

Aus dem Department für Pathobiologie
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Institut für Parasitologie
(Leiterin: Univ.Prof. Dr.med.vet. Anja Joachim)

**Etablierung einer PCR zum Nachweis von *Enterocytozoon bieneusi*
in Krähenvögeln**

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von

Gregor Geisler

Wien, im Juli, 2020

Betreuerin: Dr. med. vet. Barbara Hinney, DipEVPC

Institut für Parasitologie

Department für Pathobiologie

Veterinärmedizinische Universität Wien

BegutachterIn: Ao. Univ. Prof. Dr. med. vet. Alexandra Scope

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung und Fragestellung.....	1
2. Literaturübersicht.....	3
2.1. Taxonomie und Systematik von <i>E. bieneusi</i>	3
2.2. Biologie von <i>E. bieneusi</i>	3
2.3. Verbreitung von <i>E. bieneusi</i>	5
2.3.1. <i>E. bieneusi</i> bei Vögeln.....	5
2.3.2. <i>E. bieneusi</i> bei anderen Tiergruppe.....	9
2.3.3. <i>E. bieneusi</i> beim Menschen.....	10
2.3.4. <i>E. bieneusi</i> als Zoonoseerreger.....	11
2.4. Nachweismethoden für Enterocytozoon.....	12
2.4.1. Elektronenmikroskopischer Nachweis.....	12
2.4.2. Lichtmikroskopischer Nachweis.....	12
2.4.3. Zellkulturtechnischer Nachweis.....	13
2.4.4. Molekularbiologischer Nachweis.....	13
2.5. Krähenvögel in Österreich.....	13
2.5.1. In Österreich vorkommende Krähenvögel und deren Verbreitung.....	13
2.5.2. In Wien vorkommende Krähenvögel.....	14
3. Material und Methodik.....	16
3.1. Art und Herkunft des Tiermaterials.....	16
3.2. Methodik.....	16
3.2.1. Sektion und Organentnahme.....	16
3.2.2. DNA-Isolation & Konzentrationsbestimmung.....	16
3.2.3. Vorversuche zur Modifikation der PCR I.....	18
3.2.4. Gelelektrophorese.....	19
3.2.5. Vorversuche zur Modifikation der PCR II.....	20
3.2.6. Modifikation der PCR.....	22
3.2.7. PCR des Tiermaterials mit modifizierter Variante.....	24
4. Ergebnis und Auswertung.....	25
4.1. Differenzierung des Probematerials.....	25
4.2. Etablierung der PCR.....	25
4.3. Untersuchung des Probematerials.....	26
5. Diskussion.....	27

6. Zusammenfassung.....	30
7. Summary.....	31
8. Literaturverzeichnis.....	32
9. Abbildungs -und Tabellenverzeichnis.....	41

Abkürzungen

AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
n	Anzahl
A	Base Adenin
C	Base Cytosin
G	Base Guanin
T	Base Thymin
bp	Basenpaare
ca.	circa
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
E.	<i>Enterocytozoon</i>
E B	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>
EGM	<i>Enterocytozoon</i> group Microsporidia
x g	Mal Erdbeschleunigung=9,81 m/s ² (Meter pro Sekunde zum Quadrat)
C. c.	<i>Corvus corone</i>
°C	Grad Celsius
g	Gramm
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
ITS	innere transkripierte Trenn-DNA-Sequenz
c	Konzentration
x	Mal/Multipliziert mit
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromol
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
-	Negativkontrolle
pM	Pikomol
+	Positivkontrolle
%	Prozent
rDNA	ribosomale DNA
rRNA	ribosomale RNA
s	Sekunde
s.	siehe
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TELM	Transmissionslichtmikroskop

TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
UV	Ultraviolett
U	Units
v. A.	vor Allem
cm	Zentimeter
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung und Fragestellung

Mikrosporidien sind obligat intrazelluläre, einzellige, eukaryotische Parasiten. Sie befallen Wirte aller Stämme des Tierreichs, von Protisten bis hin zu höheren Wirbeltieren. Zu den Mikrosporidien zählen über 200 Gattungen, welche über 1700 beschriebene Spezies umfassen, die in mindestens 5 größeren Kladen eingruppiert werden. Innerhalb dieses Stammes ist *Enterocytozoon bieneusi* diejenige Art, mit der größten Bedeutung als Humanpathogen (Weiss & Becnel, 2014; Stentiford, et al., 2019).

