicht nicht eindeutig auf *E. cuniculi* zurückzuführen ist (Mathis et al. 2005).

Besonders mit dem Aufkommen der AIDS-Pandemie erlangten Mikrosporidien erhöhte Aufmerksamkeit. So wurden Infektionen mit *E. cuniculi* vor allem bei HIV-infizierten, aber auch bei anderweitig vorerkrankten bzw. immunsupprimierten Menschen festgestellt (Mathis et al. 2005). Zu den Symptomen, welche bei Menschen im Zusammenhang mit einer *E. cuniculi*-Infektion auftreten können, zählen u. a. Durchfall, Bauchschmerzen, persistierender Husten, Hepatitis, Peritonitis, Leberversagen, Nierenversagen, disseminierte Erkrankungen mit Fieber, Endokarditis und viele weitere Krankheitserscheinungen (Han et al. 2021).

Diverse serologische Studien zeigen, dass Antikörper gegen *E. cuniculi* sowohl unter immunsupprimierten als auch immunkompetenten Menschen verbreitet sind (Singh et al. 1982; Hollister und Canning 1987; Morales et al. 1995; Pospíšilová et

al. 1997; Kučerová-Pospíšilová und Ditrich 1998; Halanova et al. 2003; Pan et al. 2015; Abu-Akkada et al. 2015). Die Vermutung liegt daher nahe, dass eine Exposition zu *E. cuniculi* häufig ist und sich daraus bei immunkompetenten Menschen in aller Regel asymptomatische Infektionen ergeben (Mathis et al. 2005).

Da die Sporen des Erregers unter geeigneten Bedingungen viele Monate in der Umwelt infektiös bleiben können (Waller 1979; Koudela et al. 1999), bedarf es für eine Übertragung nicht zwingend eines direkten Kontaktes zu einem infizierten tierischen oder menschlichen Individuum (Mathis et al. 2005). Eine orale Aufnahme von Sporen über kontaminierte Nahrungsmittel und Wasser könnte eine wichtige Rolle bei der horizontalen Übertragung spielen (Mathis et al. 2005; Han et al. 2021). *E. cuniculi* konnte bereits in verschiedenen tierischen Produkten wie Fleisch (Reetz 1993; Zanet et al. 2013), Milch (Kváč et al. 2016; Vecková et al. 2021) und Eiern (Reetz 1994) nachgewiesen werden.

Die Sporen des Erregers überstehen die Fermentation von Fleischprodukten, welche für gewöhnlich ungekocht konsumiert werden (Sak et al. 2019). Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass *E. cuniculi* die Käseverarbeitung (Pasteurisation und Koagulation) ebenso wie die Pasteurisation von Milch übersteht und somit Milch, Frisch- und Weichkäse eine potenzielle Infektionsquelle für den Menschen darstellen könnten (Kváč et al. 2016; Vecková et al. 2021). Auch in Hühnereiern konnte der Erreger detektiert werden, weshalb auch diese als mögliche Infektionsquelle zu berücksichtigen sind (Reetz 1994).

Weltweit liegen einige Berichte über Infektionen und damit einhergehenden Erkrankungen beim Menschen durch *E. cuniculi* vor. Teilweise wird im Rahmen der Anamnese der vorangegangene Kontakt zu (Haus-)Tieren beleuchtet, um mögliche Infektionsquellen ausfindig zu machen. Bei *E. cuniculi*-Nachweisen des Genotyps I in der Schweiz konnte bei zwei von sechs Patienten ein Kontakt zu Kaninchen in der Vergangenheit festgestellt werden (Mathis et al. 1997; Weber et al. 1997). Bei einer HIV-infizierten Patientin wurde unter anderem anhand der klinischen Symptomatik und der beruflich bedingten Exposition (Tätigkeit als Hundefriseurin) eine Infektion mit dem Genotyp III von *E. cuniculi* stark vermutet (Weitzel et al. 2001). Auch bei einem Patienten, der sich mit dem Genotyp I infiziert hatte, wurde vermutet, dass die beruflich bedingte Exposition zu Staub von Gras, welches von Nagetieren kontaminiert wurde, ursächlich für die Infektion sein

könnte (Ditrich et al. 2011). Bei einem Patienten, bei dem eine Lungentransplantation durchgeführt wurde und anschließend weitere schwerwiegende gesundheitliche Probleme auftraten, konnte post mortem eine disseminierte *E. cuniculi*-Infektion festgestellt werden. Der Patient war zuvor Viehzüchter gewesen und hatte im Rahmen dessen zudem Kontakt zu Hütehunden (Levine et al. 2013). Bei einem Kind konnte nach Kontakt zu Hundewelpen mit offensichtlicher Encephalitozoonose eine Antikörperkonversion festgestellt werden (Mc Innes und Steward 1991). Bei einer amerikanischen Patientin, welche aufgrund ihrer schweren Vorerkrankung eine Knochenmarkstransplantation erhalten hatte, konnte *E. cuniculi* Genotyp III im Zusammenhang mit einer respiratorischen Erkrankung nachgewiesen werden und es konnte belegt werden, dass sie in der Vergangenheit unter anderem Hunde als Haustier hielt (Teachey et al. 2004; Orenstein et al. 2005). Bei zwei erkrankten Vogelbesitzern aus Polen konnte *E. cuniculi* Genotyp II nachgewiesen werden. Da der Nachweis ebenso bei den gehaltenen Vögeln gelang, wird eine direkte Übertragung von den Vögeln auf die Besitzer vermutet (Kicia et al. 2022).

2. Encephalitozoon hellem

E. hellem wurde erstmals im Jahre 1990 als Ursache für Keratokonjunktividen bei AIDS-Patienten beschrieben (Didier et al. 1991a; Yee et al. 1991). Morphologisch und ultrastrukturell lassen sich *E. hellem* und *E. cuniculi* nicht unterscheiden. Immunologische und molekularbiologische Testmethoden ermöglichen jedoch die Differenzierung der beiden Mikrosporidienarten (Didier et al. 1991a).

2.1. Wirtsspektrum und Genotypen

Bei Tieren ist *E. hellem* am weitesten unter den Vögeln verbreitet und konnte bereits bei Wild- als auch bei Ziervögeln nachgewiesen werden. Der Erreger wurde jedoch gelegentlich auch bei Säugetieren, einschließlich Nagetieren, Fleischfressern und Affen, festgestellt (Hinney et al. 2016). Bei Hasenartigen wurde eine natürliche Infektion mit *E. hellem* bisher nur im Nierengewebe eines europäischen Feldhasen nachgewiesen, der gleichzeitig mit *E. intestinalis* infiziert war (Bosschere et al. 2007). Da es sich bei *E. hellem* um einen potentiellen Zoonoseerreger handelt, treten Infektionen auch bei Menschen, insbesondere wenn immunsupprimierende Krankheiten vorliegen, auf (Mathis et al. 2005).

Drei verschiedene Genotypen (Genotyp 1, 2, 3) von *E. hellem* wurden von Mathis et al. auf Grundlage molekulargenetischer Analysen der ITS-Region des rDNA-Gens beschrieben (Mathis et al. 1999). Anschließend konnten Xiao et al. den Genotyp 1 in 1A, 1B und 1C und den Genotyp 2 in 2A und 2B unterteilen, indem sie zusätzlich den Genlocus des Polarfadenproteins und das Gen der kleinen Untereinheit der rRNA analysierten. Es wurde zudem empfohlen, den Genotyp 3 in 2C umzubenennen (Xiao et al. 2001a).

2.2. Klinische Symptomatik bei Tieren und Menschen

Die klinische Symptomatik wurde in der Literatur vor allem bei Vögeln beschrieben, da der Erreger überwiegend bei dieser Tiergruppe vorkommt.

E. hellem-Infektionen bei Vögeln können eine Vielzahl klinischer Symptome verursachen, die mild bis tödlich verlaufen können (Black et al. 1997; Phalen et al. 2006). Die meisten Infektionen verlaufen jedoch vermutlich asymptomatisch (Barton et al. 2003; Lee et al. 2011). Bei Wellensittichküken wurden eine verstärkte Verkümmerng und eine hohe Sterblichkeit beobachtet (Black et al. 1997). Bei Autopsien infizierter Vögel wurden Anomalien wie ein erheblicher Muskelschwund, ein Verlust von Körperfett und Läsionen, insbesondere in den Nieren, der Leber, den Därmen und den Augen, festgestellt (Snowden und Phalen 2004). Klinische Manifestationen beim Menschen treten, wie bei *E. cuniculi*, vorwiegend bei immunsupprimierten Personen auf. Es wurde insbesondere über Keratokonjunktividen, aber auch über Nephritis, Pneumonie, Bronchitis und disseminierte Erkrankungen mit Nierenversagen berichtet (Han et al. 2021).

Zu klinischen Erscheinungen von *E. hellem* bei Kaninchen wie auch zum Vorkommen dieser Mikroskopidienart bei Wildkaninchen fehlen Kenntnisse bisher nahezu vollständig, so dass hier ein großer Forschungsbedarf besteht.

III. PUBLIKATION



Article

Occurrence of *Encephalitozoon cuniculi* and *Encephalitozoon hellem* in European Wild Rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in Southern Germany (Bavaria)

Katharina Breuning*^{*}, Monika Rinder[†] and Rüdiger Korbel

Center for Clinical Veterinary Medicine, Clinic for Birds, Small Mammals, Reptiles and Ornamental Fish, Veterinary Faculty, University of Munich, 85764 Oberschleissheim, Germany; monika.rinder@lmu.de (M.R.); korbel@lmu.de (R.K.)

* Correspondence: katharina.breuning@lmu.de

Simple Summary: Microsporidia are a group of fungus-related eukaryotes with worldwide distribution. The microsporidian species *Encephalitozoon cuniculi* and *E. hellem* occur in mammals, birds and even humans. Knowledge of their relevance in wild rabbits is very limited so far. Thus, the aim of the present study was to investigate the occurrence of *E. cuniculi* and *E. hellem* in wild rabbit populations in southern Germany (Bavaria). Therefore, blood and organ samples of 158 wild rabbits were investigated by serological and PCR-based assays. Antibodies to *E. cuniculi* were detected in 24 of the 158 (15.2%) wild rabbits, while DNA of *E. cuniculi* was found in 7 (4.4%) and DNA of *E. hellem* was found in 3 (1.9%). Sequencing identified *E. cuniculi* genotype 1. This study provides the first *E. cuniculi* genotype determination in free-living wild rabbits worldwide and the first evidence of *E. hellem* in rabbits worldwide. Wild rabbits should, therefore, be regarded as a reservoir for both pathogens and as a source of infection for domestic rabbits, other animals and humans.

Abstract: *Encephalitozoon cuniculi* and *Encephalitozoon hellem* are fungus-related, obligate intracellular pathogens belonging to the microsporidia. Both microorganisms occur in mammals, birds and even humans, thus revealing a zoonotic potential. Knowledge of their relevance in wild rabbits is very limited so far. Thus, the aim of the present study was to investigate the occurrence of *E. cuniculi* and *E. hellem* in wild rabbit populations in southern Germany (Bavaria). Therefore, blood and organ samples (brain/kidney) of 158 wild rabbits were investigated by immunofluorescence and PCR-based assays. Antibodies to *E. cuniculi* were detected in 24 of the 158 (15.2%) wild rabbits, while DNA of *E. cuniculi* was found in 7 (4.4%) and DNA of *E. hellem* was found in 3 (1.9%). Sequencing identified *E. cuniculi* genotype 1. This study provides the first *E. cuniculi* genotype determination in free-living wild rabbits worldwide and the first evidence of *E. hellem* in rabbits worldwide. Wild rabbits should, therefore, be regarded as a reservoir for both pathogens and, on the basis of molecular evidence from kidney tissue and presumed urine excretion, also as a source of infection for *E. cuniculi* for animals and humans.

Keywords: microsporidia; wildlife; Lagomorpha; zoonotic; IFAT; PCR



Citation: Breuning, K.; Rinder, M.; Korbel, R. Occurrence of *Encephalitozoon cuniculi* and *Encephalitozoon hellem* in European Wild Rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in Southern Germany (Bavaria). *Animals* **2024**, *14*, 2880. <https://doi.org/10.3390/ani14192880>

Academic Editor: Laila Darwich

Received: 6 September 2024

Revised: 29 September 2024

Accepted: 5 October 2024

Published: 7 October 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Encephalitozoon cuniculi and *Encephalitozoon hellem* are obligate intracellular, spore-forming pathogens belonging to the group of microsporidia. *E. cuniculi* was first described by Wright and Craighead in 1922. They discovered it by chance during experimental research as the causative agent of motor paralysis in young rabbits [1]. The pathogen is mainly associated with rabbits, but it has a very broad host range and may occur in many other mammals including humans, as well as in birds [2–4].

So far, four different genotypes of *E. cuniculi* have been identified, which may be differentiated based on molecular genetic investigations of the ITS region of the rRNA gene. Those genotypes are called “rabbit strain” (type I), “mouse strain” (type II), “dog strain”

(type III) and “human strain” (type IV) [5,6], but are of low host-specificity. For example, in rabbits, natural infections with genotypes I, II and III have been detected [7,8]. In humans, in addition to further genotype IV [6], infections with all of the other three genotypes were also identified, revealing a zoonotic potential independent of the genotype involved [3,9].

Horizontal infections with *E. cuniculi* occur primarily through oral ingestion of spores, which are excreted intermittently by infected animals or humans, mainly via the urine but also with faeces [10,11]. The oral route with ingestion of contaminated food and water is the most probable route of transmission of microsporidian spores to humans [3,12].

Infections with *E. cuniculi* in rabbits are usually clinically asymptomatic, but immunosuppression may lead to clinical signs and even death [13]. After ingestion, the spores enter the intestine, where they infect the epithelium and then reach the bloodstream via the gut-associated lymphoid tissue. Via the blood, the pathogen reaches various organs—either as a free spore or within infected monocytes [14]. The final predilection sites are the brain and the kidneys [10]. In addition, ocular transmission of the pathogen during the intrauterine period is possible [15]. Cerebral infection typically results in non-suppurative, focal to multifocal granulomatous (meningo-) encephalitis [16–19]. In the kidneys, *E. cuniculi* multiplies primarily in the tubular epithelial cells. Histologically, the kidneys typically show focal, multifocal or segmental non-suppurative granulomatous interstitial nephritis with macroscopic scarring due to fibrosis [17–21]. Clinically, infections manifest in neurological symptoms (vestibular dysfunction, e.g., head tilt, ataxia, nystagmus, rotations around the longitudinal axis), signs of renal insufficiency (non-specific symptoms such as apathy, anorexia, weight loss, polydipsia, polyuria) or ocular signs (phacoclastic uveitis, consecutive cataracts) [22–24]. Clinical manifestation in humans usually occurs in immunocompromised individuals only. Diarrhea and abdominal pain, hepatitis, peritonitis, liver failure, renal failure, disseminated disease with fever, persistent cough and endocarditis have been described [12].

E. hellem was first described in humans in 1990 as a cause of keratoconjunctivitis in AIDS patients [25,26]. Morphologically and ultrastructurally, *E. hellem* and *E. cuniculi* do not differ. However, immunological and molecular testing methods make it possible to distinguish between the two species [25]. In animals, *E. hellem* is most widespread among birds, both wild and companion birds, but the pathogen has also been occasionally detected in mammals, including rodents, carnivores and monkeys [4]. In Lagomorpha, natural infection with *E. hellem* has only been detected in the kidney tissue of a single European brown hare so far, which was simultaneously infected with *E. intestinalis* [27].

Three different genotypes (genotypes 1, 2 and 3) of *E. hellem* have been described by Mathis et al. based on molecular genetic analyses of the ITS region of the rDNA gene [28]. Subsequently, Xiao et al. were able to subdivide genotype 1 into 1A, 1B and 1C and genotype 2 into 2A and 2B by additionally analysing the gene locus of the polar tube protein and the gene of the small subunit of the rRNA; it has been recommended to rename genotype 3 as 2C [29].

E. hellem infections in birds may cause a variety of clinical symptoms ranging from mild to fatal [30,31]. However, most infections are probably asymptomatic [32,33]. Increased stunting and high mortality have been observed in budgerigar chicks [30]. Necropsy of infected birds revealed abnormalities such as significant muscle wasting, loss of body fat and lesions, especially in the kidneys, liver, intestines and eyes [34]. Clinical manifestations in humans, as with *E. cuniculi*, occur predominantly in immunocompromised individuals. Keratoconjunctivitis in particular, but also nephritis, pneumonia, bronchitis and disseminated disease with renal failure have been reported [12].

Since hunted European wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in Germany and elsewhere are partially intended for consumption and usually enter the human food chain without prior hygiene control in accordance with country-specific legislation, there is a need to identify possible zoonotic agents such as *E. cuniculi* and *E. hellem*. In the past, the serological prevalence of *E. cuniculi* in domestic rabbits was found to vary between 7.7 [35] and 81.7% [36] worldwide. However, significantly fewer studies have been conducted in wild

rabbits, and there is no current data on *E. cuniculi* and a complete lack of data on *E. hellem* for Central Europe. Previous serologic studies on *E. cuniculi* in Germany on wild rabbits have shown contradictory results. The first study in southern Germany in 1988 showed a seroprevalence of 18.1% in 155 wild rabbits investigated [37], but in a subsequent study in northern Germany in 1996, none of 100 wild rabbits tested positive [38]. Molecular studies to detect the nucleic acids of the pathogens had not yet been carried out in wild rabbits in Germany so far.

The aim of this study was, therefore, to gain updated insight into the prevalence of *E. cuniculi* using serological and molecular assays and to investigate the occurrence of *E. hellem* in wild rabbits in Germany for the first time in order to assess whether wild rabbits represent a reservoir for both pathogens and thus a potential source of infection.

2. Materials and Methods

2.1. Ethics

The Ethics Committee of the Faculty of Veterinary Medicine at LMU Munich approved this study, and no ethical concerns were raised (reference number 317-30-06-2022). Most of the samples were collected from legally hunted wild rabbits during the hunting seasons. Three samples originated from wild rabbits from a shelter that died or had to be euthanised due to severe disease independently of the current investigation. One of the samples came from a wild rabbit that had been found freshly dead, presumably after an accident with a car.

2.2. Study Area and Sample Collection

This study was conducted between 2021 and 2023. A total of 158 European wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) originating from all seven administrative districts of Bavaria, a federal state located in the south of Germany, were sampled (Figure 1). Data on age (juvenile (≤ 200 days [39], not fully grown)/adult), gender, location of origin and sampling year were recorded for each wild rabbit included in the investigation (Table 1, Supplementary Table S1).

Table 1. Age and gender of the sampled European wild rabbits and sampling year.

| | Number of Rabbits |
|----------------------|-------------------|
| Age | |
| Juvenil | 36 |
| Adult | 122 |
| Sex | |
| Male | 88 |
| Female | 70 |
| Sampling year | |
| 2021 | 7 |
| 2022 | 126 |
| 2023 | 25 |

Brain, kidney and blood samples were taken from each individual. Only rabbits with both blood and tissue samples available were included in this study. Sampling was either performed by the hunters themselves immediately after the hunt according to previous instructions, or the carcasses were provided whole and tissue and blood samples were taken in the laboratory. The fresh clinical samples or the carcasses were generally submitted to the laboratory within 1–3 days. For 46 of the 158 carcasses/samples, however, no immediate transfer could take place due to logistical circumstances, thus they were frozen at $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ by the hunters in the meantime.

Tissue samples were placed in sterile plastic containers (125 mL) and blood samples were collected in 4 mL serum tubes. The tissue samples were stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis. The serum tubes were centrifuged after clotting, and the supernatant was pipetted off and transferred to sterile 1.5 mL Eppendorf tubes. The Eppendorf tubes containing the serum samples were stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until used for *E. cuniculi* antibody testing.

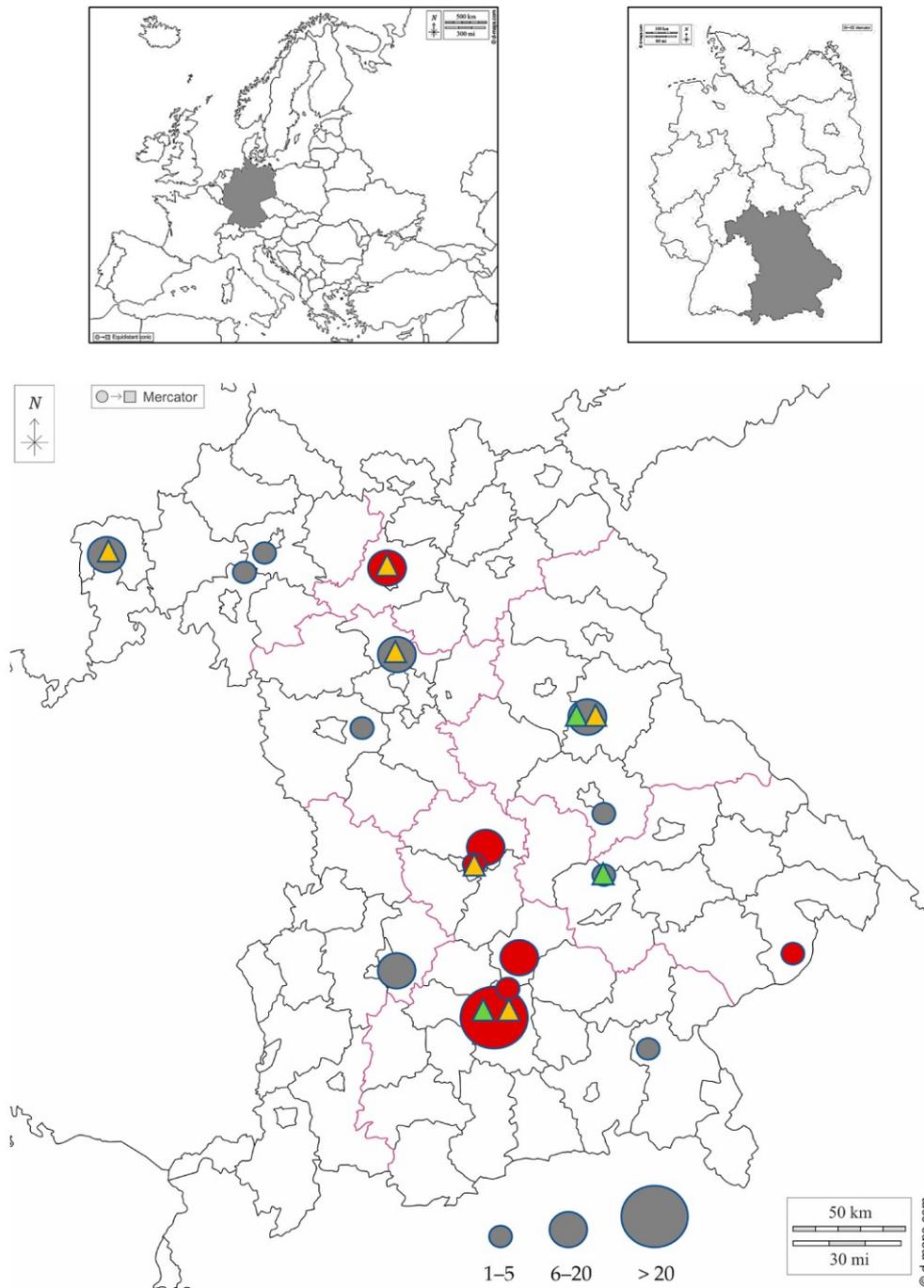


Figure 1. Rural administrative district map of Bavaria showing the collection areas of wild rabbits. Numbers of sampled rabbits per administrative district are semiquantitatively indicated by differing

circle diameters. Areas in which wild rabbits were tested seropositive for *E. cuniculi* are marked in red, while areas in which all tested wild rabbits were seronegative are marked in dark gray. Areas in which *E. cuniculi* DNA has been detected in wild rabbits using molecular testing methods are highlighted with a yellow triangle. Areas in which *E. hellem* DNA has been detected using molecular testing methods are highlighted with a light green triangle. Maps were taken from d-maps.com (https://d-maps.com/carte.php?num_car=6121&lang=de, https://d-maps.com/carte.php?num_car=17879&lang=de, https://d-maps.com/carte.php?num_car=2233&lang=de; accessed on 1 August 2024).

2.3. Indirect Immunofluorescence Antibody Test

The indirect immunofluorescence antibody test (IFAT) for the detection of *E. cuniculi* antibodies was carried out according to Chalupsky et al. [40] by a commercial company (SYNLAB.vet GmbH, Augsburg, Germany). Both IgG and IgM antibodies were tested. The highest serum dilution level evaluated as positive was given as a titer. Titers of $\geq 1:80$ were considered positive for both antibody isotypes. Possible associations between seropositivity and the age or gender of the rabbits were verified using the Chi-Square test.

2.4. DNA Extraction

A total of 500 mg of brain or kidney tissue was added to 150 μ L of sterile phosphate-buffered saline (pH 7.2) and then homogenised with the aid of SiLibeads Typ ZS 1.4–1.6 mm (Sigmund Lindner GmbH, Warmensteinach, Germany) using a vibrating mill (Retsch, Haan, Germany) for 5 min with a frequency of 30 Hz. A total of 200 mg of the homogenised tissue material was weighed into a microcentrifuge tube, mixed with 600 μ L of sterile phosphate-buffered saline (pH 7.2) by pulse-vortexing and then clarified by centrifugation at $16,200 \times g$ for 2 min. Nucleic acid was extracted from 200 μ L of the supernatant using the IndiSpin[®] Pathogen Kit (Indical Bioscience GmbH, Leipzig, Germany) according to the manufacturer's instructions, except that proteinase K digestion was performed at 56 °C for one hour instead of 20–25 °C for 15 min.

2.5. Real-Time PCR

The extracted DNA was tested for *E. cuniculi* and *E. hellem* in a duplex real-time PCR analysis, as described before by Leipig et al. [41], using the *E. cuniculi* forward primer MSP-3 (5'-TTGCGATGAAGGACGAAGG-3'), the *E. hellem* forward primer MSP-4 (5'-TGATGAAGGACGAAGG-3'), a reverse primer (MSP-5: 5'-TCTTGCGAGCGTACTATCC-3') and the molecular beacon fluorescent probes for *E. cuniculi* (MSP-S3: 5'-FAM-CGCGATC-GACTGGACGGGACNGTGTGTGTTGCCATGAGAAAGATCGCG-BHQ-1-3') and *E. hellem* (MSP-S4: 5'-HEX-CGCGATCGACTGGACGGGACTGTTTTAGTGTGTTCCGAGAGAAAGA-TCGCG-BHQ-1-3'). Primers and probes were synthesised by Metabion (Planegg, Germany).

Real-time PCR was performed using 2.5 u AllTaq DNA polymerase (Qiagen, Hilden, Germany), 0.5 μ M MSP-3, 0.5 μ M MSP-4, 1 μ M MSP-5, 0.5 μ M MSP-S3, 1 μ M MSP-S4, 0.25 mM, each, dNTPs, 2.5 μ g bovine serum albumin, 5.5 mM $MgCl_2$, 1 \times key buffer (Qiagen, Hilden, Germany) and 2.5 μ L of DNA in a total volume of 25 μ L. The real-time PCR assay was performed using a G8830A AriaMx Real-time PCR System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) using an initial denaturation for 15 min at 95 °C, followed by fifty cycles of denaturation for 30 s at 95 °C, annealing for 60 s at 53 °C and elongation for 30 s at 72 °C. Samples that yielded Ct values calculated by the Aria data analysis software and revealed a sigmoid shape of the fluorescence curve were then further analysed in conventional nested PCR assays for confirmation and genotyping.

2.6. Nested PCR I

In order to confirm the results of the real-time PCR assay obtained for *E. cuniculi* and *E. hellem* and thus to identify the species, a nested PCR I was performed according to Katzwinkel-Wladarsch et al. [42] with minor modifications. The primers used were generic microsporidia primers. For the first round, forward primer MSP-1 (5'-

TGAATGKGTCCCTGT-3') and reverse primer MSP-2a (5'-TCACTCGCCGCTACT-3') were applied, and in the second round, forward primer MSP-3 (5'GGAATTCACACACCGCCGCTCRYTAT-3') and reverse primer MSP-4a (5'-CCAAGCTTATGCTTAAGTYMAARGGGT-3'). The primers were synthesised by Metabion (Planegg, Germany).

The first PCR round contained 1.25 u AllTaq DNA polymerase (Qiagen, Hilden, Germany), 0.5 µM of each respective primer, 0.25 mM, each, dNTPs, 1.0 mM MgCl₂, 1 × key buffer (Qiagen, Hilden, Germany) and 2.5 µL DNA in a total volume of 25 µL.

The second PCR round contained 1.25 u AllTaq DNA polymerase (Qiagen, Hilden, Germany), 0.5 µM of each respective primer, 0.25 mM, each, dNTPs, 0.5 mM MgCl₂, 1 × key buffer (Qiagen, Hilden, Germany) and 1 µL of the first PCR round in a total volume of 25 µL. The nested PCR assay was performed using a SensoQuest LabCycler (SensoQuest GmbH, Göttingen, Germany). For both rounds, identical temperature profiles were used. The initial denaturation was carried out for 2 min at 96 °C, followed by fifty cycles of denaturation for 60 s at 92 °C, annealing for 60 s at 58 °C, elongation for 90 s at 72 °C and a final extension step for 7 min at 72 °C.

PCR products were visualised under UV light after electrophoresis in 2% agarose gels with ethidium bromide.

2.7. Nested PCR II

The nested PCR II aimed at determining the genotypes of *E. cuniculi* involved. All samples for which real-time PCR had previously yielded Ct values for *E. cuniculi* were included. The first round of the nested PCR assay was performed according to Asakura et al. [43] with minor changes, using the *E. cuniculi* forward primer F2 (5'-TCCTAGTAATAGCGGCTGAC-3') and the *E. cuniculi* reversed primer int580r (5'-TTTCACTCGCCGCTACTCAG-3'), which was originally designed by Didier et al. [5]. Primers were synthesised by Metabion (Planegg, Germany). The PCR reaction contained 0.625 u AllTaq DNA polymerase (Qiagen, Hilden, Germany), 0.2 µM of each primer, 0.2 mM, each, dNTPs, 1 × key buffer (Qiagen, Hilden, Germany) and 2.5 µL of DNA in a total volume of 25 µL. The PCR assay was performed with an initial denaturation for 2 min at 95 °C, followed by thirty-five cycles of denaturation for 30 s at 94 °C, annealing for 30 s at 56 °C, elongation for 30 s at 72 °C and a final extension step for 5 min at 72 °C.

For the second round of nested PCR II *E. cuniculi*, forward primer EcF3 (5'-AAGATGACCGACTGGACGAA-3') and reverse primer EcR3 (5'-GTGCACACCGCACACAATTC-3') were designed for the present study based on the identification of rDNA genomic regions conserved for the varying *E. cuniculi* genotypes. Primers were synthesised by Metabion (Planegg, Germany). The PCR reactions contained 0.625 u AllTaq DNA polymerase (Qiagen, Hilden, Germany), 0.25 µM of each primer, 0.2 mM, each, dNTPs, 1 × key buffer (Qiagen, Hilden, Germany), 1 µL of the first PCR round in a total volume of 25 µL. The initial denaturation was carried out for 2 min at 95 °C, followed by forty cycles of denaturation for 5 s at 95 °C, annealing for 15 s at 53 °C and elongation for 10 s at 72 °C.

PCR products were visualised under UV light after electrophoresis in 2% agarose gels with ethidium bromide.

2.8. Sequencing

PCR products of expected sizes were extracted from agarose gel using the QiaQuick gel extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany) and sequenced by Sanger's method at Eurofins Genomics (Ebersberg, Germany) from both sides, using the respective PCR primers of the second PCR rounds. The BLAST search tool provided by the National Centre for Biotechnology Information (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>; access date: 3 May 2024) was used to determine the identity of the PCR products. To determine the genotype of *E. cuniculi* sequence alignments were carried out using CLUSTAL W, which is included in the DNAMAN software package (Lynnon Corporation, Quebec, QC, Canada), including sequences for the different *E. cuniculi* genotypes deposited in the NCBI GenBank.

3. Results

3.1. Indirect Immunofluorescence Antibody Test for *E. cuniculi*

Serum samples obtained from 24 of the 158 wild rabbits (15.2%) were positive for antibodies against *E. cuniculi*. No association was found between seropositivity and age ($X^2(1, N = 158) = 1.116, p = 0.29$) or gender ($X^2(1, N = 158) = 0.06, p = 0.80$) using the Chi-Square test.

In 12 of the samples, both IgM and IgG antibodies were found. As shown in Table 2, only IgG antibodies were detected in 10 samples, while only IgM antibodies were found in 2 samples. In 19 serum samples, low titres of 1:80 were detected. Higher titres ranging from 1:160 to >1:1280 were found in five samples (Table 2). Wild rabbits originating from 7 of the 17 locations in Bavaria included in this study tested positive (Table 2, Figure 1).

Table 2. Results of indirect immunofluorescence antibody test for *E. cuniculi* with titres for IgG and IgM.

| Rabbit No. | Locations (Administrative Districts) | IgG Titre | IgM Titre |
|------------|---|-----------|-----------|
| 2 | Munich | 1:80 | - |
| 3 | Munich | - | 1:80 |
| 9 | Munich | >1:1280 | 1:320 |
| 13 | Freising | 1:640 | 1:80 |
| 17 | Munich | 1:80 | - |
| 34 | Bamberg | 1:160 | - |
| 37 | Bamberg | 1:80 | - |
| 45 | Passau | 1:80 | 1:80 |
| 46 | Passau | - | 1:80 |
| 52 | Munich | 1:1280 | - |
| 53 | Munich | 1:320 | 1:80 |
| 56 | Munich | 1:80 | 1:80 |
| 62 | Munich | 1:80 | 1:80 |
| 63 | Munich | 1:80 | - |
| 97 | Munich | 1:80 | - |
| 102 | Munich | 1:80 | 1:80 |
| 103 | Munich | 1:80 | 1:80 |
| 106 | Munich | 1:80 | - |
| 109 | Munich | 1:80 | - |
| 121 | Munich | 1:80 | 1:80 |
| 133 | Ingolstadt | 1:80 | 1:80 |
| 138 | Eichstätt | 1:80 | 1:80 |
| 145 | Eichstätt | 1:80 | 1:80 |
| 148 | Eichstätt | 1:80 | - |

3.2. Genome detection by Real-Time PCR

Real-time PCR revealed Ct values for *E. cuniculi* in 10 of the 158 (6.3%) and for *E. hellem* in 4 of the 158 (2.5%) wild rabbits (Supplementary Tables S2 and S3). The Ct values for *E. cuniculi* ranged between 27.67 and 45.98, and those for *E. hellem* were between 42.93 and 48.23. Only the Ct values of those samples for which the curves showed a sigmoid shape were taken into account.

Positive reactivities for *E. cuniculi* were found in both the brain and the kidneys of 2 rabbits (Nos. 9 and 118) as well as in the brains only of 3 rabbits (Nos. 75, 79 and 155) and in the kidneys only of 5 rabbits (Nos. 66, 68, 97, 134 and 157) (Supplementary Table S2).

Regarding the 4 rabbits with Ct values for *E. hellem*-positive reactions, 1 rabbit (No. 118) originated from both the brain and kidney samples, while in 2 rabbits (Nos. 97 and 150), the kidney samples only, and in 1 rabbit (No. 109) the brain sample revealed fluorescence signals (Supplementary Table S3).

A total of 2 of the rabbits showed Ct values for both *E. cuniculi* and *E. hellem*, 1 rabbit (No. 118) in the brain and kidney samples and the other (No. 97) in the kidney sample.

3.3. Nested PCRs and Sequencing

Samples from rabbits that gave Ct values in the real-time PCR were subsequently analysed with nested PCRs for confirmation and genotyping.

The nested PCRs I yielded PCR products of the expected size for *E. cuniculi* in 7 of the 10 rabbits that had previously yielded Ct values in the real-time PCR (Supplementary Table S2, Supplementary Figure S1). For *E. hellem*, products of the expected size were obtained in three of the four rabbits that previously gave Ct values in the real-time PCR (Supplementary Table S3, Supplementary Figure S2).

Using nested PCR II, in 1 rabbit (No. 9), *E. cuniculi* genotype 1 characterised by three 5'-GTTT-3' repeats in the ITS DNA sequence, [5] was found. Identical sequences were obtained from both brain and kidney samples of this rabbit. The sequences are available in GenBank under the accession numbers PQ214196 and PQ214197. For the remaining PCR products of nested PCR I and II, including those of *E. hellem*, direct Sanger sequencing did not result in evaluable nucleotide sequences, probably because of the low DNA amount or bad DNA quality of the PCR product. The genotype of *E. hellem* involved could thus not be determined.

4. Discussion

In the current study, antibodies against *E. cuniculi* were detected in 15.2% of the wild rabbits tested, which is comparable to the results of the first investigation in southern Germany [37]. In that previous study, published in 1988, 18.1% of the wild rabbits tested positive. However, the wild rabbits analysed at that time came from only two properties in Munich, which limited the significance of the results [37]. The current results show that the pathogen is circulating in various areas of Bavaria and, considering the former study, indicate the endemic occurrence of *E. cuniculi* in the wild rabbit population, at least in southern Germany. Whether this endemic occurrence also extends to other regions in Germany is still unclear, as in another study including wild rabbits from the northern part of Germany published in 1996, antibodies against the pathogen were not detected, and it was therefore assumed that wild rabbits probably do not play a role in the spread of the pathogen [38]. Further new investigations are thus necessary to answer this question.

In the present study, *E. cuniculi* genomic DNA was detected in the examined animals in addition to the presence of antibodies. The current investigation thus represents the first successful molecular detection of *E. cuniculi* genomes from organ material of free-living wild rabbits worldwide and demonstrates that the wild rabbits examined were not only exposed to the pathogen but were actually infected. In 10 of the 158 (6.3%) wild rabbits, Ct values for *E. cuniculi* were obtained in the real-time PCR assay used. These results were subsequently confirmed by nested PCR in 7 out of the 10 rabbits. In addition, the detection in the kidney material, in particular, indicates that wild rabbits are not only a reservoir of the pathogen but, as has been proven in domestic rabbits already [44] are most likely also a source of infection due to the potential excretion of spores via the urine. Some rabbits within the present investigation showed Ct values by real-time PCR and did not reveal detectable antibody titres in the IFAT at the same time. Similar results of lacking antibody detections have been reported already in the past [45,46]. The potential reasons may only be speculated. Besides false-negative IFAT results caused by individual serum-inherent inhibition and false-positive PCR results, which were excluded as far as possible in the current study by a further confirmatory PCR test, causes may be an as-yet undetectable antibody level, an insufficient amount of spores ingested for seroconversion [45] or immunosuppressive effects of other diseases that prevent antibody production [45,46]. Excessive binding of antibodies by the pathogen could also play a role [46].

Up to the investigation presented here, there have been three prevalence studies on *E. cuniculi* in European wild rabbits based on DNA testing, all of which were conducted in Spain (including Tenerife). In addition, molecular methods have been used in a prevalence study of Eastern cottontail rabbits in Italy [47]. In one of the three studies from Spain, *E. cuniculi* DNA was detected by PCR in 2 of the 50 faecal samples examined [48]. However,

the positive faecal samples originated from wild rabbits temporarily housed on farms in close contact with each other, which means that there might have been an increased risk of transmission. In the same study, *E. cuniculi* could not be detected in faecal samples originating from free-living wild rabbits, but other unknown microsporidian species were detected in five of these rabbits [48]. In the two other studies from Spain (0%, 0/383 [49], 0/438 [50]), DNA from *E. cuniculi* could not be detected [49,50]. However, only kidney tissue [49] or faecal samples were analysed [50]. In a former investigation conducted in Italy [47] on Eastern cottontail rabbits, a lagomorph species introduced for hunting purposes from North America to Italy in the 1960s, *E. cuniculi* was detected from organ tissues by conventional PCR in almost 10% of individuals that were tested. In this study, in addition to the brain and kidneys, the pathogen was also detected in skeletal muscle [47], which provides an interesting finding with regard to the potential risk of infection for humans and animals through the consumption of muscle meat. In histopathological studies on 34 European wild rabbits from Spain [51] and 62 European wild rabbits from England [52], no spores of *E. cuniculi* were detected in any of the tissue samples examined. In the study carried out in Spain, a broad range of organs of the wild rabbits were screened [51]. In the study carried out in England, only the kidneys were screened [52]. In both studies, the tissue samples were stained with hematoxylin and eosin (HE) and examined using light microscopy [51,52].

E. cuniculi genotype 1 (“rabbit strain”) was detected in both the brain and kidney tissue of one rabbit in the present study. This represents the first description of *E. cuniculi* genotypes in free-living wild rabbits. In previous studies on wild rabbits, genotyping of *E. cuniculi* was only carried out in one study conducted in Spain from faecal samples. Genotype 1 was also detected in this study, but only in wild rabbits temporarily housed on farms, which may have an increased risk of infection and other possible sources of infection compared to those in the wild [48].

Studies in wild rabbits in which both antibody determination and molecular methods were used for comparison were not available so far. Our study allowed for the first time a comparison of both antibody determination and PCR testing to assess whether wild rabbits are affected by the pathogen and thus pose a potential risk of infection to other animals and humans.

Antibodies against *E. cuniculi* were detected in 24 of the 158 wild rabbits in the current study, in 12 rabbits with both IgG and IgM, in 10 rabbits with exclusively IgG and in 2 rabbits with exclusively IgM (Table 2). Most prevalence studies, both in domesticated and wild rabbits, are based on the detection of antibodies, partly because this investigation can easily be performed antemortem. The interpretation of antibody detection is difficult, as it basically only proves exposure to the pathogen in the first place [53]. Simultaneous testing of IgG and IgM antibodies can provide an indication of infection status. The exclusive detection of antibodies of the IgM isotype serves as an indication of an early, acute infection. If both IgM and IgG isotype antibodies are detected, this indicates an acute infection. If only antibodies of the IgG isotype are present, this is an indication of a latent/chronic infection [10,54,55]. In the current study, solely IgM antibodies were detected in two of the wild rabbits examined, suggesting an early infection. Previous antibody determinations in wild rabbits were most often tested only for IgG antibodies, possibly leaving early-stage infections undetected.

Previous global serological studies on *E. cuniculi* in wild rabbits reported seroprevalences ranging from 3.9 to 100% in the UK (100%; 3/3) [56], Germany (18.1%, 28/155) [37], France (3.9%; 8/204) [57], Australia (24.7%; 20/81) [58] and Slovakia (44.7%; 21/47) [59], but no seropositive rabbits at all were found in further studies in Australia (0%, 0/823) [60], New Zealand (0%, 0/57) [60], the UK (0%, 0/175 [61]; 0/27 [62]; 0/60 [63]) and Germany (0%, 0/100) [38], suggesting that wild rabbits do not generally serve as a reservoir for the pathogen. In comparison to these varying results in wild rabbits, antibodies are regularly observed in domestic rabbits, especially pet rabbits, and often with high prevalence [64]. Due to the primarily high seroprevalences among domestic rabbits, some authors have sug-

gested that the pathogen may be transmitted from domestic rabbits to wild rabbits [38,65]. In contrast, other researchers even suspect that wild rabbits are the natural reservoir of the pathogen, as they tested wild rabbits as seropositive, in which contact with domestic rabbits was virtually ruled out [57]. The partially lower seroprevalence in wild rabbits could be due to a lower population density and a consequently lower infection risk compared to domestic rabbits, as high prevalence has been found in domestic rabbits, particularly in connection with overstocking and presumably associated urine contamination [66]. An additional factor to consider that could limit the prevalence in the wild population is that wild rabbits with manifest encephalitozoonosis are most likely more susceptible to predation and, therefore, may not be among the rabbits studied [38]. This would also partially limit the possibility of diseased rabbits continuing to excrete spores, which in turn could infect other rabbits.

In the current study, *E. cuniculi* DNA was detected in the brain and kidneys of only 2 of the 24 rabbits that tested positive for antibodies using IFAT. This could occur due to very low spore concentration and/or uneven distribution in the tissue under study [45]. It is possible that the animals were still in the early phase of infection or were exposed to the pathogen but were able to fight off the infection, which may have prevented high spore numbers and their detection in the organs. Some authors report that spores are less abundant in the tissues concerned when infection progresses [19,20], which could also lead to a lower positive rate.

E. hellem is a potential pathogen that occurs mainly in birds and humans, but occasionally also in mammals. In Lagomorpha, both domesticated and wild, natural infection with *E. hellem* has so far only been detected in the kidney tissue of a single European brown hare, which was simultaneously infected with *E. intestinalis*. The researchers had not expected to find these pathogens, as the kidney lesions initially indicated an infection with *E. cuniculi* [27].

To the best of our knowledge, the present study presents the first successful detection of *E. hellem* in rabbits. A total of 4 of the 158 wild rabbits showed Ct values using real-time PCR. Although the Ct values are relatively high (Supplementary Table S3), the real-time PCR used is very sensitive, and no non-specific reactions between *E. hellem* and *E. cuniculi* have been documented [41]. The nested PCR used in this investigation also confirmed these results with corresponding bands in three of the four rabbits visible after agarose gel electrophoresis. For the identification of *E. hellem*, only molecular methods were used here, as there is no established antibody test for this pathogen in rabbits available. In general, knowledge of *E. hellem* in rabbits is very limited so far. The few studies published originate from Spain (including Tenerife). They were also based on molecular testing methods, and *E. hellem* could not be detected (0%, 0/383 [49], 0/50 [48], 0/438 [50]).

Further large-scale studies on this pathogen—for both domesticated and wild rabbits—could provide an important insight into the actual spread of *E. hellem* and also supply information on a possible relevance as a pathogen for rabbits.

There were some limitations of the present study that should be mentioned. The sample areas of this study were distributed as far as possible across different regions of Bavaria. However, an even distribution of samples was not achieved. Wild rabbits in Bavaria, as well as in many other states in Germany, have been eradicated or at least very severely decimated in some areas due to epidemics such as rabbit haemorrhagic disease or myxomatosis [67]. The largest proportion of the samples, therefore, originated from the Munich area, as there are still quite large wild rabbit populations in this region. Nevertheless, many counties could be included in the investigation (Figure 1).

The sample material used from the brain and kidneys is very suitable for testing for *E. cuniculi*, but *E. hellem* has so far been isolated primarily from faecal samples, even if there is also evidence from organ material [4]. It is, therefore, possible that faeces or intestinal tissue are more appropriate for the detection of this pathogen and should, therefore, be additionally included in future investigations. The inclusion of the eyes of the animals

in the sample material specifically for the detection of *E. cuniculi* could possibly further increase the detection rate.

5. Conclusions

The results of this study show that both *E. cuniculi* and *E. hellem* are present in wild rabbits in Bavaria. This study provides the first *E. cuniculi* genotype determination in free-living wild rabbits worldwide and, in addition, the first evidence of *E. hellem* in rabbits worldwide. Wild rabbits should, therefore, be regarded as a reservoir for both pathogens and, on the basis of molecular evidence from kidney tissue and presumed urine excretion, also as a source of infection for *E. cuniculi* for animals and humans. For domestic rabbits, the possibility of infection via wild rabbits by outdoor housing or contaminated fresh feed from meadows arises. For immunocompromised persons (YOPI group) in particular, hygienic safety precautions should be considered when in contact with wild rabbits, their food products and excretions. Further studies covering larger parts of Germany would be desirable to gain deeper insights into the circulation of the pathogens in the wild rabbit population.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ani14192880/s1>, Table S1. Location and number of rabbits sampled from these locations; Table S2. Real-time PCR, Ct values of samples tested positive for *E. cuniculi* DNA; Table S3. Real-time PCR, Ct values of samples tested positive for *E. hellem* DNA; Figure S1. Agarose gel electrophoresis of the second round of nested PCR II showing specific PCR products of *E. cuniculi* strain (expected size about 0.3 kb); Figure S2. Agarose gel electrophoresis of the second round of nested PCR I showing specific PCR products of *E. hellem* strain (expected size about 0.3 kb).

Author Contributions: Conceptualization, K.B., M.R. and R.K.; methodology, K.B. and M.R.; investigation, K.B. and M.R.; data curation, K.B. and M.R.; writing—original draft preparation, K.B., M.R. and R.K.; writing—review and editing, K.B., M.R. and R.K.; supervision, R.K.; funding acquisition, K.B. and R.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Bavarian Academy for Hunting and Nature, grant number 8200483.

Institutional Review Board Statement: The animal study protocol was approved by the Institutional Ethics Committee of Ludwig-Maximilians-Universität in Munich (protocol code 317-30-06-2022, 26.08.2022).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data are contained within the article and Supplementary Materials. Sequence information is found in GenBank (accession numbers PQ214196 and PQ214197).