Obwohl bereits 1985 als Krankheitserreger vorrangig immunsupprimierter Patienten entdeckt, dauerte es viele Jahre, bis man auch *E. bieneusi* als Erreger bei Tieren nachwies. So fand auch dessen zoonotisches Potenzial Beachtung (Desportes, et al., 1985; Dengjel, et al., 2001). In der Folge wurde eine große Anzahl verschiedener Genotypen bestimmt, von denen einige stark wirtsspezifisch sind, während andere an diversen, teils sehr unterschiedlichen Spezies parasitieren (Dengjel, et al., 2001; Didier, 2005; Lobo, et al., 2006). Vögel sind dabei ebenfalls als mögliche Überträger humanpathogener Stämme in Erscheinung getreten. Diese lassen sich sowohl in wildlebenden Populationen als auch bei Nutzgeflügel und Heimtieren finden (Reetz, et al., 2002; Lobo, et al., 2006).

Die Bedeutung als Krankheitserreger bei tierischen Wirten ist nur sehr unzureichend untersucht, befallene Individuen zeigen sich häufig asymptomatisch. Erkrankte Tiere mit sichtbarer Symptomatik wiesen immer einen Befall mit weiteren Krankheitserregern auf (Müller, et al., 2008).

Eine Transmission durch asymptomatische Träger ist dabei dennoch möglich und gewinnt an Bedeutung unter dem Aspekt, dass einige Wildvögel häufig in der Nähe des Menschen vorkommen, wie z.B. Tauben oder Krähen (Graczyk, et al., 2007; Perec-Matysiaka, et al., 2017).

Ein Ziel dieser Arbeit war daher, Erkenntnisse zur Verbreitung von *E. bieneusi* bei wilden Krähen in Österreich zu gewinnen. Darüber hinaus sollte eine PCR zur Detektion dieses Erregers etabliert werden. Schließlich wurden die Kotproben aller zur Verfügung stehenden Krähen mithilfe der modifizierten Methode untersucht. Die Hypothese war, dass Krähen in Wien mit *Enterocytozoon bieneusi* befallen sind. Für dieses Projekt wurden zwei Hypothesen formuliert:

1. *E. bieneusi* kommt bei Krähen in Wien vor
2. *E. bieneusi* lässt sich mit einer ITS- PCR nachweisen.

Teile der Diplomarbeit, die Beurteilung und Sektion der Vögel, die Organentnahme sowie die DNA-Isolation wurden gemeinsam mit Fr. Marlena Lackner durchgeführt, deren Diplomarbeit

einer ähnlichen Fragestellung folgte. Hier wurden dieselben Krähen auf einen Befall mit *Encephalitozoon cuniculi* untersucht (Lackner, 2018).

2. Literaturübersicht

2.1 Taxonomie und Systematik von *Enterocytozoon*

E. bieneusi wurde im Zuge der HIV-AIDS-Pandemie in der Mitte der 1980er Jahre, als Erreger schwerer Durchfallerkrankungen bei AIDS-Patienten beschrieben (Desportes, et al., 1985). Die momentane taxonomische Einordnung stellt sich folgendermaßen dar: (Anon., 2019)

Stamm:	<i>Fungi</i>
Klasse:	<i>Microsporidia</i>
Unterordnung:	<i>Apansporoblastina</i>
Familie:	<i>Enterocytozoonidae</i>
Gattung:	<i>Enterocytozoon</i>
Art:	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>

Neuere Untersuchungen sehen *E. bieneusi* in einer komplexen Verwandtschaftsgruppe mit verschiedenen, ähnlichen Arten. Diese Gruppe wird als *Enterocytozoon group microsporidia* (EGM) bezeichnet. Die nächste verwandte Spezies ist *Enterocytozoon canceri*, ein Parasit aquatiler Krabben (Stentiford, et al., 2019). Innerhalb der Gattung *Enterocytozoon* ist eine weitere Art beschrieben worden, *Enterocytozoon hepatopenaei*. Diese wurde als Parasit von Garnelen (*Penaeus monodon*) identifiziert (Tourtip, et al., 2009). Neuere Erkenntnisse legen allerdings eher den Status als Vertreter einer Schwestergruppe, gemeinsam mit *Enterospira nucleophila* nahe. Andere nah verwandte Genera aus der Klade der EGM sind *Desmozoon*, *Obraspora* und *Nucleospora*, die allesamt Parasiten von Fischen oder aber aquatilen Invertebraten sind (Stentiford, et al., 2016).