Acknowledgments: First of all, we would like to thank the Bavarian Academy for Hunting and Nature (BAJN) for partial funding of the study and the Bavarian Hunting Society for their outstanding support in providing the wild rabbit samples for testing. We also gratefully acknowledge the most fruitful support by J. Reddemann and the BAJN board. Also, we would like to thank SYNLAB.vet GmbH (Augsburg), especially I. Schwarze, for the continuous and most helpful cooperation and professional exchange. Last but not least, we would like to thank our colleagues at the laboratory and pathology section of the Clinic for Birds, Small Mammals, Reptiles and Ornamental Fish of LMU Munich for their great support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Wright, J.H.; Craighead, E.M. Infectious motor paralysis in young rabbits. *J. Exp. Med.* **1922**, *36*, 135–140. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Deplazes, P.; Mathis, A.; Weber, R. Epidemiology and zoonotic aspects of microsporidia of mammals and birds. *Contrib. Microbiol.* **2000**, *6*, 236–260. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Mathis, A.; Weber, R.; Deplazes, P. Zoonotic potential of the microsporidia. *Clin. Microbiol. Rev.* **2005**, *18*, 423–445. [[CrossRef](#)]
4. Hinney, B.; Sak, B.; Joachim, A.; Kváč, M. More than a rabbit's tale—*Encephalitozoon* spp. in wild mammals and birds. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* **2016**, *5*, 76–87. [[CrossRef](#)]

5. Didier, E.S.; Vossbrinck, C.R.; Baker, M.D.; Rogers, L.B.; Bertucci, C.D.; Shadduck, J.A. Identification and characterization of three *Encephalitozoon cuniculi* strains. *Parasitology* **1995**, *111*, 411–421. [[CrossRef](#)]
6. 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*, 2651–2653. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Valencakova, A.; Balent, P.; Ravaszova, P.; Horak, A.; Obornik, M.; Halanova, M.; Malcekova, B.; Novotny, F.; Goldova, M. Molecular identification and genotyping of Microsporidia in selected hosts. *Parasitol. Res.* **2012**, *110*, 689–693. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Deng, L.; Chai, Y.; Xiang, L.; Wang, W.; Zhou, Z.; Liu, H.; Zhong, Z.; Fu, H.; Peng, G. First identification and genotyping of *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon* spp. in pet rabbits in China. *BMC Vet. Res.* **2020**, *16*, 212. [[CrossRef](#)]
9. Sokolova, O.I.; Demyanov, A.V.; Bowers, L.C.; Didier, E.S.; Yakovlev, A.V.; Skarlato, S.O.; Sokolova, Y.Y. Emerging microsporidian infections in Russian HIV-infected patients. *J. Clin. Microbiol.* **2011**, *49*, 2102–2108. [[CrossRef](#)]
10. Cox, J.C.; Hamilton, R.C.; Attwood, H.D. An investigation of the route and progression of *Encephalitozoon cuniculi* infection in adult rabbits. *J. Protozool.* **1979**, *26*, 260–265. [[CrossRef](#)]
11. Kimura, M.; Aoki, M.; Ichikawa-Seki, M.; Matsuo, K.; Yagita, K.; Itagaki, T. Detection and genotype of *Encephalitozoon cuniculi* DNA from urine and feces of pet rabbits in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* **2013**, *75*, 1017–1020. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Han, B.; Pan, G.; Weiss, L.M. Microsporidiosis in Humans. *Clin. Microbiol. Rev.* **2021**, *34*, e0001020. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Harcourt-Brown, F. *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbits. *Semin. Avian. Exot. Pet. Med.* **2004**, *13*, 86–93. [[CrossRef](#)]
14. Marcatò, P.S.; Rosmini, R. *Patologia del Coniglio e della Lepre: Atlante a Colori e Compendio*; Società Editrice Esculapio: Bologna, Italy, 1986.
15. Ozkan, O.; Karagoz, A.; Kocak, N. First molecular evidence of ocular transmission of Encephalitozoonosis during the intrauterine period in rabbits. *Parasitol. Int.* **2019**, *71*, 1–4. [[CrossRef](#)]
16. Scharmann, W.; Reblin, L.; Griem, W. Untersuchungen über die Infektion von Kaninchen durch *Encephalitozoon cuniculi*. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* **1986**, *99*, 20–24.
17. Cox, J.C.; Gallichio, H.A. Serological and histological studies on adult rabbits with recent, naturally acquired encephalitozoonosis. *Res. Vet. Sci.* **1978**, *24*, 260–261. [[CrossRef](#)]
18. Eröksüz, H.; Eröksüz, Y.; Metin, N.; Özer, H. Morphologic examinations of cases of naturally acquired encephalitozoonosis in a rabbit colony. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* **1999**, *23*, 191–196.
19. 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*, 629–635. [[CrossRef](#)]
20. Flatt, R.E.; Jackson, S.J. Renal nosematosis in young rabbits. *Path. Vet.* **1970**, *7*, 492–497.
21. Rodríguez-Tovar, L.E.; Nevárez-Garza, A.M.; Trejo-Chávez, A.; Hernández-Martínez, C.A.; Hernández-Vidal, G.; Zarate-Ramos, J.J.; Castillo-Velázquez, U. *Encephalitozoon cuniculi*: Grading the histological lesions in brain, kidney, and liver during primo-infection outbreak in rabbits. *J. Pathog.* **2016**, *2016*, 5768428. [[CrossRef](#)]
22. Harcourt-Brown, F.M.; Holloway, H.K.R. *Encephalitozoon cuniculi* in pet rabbits. *Vet. Rec.* **2003**, *152*, 427–431. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. 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*, 271–275. [[CrossRef](#)]
24. Künzel, F.; Gruber, A.; Tichy, A.; Edelhofer, R.; Nell, B.; Hassan, J.; Leschnik, M.; Thalhammer, J.G.; Joachim, A. Clinical symptoms and diagnosis of encephalitozoonosis in pet rabbits. *Vet. Parasitol.* **2008**, *151*, 115–124. [[CrossRef](#)]
25. Didier, E.S.; Didier, P.J.; Friedberg, D.N.; Stenson, S.M.; Orenstein, J.M.; Yee, R.W.; Tio, F.O.; Davis, R.M.; Vossbrinck, C.; Millichamp, N. Isolation and characterization of a new human microsporidian, *Encephalitozoon hellem* (n. sp.), from three AIDS patients with keratoconjunctivitis. *J. Infect. Dis.* **1991**, *163*, 617–621. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Yee, R.W.; Tio, F.O.; Martinez, J.A.; Held, K.S.; Shadduck, J.A.; Didier, E.S. Resolution of microsporidian epithelial keratopathy in a patient with AIDS. *Ophthalmology* **1991**, *98*, 196–201. [[CrossRef](#)]
27. de Bosschere, H.; Wang, Z.; Orlandi, P.A. First diagnosis of *Encephalitozoon intestinalis* and *E. Hellem* in a European brown hare (*Lepus europaeus*) with kidney lesions. *Zoonoses Public Health* **2007**, *54*, 131–134. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Mathis, A.; Tanner, I.; Weber, R.; Deplazes, P. Genetic and phenotypic intraspecific variation in the microsporidian *Encephalitozoon hellem*. *Int. J. Parasitol.* **1999**, *29*, 767–770. [[CrossRef](#)]
29. Xiao, L.; Li, L.; Moura, H.; Sulaiman, I.; Lal, A.A.; Gatti, S.; Scaglia, M.; Didier, E.S.; Visvesvara, G.S. Genotyping *Encephalitozoon hellem* isolates by analysis of the polar tube protein gene. *J. Clin. Microbiol.* **2001**, *39*, 2191–2196. [[CrossRef](#)]
30. Black, S.S.; Steinhart, L.A.; Bertucci, D.C.; Rogers, L.B.; Didier, E.S. *Encephalitozoon hellem* in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *Vet. Pathol.* **1997**, *34*, 189–198. [[CrossRef](#)]
31. Phalen, D.N.; Logan, K.S.; Snowden, K.F. *Encephalitozoon hellem* infection as the cause of a unilateral chronic keratoconjunctivitis in an umbrella cockatoo (*Cacatua alba*). *Vet. Ophthalmol.* **2006**, *9*, 59–63. [[CrossRef](#)]
32. Barton, C.E.; Phalen, D.N.; Snowden, K.F. Prevalence of Microsporidian Spores Shed by Asymptomatic Lovebirds: Evidence for a Potential Emerging Zoonosis. *J. Avian Med. Surg.* **2003**, *17*, 197–202. [[CrossRef](#)]
33. Lee, S.-Y.; Lee, S.-S.; Lyoo, Y.S.; Park, H.-M. DNA detection and genotypic identification of potentially human-pathogenic microsporidia from asymptomatic pet parrots in South Korea as a risk factor for zoonotic emergence. *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77*, 8442–8444. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Snowden, K.; Phalen, D.N. Encephalitozoon infection in birds. *Semin. Avian. Exot. Pet. Med.* **2004**, *13*, 94–99. [[CrossRef](#)]

35. Ozkan, O.; Ozkan, A.T.; Zafer, K. Encephalitozoonosis in New Zealand rabbits and potential transmission risk. *Vet. Parasitol.* **2011**, *179*, 234–237. [\[CrossRef\]](#)
36. Berger Baldotto, S.; Cray, C.; Giannico, A.T.; Reifur, L.; Montiani-Ferreira, F. Seroprevalence of *Encephalitozoon cuniculi* Infection in Pet Rabbits in Brazil. *J. Exot. Pet. Med.* **2015**, *24*, 435–440. [\[CrossRef\]](#)
37. Neuwirt, E. Ein Beitrag zur Diagnose der Encephalitozoonose (Nosematose) beim Kaninchen; Vergleich zwischen direkten und indirekten Nachweismethoden. Doctoral Thesis, Ludwig-Maximilians-Universität, München, Germany, 1988.
38. Meyer-Breckwoldt, A. Epidemiologische und klinische Untersuchungen zur Encephalitozoonose bei Zwergkaninchen. Doctoral Thesis, Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover, Germany, 1996.
39. Fa, J.E.; Sharples, C.M.; Bell, D.J.; DeAngelis, D. An individual-based model of rabbit viral haemorrhagic disease in European wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Ecol. Model.* **2001**, *144*, 121–138. [\[CrossRef\]](#)
40. Chalupský, J.; Vávra, J.; Bedrník, P. Detection of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits by the indirect immunofluorescent antibody test. *Folia Parasitol.* **1973**, *20*, 281–284.
41. Leipzig, M.; Matiassek, K.; Rinder, H.; Janik, D.; Emrich, D.; Baiker, K.; Hermanns, W. Value of histopathology, immunohistochemistry, and real-time polymerase chain reaction in the confirmatory diagnosis of *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbits. *J. Vet. Diagn. Investig.* **2013**, *25*, 16–26. [\[CrossRef\]](#)
42. Katzwinkel-Wladarsch, S.; Lieb, M.; Helse, W.; Löscher, T.; Rinder, H. Direct amplification and species determination of microsporidian DNA from stool specimens. *Trop. Med. Int. Health* **1996**, *1*, 373–378. [\[CrossRef\]](#)
43. Asakura, T.; Nakamura, S.; Ohta, M.; Une, Y.; Furuya, K. Genetically unique microsporidian *Encephalitozoon cuniculi* strain type III isolated from squirrel monkeys. *Parasitol. Int.* **2006**, *55*, 159–162. [\[CrossRef\]](#)
44. 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*, 1749–1757. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Csokai, J.; Joachim, A.; Gruber, A.; Tichy, A.; Pakozdy, A.; Künzel, F. Diagnostic markers for encephalitozoonosis in pet rabbits. *Vet. Parasitol.* **2009**, *163*, 18–26. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
46. Hein, J.; Flock, U.; Sauter-Louis, C.; Hartmann, K. *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits in Germany: Prevalence and sensitivity of antibody testing. *Vet. Rec.* **2014**, *174*, 350. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
47. Zanet, S.; Palese, V.; Trisciuglio, A.; Cantón Alonso, C.; Ferroglio, E. *Encephalitozoon cuniculi*, *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infection in invasive Eastern Cottontail Rabbits *Sylvilagus floridanus* in Northwestern Italy. *Vet. Parasitol.* **2013**, *197*, 682–684. [\[CrossRef\]](#)
48. Baz-González, E.; Martín-Carrillo, N.; García-Livia, K.; Abreu-Acosta, N.; Foronda, P. Molecular Detection of Microsporidia in Rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in Tenerife, Canary Islands, Spain. *Biology* **2022**, *11*, 1796. [\[CrossRef\]](#)
49. Martínez-Padilla, A.; Caballero-Gómez, J.; Magnet, Á.; Gómez-Guillamón, F.; Izquierdo, F.; Camacho-Sillero, L.; Jiménez-Ruiz, S.; Del Águila, C.; García-Bocanegra, I. Zoonotic Microsporidia in Wild Lagomorphs in Southern Spain. *Animals* **2020**, *10*, 2218. [\[CrossRef\]](#)
50. Rego, L.; Castro-Scholten, S.; Cano, C.; Jiménez-Martín, D.; Köster, P.C.; Caballero-Gómez, J.; Bailo, B.; Dashti, A.; Hernández-Castro, C.; Cano-Terriza, D.; et al. Iberian wild leporidae as hosts of zoonotic enteroparasites in Mediterranean ecosystems of Southern Spain. *Zoonoses Public Health* **2023**, *70*, 223–237. [\[CrossRef\]](#)
51. Espinosa, J.; Ferreras, M.C.; Benavides, J.; Cuesta, N.; Pérez, C.; García Iglesias, M.J.; García Marín, J.F.; Pérez, V. Causes of Mortality and Disease in Rabbits and Hares: A Retrospective Study. *Animals* **2020**, *10*, 158. [\[CrossRef\]](#)
52. Lamalle, A.; Haverson, V.A.; Hughes, K. Renal pathology in wild European rabbits. *Vet. Rec.* **2023**, *193*, e2948. [\[CrossRef\]](#)
53. Latney, L.V.; Bradley, C.W.; Wyre, N.R. *Encephalitozoon cuniculi* in pet rabbits: Diagnosis and optimal management. *Vet. Med. Res. Rep.* **2014**, *5*, 169–180. [\[CrossRef\]](#)
54. Kunstýř, I.; Lev, L.; Naumann, S. Humoral antibody response of rabbits to experimental infection with *Encephalitozoon cuniculi*. *Vet. Parasitol.* **1986**, *21*, 223–232. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
55. 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*, 143–148. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
56. Wilson, J.M. *Encephalitozoon cuniculi* in wild European rabbits and a fox. *Res. Vet. Sci.* **1979**, *26*, 114. [\[CrossRef\]](#)
57. Chalupský, J.; Vávra, J.; Gaudin, J.C.; Vandewalle, P.; Arthur, C.P.; Guenezan, M.; Launay, H. Serological evidence of the occurrence of encephalitozoonosis and toxoplasmosis in the European wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) in France. *Bull. Soc. fr. parasitol.* **1990**, *8*, 91–95.
58. Thomas, C.; Finn, M.; Twigg, L.; Deplazes, P.; Thompson, R.C. Microsporidia (*Encephalitozoon cuniculi*) in wild rabbits in Australia. *Aust. Vet. J.* **1997**, *75*, 808–810. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
59. Balent, P.; Halanova, M.; Sedlakova, T.; Valencakova, A.; Cislakova, L. *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbits and laboratory mice in Eastern Slovakia. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* **2004**, *48*, 113–116.
60. Cox, J.C.; Pye, D.; Edmonds, J.W.; Shepherd, R. An investigation of *Encephalitozoon cuniculi* in the wild rabbit *Oryctolagus cuniculus* in Victoria, Australia. *Epidemiol. Infect.* **1980**, *84*, 295–300. [\[CrossRef\]](#)
61. Cox, J.C.; Ross, J. A serological survey of *Encephalitozoon cuniculi* infection in the wild rabbit in England and Scotland. *Res. Vet. Sci.* **1980**, *28*, 396. [\[CrossRef\]](#)
62. Blevins, M. Prevalence of *Encephalitozoon cuniculi* in a population of wild rabbits in Norfolk, England. *Zoomed* **2007**, *7*, 28–36.

63. Bose, H.M.; Woodhouse, M.A.; Powell, R. Absence of *Encephalitozoon cuniculi* antibodies in wild rabbits in England. *Vet. Rec.* **2015**, *177*, 48. [[CrossRef](#)]
64. Magalhães, T.R.; Pinto, F.F.; Queiroga, F.L. A multidisciplinary review about *Encephalitozoon cuniculi* in a One Health perspective. *Parasitol. Res.* **2022**, *121*, 2463–2479. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Keeble, E.J.; Shaw, D.J. Seroprevalence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in domestic rabbits in the United Kingdom. *Vet. Rec.* **2006**, *158*, 539–544. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Gannon, J. A survey of *Encephalitozoon cuniculi* in laboratory animal colonies in the United Kingdom. *Lab. Anim.* **1980**, *14*, 91–94. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Frölich, K.; Thiede, S.; Kozikowski, T.; Jakob, W. A review of mutual transmission of important infectious diseases between livestock and wildlife in Europe. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2002**, *969*, 4–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Supplementary Material

1

Table S1. Location and number of rabbits sampled from these location

| Location (Administrative district) | Number of rabbits investigated |
|---|---------------------------------------|
| Aichach-Friedberg | 8 |
| Ansbach | 2 |
| Aschaffenburg | 20 |
| Bamberg | 17 |
| Eichstätt | 15 |
| Erlangen | 8 |
| Freising | 8 |
| Ingolstadt | 4 |
| Landshut | 2 |
| Munich | 55 |
| Passau | 2 |
| Regensburg | 1 |
| Schwandorf | 8 |
| Schweinfurt | 4 |
| Traunstein | 2 |
| Würzburg | 2 |

Table S2. Real-time PCR, Ct values of samples tested positive for *E. cuculi* DNA

| Rabbit no. | Ct value brain | Ct value kidneys |
|-------------------|-----------------------|-------------------------|
| *9 | 32.91 | 27.67 |
| 66 | - | 30.92 |
| 68 | - | 36.15 |
| 75 | 38.58 | - |
| 79 | 38.50 | - |
| 97 | - | 45.98 |
| 118 | 40.67 | 39.06 |
| 134 | - | 34.40 |
| 155 | 37.66 | - |
| 157 | - | 38.30 |

* sequencing revealed genotype 1

Table S3. Real-time PCR, Ct values of samples tested positive for *E. hellem* DNA

| Rabbit no. | Ct value brain | Ct value kidneys |
|-------------------|-----------------------|-------------------------|
| 97 | - | 42.93 |
| 109 | 44.04 | - |
| 118 | 47.86 | 48.23 |
| 150 | - | 43.03 |

Supplementary Material

2

Figure S1. Agarose gel electrophoresis of the second round of nested PCR II showing specific PCR products of *E. cuniculi* strain (expected size about 0,3 kb)

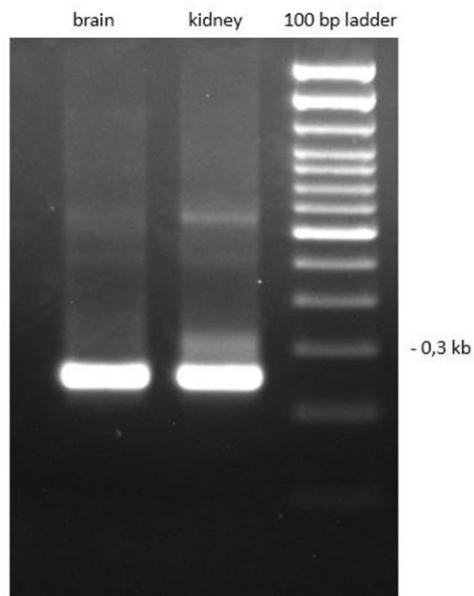
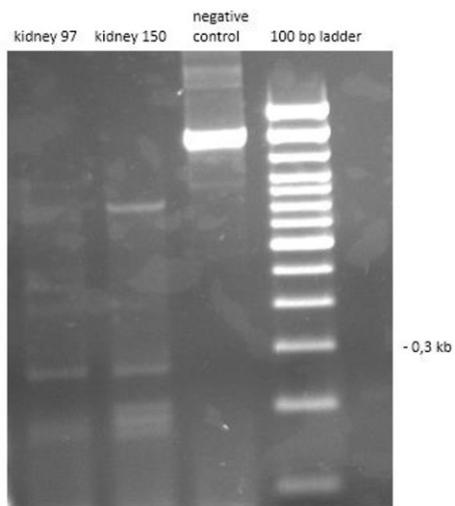


Figure S2. Agarose gel electrophoresis of the second round of nested PCR I showing specific PCR products of *E. hellem* strain (expected size about 0,3 kb)



IV. DISKUSSION

Im Folgenden wird die im Rahmen der vorliegenden Diskussion erstellte Publikation Breuninger et al. (2024) zusätzlich übergreifend diskutiert.

1. Untersuchungsmaterial

1.1. Herkunft der Proben

Die 158 Proben der Studie von Breuninger et al. (2024) stammten von Europäischen Wildkaninchen aus verschiedenen Orten Bayerns. Es konnten alle 7 Regierungsbezirke Bayerns in die Beprobung einbezogen werden. Die Proben verteilten sich auf insgesamt 13 Landkreise (München, Freising, Traunstein, Aichach-Friedberg, Bamberg, Ansbach, Passau, Straubing-Bogen, Schwandorf, Würzburg, Schweinfurt, Eichstätt, Landshut und Regensburg) und 4 kreisfreie Städte (München, Aschaffenburg, Ingolstadt und Erlangen).

Die Verteilung der Proben innerhalb der Regierungsbezirke war ungleichmäßig, was in erster Linie mit dem ebenso unregelmäßigen Vorkommen der Wildkaninchen zusammenhängt. Des Weiteren konnten Proben nur aus denjenigen Gebieten bezogen werden, in denen die Bereitschaft für die Zurverfügungstellung durch die Jagdausübenden bestand.

Wildkaninchen wurden in den letzten Jahren und Jahrzehnten unter anderem durch das Auftreten von seuchenhaft verlaufenden Krankheiten wie der Rabbit Haemorrhagic Disease (RHD) und der Myxomatose deutschlandweit stellenweise stark dezimiert (Greiser et al. 2023). Auch wurde von einigen Jägern das Auftreten von massenhaftem Versterben der Wildkaninchen in den Jagdrevieren während der Durchführung dieser Studie oder in den Jahren zuvor berichtet. Dies hatte mancherorts ein vollständiges Erlöschen der ansässigen Population zur Folge. Zudem liegt uns ein Nachweis über einen RHD 2-Ausbruch kurze Zeit nach der Beprobung in einem der einbezogenen Jagdreviere vor. In Bayern spiegelt sich die verminderte Anzahl der Wildkaninchen im Vergleich zu früheren Zeiten auch anhand der jährlichen Streckenzahlen wider. Die Gesamtjahresstrecke der Wildkaninchen in Bayern betrug laut Statistik des Deutschen Jagdverbands in den Jahren 2020/2021 lediglich 3.240 Tiere (Deutscher Jagdschutz - Verband e.V., Vereinigung der deutschen Landesjagdverbände 2023). Im Vergleich dazu wurden

in den Jahren 1990/1991 noch 27.421 Wildkaninchen erlegt (Deutscher Jagdschutz - Verband e.V., Vereinigung der deutschen Landesjagdverbände 1992).

Die größten Wildkaninchenvorkommen in Deutschland sind im Nordwesten zu verzeichnen (Greiser et al. 2023). Die Tiere bevorzugen leichte, sandige Böden, um ihre Gangsysteme anlegen zu können, wobei sie sich als Kulturfolger auch erfolgreich an das Leben in städtischen Bereichen angepasst haben, auf ihre Gangsysteme verzichten und aufgrund des konstanten Nahrungsangebots gehäuft in Parks, Gärten und Friedhöfen vorzufinden sind (Zimmermann 1991).

Die Verteilung der Proben der aktuellen Studie zeigt eine Ballung für die kreisfreie Stadt München, aus der 54 der insgesamt 158 Proben (34 %) stammten.

Im Vergleich zu einer in Bayern durchgeführten serologischen Studie zu *E. cuniculi* bei Wildkaninchen aus dem Jahre 1988, bei der alle 155 Proben von lediglich zwei Grundstücken im Norden Münchens stammten (Neuwirt 1988), konnte bei der aktuellen Studie eine deutlich weitreichendere Verteilung der Proben erzielt werden, wodurch eine Aussage bezüglich des Vorkommens des Erregers auch in anderen Gebieten Bayerns möglich ist. Aufgrund der teilweise sehr geringen Probenanzahl für einzelne Orte sind die Nachweise aber in diesen Fällen nicht als Prävalenzangaben zu werten. In der bislang zweiten Studie aus Deutschland aus dem Jahre 1996 wurden 100 Wildkaninchen aus verschiedenen Gebieten im Norden Deutschlands (Raum Hannover, Raum Wolfsburg, nördlich von Hamburg, Insel Norderney) untersucht und keines der Wildkaninchen wurde serologisch positiv auf *E. cuniculi* getestet (Meyer-Breckwoldt 1996). Größere, deutschlandweite Studien wären wünschenswert, um mögliche regionale Unterschiede bezüglich des Vorkommens von *E. cuniculi* bei Wildkaninchen zu erfassen.

1.2. Probenentnahme

Von den 158 Wildkaninchen aus Bayern wurden jeweils eine Blutprobe sowie Organproben von Gehirn und Nieren entnommen. Es wurden lediglich Tiere in die Studie einbezogen, von denen sowohl Blut- als auch Organproben vorlagen. Die Probenentnahme erfolgte entweder persönlich vor Ort oder wurde nach entsprechender vorheriger Anleitung durch die Jäger selbst durchgeführt. Die frischen Proben wurden von den Jägern im Durchschnitt innerhalb von 1-3 Tagen übergeben (Breuninger et al. 2024). Da das Gehirn nicht leicht zugänglich ist, wurden bei eigenständiger Probenentnahme durch die Jagdausübenden die Köpfe

der Kaninchen im Ganzen eingereicht und in den Untersuchungsräumen der klinikeigenen Pathologie mittels Trennscheibe geöffnet, um das Gehirn anschließend herauszunehmen. Das Blut wurde aus dem Herz bzw. aus den thorakalen Gefäßen gewonnen. Teilweise wurde Blut direkt aus dem thorakalen oder abdominalen Raum entnommen, wenn es infolge des Abschusses des Tieres zu einer dortigen Blutansammlung durch Zerstörung der Gefäße und Organe kam. Das Blut wurde in 4 ml Serumröhrchen gefüllt und anschließend zentrifugiert. Das gewonnene Serum wurde abpipettiert und für die Antikörperuntersuchung mittels IFAT an das externe Labor SYNLAB.vet GmbH in Augsburg gesandt. Die Organproben wurden in sterile Behälter gegeben und bei – 20 °C bis zur weiteren Untersuchung mittels real-time PCR aufbewahrt (Breuninger et al. 2024).

Aufgrund logistischer Gegebenheiten konnte ein Teil der Proben (46/158) nicht unmittelbar übergeben werden, weshalb die Proben in diesen Fällen vor Ort von den Jägern eingefroren wurden. Im Rahmen des Einfrierens und Auftauens von Tierkörpern bzw. Blutproben kommt es zu einer Hämolyse, wodurch die Probenqualität beeinflusst wird. Diese Problematik ist bei Untersuchungen von Wildtieren häufig gegeben. In der aktuellen Studie konnten jedoch auch aus stark hämolytischen Serumproben erfolgreich Antikörper nachgewiesen werden. Dies stimmt mit anderen Studien überein, in denen festgestellt werden konnte, dass der Nachweis von Antikörpern mittels IFAT aus hämolytischen Proben durchaus möglich ist (Leutenegger et al. 1999; Miller et al. 2002).

Bei einer Untersuchung von Wildkatzenproben mit einem IFAT konnte bei hämolytischen Proben zwar eine verminderte Sensitivität im Vergleich zu Proben von guter Qualität festgestellt werden, welche sich jedoch im Mittel auf weniger als eine Titerstufe beschränkte. Mögliche Abweichungen dürften daher weniger als 10 % betragen (Leutenegger et al. 1999). Bei einer Untersuchung von Seeottern mittels IFAT auf *Toxoplasma gondii*-Antikörper wurde das Testverfahren als geeignet eingestuft und die IFAT-Titer standen nicht in Zusammenhang mit dem Ausmaß der Serumhämolyse (Miller et al. 2002). Im Rahmen einer Testung von Damwildseren auf *Mycobacterium bovis*-Antikörper mit einem ELISA wurde eine verminderte Sensitivität nur bei starker Hämolyse beobachtet (Boadella et al. 2012). In einer Studie zum Suid Herpesvirus 1 konnte festgestellt werden, dass Hämolyse und wiederholte Gefrier-Auftau-Zyklen von Wildschweinseren die ELISA-Testreaktionen beeinflussen können, was zu einer höheren Anzahl fraglicher

Ergebnisse führt (Boadella und Gortázar 2011). Im Gegensatz dazu wurde berichtet, dass Hämolyse und wiederholte Gefrier-Auftauzyklen nur eine geringe Auswirkung auf die erhaltenen Werte der optischen Dichte eines ELISA haben, der mit Hausschweinsereen durchgeführt wurde (Neumann und Bonistalli 2009). Es ist jedoch schwierig zu beurteilen, welcher Faktor am einflussreichsten ist, wenn die Auswirkungen der Hämolyse auf die Testergebnisse in Verbindung mit suboptimalen Lagerungsbedingungen untersucht werden (Casaubon et al. 2013). So hat sich beispielsweise gezeigt, dass eine lange Probenlagerung bei Raumtemperatur die Zahl der falsch negativen Ergebnisse aus Körperflüssigkeiten erhöht, wenngleich sich Antikörper teils auch nach 4 Wochen noch nachweisen ließen (Jakubek et al. 2012). Ähnliche Ergebnisse konnten in einer Studie festgestellt werden, in der die Stabilität von Antikörpern aus Blut- und/oder Gewebeflüssigkeit aus Tierkörpern auch nach 11 Tagen noch gegeben war, jedoch auch in diesem Fall mit einem Anstieg der falsch negativen Ergebnisse mit zunehmender Lagerzeit (Tryland et al. 2006). In einer weiteren Studie wurde der Einfluss der Hämolyse auf serologische Tests bei verschiedenen Wildwiederkäuerarten untersucht. Auch hier wurde ein höheres Risiko falsch negativer Ergebnisse bei der Anwendung hämolytischer Proben geschildert, jedoch wurden die falsch negativen Ergebnisse insgesamt als vernachlässigbar beurteilt (Casaubon et al. 2013).

Hämolytische Proben gelten aufgrund von Zytotoxizität als problematisch für den Serumneutralisationstest (García-Bocanegra et al. 2011). Auch gelten hämolytische und/oder kontaminierte Proben als nicht geeignet für Testverfahren wie beispielsweise den Serumagglutinationstest oder die Komplementbindungsreaktion (Köppel et al. 2007).

Neben falsch negativen Ergebnissen muss auch in Erwägung gezogen werden, dass falsch positive Ergebnisse im Zusammenhang mit hämolytischen Proben auftreten könnten (Bergeron et al. 2017).

1.3. Stichprobenumfang

Insgesamt wurden 158 Wildkaninchen auf *E. cuniculi* und *E. hellem* untersucht. Die Probenanzahl lässt keinen Rückschluss auf die exakte Prävalenz der gesamten bayerischen Wildkaninchenpopulation zu. Die Studie wurde so konzipiert, dass eine Stichprobenmenge gewählt wurde, die für eine vermutete Prävalenz $\geq 2\%$

erforderlich ist, um mit mindestens 95 %iger Sicherheit mindestens ein infiziertes Tier zu erfassen. Der Stichprobenumfang wurde daher mit 149 Wildkaninchen festgelegt; letztlich konnten sogar 158 Wildkaninchen in die Untersuchung einbezogen werden.

Lediglich fünf vorangegangene serologische oder molekulardiagnostische Studien an Wildkaninchen bezüglich *E. cuniculi* weisen höhere Stichprobenmengen auf. So wurde die größte bislang vorgenommene Untersuchung an 823 Wildkaninchen in Australien durchgeführt (Cox et al. 1980). Zu den weiteren Studien mit höheren Stichprobenzahlen zählen eine Studie aus England mit 175 Wildkaninchen (Cox und Ross 1980), eine Studie aus Frankreich mit 204 Wildkaninchen (Chalupský et al. 1990), eine Studie aus Spanien mit 383 Wildkaninchen (Martínez-Padilla et al. 2020) und eine Studie aus Spanien mit 438 Wildkaninchen (Rego et al. 2023). Eine nahezu gleiche Stichprobenmenge wie in der aktuellen Studie weist die ältere der beiden vorherigen Studien aus Deutschland auf, bei der 155 Wildkaninchen untersucht wurden (Neuwirt 1988), wie auch eine Studie aus Italien an Östlichen Baumwollschwanzkaninchen mit 144 untersuchten Individuen (Zanet et al. 2013). Die weiteren bisher an Wildkaninchen durchgeführten Studien umfassen Stichprobenmengen von minimal 3 (Wilson 1979a) bis maximal 100 (Meyer-Breckwolddt 1996) Tieren. Grundsätzlich sollte der Stichprobenumfang jedoch stets im Zusammenhang mit den Prävalenzen beurteilt werden. Bei hohen Prävalenzen können bereits kleine Stichprobenmengen aussagekräftig sein, während bei sehr niedrigen Prävalenzen entsprechend höhere Stichprobenmengen herangezogen werden sollten.

Bezüglich *E. hellem* wurden in der Vergangenheit lediglich drei Studien in Spanien durchgeführt. Zwei der Studien hatten im Vergleich zu der aktuellen Studie höhere Stichprobenmengen mit jeweils 383 (Martínez-Padilla et al. 2020) und 438 (Rego et al. 2023) Wildkaninchen. Eine Studie basiert mit 50 Wildkaninchen (Baz-González et al. 2022) auf einer deutlich geringeren Stichprobenmenge.

2. Untersuchungsmethoden

Für die Untersuchung der Wildkaninchen auf *E. cuniculi* wurde in der vorliegenden Studie eine Antikörperbestimmung von sowohl IgG als auch IgM mittels IFAT durchgeführt. Für *E. hellem* standen für die Routinediagnostik etablierte serologische Nachweisverfahren leider nicht zur Verfügung. Außerdem wurden

Gehirn und Nieren, die Hauptprädispositionsorgane des Erregers, mittels duplex real-time PCR (mit Primern und Sonden für sowohl *E. cuniculi* als auch *E. hellem*) auf DNA der beiden Mikrosporidienarten untersucht. Zur Bestätigung und Genotypisierung wurden bei Proben, welche in der real-time PCR Ct-Werte und sigmoide Kurven ergaben, anschließend nested-PCRs durchgeführt. Eine Sequenzierung von PCR-Produkten der real-time PCR war wegen der geringen Größe der Amplifikate aus technischen Gründen nicht erfolgreich (Daten nicht dargestellt).

Die meisten bisher publizierten Prävalenzstudien bzgl. *E. cuniculi*, sowohl bei domestizierten Kaninchen als auch bei Wildkaninchen, beruhen lediglich auf dem Nachweis von Antikörpern, was vor allem damit zusammenhängt, dass diese Untersuchung am lebenden Tier durchgeführt werden kann. Die Interpretation des Antikörpernachweises allein ist jedoch schwierig, da er im Grunde nur die Exposition gegenüber dem Erreger beweist. Ein positiver Antikörpernachweis kann bei Tieren auftreten, die dem Erreger ausgesetzt waren, die exponiert waren und sich von der Infektion erholt haben, oder die infiziert sind (mit oder ohne klinische Symptome) (Latney et al. 2014). Bei Europäischen Wildkaninchen liegen lediglich drei Prävalenzstudien bezüglich *E. cuniculi* aus Spanien vor, in denen molekularbiologische Methoden (PCR) für den direkten Erregernachweis verwendet wurden (Martínez-Padilla et al. 2020; Baz-González et al. 2022; Rego et al. 2023). Außerdem wurden PCRs bei einer Prävalenzstudie bei Östlichen Baumwollschwanzkaninchen in Italien angewendet (Zanet et al. 2013).

Der IFAT und der ELISA sind gebräuchliche serologische Testverfahren für den Nachweis von Antikörpern gegen *E. cuniculi*. Die Ergebnisse beider Testverfahren korrelieren gut miteinander (Boot et al. 2000). Für die aktuelle Studie wurde der IFAT für die Antikörperbestimmung von IgG und IgM gewählt. Der IFAT gilt als zuverlässiges und einfach durchführbares Testverfahren mit einer hohen Sensitivität (Cox und Pye 1975; Cox und Gallichio 1977; Hein et al. 2014) und Spezifität (Künzel et al. 2014; Cray et al. 2020). Trotzdem kann es in einzelnen Fällen zu falsch-negativen Testergebnissen kommen. Ursächlich könnten eine für eine Serokonversion zu geringe Aufnahme an Sporen sein, eine noch nicht begonnene Antikörperproduktion (Csokai et al. 2009b) oder immunsuppressive Effekte anderer Erkrankungen, welche eine Antikörperproduktion verhindern (Csokai et al. 2009b; Hein et al. 2014). Auch eine Bindung aller Antikörper durch

den Erreger könnte eine Rolle spielen (Hein et al. 2014).

Der Nachweis von IgM-Antikörpern zusätzlich zum Nachweis von IgG-Antikörpern, kann zumindest einen Hinweis auf die Phase einer Infektion des Tieres mit *E. cuniculi* (z. B. frische Infektion versus länger bestehende chronische Phase) liefern (Cox et al. 1979; Kunstýř et al. 1986; Jeklova et al. 2010b). Bisherige Antikörperbestimmungen bei Wildkaninchen basierten überwiegend auf der Testung von IgG-Antikörpern, wodurch möglicherweise Infektionen in der Frühphase, in der lediglich IgM-Antikörper gebildet wurden, unentdeckt blieben.

Für den Nachweis von Erreger-DNA wurde eine real-time PCR verwendet. Real-time oder nested-PCRs werden wegen ihrer meist höheren Sensitivität für den Nachweis aus Organmaterial präferiert (Csokai et al. 2009b; Leipzig et al. 2013). Konventionelle PCRs haben sich jedoch als geeignet für den Nachweis aus der Linse erwiesen (Künzel et al. 2008; Csokai et al. 2009b). Für den Nachweis aus anderweitigem Organmaterial sind sie jedoch meist nicht ausreichend sensitiv (Csokai et al. 2009b). Zu bedenken ist, dass falsch-negative PCR-Ergebnisse aus Organmaterial aufgrund einer sehr geringen Sporenkonzentration und/oder einer ungleichmäßigen Verteilung im zu untersuchenden Gewebe auftreten können. Ein weiterer Grund könnte eine sich noch in der Frühphase befindliche Infektion mit noch geringer Erregerzahl darstellen (Csokai et al. 2009b). Zudem berichteten einige Autoren, dass mit dem Fortschreiten der Erkrankung weniger Sporen des Erregers in den betroffenen Geweben vorhanden sind, was zugleich zu einer geringeren Positivrate führen könnte (Flatt und Jackson 1970; Csokai et al. 2009a).

3. Nachweisraten

3.1. Immunfluoreszenzantikörpertest

Mittels IFAT wurde das Serum der Wildkaninchen auf *E. cuniculi*-Antikörper der Typen IgG und IgM untersucht.

Bei der Untersuchung des Serums der Wildkaninchen konnten bei insgesamt 24 (15,2 %) der 158 Tiere Antikörper gegen *E. cuniculi* nachgewiesen werden (Breuninger et al. 2024). Nachweise von *E. cuniculi*-Antikörpern bei Europäischen Wildkaninchen sind bisher in früheren Studien auch in England (3/3; 100 %) (Wilson 1979a), Deutschland (und zwar im Norden Münchens) (28/155; 18,1 %) (Neuwirt 1988), Frankreich (8/204; 3,9 %) (Chalupský et al. 1990), Australien

(20/81; 24,7 %) (Thomas et al. 1997) und der Slowakai (21/47; 44,7%) (Balent et al. 2004) gelungen. Es ist zu beachten, dass sich die Kaninchen, die in der slowakischen Studie positiv getestet wurden, in menschlicher Obhut befanden, um später in die freie Wildbahn entlassen zu werden (Balent et al. 2004). Dies könnte das Risiko einer Infektion oder auch die Ausbreitung einer bestehenden Infektion erhöht haben, weshalb das Ergebnis möglicherweise nicht auf freilebende Wildkaninchen in dieser Region übertragen werden kann. Bei weiteren Studien in Australien (0/823; 0%) (Cox et al. 1980), Neuseeland (0/57; 0%) (Cox et al. 1980), England (0/175; 0%) (Cox und Ross 1980) und Norddeutschland (0/100; 0%) (Meyer-Breckwoldt 1996) konnten keine *E. cuniculi*-Antikörper detektiert werden. Vergleichbar ist die ermittelte Prävalenz von 15,2 % der aktuellen Studie mit den Ergebnissen der ersten Untersuchung aus München im Jahre 1988, bei der eine Prävalenz von 18,1 % ermittelt werden konnte (Neuwirt 1988).

Bei 12 (50 %) der 24 serologisch auf *E. cuniculi* positiv getesteten Wildkaninchen der aktuellen Studie konnten Antikörper sowohl des Typs IgG als auch IgM nachgewiesen werden. Bei weiteren 10 (41,7 %) seropositiven Wildkaninchen konnten lediglich IgG-Antikörper nachgewiesen werden. Nur bei 2 der 24 seropositiven Tiere (8,3 %) ließen sich ausschließlich IgM-Antikörper feststellen (Breuninger et al. 2024). Dies stimmt mit anderen Studien bei natürlich infizierten domestizierten Kaninchen überein, bei denen der alleinige Nachweis von IgM-Antikörpern am seltensten erfolgte (Jeklova et al. 2010b; Škrbec et al. 2023). Škrbec et al. (2023) konnten in einer aktuellen Studie 160 Kaninchen positiv auf *E. cuniculi*-Antikörper testen. Davon waren insgesamt 74,4 % (119/160) der Tiere sowohl IgG als auch IgM positiv, 22,5 % (36/160) ausschließlich IgG positiv und nur 3,1 % (5/160) der Tiere ausschließlich IgM positiv. Je nach klinischer Manifestation können sich die Angaben hinsichtlich des Nachweises von IgG und IgM unterscheiden. Škrbec et al. (2023) konnten jedoch bei allen untersuchten Tier- bzw. Symptomgruppen (klinisch gesund, neurologische Symptome, Symptome des Harntrakts, Symptome der Augen, Symptome des Gastrointestinaltrakts) am häufigsten IgG und IgM in Kombination nachweisen. Jeklova et al. (2010b) wiesen bei Kaninchen mit neurologischen Symptomen, Augensymptomen und multiplen Symptomen (neurologisch und renal oder neurologisch und okulär) ebenso am häufigsten IgG und IgM kombiniert nach. Bei Kaninchen mit Nierenerkrankungen, anderweitigen Erkrankungen und klinisch gesunden Tieren wurde jedoch am

häufigsten ausschließlich IgG festgestellt (Jeklova et al. 2010b).

Bei den Antikörpernachweisen der aktuellen Studie wurden bei der überwiegenden Anzahl der getesteten Tiere niedrige Antikörpertiter von 1:80 festgestellt. Höhere Titer lagen bei 5 Tieren vor (Breuninger et al. 2024). Diese Beobachtung ähnelt der einer vorangegangenen Studie aus München mit Wildkaninchen, bei der von 28 positiv getesteten Kaninchen 16 Tiere Titer von 1:64 und niedriger, 7 Tiere Titer von 1:128 und lediglich 5 Tiere höhere Titer aufwiesen (Neuwirt 1988). Auch in einer Studie aus Frankreich, bei der 8 von 204 Wildkaninchen seropositiv getestet wurden, hatten 5 dieser 8 seropositiven Tiere niedrige Titer (1:16 bis 1:32), 2 Tiere Titer von 1:256 und nur ein Tier einen höheren Titer von 1:1024 (Chalupský et al. 1990). In einer Studie von Jeklova et al. (2010a), bei der Kaninchen mit geringen und hohen Sporenmengen oral und okulär infiziert wurden, konnte festgestellt werden, dass die Infektion mit einer geringen Sporenmenge zu einer verzögerten und geringen IgG-Antikörperreaktion mit einer reduzierten und statistisch nicht signifikanten IgM-Produktion führt. Eine starke und schnelle Antikörperreaktion konnte hingegen bei der Infektion mit hoher Sporenmenge beobachtet werden (Jeklova et al. 2010a). Ursächlich für die in den Studien überwiegend nachgewiesenen niedrigen Antikörpertiter könnte also ein niedrigerer Infektionsdruck unter den Wildkaninchen sein, da diese eine geringere Populationsdichte im Vergleich zu Haus- oder Laborkaninchen aufweisen könnten, welche oftmals aufgrund von Überbesatz und damit verbundener Urinkontamination viele Sporen des Erregers aufnehmen (Gannon 1980).

In einer Studie bei Wildkaninchen in Australien wurden allerdings durchweg hohe Antikörpertiter festgestellt (Thomas et al. 1997). Dies könnte möglicherweise mit einer höheren Wildkaninchendichte und -infektionsrate zusammenhängen. Bei domestizierten Kaninchen sind überwiegend moderate (1:640–1:2560) oder hohe ($\geq 1:5120$) Antikörpertiter zu beobachten (Csokai et al. 2009b). IgM-Antikörpertiter fallen im Verhältnis zu IgG-Antikörpertitern in der Regel niedriger aus (Cray et al. 2015).

Die Ergebnisse der serologischen Untersuchung zeigen, dass die Wildkaninchen der vorliegenden Studie dem Erreger in einem nicht zu unterschätzenden Ausmaß ausgesetzt waren. Der Erreger könnte durch kontaminierte Futtermittel und/oder Wasser von den Wildkaninchen aufgenommen werden. Die Kontamination könnte

durch Artgenossen, aber auch durch andere Wild- oder Haustiere erfolgen. Dabei wäre es denkbar, dass die Außenhaltung von Hauskaninchen, bei denen der Erreger bekanntermaßen häufig vorkommt, womöglich zu einer Infektion der Wildkaninchen beitragen könnte (Breuninger et al. 2024).

3.2. PCR-Untersuchungen zu *E. cuniculi*

Bei der Untersuchung von Gehirn und Nieren auf *E. cuniculi* mittels real-time PCR ergaben sich bei 10 der 158 Wildkaninchen nach Anwendung der Analysesoftware des Geräts Ct-Werte und sigmoide Kurvenverläufe der Fluoreszenzsignale. Die Ct-Werte lagen zwischen 27,67 und 45,98. Bei 2 der 10 Kaninchen ergaben sich Ct-Werte sowohl von Gehirn- als auch Nierengewebe, bei 3 Kaninchen nur vom Gehirngewebe, bei 5 Kaninchen nur vom Nierengewebe (Breuninger et al. 2024). Studien an Wildkaninchen mit dem Einsatz von molekularbiologischen Untersuchungsmethoden sind bisher rar. In einer Studie aus Spanien konnte in insgesamt 2 von 50 untersuchten Kotproben mittels nested-PCR *E. cuniculi*-DNA nachgewiesen werden. Die positiven Kotproben stammten jedoch von Wildkaninchen, die in landwirtschaftlichen Betrieben gehalten wurden. Die Autoren äußerten daher die Vermutung, dass dieser Umstand einen Einfluss auf den Infektionsstatus der Tiere haben könnte. In derselben Studie konnte *E. cuniculi* in Kotproben von freilebenden Wildkaninchen nicht nachgewiesen werden. Jedoch wurden in 5 dieser Proben andere unbekannte Mikrosporidienarten gefunden (Baz-González et al. 2022). Bei der Bewertung der Ergebnisse zu bedenken ist außerdem, dass die Sporenausscheidung über den Urin und die Faeces intermittierend stattfindet (Cox et al. 1979; Kimura et al. 2013) und somit nicht immer ein Nachweis erfolgen kann, woraus eine nur eingeschränkte Aussagekraft bei der Verwendung von Kot als Untersuchungsmaterial resultiert. Bei zwei weiteren Studien aus Spanien konnte *E. cuniculi* nicht mittels PCR aus Nierengewebe (Martínez-Padilla et al. 2020) oder Kotproben (Rego et al. 2023) nachgewiesen werden. In einer Studie aus Italien wurde *E. cuniculi* bei fast 10 % der untersuchten Östlichen Baumwollschwanzkaninchen durch eine konventionelle PCR in Organproben nachgewiesen. In dieser Studie wurde neben dem Gehirn und den Nieren auch die Skelettmuskulatur auf den Erreger untersucht. Auch hier wurde der Erreger gefunden (Zanet et al. 2013), was ein interessantes Ergebnis im Hinblick auf die potenzielle Möglichkeit einer Infektion von Mensch und Tier durch den Verzehr von Muskelfleisch darstellt. Außerdem konnte bei dieser Studie Erreger-

DNA deutlich häufiger im Gehirn als in den Nieren und der Skelettmuskulatur festgestellt werden (Zanet et al. 2013). Gleiches konnte auch im Rahmen einer Studie an Hauskaninchen festgestellt werden, bei denen Gehirn und Nieren mittels PCR untersucht wurden und der Nachweis aus dem Gehirn, möglicherweise aufgrund einer höheren Sporenkonzentration, häufiger erfolgreich war als aus den Nieren (Csokai et al. 2009b). Andererseits konnte in einer Studie von Leipzig et al. (2013) *E. cuniculi*-DNA nahezu mit gleicher Häufigkeit in Gehirn und Nieren von Hauskaninchen detektiert werden.