2.2 Biologie von *E. bieneusi*

Als obligat intrazelluläre Parasiten haben Mikrosporidien keine aktiven Stadien außerhalb ihres Wirts, sondern widerstandsfähige Umweltstadien. Typisch ist die Existenz einer sogenannten Spore, die typischerweise eine dicke, dreilagige Wand aufweist. Diese Lagen sind die vorrangig aus Proteinen bestehende Exospore, die chitinhaltige Endospore und eine Zellwand,

welche das Zytoplasma in sich einschließt. Eingebettet ins Plasma befinden sich die Zellorganellen. Neben einem Zellkern und der daran angrenzenden hinterständigen Vakuole sind dies der Polaroplast und der Extrusionsapparat, welche für die Mikrosporidien einzigartig sind (Franzen & Müller, 1999). Der Polaroplast ist eine geschichtete Struktur, die aus einer Reihe lose aufeinanderliegender Membranen besteht und unter Wassereinlagerung anschwillt, um Druck auf die Polarkappe auszuüben. Dies führt zum Ausstülpen des Polartubulus (Lom, 1967). Weitere Bestandteile des Extrusionsapparates sind der Ankerfaden am vorderen Pol der Spore, an welcher der Polfaden beginnt, der in mehreren Windungen, die bis in den hinteren Teil der Spore reichen, aufgewickelt ist. Die Anzahl dieser Windungen ist dabei ein wichtiges Kriterium zur Unterscheidung zwischen den einzelnen Gattungen der Mikrosporidien (Mathis, et al., 2005). Die adulten Sporen von *E. bienewisi* messen 1,5 x 0,5 µm. Der Polarfaden weist 5-6 Windungen auf (Desportes, et al., 1985).

Die Infektion findet mit großer Wahrscheinlichkeit über die orale Aufnahme von Sporen, möglicherweise in Einzelfällen auch über die aerogene Aufnahme statt (Cegielski, et al., 1999; Sodqi, et al., 2004). Werden nun adäquate Bedingungen in einem geeigneten Wirt vorgefunden, wird der Polfaden ausgestülpt und penetriert die Wirtszelle (Abb. 1). Damit wird Sporoplasma mit dem Zellkern in der Wirtszelle deponiert, wo es sich in Meronten umwandelt. Die Meronten teilen sich mehrmals und entwickeln sich zu Sporonten, die sich durch eine dichte oberflächliche Schicht auszeichnen. Diese Schicht wandelt sich schließlich zur Exospore. Sporonten teilen sich abermals mehrfach zu Sporoblasten, die sich letztendlich zu infektiösen Sporen entwickeln (Deplazes, et al., 1996; Franzen & Müller, 1999).

2.3 Verbreitung von *E. bienewisi*

Die Verbreitung von *E. bienewisi* als Art ist weder auf einen bestimmten Erdteil noch auf ein limitiertes Wirtsspektrum beschränkt. Befallene tierische Organismen sind aus Europa (Bart, et al., 2008; Lallo, et al., 2012), Asien (Mynarova, et al., 2016), Nordamerika (Buckolt, et al., 2002), Südamerika (Rodrigues da Cunha, et al., 2017), der Arabischen Halbinsel (Müller, et al., 2008) und Australien (Zhang, et al., 2018) bekannt. Neben dem Menschen ist die Spezies bei unterschiedlichsten Ordnungen der Säugetiere und Vögel, sowie bei zwei Reptilienarten nachgewiesen worden (Karim, et al., 2014).