In der aktuellen Studie zeigten sich nur bei 2 der 24 serologisch positiven Wildkaninchen Ct-Werte und sigmoide Kurven mittels real-time PCR. Bei 8 Wildkaninchen, bei welchen die real-time PCR positive Reaktionen ergab, konnten keine Antikörper mittels IFAT nachgewiesen werden (Breuninger et al. 2024). Dabei ist zunächst immer an falsch positive Reaktionen zu denken, die bei der PCR durch unspezifische Reaktionen oder durch Kontaminationen entstehen können. Um dies auszuschließen, wurde, wie weiter unten erläutert, eine unabhängige PCR als Bestätigungstest durchgeführt. Wie zuvor unter Absatz 1.2. erläutert, könnten jedoch auch eine für eine Serokonversion zu geringe Aufnahme an Sporen, eine noch nicht begonnene Antikörperproduktion (Csokai et al. 2009b) oder immunsuppressive Effekte anderweitiger Erkrankungen, welche eine Antikörperproduktion verhindern, ursächlich sein (Csokai et al. 2009b; Hein et al. 2014). Auch eine Bindung aller Antikörper durch den Erreger könnte eine Rolle spielen (Hein et al. 2014).

Der Vergleich serologischer und molekularbiologischer Untersuchungsmethoden bei domestizierten Kaninchen basiert oftmals auf IFAT, CIA oder ELISA und der PCR-Untersuchung von Urin oder Liquor (Künzel et al. 2008; Jeklova et al. 2010a; Hein et al. 2014), da diese am lebenden Tier durchführbar sind. Studien, bei denen sowohl eine serologische Untersuchung aus Blut als auch eine PCR von Organmaterial parallel durchgeführt werden, sind daher, insbesondere bei natürlich infizierten Kaninchen, selten. Csokai et al. (2009b) untersuchten in einer Studie Kaninchen unter anderem auf Antikörper mittels IFAT sowie verschiedene Organe (Gehirn, Nieren, Herz, Leber, Lunge, Milz und Augen) mittels nested-PCR auf *E. cuniculi*-DNA. Dabei konnte ein größerer Anteil der Tiere positiv mit dem IFAT als mit der PCR getestet werden (Kaninchen mit klinischem Verdacht auf Encephalitozoonose, n=33, IFAT: 69,7 %, PCR: 63,3 %; Kaninchen ohne klinische

Anzeichen, n=38, IFAT: 50 %, PCR: 42,1%). Die höchsten Nachweisraten wurden mittels histologischer Untersuchung mit Hilfe spezieller Färbeverfahren (Ziehl-Neelsen, säurefeste Trichromfärbung) erreicht. Jedoch erwies sich grundsätzlich bei chronisch infizierten Tieren auch die PCR als geeignete Methode zur Untersuchung von Organen, insbesondere Gehirnen. Alle Kaninchen, bei denen die PCR positiv ausfiel, waren auch serologisch positiv (Csokai et al. 2009b). Im Gegensatz dazu konnte in einer Studie von Baneux und Pognan (2003) ein Kaninchen mittels PCR positiv getestet werden, welches sowohl serologisch als auch histologisch keinen Hinweis auf eine Infektion mit *E. cuniculi* lieferte. Die Einbindung einer histologischen Untersuchung, zusätzlich zu einer Testung mittels PCR, wird von einigen Autoren empfohlen (Csokai et al. 2009b; Leipzig et al. 2013) und könnte bei zukünftigen Untersuchungen auf den Erreger ergänzend angewandt werden.

Die Divergenz der Ergebnisse der beiden angewandten Testverfahren der aktuellen Studie legt nahe, dass die Serologie und der direkte Erregernachweis mittels PCR möglicherweise differenziert betrachtet werden sollten. Vor allem bei Hauskaninchen, bei denen im Rahmen der tierärztlichen Diagnostik lediglich ein Antikörpernachweis möglich ist, sollte dennoch hinterfragt werden, ob das Tier tatsächlich mit dem Erreger infiziert ist oder ob lediglich aufgrund eines bloßen Kontaktes zu dem Erreger Antikörper gebildet wurden, die dann persistiert haben. Jedoch muss, wie bereits unter Absatz 4.2. aufgeführt, berücksichtigt werden, dass die Ergebnisse der PCR-Untersuchung der aktuellen Studie womöglich bei manchen Kaninchen falsch negativ ausfielen, beispielsweise aufgrund einer sehr geringen Sporenkonzentration und/oder einer ungleichmäßigen Verteilung im zu untersuchenden Gewebe oder einer noch in der Frühphase befindlichen Infektion (Csokai et al. 2009b).

3.2.1. Genotypisierung von *E. cuniculi*

Für die Genotypisierung wurden im Anschluss an die real-time PCR nested-PCRs durchgeführt. Die nested-PCRs ergaben bei 7 der 10 Kaninchen, die zuvor Ct-Werte für *E. cuniculi* in der real-time PCR gezeigt hatten, PCR-Produkte der erwarteten Größe. Durch Sequenzierung der PCR-Produkte wurde der *E. cuniculi* Genotyp 1 („Kaninchenstamm“) identifiziert. Die Genotypisierung war bei einem Kaninchen sowohl aus dem Gehirn als auch aus den Nieren erfolgreich (Breuninger et al.

2024).

Weitere Versuche der Genotypisierung von *E. cuniculi* gelangen jedoch nicht. Es könnte sein, dass bei den weiteren Proben Erreger-DNA in zu geringer Menge und/oder Qualität vorgelegen hatte (Breuninger et al. 2024), da die Banden im Agarosegel eher schwach ausgebildet waren. Zudem könnte unspezifischer Hintergrund den direkten Sequenzierungsprozess beeinträchtigt haben.

Bei domestizierten Kaninchen wird der Genotyp 1 von *E. cuniculi* am häufigsten festgestellt. Neben Infektionen mit dem Genotyp I konnten bei Kaninchen in der Vergangenheit jedoch auch natürliche Infektionen mit den Genotypen II und III nachgewiesen werden (Valencakova et al. 2012; Deng et al. 2020). Bei Wildkaninchen wurde eine Genotypisierung bisher nur bei einer Untersuchung in Spanien durchgeführt, die in menschlicher Haltung lebten. Hierbei wurde ebenfalls der Genotyp 1 identifiziert. Für die Untersuchung wurden Kotproben verwendet. Es ist nicht auszuschließen, dass das Leben in Menschenhand einen Risikofaktor für den Erwerb einer *E. cuniculi*-Infektion darstellt. In derselben Untersuchung konnte *E. cuniculi* nicht bei den einbezogenen freilebenden Wildkaninchen festgestellt werden (Baz-González et al. 2022).

Letztlich zeigen die positiven PCR-Nachweise bei 10 der 158 untersuchten Wildkaninchen dennoch, dass auch Wildkaninchen ein Erregerreservoir und somit auch eine potenzielle Infektionsquelle darstellen. Menschen könnten sich durch den Verzehr von Kaninchenfleisch oder -organen infizieren. Gleichermäßen gilt dies auch für Prädatoren. Der Kontakt zu Wildkaninchen, zu deren Fleisch bzw. Organen und Ausscheidungen sollte angesichts der Ergebnisse dieser Studie, insbesondere von immunsupprimierten Menschen, mit Vorsicht und unter Einhaltung gängiger Hygienemaßnahmen, wie beispielsweise dem Tragen von Schutzhandschuhen oder gründlichem Händewaschen, erfolgen. Wildkaninchenfleisch sollte von den betroffenen Personengruppen nur durchgegart verzehrt werden. Für Hauskaninchen und andere Haustiere, welche in Gebieten gehalten werden, in denen Wildkaninchen vorkommen, könnte eine Fütterung mit kontaminiertem Grünfutter eine mögliche Infektionsquelle darstellen (Breuninger et al. 2024).

3.3. PCR-Untersuchungen zu *E. hellem*

Die in der vorliegenden Studie angewandte real-time PCR erlaubt als eine duplex

real-time PCR (mit Primern und Sonden für sowohl *E. cuniculi* als auch *E. hellem*) auch einen Nachweis von *E. hellem*. Dabei ergaben sich bei 4 Wildkaninchen Ct-Werte und sigmoide Kurven für *E. hellem*. Bei einem der Kaninchen sowohl aus Gehirn- als auch Nierengewebe. Bei einem weiteren Kaninchen ausschließlich aus dem Gehirn-, bei zwei Kaninchen ausschließlich aus dem Nierengewebe. Die Ct-Werte lagen zwischen 42,93 und 48,23 (Breuninger et al. 2024).

3.3.1. Genotypisierung von *E. hellem*

Bei 3 der 4 Wildkaninchen, welche in der real-time PCR Ct-Werte für *E. hellem* zeigten, ergaben sich anschließend mittels nested-PCR Produkte der erwarteten Größe, was den Nachweis des Erregers zusätzlich bestätigt. Eine Genotypisierung war jedoch leider nicht möglich, da die Sequenzierungen nur Sequenzen schlechter Qualität ergaben, die nicht auswertbar waren. Möglicherweise lag im Ausgangsmaterial Erreger-DNA in zu geringer Menge und/oder Qualität vor (Breuninger et al. 2024). Die Banden der PCR-Produkte im Agarosegel waren schwach, so dass die Menge vermutlich nicht für eine Sequenzierung ausreichte. Zudem könnte unspezifischer Hintergrund den direkten Sequenzierungsprozess beeinträchtigt haben.

E. hellem wurde zuvor noch nicht bei Kaninchen nachgewiesen. Zukünftige Untersuchungen zu *E. hellem*, sowohl bei Wildkaninchen als auch bei Hauskaninchen, wären wünschenswert, um weitere Erkenntnisse hinsichtlich der Verbreitung des Erregers zu erlangen.

4. Erhobene Tierdaten

Von jedem beprobten Wildkaninchen wurden Daten zu Alter (juvenil/adult), Geschlecht, Herkunftsort und Jahr der Probennahme erhoben. Es konnten keine signifikanten Assoziationen zwischen Geschlecht oder Alter der Kaninchen und den serologischen Nachweisen von *E. cuniculi* festgestellt werden (Breuninger et al. 2024). Eine Auswertung hinsichtlich des Herkunftsortes und des Jahres der Beprobung in Bezug auf die Seropositivität der Kaninchen wurde aufgrund der ungleichmäßigen Probenverteilung nicht durchgeführt. Anhand der Antikörper-Nachweise in den Landkreisen München, Bamberg, Passau, Freising und Eichstätt sowie den kreisfreien Städten München und Ingolstadt konnte jedoch aufgezeigt werden, dass der Erreger in unterschiedlichen Gebieten Bayerns zirkuliert.

In Studien mit domestizierten Kaninchen wurden Korrelationen zwischen dem Infektionsstatus und verschiedenen Daten der untersuchten Tiere oftmals betrachtet. Dabei wurde häufig auch der Kontakt zu Wildkaninchen und anderen (Wild-)Tieren sowie die Haltung und Fütterung als mögliche Infektionsquellen diskutiert. Keeble und Shaw (2006) konnten beispielsweise bei Hauskaninchen keine Korrelation zwischen einem positiven Antikörpertiter und Geschlecht, Alter, Haltung (Innen-/Außenhaltung), Zugang zu Gras oder Kontakt zu Wildkaninchen sowie zu Haustieren feststellen. Hinsichtlich Geschlecht und Alter ergaben sich damit übereinstimmende Ergebnisse auch in anderen Studien (Meyer-Breckwoldt 1996; Okewole 2008; Shin et al. 2014; Berger Baldotto et al. 2015). Andere Studien zeigen wiederum einen signifikanten Einfluss des Alters, wobei ältere Kaninchen im Vergleich zu Jungtieren eine höhere Seroprävalenz aufwiesen (Dipineto et al. 2008; Santaniello et al. 2009; Tee et al. 2011; Lonardi et al. 2013). In einer Studie von Meyer-Breckwoldt (1996) zeigte sich, dass Kaninchen, welche (zeitweise) in Außenhaltung lebten oder Kontakt zu anderen Haustieren hatten, deutlich häufiger infiziert waren. Außerdem erkrankten Hauskaninchen, die Kontakt zu Artgenossen hatten, deutlich häufiger (Meyer-Breckwoldt 1996). Gleiches ergab auch die Studie von Okewole (2008), bei der eine Korrelation zwischen Seropositivität und Kontakt zu Artgenossen oder wildlebenden Tieren festgestellt werden konnte. Eine Fütterung mit Gras hatte keinen Einfluss auf den Infektionsstatus (Okewole 2008). Mäkitaipale et al. (2022) konnten ein höheres Risiko für Seropositivität bei Kaninchen ausmachen, die über den ganzen Sommer uneingeschränkten Zugang ins Freie hatten.

5. Schlussfolgerung

Die Ergebnisse der Studie zeigen, dass sowohl *E. cuniculi* als auch *E. hellem* bei Wildkaninchen in Bayern vorkommen. Die Studie liefert die weltweit erste Genotypisierung von *E. cuniculi* bei freilebenden Wildkaninchen und darüber hinaus den ersten Nachweis von *E. hellem* bei Kaninchen weltweit. Wildkaninchen sollten daher als Reservoir für beide Erreger und, insbesondere bezüglich *E. cuniculi*, aufgrund molekularer Nachweise aus dem Nierengewebe und der vermuteten Urinausscheidung auch als Infektionsquelle für Tiere und Menschen angesehen werden. Für Hauskaninchen besteht die Möglichkeit einer Infektion über Wildkaninchen durch Außenhaltung oder kontaminiertes Frischfutter von Wiesen.

Insbesondere immunsupprimierte Personen (YOPI-Gruppe) sollten bei Kontakt mit Wildkaninchen oder deren Produkten für den menschlichen Verzehr sowie deren Ausscheidungen gängige Hygienemaßnahmen einhalten (Breuninger et al. 2024).

Weitere Studien, die größere Teile Deutschlands abdecken, wären wünschenswert, um tiefere Einblicke in die Verbreitung der Erreger in der Wildkaninchenpopulation zu erhalten.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Encephalitozoon cuniculi und *Encephalitozoon hellem* sind obligat intrazelluläre, sporenbildende Infektionserreger, die den Mikrosporidien angehören.

E. cuniculi ist weltweit vorkommend, weist ein sehr breites Wirtsspektrum auf und wurde bereits bei vielen verschiedenen Säugetierarten, einschließlich Menschen, sowie bei Vögeln nachgewiesen. Der Erreger ist eine wichtige Ursache für ZNS-, Nieren- und Augenerkrankungen, insbesondere bei immungeschwächten Hauskaninchen. Als Zoonoseerreger kann *E. cuniculi* jedoch auch bei immunsupprimierten Menschen Krankheiten verursachen. Das Vorkommen von *E. cuniculi* bei Wildkaninchen und damit die Rolle von Wildkaninchen als Infektionsreservoir für Hauskaninchen, andere Tiere und – über den Verzehr von Kaninchenfleisch – für den Menschen ist weitgehend unbekannt. Darüber hinaus ist die Bedeutung von *E. hellem*, einer nahe verwandten und ebenfalls potentiell zoonotischen Mikrosporidienart, bei Wildkaninchen bislang unklar.

Ziel dieser Studie war es daher, das aktuelle Vorkommen von *E. cuniculi* und *E. hellem* bei Wildkaninchen in Bayern zu untersuchen. Zwischen 2021 und 2023 wurden 158 Wildkaninchen aus verschiedenen Regionen Bayerns beprobt. Das Blutserum jedes Individuums wurde mittels indirektem Immunfluoreszenzantikörpertest auf spezifische *E. cuniculi*-Antikörper untersucht. Darüber hinaus wurden Gehirn- und Nierengewebe mittels speziesspezifischer duplex real-time PCR (mit Primern und Sonden für *E. cuniculi* und *E. hellem*) untersucht. Antikörper gegen *E. cuniculi* wurden bei 24 der 158 (15,2 %) Wildkaninchen nachgewiesen. Bei der real-time PCR ergaben sich bei 10 der 158 (6,3 %) Wildkaninchen Ct-Werte und sigmoide Fluoreszenzkurvenverläufe für *E. cuniculi*. Nachfolgende nested-PCRs bestätigten dies mit Produkten der erwarteten Größe bei 7 dieser 10 Wildkaninchen. Eine Genotypisierung von *E. cuniculi* konnte bei einem Kaninchen erfolgreich durchgeführt werden und ergab den Genotyp 1 sowohl aus Gehirn- als auch Nierengewebe. Weltweit ist dies die erste Genotypisierung von *E. cuniculi* bei freilebenden Wildkaninchen. In der real-time PCR ergaben sich zudem bei 4 der 158 Wildkaninchen Ct-Werte und sigmoide Kurven für *E. hellem*. Bei 3 dieser 4 Wildkaninchen bestätigte sich diese positive Reaktivität in einer nachfolgenden nested-PCR durch Produkte in erwarteter Größe. Die Ergebnisse stellen den ersten Nachweis von *E. hellem* bei Kaninchen überhaupt

dar. Eine Genotypisierung war nicht erfolgreich.

Diese Studie liefert die weltweit erste Genotypisierung von *E. cuniculi* bei Wildkaninchen und darüber hinaus den weltweit ersten Nachweis von *E. hellem* bei Kaninchen. Wildkaninchen sollten daher als Reservoir für beide Erreger und, basierend auf molekularbiologischen Nachweisen aus dem Nierengewebe und der vermuteten Ausscheidung über den Urin, auch als Infektionsquelle für Tiere und Menschen für *E. cuniculi* angesehen werden.

Weitere umfassende Studien, die größere Teile Deutschlands einbeziehen, wären wünschenswert, um die Verbreitung von *E. cuniculi* und *E. hellem* genauer beurteilen zu können und um zu bewerten, inwiefern Wildkaninchen auch in anderen Regionen als Reservoir und potenzielle Infektionsquelle für die Erreger dienen.

VI. SUMMARY

Encephalitozoon cuniculi and *Encephalitozoon hellem* are obligate intracellular, spore-forming infectious agents belonging to the microsporidia. *E. cuniculi* occurs worldwide, has a very broad host spectrum and has already been detected in many different mammal species, including humans, as well as birds. It is an important cause of CNS, kidney and eye diseases, especially in immunocompromised domestic rabbits. However, as a zoonotic pathogen, *E. cuniculi* can also cause disease in immunosuppressed humans. The occurrence of *E. cuniculi* in wild rabbits and thus the role of wild rabbits as an infection reservoir for domestic rabbits, other animals and - via the consumption of rabbit meat - for humans is largely unknown. In addition, the significance of *E. hellem*, a closely related and also potentially zoonotic microsporidia species, in wild rabbits is still unknown.

The aim of this study was therefore to investigate the current occurrence of *E. cuniculi* in wild rabbits in Bavaria. Between 2021 and 2023, 158 wild rabbits from different regions of Bavaria were sampled. The blood serum of each individual was analysed for specific *E. cuniculi* antibodies using an indirect immunofluorescence antibody test. In addition, brain and kidney tissues were analysed using species-specific duplex real-time PCR (with primers for *E. cuniculi* and *E. hellem*). Antibodies against *E. cuniculi* were detected in 24 of the 158 (15.2 %) wild rabbits. Real-time PCR revealed Ct values and sigmoid curves for *E. cuniculi* in 10 of the 158 (6.3 %) wild rabbits. Subsequent nested PCRs confirmed this with products of the expected size in 7 of these 10 wild rabbits. Genotyping was successfully performed on one individual, revealing genotype 1 in both brain and kidney tissue. This is the first time that *E. cuniculi* has been genotyped in free-living wild rabbits worldwide. Unexpectedly, real-time PCR revealed Ct values and sigmoid curves for *E. hellem* in 4 of the 158 wild rabbits. In 3 of these 4 wild rabbits, this was confirmed in the subsequent nested PCR by products of the expected size. The results show the first detection of *E. hellem* in rabbits worldwide. Genotyping was not successful.

This study provides the first genotyping of *E. cuniculi* in wild rabbits worldwide and, in addition, the first detection of *E. hellem* in rabbits worldwide. Wild rabbits should therefore be considered a reservoir for both pathogens and, based on molecular biological evidence from kidney tissue and the suspected excretion via

urine, also as a source of infection for animals and humans for *E. cuniculi*.

Further comprehensive studies involving larger parts of Germany would be desirable in order to be able to assess the distribution of *E. cuniculi* and *E. hellem* more precisely and to evaluate the extent to which wild rabbits also serve as a reservoir and potential source of infection of the pathogens in other regions.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

- Abu-Akkada, S. S.; El Kerdany, E. D. H.; Mady, R. F.; Diab, R. G.; Khedr, G. A. E.; Ashmawy, K. I.; Lotfy, W. M. (2015): Encephalitozoon cuniculi infection among immunocompromised and immunocompetent humans in Egypt. In: *Iranian journal of parasitology* 10 (4), S. 561–570.
- Abu-Akkada, S. S.; Oda, S. S. (2016): Prevention and treatment of Encephalitozoon cuniculi infection in immunosuppressed rabbits with fenbendazole. In: *Iranian Journal of Veterinary Research* 17 (2), S. 98–105.
- Askari, Z.; Mirjalali, H.; Mohebbali, M.; Zarei, Z.; Shojaei, S.; Rezaeian, T.; Rezaeian, M. (2015): Molecular detection and identification of zoonotic microsporidia spore in fecal samples of some animals with close-contact to human. In: *Iranian journal of parasitology* 10 (3), S. 381.
- Asmuth, D. M.; DeGirolami, P. C.; Federman, M.; Ezratty, C. R.; Pleskow, D. K.; Desai, G., Wanke, C. A. (1994): Clinical features of microsporidiosis in patients with AIDS. In: *Clinical Infectious Diseases* 18 (5), S. 819–825.
- Balent, P.; Halanova, M.; Sedlakova, T.; Valencakova, A.; Cislakova, L. (2004): *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbits and laboratory mice in Eastern Slovakia. In: *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 48 (2), S. 113–116.
- Baneux, P. J. R.; Pognan, F. (2003): In utero transmission of Encephalitozoon cuniculi strain type I in rabbits. In: *Laboratory animals* 37 (2), S. 132–138. DOI: 10.1258/00236770360563778.
- Barker, Rosalind J. (1974): Studies on the life cycle and transmission of Encephalitozoon cuniculi. Thesis. University of London, London. Dept. of Zoology and Applied Entomology.
- Barton, Casey E.; Phalen, David N.; Snowden, Karen F. (2003): Prevalence of Microsporidian Spores Shed by Asymptomatic Lovebirds: Evidence for a Potential Emerging Zoonosis. In: *J. Avian Med. Surg.* 17 (4), S. 197–202. DOI: 10.1647/2002-011.
- Bártová, Eva; Marková, Jiřina; Sedlák, Kamil (2015): Prevalence of antibodies to Encephalitozoon cuniculi in European hares (*Lepus europaeus*). In: *Annals of agricultural and environmental medicine* 22 (4), S. 674–676. DOI: 10.5604/12321966.1185773.
- Baz-González, Edgar; Martin-Carrillo, Natalia; García-Livia, Katherine; Abreu-Acosta, Néstor; Foronda, Pilar (2022): Molecular Detection of Microsporidia

- in Rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in Tenerife, Canary Islands, Spain. In: *Biology* 11 (12), S. 1796. DOI: 10.3390/biology11121796.
- Beauvais, B.; Sarfati, C.; Challier, S.; Derouin, F. (1994): In vitro model to assess effect of antimicrobial agents on *Encephalitozoon cuniculi*. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 38 (10), S. 2440–2448.
- Berger Baldotto, Suelen; Cray, Carolyn; Giannico, Amália Turner; Reifur, Larissa; Montiani-Ferreira, Fabiano (2015): Seroprevalence of *Encephalitozoon cuniculi* Infection in Pet Rabbits in Brazil. In: *J. Exot. Pet. Med.* 24 (4), S. 435–440. DOI: 10.1053/j.jepm.2015.08.010.
- Bergeron, H. C.; Glas, P. S.; Schumann, K. R. (2017): Diagnostic specificity of the African swine fever virus antibody detection enzyme-linked immunosorbent assay in feral and domestic pigs in the United States. In: *Transboundary and emerging diseases* 64 (6), S. 1665–1668. DOI: 10.1111/tbed.12717.
- Bigliardi, Elisa; Gatti, Simonetta; Sacchi, Luciano (1997): Ultrastructure of microsporidian spore wall: The *encephalitozoon cuniculi* exospore. In: *Italian Journal of Zoology* 64 (1), S. 1–5. DOI: 10.1080/11250009709356166.
- Bigliardi, Elisa; Sacchi, Luciano (2001): Cell biology and invasion of the microsporidia. In: *Microbes and Infection* 3 (5), S. 373–379. DOI: 10.1016/S1286-4579(01)01393-4.
- Bismanis, J. E. (1970): Detection of latent murine nose matosis and growth of *Nosema cuniculi* in cell cultures. In: *Canadian Journal of Microbiology* 16 (4), S. 237–242.
- Black, S. S.; Steinohrt, L. A.; Bertucci, D. C.; Rogers, L. B.; Didier, E. S. (1997): *Encephalitozoon hellem* in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). In: *Veterinary pathology* 34 (3), S. 189–198. DOI: 10.1177/030098589703400303.
- Blevins, M. (2007): Prevalence of *Encephalitozoon cuniculi* in a population of wild rabbits in Norfolk, England. In: *Zoomed* 7, S. 28–36.
- Boadella, M.; Barasona, J. A.; Diaz-Sanchez, S.; Lyashchenko, K. P.; Greenwald, R.; Esfandiari, J.; Gortazar, C. (2012): Performance of immunochromatographic and ELISA tests for detecting fallow deer infected with *Mycobacterium bovis*. In: *Preventive Veterinary Medicine* 104 (1-2), S.

- 160–164. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2011.10.005.
- Boadella, Mariana; Gortázar, Christian (2011): Effect of haemolysis and repeated freeze-thawing cycles on wild boar serum antibody testing by ELISA. In: *BMC Research Notes* 4 (1), S. 1–4. DOI: 10.1186/1756-0500-4-498.
- Bohne, Wolfgang; Böttcher, Karin; Gross, Uwe (2011): The parasitophorous vacuole of *Encephalitozoon cuniculi*: biogenesis and characteristics of the host cell-pathogen interface. In: *International journal of medical microbiology : IJMM* 301 (5), S. 395–399. DOI: 10.1016/j.ijmm.2011.04.006.
- Boot, R.; Hansen, A. K.; Hansen, C. K.; Nozari, N.; Thuis, H. C. W. (2000): Comparison of assays for antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits. In: *Laboratory animals* 34 (3), S. 281–289.
- Boot, R.; van Knapen, F.; Kruijt, B. C.; Walvoort, H. C. (1988): Serological evidence for *Encephalitozoon cuniculi* infection (nosemiasis) in gnotobiotic guineapigs. In: *Laboratory animals* 22 (4), S. 337–342. DOI: 10.1258/002367788780746296.
- Bose, H. M.; Woodhouse, M. A.; Powell, R. (2015): Absence of *Encephalitozoon cuniculi* antibodies in wild rabbits in England. In: *The Veterinary record* 177 (2), S. 48. DOI: 10.1136/vr.103188.
- Bosschere, H. de; Wang, Z.; Orlandi, P. A. (2007): First diagnosis of *Encephalitozoon intestinalis* and *E. Hellem* in a European brown hare (*Lepus europaeus*) with kidney lesions. In: *Zoonoses Public Health* 54 (3-4), S. 131–134. DOI: 10.1111/j.1863-2378.2007.01034.x.
- Braunfuchsová, P.; Kopecky, J.; Ditrich, O.; Koudela, B. (1999): Cytokine response to infection with the microsporidian, *Encephalitozoon cuniculi*. In: *Folia Parasitol.* 46 (2), S. 91–95.
- Braunfuchsová, Pavlína; Salát, Jiří; Kopecký, Jan (2002): Comparison of the significance of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes in the protection of mice against *Encephalitozoon cuniculi* infection. In: *J. Parasitol.* 88 (4), S. 797–799. DOI: 10.1645/0022-3395(2002)088[0797:COTSOC]2.0.CO;2.
- Braunfuchsová, Pavlína; Salát, Jiří; Kopecký, Jan (2001): CD8⁺ T lymphocytes protect SCID mice against *Encephalitozoon cuniculi* infection. In: *International journal for parasitology* 31 (7), S. 681–686. DOI: 10.1016/S0020-7519(01)00134-5.

- Breuninger, K.; Rinder, M.; Korbel, R. (2024): Occurrence of *Encephalitozoon cuniculi* and *Encephalitozoon hellem* in European wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in Southern Germany (Bavaria). In: *Animals* 14 (1), S. 2880. DOI: 10.3390/ani1419288.
- Brown, James R.; Doolittle, W. Ford (1999): Gene descent, duplication, and horizontal transfer in the evolution of glutamyl- and glutaminyl-tRNA synthetases. In: *Journal of molecular evolution* 49 (4), S. 485–495. DOI: 10.1007/pl00006571.
- Bywater, J. E. C.; Kellett, B. S. (1979): Humoral immune response to natural infection with *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits. In: *Laboratory animals* 13 (4), S. 293–297.
- Cali, A. (1971): Morphogenesis in the genus *Nosema*. In: *Proc. 4th Intern Colloq Insect Pathol. Maryland,* S. 431–438.
- Capella-Gutiérrez, Salvador; Marcet-Houben, Marina; Gabaldón, Toni (2012): Phylogenomics supports microsporidia as the earliest diverging clade of sequenced fungi. In: *BMC biology* 10 (1), S. 1–14. DOI: 10.1186/1741-7007-10-47.
- Casaubon, Julien; Chaignat, Valérie; Vogt, Hans-Rudolf; Michel, Adam O.; Thür, Barbara; Ryser-Degiorgis, Marie-Pierre (2013): Survey of bluetongue virus infection in free-ranging wild ruminants in Switzerland. In: *BMC veterinary research* 9 (1), S. 1–10. DOI: 10.1186/1746-6148-9-166.
- Chalupsky, J.; Bedrník, P.; Vavra, J. (1971): The indirect fluorescent antibody test for *Nosema cuniculi*. In: *Journal of Protozoology* 18 (Supplement 177).
- Chalupský, J.; Vávra, J.; Bedrník, P. (1973): Detection of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits by the indirect immunofluorescent antibody test. In: *Folia Parasitol.* 20 (4), S. 281–284.
- Chalupský, J.; Vávra, J.; Bedrník, P. (1979): Encephalitozoonosis in laboratory animals--a serological survey. In: *Folia Parasitol.* 26 (1), S. 1–8.
- Chalupský, J.; Vávra, J.; Gaudin, J. C.; Vandewalle, P.; Arthur, C. P.; Guenezan, M.; Launay, H. (1990): Serological evidence of the occurrence of encephalitozoonosis and toxoplasmosis in the European wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) in France. In: *Bull. Soc. fr. parasitol.* 8 (1), S. 91–95.
- Couzinet, S.; Cejas, E.; Schittny, J.; Deplazes, P.; Weber, R.; Zimmerli, S. (2000): Phagocytic uptake of *Encephalitozoon cuniculi* by nonprofessional

-
- phagocytes. In: *Infection and immunity* 68 (12), S. 6939–6945. DOI: 10.1128/IAI.68.12.6939-6945.2000.
- Cox, J. C.; Gallichio, H. A. (1977): An evaluation of indirect immunofluorescence in the serological diagnosis of *Nosema cuniculi* infection. In: *Res. Vet. Sci.* 22 (1), S. 50–52. DOI: 10.1016/S0034-5288(18)33311-3.
- Cox, J. C.; Gallichio, H. A. (1978): Serological and histological studies on adult rabbits with recent, naturally acquired encephalitozoonosis. In: *Res. Vet. Sci.* 24 (2), S. 260–261. DOI: 10.1016/S0034-5288(18)33084-4.
- Cox, J. C.; Horsburgh, R.; Pye, D. (1981): Simple diagnostic test for antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* based on enzyme immunoassay. In: *Laboratory animals* 15 (1), S. 41–43. DOI: 10.1258/002367781780958513.
- Cox, J. C.; Pye, D. (1975): Serodiagnosis of nosematosis by immunofluorescence using cell-culture-grown organisms. In: *Laboratory animals* 9 (4), S. 297–304. DOI: 10.1258/002367775780957124.
- Cox, J. C.; Pye, D.; Edmonds, J. W.; Shepherd, R. (1980): An investigation of *Encephalitozoon cuniculi* in the wild rabbit *Oryctolagus cuniculus* in Victoria, Australia. In: *Epidemiol. Infect.* 84 (2), S. 295–300. DOI: 10.1017/s0022172400026796.
- Cox, J. C.; Ross, J. (1980): A serological survey of *Encephalitozoon cuniculi* infection in the wild rabbit in England and Scotland. In: *Res. Vet. Sci.* 28 (3), S. 396. DOI: 10.1016/S0034-5288(18)32734-6.
- Cox, John C.; Hamilton, Ross C.; Attwood, Harold D. (1979): An investigation of the route and progression of *Encephalitozoon cuniculi* infection in adult rabbits. In: *J. Protozool.* 26 (2), S. 260–265. DOI: 10.1111/j.1550-7408.1979.tb02776.x.
- Cray, Carolyn; Liebl, Madisen P.; Arheart, Kristopher; Peschke, Roman; Künzel, Frank; Joachim, Anja (2020): Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and immunofluorescence test for determination of anti-*Encephalitozoon cuniculi* antibodies in sera from rabbits with different clinical and histopathological presentations. In: *J. Exot. Pet. Med.* 32, S. 39–42. DOI: 10.1053/j.jepm.2019.11.003.
- Cray, Carolyn; McKenny, Sarah; Perritt, Emily; Arheart, Kristopher L. (2015): Utility of IgM Titers With IgG and C-Reactive Protein Quantitation in the Diagnosis of Suspected *Encephalitozoon Cuniculi* Infection in Rabbits. In: *J.*

- Exot. Pet. Med.* 24 (3), S. 356–360. DOI: 10.1053/j.jepm.2015.06.017.
- Csokai, Jacqueline; Gruber, Andrea; Künzel, Frank; Tichy, Alexander; Joachim, Anja (2009a): Encephalitozoonosis in pet rabbits (*Oryctolagus cuniculus*): pathohistological findings in animals with latent infection versus clinical manifestation. In: *Parasitology research* 104 (3), S. 629–635. DOI: 10.1007/s00436-008-1239-2.
- Csokai, Jacqueline; Joachim, Anja; Gruber, Andrea; Tichy, Alexander; Pakozdy, Akos; Künzel, Frank (2009b): Diagnostic markers for encephalitozoonosis in pet rabbits. In: *Veterinary parasitology* 163 (1-2), S. 18–26. DOI: 10.1016/j.vetpar.2009.03.057.
- Dalboni, Luciane Costa; Alvares Saraiva, Anuska Marcelino; Konno, Fabiana Toshie de Camargo; Perez, Elizabeth Cristina; Codeceira, Jéssica Feliciano; Spadacci-Morena, Diva Denelle; Lallo, Maria Anete (2021): Encephalitozoon cuniculi takes advantage of efferocytosis to evade the immune response. In: *PloS one* 16 (3), e0247658. DOI: 10.1371/journal.pone.0247658.
- De Groote, M. A.; Visvesvara, G.; Wilson, M. L.; Pieniazek, N. J.; Slemenda, S. B.; daSilva, A. J. et al. (1995): Polymerase chain reaction and culture confirmation of disseminated Encephalitozoon cuniculi in a patient with AIDS: successful therapy with albendazole. In: *Journal of Infectious Diseases* 171 (5), S. 1375–1378.
- Deng, Lei; Chai, Yijun; Xiang, Leiqiong; Wang, Wuyou; Zhou, Ziyao; Liu, Haifeng et al. (2020): First identification and genotyping of *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon* spp. in pet rabbits in China. In: *BMC veterinary research* 16 (1), S. 1–8. DOI: 10.1186/s12917-020-02434-z.
- Deplazes, P.; Mathis, A.; Weber, R. (2000): Epidemiology and zoonotic aspects of microsporidia of mammals and birds. In: *Contributions to microbiology* 6, S. 236–260. DOI: 10.1159/000060363.
- Desoubeaux, Guillaume; Pantin, Ana; Peschke, Roman; Joachim, Anja; Cray, Carolyn (2017): Application of Western blot analysis for the diagnosis of Encephalitozoon cuniculi infection in rabbits: example of a quantitative approach. In: *Parasitology research* 116 (2), S. 743–750. DOI: 10.1007/s00436-016-5343-4.
- Desser, S. S.; Hong, H.; Yang, Y. J. (1992): Ultrastructure of the development of

- a species of *Encephalitozoon* cultured from the eye of an AIDS patient. In: *Parasitology research* 78 (8), S. 677–683. DOI: 10.1007/BF00931520.
- Deutscher Jagdschutz - Verband e.V., Vereinigung der deutschen Landesjagdverbände (1992): DJV - Handbuch Jagd 1992, S. 176.
- Deutscher Jagdschutz - Verband e.V., Vereinigung der deutschen Landesjagdverbände (2023): DJV - Handbuch Jagd 2023.
- Didier, E. S.; Didier, P. J.; Friedberg, D. N.; Stenson, S. M.; Orenstein, J. M.; Yee, R. W. et al. (1991a): Isolation and characterization of a new human microsporidian, *Encephalitozoon hellem* (n. sp.), from three AIDS patients with keratoconjunctivitis. In: *J. Infect. Dis.* 163 (3), S. 617–621. DOI: 10.1093/infdis/163.3.617.
- Didier, E. S.; Orenstein, J. M.; Aldras, A.; Bertucci, D.; Rogers, L. B.; Janney, F. A. (1995a): Comparison of three staining methods for detecting microsporidia in fluids. In: *Journal of clinical microbiology* 33 (12), S. 3138–3145. DOI: 10.1128/jcm.33.12.3138-3145.1995.
- Didier, E. S.; Vossbrinck, C. R.; Baker, M. D.; Rogers, L. B.; Bertucci, C. D.; Shadduck, J. A. (1995b): Identification and characterization of three *Encephalitozoon cuniculi* strains. In: *Parasitology* 111 (4), S. 411–421. DOI: 10.1017/S0031182000065914.
- Didier, Elizabeth S. (1995): Reactive nitrogen intermediates implicated in the inhibition of *Encephalitozoon cuniculi* (phylum Microspora) replication in murine peritoneal macrophages. In: *Parasite immunology* 17 (8), S. 405–412.
- Didier, Elizabeth S.; Weiss, Louis M. (2011): Microsporidiosis: not just in AIDS patients. In: *Current opinion in infectious diseases* 24 (5), S. 490–495. DOI: 10.1097/QCO.0b013e32834aa152.
- Didier, P. J.; Didier, E. S.; Orenstein, J. M.; Shadduck, J. A. (1991b): Fine structure of a new human microsporidian, *Encephalitozoon hellem*, in culture. In: *J. Protozool.* 38 (5), S. 502–507. DOI: 10.1111/j.1550-7408.1991.tb04824.x.
- Dipineto, L.; Rinaldi, L.; Santaniello, A.; Sensale, M.; Cuomo, A.; Calabria, M. et al. (2008): Serological survey for antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in pet rabbits in Italy. In: *Zoonoses Public Health* 55 (3), S. 173–175. DOI: 10.1111/j.1863-2378.2007.01097.x.
- Ditrich, Oleg; Chrdle, Ales; Sak, Bohumil; Chmelík, Václav; Kubále, Jirí;

- Dyková, Iva; Kvác, Martin (2011): Encephalitozoon cuniculi genotype I as a causative agent of brain abscess in an immunocompetent patient. In: *Journal of clinical microbiology* 49 (7), S. 2769–2771. DOI: 10.1128/JCM.00620-11.
- Edlind, Thomas D.; Li, Jing; Visvesvara, Govinda S.; Vodkin, Michael H.; McLaughlin, Gerald L.; Katiyar, Santosh K. (1996): Phylogenetic Analysis of β -Tubulin Sequences from Amitochondrial Protozoa. In: *Molecular phylogenetics and evolution* 5 (2), S. 359–367.
- Edlind, Thomas D.; Visvesvara, Govinda S.; Li, Jing; Katiyar, Santosh K. (1994): Cryptosporidium and microsporidial beta-tubulin sequences: predictions of benzimidazole sensitivity and phylogeny. In: *The Journal of eukaryotic microbiology* 41 (5), S. 38.
- Eröksüz, H.; Eröksüz, Y.; Metin, N.; Özer, H. (1999): Morphologic examinations of cases of naturally acquired encephalitozoonosis in a rabbit colony. In: *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 23 (3), S. 191–196.
- Espinosa, José; Ferreras, M. Carmen; Benavides, Julio; Cuesta, Nerea; Pérez, Claudia; García Iglesias, M. José et al. (2020): Causes of Mortality and Disease in Rabbits and Hares: A Retrospective Study. In: *Animals* 10 (1), S. 158. DOI: 10.3390/ani10010158.
- Ewringmann, A.; Göbel, T. (1999): Untersuchungen zur Klinik und Therapie der Encephalitozoonose beim Heimtierkaninchen. In: *Kleintierpraxis* 44, S. 357–372.
- Fasshauer, Verena; Gross, Uwe; Bohne, Wolfgang (2005): The parasitophorous vacuole membrane of Encephalitozoon cuniculi lacks host cell membrane proteins immediately after invasion. In: *Eukaryotic cell* 4 (1), S. 221–224. DOI: 10.1128/EC.4.1.221-224.2005.
- Fast, N. M.; Logsdon, J. M.; Doolittle, W. F. (1999): Phylogenetic analysis of the TATA box binding protein (TBP) gene from Nosema locustae: evidence for a microsporidia-fungi relationship and spliceosomal intron loss. In: *Molecular biology and evolution* 16 (10), S. 1415–1419. DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026052.
- Fast, Naomi M.; Keeling, P. J. (2001): Alpha and beta subunits of pyruvate dehydrogenase E1 from the microsporidian Nosema locustae: mitochondrion-derived carbon metabolism in microsporidia. In: *Molecular and Biochemical Parasitology* 117 (2), S. 201–209. DOI: 10.1016/S0166-6851(01)00356-5.

- Felchle, L. M.; Sigler, R. L. (2002): Phacoemulsification for the management of Encephalitozoon cuniculi-induced phacoclastic uveitis in a rabbit. In: *Vet. Ophthalmol.* 5 (3), S. 211–215.
- Flatt, R. E.; Jackson, S. J. (1970): Renal nosematosis in young rabbits. In: *Path. Vet.* 7 (6), S. 492–497.
- Franssen, F. F.; Lumeij, J. T.; van Knapen, F. (1995): Susceptibility of Encephalitozoon cuniculi to several drugs in vitro. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 39 (6), S. 1265–1268.
- Franzen, C.; Müller, A.; Hartmann, P.; Salzberger, B. (2005): Cell invasion and intracellular fate of Encephalitozoon cuniculi (Microsporidia). In: *Parasitology* 130 (3), S. 285–292. DOI: 10.1017/s003118200400633x.
- Fuentealba, I. C.; Mahoney, N. T.; Shaddock, J. A.; Harvill, J.; Wicher, V.; Wicher, K. (1992): Hepatic lesions in rabbits infected with Encephalitozoon cuniculi administered per rectum. In: *Veterinary pathology* 29 (6), S. 536–540. DOI: 10.1177/030098589202900608.
- Gannon, J. (1978): The immunoperoxidase test diagnosis of Encephalitozoon cuniculi in rabbits. In: *Laboratory animals* 12 (3), S. 125–127. DOI: 10.1258/002367778780936322.
- Gannon, J. (1980): A survey of *Encephalitozoon cuniculi* in laboratory animal colonies in the United Kingdom. In: *Laboratory animals* 14 (2), S. 91–94. DOI: 10.1258/002367780780942917.
- García-Bocanegra, Ignacio; Arenas-Montes, Antonio; Lorca-Oró, Cristina; Pujols, Joan; González, Miguel Angel; Napp, Sebastián et al. (2011): Role of wild ruminants in the epidemiology of bluetongue virus serotypes 1, 4 and 8 in Spain. In: *Veterinary research* 42, Artikel 88, S. 1–7. DOI: 10.1186/1297-9716-42-88.
- Geck, P. (1971): India-ink immune-reaction for the rapid detection of enteric pathogens. In: *Acta microbiologica Academiae Scientiarum Hungaricae* 18 (3), S. 191–196.
- Germot, Agnès; Philippe, Hervé; Le Guyader, Hervé (1997): Evidence for loss of mitochondria in Microsporidia from a mitochondrial-type HSP70 in *Nosema locustae*. In: *Molecular and Biochemical Parasitology* 87 (2), S. 159–168.
- Giordano, C.; Weigt, A.; Vercelli, A.; Rondena, M.; Grilli, G.; Giudice, C. (2005): Immunohistochemical identification of *Encephalitozoon cuniculi* in

- phacoclastic uveitis in four rabbits. In: *Vet. Ophthalmol.* 8 (4), S. 271–275.
DOI: 10.1111/j.1463-5224.2005.00394.x.
- Goodpasture, Ernest W. (1924): Spontaneous Encephalitis in Rabbits. In: *J. Infect. Dis.* 34 (4), S. 428–432.
- Greiser, G.; Mailänder, A.-S.; Martin, I.; Ponick, W. (2023): Status und Entwicklung ausgewählter Wildtierarten in Deutschland. Jahresbericht 2021. Wildtier-Informationssystem der Länder Deutschlands (WILD). Hg. v. Deutscher Jagdverband. Berlin. Online verfügbar unter https://www.jagdverband.de/sites/default/files/2021-03/2021-03_Broschuere_Wild-Bericht_2019.pdf, zuletzt geprüft am 01.10.2023.
- Halanova, M.; Cislakova, L.; Valencakova, A.; Balent, P.; Adam, J.; Travnicsek, M. (2003): Serological screening of occurrence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in humans and animals in Eastern Slovakia. In: *Annals of agricultural and environmental medicine* 10, S. 117–120.
- Hamilton, R. C.; Cox, J. C. (1981): The ultrastructure of *Encephalitozoon cuniculi* growing in renal tubules of rabbits. In: *Zeitschrift für Parasitenkunde (Berlin, Germany)* 64 (3), S. 271–278. DOI: 10.1007/BF00927374.
- Hamilton, R. C.; Cox, J. C.; Pye, D. (1977): Wall structure of the sporonts of *Encephalitozoon cuniculi* grown in human fibroblasts. In: *Journal of general microbiology* 98 (1), S. 305–307. DOI: 10.1099/00221287-98-1-305.
- Han, Bing; Pan, Guoqing; Weiss, Louis M. (2021): Microsporidiosis in Humans. In: *Clinical microbiology reviews* 34 (4), e0001020. DOI: 10.1128/CMR.00010-20.
- Harcourt-Brown, F. (2002): Textbook of rabbit medicine. Oxford, UK: Butterworth-Heinemann. Online verfügbar unter <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordid=us201300067533>.
- Harcourt-Brown, F. M.; Holloway, H. K. R. (2003): *Encephalitozoon cuniculi* in pet rabbits. In: *Vet. Rec.* 152 (14), S. 427–431. DOI: 10.1136/vr.152.14.427.
- Hein, Jutta; Flock, Ulrike; Sauter-Louis, Carola; Hartmann, Katrin (2014): *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits in Germany: prevalence and sensitivity of antibody testing. In: *Vet. Rec.* 174 (14), S. 350. DOI: 10.1136/vr.102126.
- Hinkle, G.; Morrison, H. G.; Sogin, M. L. (1997): Genes coding for reverse transcriptase, DNA-directed RNA polymerase, and chitin synthase from the microsporidian *Spraguea lophii*. In: *The Biological Bulletin* 193 (2), S. 250–

251. DOI: 10.1086/bblv193n2p250.

- Hinney, Barbara; Sak, Bohumil; Joachim, Anja; Kváč, Martin (2016): More than a rabbit's tale - *Encephalitozoon* spp. in wild mammals and birds. In: *International journal for parasitology: Parasites and wildlife* 5 (1), S. 76–87. DOI: 10.1016/j.ijppaw.2016.01.001.
- Hirt, Robert P.; Healy, Bryan; Vossbrinck, Charles R.; Canning, Elizabeth U.; Embley, T.Martin (1997): A mitochondrial Hsp70 orthologue in *Vairimorpha necatrix* : molecular evidence that microsporidia once contained mitochondria. In: *Current Biology* 7 (12), S. 995–998. DOI: 10.1016/S0960-9822(06)00420-9.
- Hirt, Robert P.; Logsdon, John M.; Healy, Brian; Dorey, Michael W.; Doolittle, W. Ford; Embley, T. Martin (1999): Microsporidia are related to Fungi: evidence from the largest subunit of RNA polymerase II and other proteins. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (2), S. 580–585. DOI: 10.1073/pnas.96.2.580.
- Hollister, W. S.; Canning, E. U. (1987): An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* and its use in determination of infections in man. In: *Parasitology* 94 (2), S. 209–219.
- Horváth, M.; Leng, L.; Stefkovic, M.; Révajová, V.; Halanová, M. (1999): Lethal encephalitozoonosis in cyclophosphamide-treated rabbits. In: *Acta veterinaria Hungarica* 47 (1), S. 85–93. DOI: 10.1556/AVet.47.1999.1.8.
- Iino, Horoaki (1960): Attempt to grow *Encephalitozoon* in tissue cultures. In: *Keio Igaku* 37, S. 339–343.
- Jakubek, Eva-Britt; Mattsson, Roland; Mörner, Torsten; Mattsson, Jens G.; Gavier-Widén, Dolores (2012): Potential application of serological tests on fluids from carcasses: detection of antibodies against *Toxoplasma gondii* and *Sarcoptes scabiei* in red foxes (*Vulpes vulpes*). In: *Acta veterinaria Scandinavica* 54 (13), S. 1–5. DOI: 10.1186/1751-0147-54-13.
- Jass, A.; Matiasek, K.; Hartmann, K.; Kuechenhoff, H.; Fischer, A. (2006): Evaluierung von Liquoruntersuchung und PCR zur Diagnose der Enzephalitozoonose beim Kaninchen. In: *Praktische Tierarzt* 87 (7), S. 518–524. Online verfügbar unter <https://scholar.google.com/citations?user=fjafq8oaaaaj&hl=de&oi=sra>.
- Jass, A.; Matiasek, K.; Henke, J.; Küchenhoff, H.; Hartmann, K.; Fischer, A.