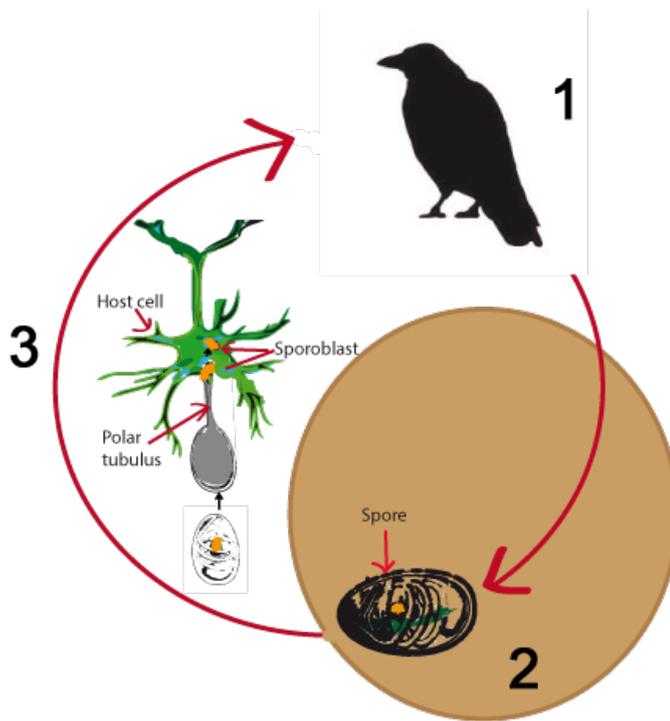


Abb.1 Lebenszyklus von *Enterocytozoon bieneusi*

Innerhalb des Wirts entwickeln sich über mehrere Vermehrungsschritte infektiöse Sporen (1). Wirtsvogel scheidet sporenhaltige Faeces aus (2). Über orale Aufnahme gelangen die Sporen in einen neuen Wirt, in geeignetem Milieu wird die Wirtszelle penetriert (3).

2.3.1 *E. bieneusi* bei Vögeln

Enterocytozoon bieneusi besiedelt eine weite Bandbreite unterschiedlicher Ordnungen innerhalb der Klasse der Vögel. Die erste Vogelspezies, die dabei als Wirt identifiziert wurde, war das Haushuhn (Reetz, et al., 2002). Es folgten zusätzliche Dokumentationen für diese Spezies (Feng, et al., 2011; da Cunha, et al., 2016). Weitere Nachweise an Hühnervögeln gelangen beim Blauen Pfau (*Pavo cristatus*) und bei der Gemeinen Wachtel (*Coturnix coturnix*) (Feng, et al., 2019; Deng, et al., 2019).

Ein Großteil der Belege innerhalb der Vögel stammt dabei von der Haustaube (*Columba livia f. domestica*), die als häufige und weltweit verbreitete Art sowohl als Nutztier gehalten wird, als auch verwilderte Populationen im urbanen Raum etabliert hat. (Graczyk, et al., 2007; Bart, et al., 2008; Kašičková, et al., 2009) Diese Tatsache begründet auch ihre Bedeutung als mögliche Überträgerspezies von Mikrosporidien mit zoonotischem Potenzial und damit ihre

Rolle als Objekt wissenschaftlicher Studien auf diesem Gebiet. Es erklärt auch den gehäuftten Nachweis von *E. bieneusi* bei Haustauben (Graczyk, et al., 2007).

Der Nachweis an Entenvögeln gelang für drei Spezies, die Schwanengans (*Anser cygnoides*), die Hausgans (*Anser anser f. domestica*) und die Hausente (*Anas platyrhynchos f. domestica*). In allen Fällen handelte es sich um Nutzgeflügel, das zum Zwecke des Verzehrs in Landwirtschaftsbetrieben gehalten- oder auf Märkten zum Verkauf angeboten wurde (Zhao, et al., 2016; Rodrigues da Cunha, et al., 2017). Weitere Spezies dieser Ordnung wurden untersucht, ohne dass ein Befall festgestellt werden konnte (Graczyk, et al., 2007; Rodrigues da Cunha, et al., 2017).

Auch innerhalb der Kranichvögel wurden mehrere Spezies als Wirte von *E. bieneusi* identifiziert. Alle Nachweise stammen aus menschlicher Obhut, die Tiere wurde in derselben Einrichtung gepflegt (Zhao, et al., 2016).