- (2008): Analysis of cerebrospinal fluid in healthy rabbits and rabbits with clinically suspected encephalitozoonosis. In: *The Veterinary record* 162 (19), S. 618–622. DOI: 10.1136/vr.162.19.618.
- Jeklova, E.; Leva, L.; Kovarcik, K.; Matiasovic, J.; Kummer, V.; Maskova, J. et al. (2010a): Experimental oral and ocular *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbits. In: *Parasitology* 137 (12), S. 1749–1757. DOI: 10.1017/S0031182010000648.
- Jeklova, Edita; Jekl, Vladimir; Kovarcik, Kamil; Hauptman, Karel; Koudela, Bretislav; Neumayerova, Helena et al. (2010b): Usefulness of detection of specific IgM and IgG antibodies for diagnosis of clinical encephalitozoonosis in pet rabbits. In: *Veterinary parasitology* 170 (1-2), S. 143–148. DOI: 10.1016/j.vetpar.2010.01.029.
- Jeklova, Edita; Leva, Lenka; Matiasovic, Jan; Ondrackova, Petra; Kummer, Vladimir; Faldyna, Martin (2020): Characterization of humoral and cell-mediated immunity in rabbits orally infected with *Encephalitozoon cuniculi*. In: *Veterinary research* 51 (1), S. 79. DOI: 10.1186/s13567-020-00806-9.
- Jeklová, Edita; Levá, Lenka; Kummer, Vladimír; Jekl, Vladimír; Faldyna, Martin (2019): Immunohistochemical Detection of *Encephalitozoon cuniculi* in Ocular Structures of Immunocompetent Rabbits. In: *Animals* 9 (11), S. 988. DOI: 10.3390/ani9110988.
- Katinka, Michael D.; Duprat, Simone; Cornillot, Emmanuel; Metenier, Guy; Thomarat, Fabienne; Prensier, Gerard et al. (2001): Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. In: *Nature* 414 (6862), S. 450–453.
- Keeble, E. J.; Shaw, D. J. (2006): Seroprevalence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in domestic rabbits in the United Kingdom. In: *The Veterinary record* 158 (16), S. 539–544. DOI: 10.1136/vr.158.16.539.
- Keeble, Emma (2011): Encephalitozoonosis in rabbits – what we do and don't know. In: *In Practice* 33 (9), S. 426–435. DOI: 10.1136/inp.d6077.
- Keeling, Patrick J.; Doolittle, W. F. (1996): Alpha-tubulin from early-diverging eukaryotic lineages and the evolution of the tubulin family. In: *Molecular biology and evolution* 13 (10), S. 1297–1305.
- Kellett, B. S.; Bywater, J. E. (1978): A modified india-ink immunoreaction for the detection of encephalitozoonosis. In: *Laboratory animals* 12 (2), S. 59–60.

DOI: 10.1258/002367778780953189.

- Khan, I. A.; Moretto, M. (1999): Role of gamma interferon in cellular immune response against murine *Encephalitozoon cuniculi* infection. In: *Infection and immunity* 67 (4), S. 1887–1893. DOI: 10.1128/IAI.67.4.1887-1893.1999.
- Khan, I. A.; Schwartzman, J. D.; Kasper, L. H.; Moretto, M. (1999): CD8+ CTLs are essential for protective immunity against *Encephalitozoon cuniculi* infection. In: *The Journal of Immunology* 162 (10), S. 6086–6091.
- Kicia, Marta; Zajączkowska, Żaneta; Kváč, Martin; Cebulski, Kamil; Holubová, Nikola; Wencel, Piotr et al. (2022): *Encephalitozoon cuniculi* and Extraintestinal Microsporidiosis in Bird Owners. In: *Emerging infectious diseases* 28 (3), S. 705–708. DOI: 10.3201/eid2803.211556.
- Kimura, Masami; Aoki, Mikiko; Ichikawa-Seki, Madoka; Matsuo, Kayoko; Yagita, Kenji; Itagaki, Tadashi (2013): Detection and genotype of *Encephalitozoon cuniculi* DNA from urine and feces of pet rabbits in Japan. In: *J. Vet. Med. Sci.* 75 (8), S. 1017–1020. DOI: 10.1292/jvms.12-0567.
- Köppel, C.; Knopf, L.; Ryser, M.-P.; Miserez, R.; Thür, B.; Stärk, K. D. C. (2007): Serosurveillance for selected infectious disease agents in wild boars (*Sus scrofa*) and outdoor pigs in Switzerland. In: *European Journal of Wildlife Research* 53, S. 212–220. DOI: 10.1007/s10344-006-0080-0.
- Kotler, Donald P.; Orenstein, Jan M. (1999): Clinical Syndromes Associated with Microsporidiosis. In: Murray Wittner und Louis M. Weiss (Hg.): *The Microsporidia and Microsporidiosis*. Washington, DC, USA: John Wiley & Sons, Inc, S. 258–292.
- Koudela, B.; Kucerova, S.; Hudcovic, T. (1999): Effect of low and high temperatures on infectivity of *Encephalitozoon cuniculi* spores suspended in water. In: *Folia Parasitol.* 46 (3), S. 171–174.
- Kučerová-Pospíšilová, Z.; Ditrich, O. (1998): The serological surveillance of several groups of patients using antigens of *Encephalitozoon hellem* and *E. cuniculi* antibodies to microsporidia in patients. In: *Folia Parasitol.* 45, S. 108–112.
- Kücken, U.; Dix, B.; Ludwig, E.; Ludwig, H.-J. (1990): Vorkommen von Einzellern im Ejakulat von Besamungsbullen (Kurzmitteilung). In: *Monatshefte für Veterinärmedizin* 45 (3), S. 92.
- Kunstýř, I.; Lev, L.; Naumann, S. (1986): Humoral antibody response of rabbits to

- experimental infection with *Encephalitozoon cuniculi*. In: *Veterinary parasitology* 21 (4), S. 223–232. DOI: 10.1016/0304-4017(86)90048-8.
- Künzel, Frank; Gruber, Andrea; Tichy, Alexander; Edelhofer, Renate; Nell, Barbara; Hassan, Jasmin et al. (2008): Clinical symptoms and diagnosis of encephalitozoonosis in pet rabbits. In: *Veterinary parasitology* 151 (2-4), S. 115–124. DOI: 10.1016/j.vetpar.2007.11.005.
- Künzel, Frank; Joachim, Anja (2010): Encephalitozoonosis in rabbits. In: *Parasitology research* 106 (2), S. 299–309. DOI: 10.1007/s00436-009-1679-3.
- Künzel, Frank; Peschke, Roman; Tichy, Alexander; Joachim, Anja (2014): Comparison of an indirect fluorescent antibody test with Western blot for the detection of serum antibodies against *Encephalitozoon cuniculi* in cats. In: *Parasitology research* 113 (12), S. 4457–4462. DOI: 10.1007/s00436-014-4130-3.
- Kváč, Martin; Tomanová, Vendula; Samková, Eva; Koubová, Jana; Kotková, Michaela; Hlásková, Lenka et al. (2016): *Encephalitozoon cuniculi* in Raw Cow's Milk Remains Infectious After Pasteurization. In: *Foodborne Pathogens and Disease* 13 (2), S. 77–79. DOI: 10.1089/fpd.2015.2036.
- Lainson, R.; Garnham, P. C. C.; Killick-Kendrick, R.; Bird, R. G. (1964): Nosematosis, a Microsporidial Infection of Rodents and Other Animals, Including Man. In: *British medical journal* 2 (5407), S. 470–472. DOI: 10.1136/bmj.2.5407.470.
- Lamalle, Alice; Haverson, Victoria A.; Hughes, Katherine (2023): Renal pathology in wild European rabbits. In: *The Veterinary record* 193 (2), e2948. DOI: 10.1002/vetr.2948.
- Latney, La'Toya V.; Bradley, Charles W.; Wyre, Nicole R. (2014): *Encephalitozoon cuniculi* in pet rabbits: diagnosis and optimal management. In: *Vet. Med. Res. Rep.* 5, S. 169–180. DOI: 10.2147/VMRR.S49842.
- Lee, So-Young; Lee, Sung-Seok; Lyoo, Young S.; Park, Hee-Myung (2011): DNA detection and genotypic identification of potentially human-pathogenic microsporidia from asymptomatic pet parrots in South Korea as a risk factor for zoonotic emergence. In: *Appl. Environ. Microbiol.* 77 (23), S. 8442–8444. DOI: 10.1128/AEM.05343-11.
- Leipig, Miriam; Matiasek, Kaspar; Rinder, Heinz; Janik, Dirk; Emrich, Daniela;

- Baiker, Kerstin; Hermanns, Walter (2013): Value of histopathology, immunohistochemistry, and real-time polymerase chain reaction in the confirmatory diagnosis of *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbits. In: *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* 25 (1), S. 16–26. DOI: 10.1177/1040638712466394.
- Leng, L.; Štefkovič, M.; Révajová, V.; Halanová, M.; Horváth, M. (1999): Lethal encephalitozoonosis in cyclophosphamide-treated rabbits. In: *Acta veterinaria Hungarica* 47 (1), S. 85–93.
- Leutenegger, C. M.; Hofmann-Lehmann, R.; Riols, C.; Liberek, M.; Worel, G.; Lups, P. et al. (1999): Viral infections in free-living populations of the European wildcat. In: *J. Wildl. Dis.* 35 (4), S. 678–686. DOI: 10.7589/0090-3558-35.4.678.
- Levaditi, C.; Nicolau, S.; Schoen, R. (1923a): L'étiologie de l'encéphalite. In: *Les Comptes Rendus de l'Académie des sciences* 39, S. 985–988.
- Levaditi, C.; Nicolau, S.; Schoen, R. (1923b): L'agent étiologique de l'encéphalite épizootique du Lapin (*Encephalitozoon cuniculi*). In: *C. R. Soc. Biol.* 89, S. 984–986.
- Levaditi, C.; Nicolau, S.; Schoen, R. (1924): Etiology of epizootic encephalitis of the rabbit, in its relationships with the experimental study of lethargic encephalitis *Encephalitozoon cuniculi*. In: *N. sp. Ann Inst Pasteur* 38 (8), S. 651–712.
- Levine, D. J.; Riley, D. J.; Jorgensen, J. H.; McClain, W. D.; Tio, F.; Visvesvara, G. S.; Abboud-Werner, S. L. (2013): Key diagnostic features of granulomatous interstitial nephritis due to *Encephalitozoon cuniculi* in a lung transplant recipient. In: *The American journal of surgical pathology* 37 (3), S. 447–452.
- Li, X.; Palmer, R.; Trout, J. M.; Fayer, R. (2003): Infectivity of Microsporidia Spores Stored in Water at Environmental Temperatures. In: *J. Parasitol.* 89 (1), S. 185–188. DOI: 10.1645/0022-3395(2003)089[0185:IOMSSI]2.0.CO;2.
- Lom, Jiri; Vavra, Jiri (1963): The mode of sporoplasm extrusion in microsporidian spores. In: *Acta Protozoologica* 1 (1-13), S. 81–92.
- Lonardi, Chiara; Grilli, Guido; Ferrazzi, Viviana; Dal Cin, Marta; Rigolin,

- Davide; Piccirillo, Alessandra (2013): Serological survey of *Encephalitozoon cuniculi* infection in commercially reared rabbit does in Northern Italy. In: *Res. Vet. Sci.* 94 (2), S. 295–298. DOI: 10.1016/j.rvsc.2012.09.020.
- Lyngset, A. (1980): A survey of serum antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in breeding rabbits and their young. In: *Laboratory Animal Science* 30 (3), S. 558–561.
- Maestrini, Giovanni; Ricci, Emanuele; Cantile, Carlo; Mannella, Riccardo; Mancianti, Francesca; Paci, Gisella et al. (2017): *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits: Serological screening and histopathological findings. In: *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases* 50, S. 54–57. DOI: 10.1016/j.cimid.2016.11.012.
- Magalhães, Tomás Rodrigues; Pinto, Filipe Fontes; Queiroga, Felisbina Luisa (2022): A multidisciplinary review about *Encephalitozoon cuniculi* in a One Health perspective. In: *Parasitology research* 121 (9), S. 2463–2479. DOI: 10.1007/s00436-022-07562-z.
- Mäkitaipale, J.; Järvenpää, E.; Bruce, A.; Sankari, S.; Virtala, A. M.; Näreaho, A. (2022): Seroprevalence of *Encephalitozoon cuniculi* and *Toxoplasma gondii* antibodies and risk-factor assessment for *Encephalitozoon cuniculi* seroprevalence in Finnish pet rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). In: *Acta veterinaria Scandinavica* 64 (1), S. 1–9.
- Marcato, Paolo S.; Rosmini, Roberto (1986): *Patologia del coniglio e della lepre. atlante a colori e compendio*. Bologna, Italy: Società Editrice Esculapio.
- Martínez-Padilla, Anabel; Caballero-Gómez, Javier; Magnet, Ángela; Gómez-Guillamón, Félix; Izquierdo, Fernando; Camacho-Sillero, Leonor et al. (2020): Zoonotic Microsporidia in Wild Lagomorphs in Southern Spain. In: *Animals* 10 (12), S. 2218. DOI: 10.3390/ani10122218.
- Mathews, Amber; Hotard, Anne; Hale-Donze, Hollie (2009): Innate immune responses to *Encephalitozoon* species infections. In: *Microbes and Infection* 11 (12), S. 905–911. DOI: 10.1016/j.micinf.2009.06.004.
- Mathis, A.; Michel, M.; Kuster, H.; Müller, C.; Weber, R.; Deplazes, P. (1997): Two *Encephalitozoon cuniculi* strains of human origin are infectious to rabbits. In: *Parasitology* 114 (1), S. 29–35.
- Mathis, A.; Tanner, I.; Weber, R.; Deplazes, P. (1999): Genetic and phenotypic intraspecific variation in the microsporidian *Encephalitozoon hellem*. In:

-
- International journal for parasitology* 29 (5), S. 767–770. DOI: 10.1016/S0020-7519(99)00025-9.
- Mathis, Alexander; Weber, Rainer; Deplazes, Peter (2005): Zoonotic potential of the microsporidia. In: *Clinical microbiology reviews* 18 (3), S. 423–445. DOI: 10.1128/CMR.18.3.423-445.2005.
- Matsubayashi, H.; Koike, T.; Mikata, I.; Takei, H.; Hagiwara, S. (1959): A case of Encephalitozoon-like body infection in man. In: *A.M.A. archives of pathology* 67 (2), S. 181–187.
- Mc Innes, E. F.; Steward, C. G. (1991): The pathology of subclinical infection of Encephalitozoon cuniculi in canine dams producing pups with overt encephalitozoonosis. In: *Journal of the South African Veterinary Association* 62 (2), S. 51–54.
- Meyer-Breckwoldt, Achim (1996): Epidemiologische und klinische Untersuchungen zur Enzephalitozoonose bei Zwergkaninchen. Inaugural-Dissertation. Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover.
- Miller, M. A.; Gardner, I. A.; Packham, A.; Mazet, J. K.; Hanni, K. D.; Jessup, D. et al. (2002): Evaluation of an indirect fluorescent antibody test (IFAT) for demonstration of antibodies to *Toxoplasma gondii* in the sea otter (*Enhydra lutris*). In: *J. Parasitol.* 88 (3), S. 594–599. DOI: 10.1645/0022-3395(2002)088[0594:EOAIFA]2.0.CO;2.
- Mohindra, A. R.; Lee, M. W.; Visvesvara, G.; Moura, H.; Parasuraman, R.; Leitch, G. J. et al. (2002): Disseminated microsporidiosis in a renal transplant recipient. In: *Transplant Infectious Disease* 4 (2), S. 102–107. DOI: 10.1034/j.1399-3062.2002.01011.x.
- Mohn, S. F.; Ødegaard, Ø. A. (1977): The indirect fluorescent antibody test (IFAT) for the detection of *Nosema cuniculi* antibodies in the blue fox (*Alopex lagopus*). In: *Acta veterinaria Scandinavica* 18 (2), S. 290–292. Online verfügbar unter <https://link.springer.com/content/pdf/10.1186/BF03548458.pdf>, zuletzt geprüft am 28.07.2022.
- Montrey, R. D.; Shadduck, J. A.; Pakes, S. P. (1973): In-vitro study of host range of three isolates of Encephalitozoon (*Nosema*). In: *J. Infect. Dis.* 127 (4), S. 450–454. DOI: 10.1093/infdis/127.4.450.
- Morales, G.; Atzori, C.; Ludovisi, A.; Rossi, P.; Scaglia, M.; Pozio, E. (1995):

- Opportunistic and non-opportunistic parasites in HIV-positive and negative patients with diarrhoea in Tanzania. In: *Tropical medicine and parasitology* 46 (2), S. 109–114.
- Moretto, Magali; Casciotti, Lori; Durell, Brigit; Khan, Imtiaz A. (2000): Lack of CD4+ T cells does not affect induction of CD8+ T-cell immunity against *Encephalitozoon cuniculi* infection. In: *Infection and immunity* 68 (11), S. 6223–6232.
- Moretto, Magali; Weiss, Louis M.; Khan, Imtiaz A. (2004): Induction of a rapid and strong antigen-specific intraepithelial lymphocyte response during oral *Encephalitozoon cuniculi* infection. In: *The Journal of Immunology* 172 (7), S. 4402–4409. DOI: 10.4049/jimmunol.172.7.4402.
- Morsy, Eman Anter; Salem, Heba Mohammed; Khattab, Marwa Salah; Hamza, Dalia Anwar; Abuowarda, Mai Mohammed (2020): *Encephalitozoon cuniculi* infection in farmed rabbits in Egypt. In: *Acta veterinaria Scandinavica* 62 (1), S. 11. DOI: 10.1186/s13028-020-0509-6.
- Müller-Doblies, Uwe Ulex; Herzog, Kathrin; Tanner, Isabelle; Mathis, Alexander; Deplazes, Peter (2002): First isolation and characterisation of *Encephalitozoon cuniculi* from a free-ranging rat (*Rattus norvegicus*). In: *Veterinary parasitology* 107 (4), S. 279–285. DOI: 10.1016/S0304-4017(02)00163-2.
- Nelson, J. B. (1962): An Intracellular Parasite Resembling a Microsporidian Associated with Ascites in Swiss Mice. In: *Experimental Biology and Medicine* 109 (3), S. 714–717.
- Nelson, John B. (1967): Experimental transmission of a murine microsporidian in Swiss mice. In: *Journal of bacteriology* 94 (5), S. 1340–1345.
- Neumann, E. J.; Bonistalli, K. N. (2009): Effect of blood sample handling post-collection on *Erysipelothrix rhusiopathiae* antibody titres. In: *The Veterinary Journal* 180 (3), S. 325–329. DOI: 10.1016/j.tvjl.2008.07.020.
- Neuwirt, Elvira (1988): Ein Beitrag zur Diagnose der *Encephalitozoonose* (Nosematose) beim Kaninchen; Vergleich zwischen direkten und indirekten Nachweismethoden. Inaugural-Dissertation. Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Okewole, E. A. (2008): Seroprevalence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in domestic rabbits in Nigeria. In: *Onderstepoort Journal of Veterinary*

Research 75 (1), S. 33–38.

- Orenstein, J. M.; Russo, P.; Didier, E. S.; Bowers, C.; Bunin, N.; Teachey, D. T. (2005): Fatal pulmonary microsporidiosis due to *encephalitozoon cuniculi* following allogeneic bone marrow transplantation for acute myelogenous leukemia. In: *Ultrastructural pathology* 29 (3-4), S. 269–276. DOI: 10.1080/01913120590951257.
- Ozkan, Ozcan; Karagoz, Alper; Kocak, Nadir (2019): First molecular evidence of ocular transmission of *Encephalitozoonosis* during the intrauterine period in rabbits. In: *Parasitology international* 71, S. 1–4. DOI: 10.1016/j.parint.2019.03.006.
- Özkan, Özcan; Alcigir, Mehmet Eray (2018): Subacute Stage of *Encephalitozoon cuniculi* Infection in Eye Lesions of Rabbit in Turkey. In: *Iranian journal of parasitology* 13 (2), S. 301.
- Özkan, Özcan; Yücesan, Banuçiçek; Babür, Cahit; Orkun, Ömer (2021): Seroprevalence of *Encephalitozoon cuniculi*, *Francisella tularensis* and *Toxoplasma gondii* in Zoonotic Diseases in European Hares (*Lepus europaeus*). In: *Turkiye Parazitol Derg* 45 (3), S. 171–175. DOI: 10.4274/tpd.galenos.2021.7237.
- Pakes, S. P.; Shaddock, J. A.; Olsen, R. G. (1972): A diagnostic skin test for *encephalitozoonosis* (nosematosis) in rabbits. In: *Laboratory Animal Science* 22 (6), S. 870–877. Online verfügbar unter <https://europepmc.org/article/med/4345308>.
- Pakes, Steven P.; Shaddock, J. A.; Cali, Ann (1975): Fine structure of *Encephalitozoon cuniculi* from rabbits, mice and hamsters. In: *J. Protozool.* 22 (4), S. 481–488.
- Pan, Y.; Wang, S.; Liu, X.; Li, R.; Gadahi, J. A. (2015): Seroprevalence of *Encephalitozoon cuniculi* in Humans and Rabbits in China. In: *Iranian journal of parasitology* 10 (2), S. 290–295.
- Petri, Michael (1969): Studies on *Nosema cuniculi* found in transplantable ascites tumours with a survey of microsporidiosis in mammals. In: *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica* 204, S. 1–91. Online verfügbar unter <https://europepmc.org/article/med/4910018>.
- Peyretailade, Eric; Broussolle, V.; Peyret, P.; Méténier, G.; Gouy, M.; Vivares, C. P. (1998): Microsporidia, amitochondrial protists, possess a 70-kDa heat

- shock protein gene of mitochondrial evolutionary origin. 15 (6), S. 683–689.
- Phalen, David N.; Logan, Kathleen S.; Snowden, Karen F. (2006):
Encephalitozoon hellem infection as the cause of a unilateral chronic keratoconjunctivitis in an umbrella cockatoo (*Cacatua alba*). In: *Vet. Ophthalmol.* 9 (1), S. 59–63. DOI: 10.1111/j.1463-5224.2005.00434.x.
- Pospíšilová, Z.; Ditrich, O.; Stanková, M.; Kodym, P. (1997): Parasitic opportunistic infections in Czech HIV-infected patients--a prospective study. In: *Central European journal of public health* 5 (4), S. 208–213.
- Ramshaw, I. A.; Ramsay, A. J.; Karupiah, G.; Rolph, M. S.; Mahalingam, S.; Ruby, J. C. (1997): Cytokines and immunity to viral infections. In: *Immunological reviews* 159 (1), S. 119–135.
- Reetz, J. (1993): Naturally-acquired microsporidia (*Encephalitozoon cuniculi*) infections in hens. In: *Tierärztliche Praxis* 21 (5), S. 429–435.
- Reetz, J. (1994): Natural transmission of microsporidia (*Encephalitozoon cuniculi*) by way of the chicken egg. In: *Tierärztliche Praxis* 22 (2), S. 147–150.
- Rego, Laura; Castro-Scholten, Sabrina; Cano, Carmen; Jiménez-Martín, Débora; Köster, Pamela C.; Caballero-Gómez, Javier et al. (2023): Iberian wild leporidae as hosts of zoonotic enteroparasites in Mediterranean ecosystems of Southern Spain. In: *Zoonoses Public Health* 70 (3), S. 223–237. DOI: 10.1111/zph.13018.
- Ribeiro, M. F. B.; Guimarães, A. M. (1998): *Encephalitozoon*-Like Microsporidia in the Ticks *Amblyomma cajennense* and *Anocentor nitens* (Acari: Ixodidae). In: *Journal of medical entomology* 35 (6), S. 1029–1033.
- Rodríguez-Tovar, Luis E.; Nevárez-Garza, Alicia M.; Trejo-Chávez, Armando; Hernández-Martínez, Carlos A.; Hernández-Vidal, Gustavo; Zarate-Ramos, Juan J.; Castillo-Velázquez, Uziel (2016): *Encephalitozoon cuniculi*: grading the histological lesions in brain, kidney, and liver during primoinfection outbreak in rabbits. In: *Journal of pathogens* (1), S. 5768428. DOI: 10.1155/2016/5768428.
- Rodríguez-Tovar, Luis E.; Villarreal-Marroquín, Alejandra; Nevárez-Garza, Alicia M.; Castillo-Velázquez, Uziel; Rodríguez-Ramírez, Heidi G.; Navarro-Soto, Magda C. et al. (2017): Histochemical study of *Encephalitozoon cuniculi* spores in the kidneys of naturally infected New

- Zealand rabbits. In: *Journal of veterinary diagnostic investigation* 29 (3), S. 269–277. DOI: 10.1177/1040638716668559.
- Sak, Bohumil; Ditrich, Oleg (2005): Humoral intestinal immunity against *Encephalitozoon cuniculi* (Microsporidia) infection in mice. In: *Folia Parasitol.* 52 (1-2), S. 158–162. DOI: 10.14411/fp.2005.020.
- Sak, Bohumil; Vecková, Tereza; Brdíčková, Klára; Smetana, Pavel; Hlásková, Lenka; Kicia, Marta et al. (2019): Experimental *Encephalitozoon cuniculi* Infection Acquired from Fermented Meat Products. In: *Foodborne Pathogens and Disease* 16 (6), S. 394–398. DOI: 10.1089/fpd.2018.2569.
- Salát, J.; Sak, B.; Le, T.; Kopecky, J. (2004): Susceptibility of IFN-gamma or IL-12 knock-out and SCID mice to infection with two microsporidian species, *Encephalitozoon cuniculi* and *E. intestinalis*. In: *Folia Parasitol.* 51 (4), S. 275–282. Online verfügbar unter <https://folia.paru.cas.cz/pdfs/fol/2004/03/01.pdf>, zuletzt geprüft am 18.10.2021.
- Salát, Jirí; Horká, Helena; Sak, Bohumil; Kopecký, Jan (2006): Pure CD4+ T lymphocytes fail to protect perorally infected SCID mice from lethal microsporidiosis caused by *Encephalitozoon cuniculi*. In: *Parasitology research* 99 (6), S. 682–686. DOI: 10.1007/s00436-006-0208-x.
- Salát, Jirí; Jelínek, Jirí; Chmelar, Jindrich; Kopecky, Jan (2008): Efficacy of gamma interferon and specific antibody for treatment of microsporidiosis caused by *Encephalitozoon cuniculi* in SCID mice. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 52 (6), S. 2169–2174. DOI: 10.1128/AAC.01506-07.
- Santaniello, Antonio; Dipineto, Ludovico; Rinaldi, Laura; Menna, Lucia Francesca; Cringoli, Giuseppe; Fioretti, Alessandro (2009): Serological survey of *Encephalitozoon cuniculi* in farm rabbits in Italy. In: *Res. Vet. Sci.* 87 (1), S. 67–69. DOI: 10.1016/j.rvsc.2008.12.008.
- Scharmman, W.; Reblin, L.; Griem, W. (1986): Untersuchungen über die Infektion von Kaninchen durch *Encephalitozoon cuniculi*. In: *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 99 (1), S. 20–24.
- Schmidt, E. C.; Shadduck, J. A. (1983): Murine encephalitozoonosis model for studying the host-parasite relationship of a chronic infection. In: *Infection and immunity* 40 (3), S. 936–942.
- Schottelius, Justus; Schmetz, Christel; Kock, Niko P.; Schüler, Thomas; Sobottka,

- Ingo; Fleischer, Bernhard (2000): Presentation by scanning electron microscopy of the life cycle of microsporidia of the genus *Encephalitozoon*. In: *Microbes and Infection* 2 (12), S. 1401–1406. DOI: 10.1016/S1286-4579(00)01293-4.
- Shadduck, J. A. (1969): *Nosema cuculi*: in vitro isolation. In: *Science* 166 (3904), S. 516–517. DOI: 10.1126/science.166.3904.516.
- Shadduck, John A.; Pakes, Steven P. (1971): Encephalitozoonosis (Nosematosis) and Toxoplasmosis. In: *American Journal of Pathology* 64 (3), S. 657–671.
- Shadduck, John A.; Watson, William T.; Pakes, Steven P.; Cali, Ann (1979): Animal Infectivity of *Encephalitozoon cuculi*. In: *The Journal of Parasitology* 65 (1), S. 123–129.
- Shin, Jin-Cheol; Kim, Dae-Geun; Kim, Sang-Hun; Kim, Suk; Song, Kun-Ho (2014): Seroprevalence of *Encephalitozoon cuculi* in pet rabbits in Korea. In: *The Korean journal of parasitology* 52 (3), S. 321–323. DOI: 10.3347/kjp.2014.52.3.321.
- Sieg, Jessica; Hein, Jutta; Jass, Ariane; Sauter-Louis, Carola; Hartmann, Katrin; Fischer, Andrea (2012): Clinical evaluation of therapeutic success in rabbits with suspected encephalitozoonosis. In: *Veterinary parasitology* 187 (1-2), S. 328–332. DOI: 10.1016/j.vetpar.2011.12.014.
- Singh, M.; Kane, G. J.; Mackinlay, L. (1982): Detection of antibodies to *Nosema cuculi* (Protozoa: Microsporida) in human and animal sera by the indirect fluorescent antibody technique. In: *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 13 (1), S. 110–113.
- Škrbec, Maruša; Dovč, Alenka; Hrženjak, Nina Mlakar; Slavec, Brigita; Žlabravec, Zoran; Kočar, Nina et al. (2023): *Encephalitozoon cuculi* Infection of Domestic Rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in Slovenia between 2017 and 2021. In: *Pathogens* 12 (4), S. 516. DOI: 10.3390/pathogens12040516.
- Smith, Theobald; Florence, Laura (1925): *Encephalitozoon cuculi* as a kidney parasite in the rabbit. In: *J Exp Med.* 41 (1), S. 25–35.
- Snowden, Karen; Phalen, David N. (2004): *Encephalitozoon* infection in birds. In: *Semin. Avian. Exot. Pet. Med* 13 (2), S. 94–99. DOI: 10.1053/j.saep.2004.01.005.
- Sobottka, Ingo; Bartscht, Katrin; Schäfer, Peter; Weitzel, Thomas; Schottelius,

- Justus; Kock, Nico; Laufs, Rainer (2002): In vitro activity of polyoxin D and nikkomycin Z against *Encephalitozoon cuniculi*. In: *Parasitology research* 88 (5), S. 451–453. DOI: 10.1007/s00436-002-0592-9.
- Sokolova, Olga I.; Demyanov, Anton V.; Bowers, Lisa C.; Didier, Elizabeth S.; Yakovlev, Alexei V.; Skarlato, Sergei O.; Sokolova, Yuliya Y. (2011): Emerging microsporidian infections in Russian HIV-infected patients. In: *Journal of clinical microbiology* 49 (6), S. 2102–2108. DOI: 10.1128/JCM.02624-10.
- Sprague, V.; Becnel, J. J. (1998): Note on the Name-Author-Date Combination for the Taxon MICROSPORIDIES Balbiani, 1882, When Ranked as a Phylum. In: *Journal of invertebrate pathology* 71 (1), S. 91–94. DOI: 10.1006/jipa.1997.4702.
- Sprague, V.; Becnel, J. J.; Hazard, E. I. (1992): Taxonomy of phylum microspora. In: *Critical reviews in microbiology* 18 (5-6), S. 285–395. DOI: 10.3109/10408419209113519.
- Sprague, Victor; Vernick, Sanfor H. (1971): The Ultrastructure of *Encephalitozoon cuniculi* (Microsporida, Nosematidae) and its Taxonomic Significance* 18 (4), S. 560–569.
- Stentiford, G. D.; Becnel, J. J.; Weiss, L. M.; Keeling, P. J.; Didier, E. S.; Williams, B. A. P. et al. (2016): Microsporidia - Emergent Pathogens in the Global Food Chain. In: *Trends in parasitology* 32 (4), S. 336–348. DOI: 10.1016/j.pt.2015.12.004.
- Suter, C.; Müller-Doblies, U. U.; Hatt J-M.; Deplazes, P. (2001): Prevention and treatment of *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbits with fenbendazole. In: *The Veterinary record* 148 (15), S. 478–480. DOI: 10.1136/vr.148.15.478.
- Talabani, Hana; Sarfati, Claudine; Pillebout, Evangeline; van Gool, Tom; Derouin, Francis; Menotti, Jean (2010): Disseminated infection with a new genovar of *Encephalitozoon cuniculi* in a renal transplant recipient. In: *Journal of clinical microbiology* 48 (7), S. 2651–2653. DOI: 10.1128/JCM.02539-09.
- Teachey, D. T.; Russo, P.; Orenstein, J. M.; Didier, E. S.; Bowers, C.; Bunin, N. (2004): Pulmonary infection with microsporidia after allogeneic bone marrow transplantation. In: *Bone marrow transplantation* 33 (3), S. 299–302.

DOI: 10.1038/sj.bmt.1704327.

- Tee, Kai-Yee; Kao, Ju-Po; Chiu, Hsin-Yu; Chang, Ming-Huang; Wang, Jiann-Hsiung; Tung, Kwong-Chung et al. (2011): Serological survey for antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits in Taiwan. In: *Veterinary parasitology* 183 (1-2), S. 68–71. DOI: 10.1016/j.vetpar.2011.06.011.
- Texier, Catherine; Vidau, Cyril; Viguès, Bernard; El Alaoui, Hicham; Delbac, Frédéric (2010): Microsporidia: a model for minimal parasite-host interactions. In: *Current opinion in microbiology* 13 (4), S. 443–449. DOI: 10.1016/j.mib.2010.05.005.
- Thomas, C.; Finn, M.; Twigg, L.; Deplazes, P.; Thompson, R. C. (1997): Microsporidia (*Encephalitozoon cuniculi*) in wild rabbits in Australia. In: *Australian veterinary journal* 75 (11), S. 808–810. DOI: 10.1111/j.1751-0813.1997.tb15658.x.
- Thompson, R. C. Andrew (2013): Parasite zoonoses and wildlife: One Health, spillover and human activity. In: *International journal for parasitology* 43 (12-13), S. 1079–1088. DOI: 10.1016/j.ijpara.2013.06.007.
- Tryland, Morten; Handeland, Kjell; Bratberg, Anna-Marie; Solbakk, Inge-Tom; Oksanen, Antti (2006): Persistence of antibodies in blood and body fluids in decaying fox carcasses, as exemplified by antibodies against *Microsporum canis*. In: *Acta veterinaria Scandinavica* 48 (1), S. 1–4. DOI: 10.1186/1751-0147-48-10.
- Undeen, Albert H. (1990): A proposed mechanism for the germination of microsporidian (Protozoa: Microspora) spores. In: *Journal of Theoretical Biology* 142 (2), S. 223–235. DOI: 10.1016/S0022-5193(05)80223-1.
- Undeen, Albert H.; Vander Meer, Robert K. (1999): Microsporidian intrasporal sugars and their role in germination. In: *Journal of invertebrate pathology* 73 (3), S. 294–302. DOI: 10.1006/jipa.1998.4834.
- Valencakova, A.; Balent, P.; Petrovova, E.; Novotny, F.; Luptakova, L. (2008): Encephalitozoonosis in household pet Nederland Dwarf rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). In: *Veterinary parasitology* 153 (3-4), S. 265–269. DOI: 10.1016/j.vetpar.2008.01.047.
- Valencakova, A.; Revajova, V.; Balent, P.; Lesnik, F.; Levkut, M. (2003): Immunosuppressive effect of *Encephalitozoon cuniculi*. In: *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 47, S. 113–120.

- Valencakova, Alexandra; Balent, Pavol; Ravaszova, Petra; Horak, Ales; Obornik, Miroslav; Halanova, Monika et al. (2012): Molecular identification and genotyping of Microsporidia in selected hosts. In: *Parasitology research* 110 (2), S. 689–693. DOI: 10.1007/s00436-011-2543-9.
- Vávra, J.; Bedrník, P.; Cinátl, J. (1972): Isolation and in vitro cultivation of the mammalian microsporidian *Encephalitozoon cuniculi*. In: *Folia Parasitol.* 19 (4), S. 349–354.
- Vávra, Jiří (1976): Development of the Microsporidia. In: Lee A. Bulla und Thomas C. Cheng (Hg.): *Biology of the Microsporidia*. Boston, MA, s.l.: Springer US (Comparative Pathobiology, 1), S. 87–109.
- Vávra, Jiří; Larsson, J. I. Ronny (1999): Structure of the Microsporidia. In: Murray Wittner und Louis M. Weiss (Hg.): *The Microsporidia and Microsporidiosis*. Washington, DC, USA: John Wiley & Sons, Inc, S. 7–84.
- Vecková, T.; Sak, B.; Samková, E.; Holubová, N.; Kicia, M.; Zajaczkowska, Ž. et al. (2021): Raw Goat's Milk, Fresh and Soft Cheeses as a Potential Source of *Encephalitozoon cuniculi*. In: *Foodborne Pathogens and Disease* 18 (9), S. 661–667.
- Visvesvara, Govinda S.; Leitch, Gordon J.; Pieniazek, Norman J. (1999): *Encephalitozoon cuniculi*: Light and Electron Microscopic Evidence for Di-, Tetra-, and Octosporous Sporogony and a Note on the Molecular Phylogeny of *Encephalitozoonidae*. In: *Journal of Eukaryotic Microbiology* 46 (2), S. 110–115.
- Vivarès, Christian P.; Méténier, Guy (2001): The microsporidian *Encephalitozoon*. In: *Bioessays* 23 (2), S. 194–202. DOI: 10.1002/1521-1878(200102)23:2<194::AID-BIES1027>3.0.CO;2-D.
- Vossbrinck, C. R.; Baker, M. D.; Didier, E. S.; Debrunner-Vossbrinck, B. A.; Shadduck, J. A. (1993): Ribosomal DNA sequences of *Encephalitozoon hellem* and *Encephalitozoon cuniculi*: species identification and phylogenetic construction. In: *J Eukaryotic Microbiology* 40 (3), S. 354–362. DOI: 10.1111/j.1550-7408.1993.tb04928.x.
- Waller, T. (1975): Growth of *Nosema cuniculi* in established cell lines. In: *Laboratory animals* 9 (1), S. 61–68. DOI: 10.1258/002367775780994835.
- Waller, T. (1977): The india-ink immunoreaction: a method for the rapid diagnosis of encephalitozoonosis. In: *Laboratory animals* 11 (2), S. 93–97.

- Waller, T. (1979): Sensitivity of *Encephalitozoon cuniculi* to various temperatures, disinfectants and drugs. In: *Laboratory animals* 13 (3), S. 227–230. DOI: 10.1258/002367779780937753.
- Waller, T.; Morein, B.; Fabiansson, E. (1978): Humoral immune response to infection with *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits. In: *Laboratory animals* 12 (3), S. 145–148. DOI: 10.1258/002367778780936331.
- Weber, R.; Deplazes, P.; Flepp, M.; Mathis, A.; Baumann, R.; Sauer, B. et al. (1997): Cerebral microsporidiosis due to *Encephalitozoon cuniculi* in a patient with human immunodeficiency virus infection. In: *The New England journal of medicine* 336 (7), S. 474–478. DOI: 10.1056/NEJM199702133360704.
- Weber, R.; Schwartz, D. A.; Deplazes, P. (1999): Laboratory diagnosis of microsporidiosis. In: Murray Wittner und Louis M. Weiss (Hg.): *The Microsporidia and Microsporidiosis*. Washington, DC, USA: John Wiley & Sons, Inc, S. 315–362.
- Weber, Rainer; Bryan, Ralph T.; Owen, Robert L.; Wilcox, C. Mel; Gorelkin, Leo; Visvesvara, Govinda S.; & Enteric Opportunistic Infections Working Group (1992): Improved Light-Microscopical Detection of Microsporidia Spores in Stool and Duodenal Aspirates. In: *New England Journal of Medicine* 326 (3), S. 161–166.
- Weidner, E.; Byrd, W. (1982): The microsporidian spore invasion tube. II. Role of calcium in the activation of invasion tube discharge. In: *The Journal of cell biology* 93 (3), S. 970–975.
- Weidner, Earl (1972): Ultrastructural study of microsporidian invasion into cells. In: *Zeitschrift für Parasitenkunde* 40 (3), S. 227–242.
- Weiser, Jaroslav (1964): On the taxonomic position of the genus *Encephalitozoon* Levaditi, Nicolau & Schoen, 1923 (Protozoa: Microsporidia). In: *Parasitology* 54 (4), S. 749–751. DOI: 10.1017/s0031182000082755.
- Weitzel, T.; Wolff, M.; Dabanch, J.; Levy, I.; Schmetz, C.; Visvesvara, G. S.; Sobottka, I. (2001): Dual microsporidial infection with *Encephalitozoon cuniculi* and *Enterocytozoon bieneusi* in an HIV-positive patient. In: *Infection* 29 (4), S. 237–239. DOI: 10.1007/s15010-001-1164-0.
- Wicher, V.; Baughn, R. E.; Fuentealba, C.; Shadduck, J. A.; Abbruscato, F.; Wicher, K. (1991): Enteric infection with an obligate intracellular parasite,

- Encephalitozoon cuniculi, in an experimental model. In: *Infection and immunity* 59 (7), S. 2225–2231.
- Wilczyńska, Anna; Komsta, Renata; Szadkowski, Mateusz; Ziętek, Jerzy; Adaszek, Łukasz (2023): Prevalence of Encephalitozoon cuniculi Infection in Guinea Pigs (*Cavia porcellus*) in Poland with Different Clinical Disorders-A Pilot Study. In: *Animals : an open access journal from MDPI* 13 (12), S. 1992. DOI: 10.3390/ani13121992.
- Wilson, J. M. (1979a): *Encephalitozoon cuniculi* in wild European rabbits and a fox. In: *Res. Vet. Sci.* 26 (1), S. 114. DOI: 10.1016/S0034-5288(20)30954-1.
- Wilson, J. M. (1979b): The biology of *Encephalitozoon cuniculi*. In: *Medical Biology* 57, S. 84–101.
- Wolfer, J.; Grahn, B.; Wilcock, B.; Percy, D. (1993): Phacoclastic uveitis in the rabbit. In: *Progress in Veterinary and Comparative Ophthalmology* 3 (3), S. 92–97.
- Wosu, N. J.; Olsen, R.; Shaddock, J. A.; Koestner, A.; Pakes, S. P. (1977): Diagnosis of Experimental Encephalitozoonosis in Rabbits by Complement Fixation. In: *Journal of Infectious Diseases* 135 (6), S. 944–948.
- Wright, J. Homer; Craighead, Eugene M. (1922): Infectious motor paralysis in young rabbits. In: *J Exp Med.* 36, S. 135–140.
- Xiao, L.; Li, L.; Moura, H.; Sulaiman, I.; Lal, A. A.; Gatti, S. et al. (2001a): Genotyping *Encephalitozoon hellem* isolates by analysis of the polar tube protein gene. In: *Journal of clinical microbiology* 39 (6), S. 2191–2196. DOI: 10.1128/jcm.39.6.2191-2196.2001.
- Xiao, L.; Li, L.; Visvesvara, G. S.; Moura, H.; Didier, E. S.; Lal, A. A. (2001b): Genotyping *Encephalitozoon cuniculi* by multilocus analyses of genes with repetitive sequences. In: *Journal of clinical microbiology* 39 (6), S. 2248–2253. DOI: 10.1128/jcm.39.6.2248-2253.2001.
- Yee, R. W.; Tio, F. O.; Martinez, J. A.; Held, K. S.; Shaddock, J. A.; Didier, E. S. (1991): Resolution of microsporidial epithelial keratopathy in a patient with AIDS. In: *Ophthalmology* 98 (2), S. 196–201. DOI: 10.1016/S0161-6420(91)32331-5.
- Yost, D. H. (1958): Encephalitozoon infection in laboratory animals. In: *Journal of the National Cancer Institute* 20 (5), S. 957–963.
- Zanet, S.; Palese, V.; Trisciuglio, A.; Cantón Alonso, C.; Ferroglio, E. (2013):

Encephalitozoon cuniculi, *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infection in invasive Eastern Cottontail Rabbits *Sylvilagus floridanus* in Northwestern Italy. In: *Veterinary parasitology* 197 (3-4), S. 682–684. DOI: 10.1016/j.vetpar.2013.05.014.

Zimmermann, H.-J. (1991): Das Wildkaninchen. In: A. Schmitt (Hg.): Natur neu entdeckt: Naturfilmer und Naturforscher berichten. Basel, S. 60–67.

VIII. DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei all denjenigen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Korbelt, der mir ermöglicht hat, mein Wunschthema zu bearbeiten und mich jederzeit bei der Umsetzung unterstützt hat.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich außerdem bei Frau Prof. Rinder für die großartige fachliche Unterstützung bei der Laborarbeit und die sehr hilfreichen Gespräche.

Vielen Dank an die Mitarbeiterinnen aus der Virologie und Pathologie, besonders Miriam Schiller, Nadja Scheidewig und Theresa Isermenger, für die hilfreiche Unterstützung bei der Vorbereitung und Untersuchung der Proben. Mein Dank geht außerdem an Sophie Rechenbach für die schöne gemeinsame Zeit an der Klinik und die Hilfe bei der Bildbearbeitung.

Für die Unterstützung bei der Probenbeschaffung möchte ich mich bei allen beteiligten Jägerinnen und Jägern herzlich bedanken. Mein besonderer Dank gilt zudem der Akademie für Jagd und Natur für die finanzielle Förderung des Projekts. Für sein persönliches Engagement möchte ich außerdem Herrn Dr. Reddemann ein großes Dankeschön aussprechen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dr. Schwarze der SYNLAB.vet GmbH, für die sehr freundlichen und hilfreichen Telefonate sowie ihr großes Interesse an dem Projekt.

Meiner Familie, W. und meinen Freunden, die mich immer ermutigt und unterstützt haben, möchte ich besonders danken, da ohne sie das Studium und die Dissertation nicht möglich gewesen wären. Ein großes Dankeschön geht an dieser Stelle an meine Mutter, deren unvergleichliche Tierliebe mich im Laufe meines Lebens geprägt hat und ohne die ich vermutlich nicht denselben beruflichen Werdegang eingeschlagen hätte.