Die weitaus größte Anzahl erwiesener Wirtsarten findet sich unter den Papageienvögeln. Die Anzahl der positiv untersuchten Spezies beträgt hier 27 (Lobo, et al., 2006; Kašičková, et al., 2009; Lallo, et al., 2012). Mehrfache unabhängige Nachweise gelangen allerdings nur für Wellensittich, Nymphensittich und Graupapagei. Da jene zu den häufigsten Psittaziden in menschlicher Obhut zählen, verwundert dies keineswegs. Innerhalb der *Psittaciformes* scheint es keine Limitierung auf bestimmte Genera oder Verwandtschaftsgruppen zu geben. Es werden mit den Gattungen *Agapornis* und *Poicephalus* afrikanische Vertreter genauso befallen wie die amerikanischen *Amazona* und *Aratinga* oder *Neophema* und *Melopsitta*, die ursprünglich auf dem australischen Kontinent heimisch sind (Reimschmidt & Lambert, 2006). Bei den Falkenvögeln konnten sowohl Lanner-, Ger- und Wanderfalke als auch Hybriden dieser Arten als Träger von *E. bieneusi* erkannt werden. Vierundzwanzig in dieser Studie präsente Vögel verendeten und wurden seziiert, sechs davon wurden positiv auf *E. bieneusi* getestet. Bei fünf Individuen fanden sich makroskopisch sichtbare Läsionen an Darm und Leber, vier dieser Tiere hatten ebenfalls pathologische Veränderungen der Nieren. Bei einem der toten Tiere mit positivem Nachweis waren keinerlei Auffälligkeiten der inneren Organe festzustellen, es litt allerdings an Gicht (Müller, et al., 2008).

Innerhalb der Sperlingsvögel wurde *E. bieneusi* bei acht Arten in fünf verschiedenen Familien festgestellt. Starenvögel erweisen sich ebenso als Träger wie Finken, Prachtfinken oder eben Krähen (Lobo, et al., 2006; Kašičková, et al., 2009; Perek-Matysiaka, et al., 2017; Tavallaa, et al., 2018; Deng, et al., 2019).

Ein großer Teil der bisher untersuchten Arten umfasst solche, die als nichtdomestizierte Wildtiere in menschlicher Obhut gepflegt werden (Lobo, et al., 2006; Kašičková, et al., 2009;

Lallo, et al., 2012; Tavallaa, et al., 2018). Neben den Nachweisen an wildlebenden Haustauben aus vielen unterschiedlichen Städten Europas wurde in Polen auch die Saatkrähe als Wildtierreservoir von *E. bieneus*, identifiziert (Perec-Matysiaka, et al., 2017).

Tab.1 Nachgewiesene Wirtsspezies von *Enterocytozoon bieneusi* bei Vögeln

Ordnung/ Familie	Art	Trivialname	Referenz
Anseriformes			
<i>Anseridae</i>	<i>Anas platyrhynchos f. domestica</i>	Hausente	Zhao et. al 2016
	<i>Anser anser f. domestica</i>	Hausgans	Zhao et. al 2016
	<i>Anser cygnoides</i>	Schwanengans	Rodrigues da Cunha et. al. 2016
Columbiformes			
<i>Columbidae</i>	<i>Columba livia f. domestica</i>	Stadttaube	Lobo et. al. 2006, Bart et. al. 2008, Graczyk et. al. 2008, Kašičkova et. al. 2009, Lallo et. al. 2012, Słodkiewicz-Kowalska et. al., Rodrigues da Cunha et. al. 2016
	<i>Geopelia cuneata</i>	Diamanttaube	Kašičkova et. al. 2009
	<i>Ocyphaps lophotes</i>	Spitzschopftaube	Kašičkova et. al. 2009
Falconiformes			
<i>Falconidae</i>	<i>Falco biarmicus</i>	Lannerfalke	Müller et. al. 2008
	<i>F. peregrinus</i>	Wanderfalke	Müller et. al. 2008
	<i>F. rusticolus</i>	Gerfalke	Müller et. al. 2008
	<i>F. rusticolus x cherrug</i>	Falken-Hybriden	Müller et. al. 2008
	<i>F. rusticolus x peregrinus</i>	Falken-Hybriden	Müller et. al. 2008
Galliformes			
<i>Phasianidae</i>	<i>Coturnix coturnix</i>	Wachtel	Deng et. al. 2019
	<i>Gallus gallus f. domestica</i>	Haushuhn	Reetz et. al. 2003, Feng et. al. 2011, da Cunha et. al. 2016
	<i>Pavo cristatus</i>	Blauer Pfau	Feng et. al. 2019
Gruiformes			
<i>Gruidae</i>	<i>Grus grus</i>	Grauer Kranich	Zhao et. al 2016
	<i>Grus japonensis</i>	Mandschurenkranich	Zhao et. al 2016
	<i>Grus leucogeranus</i>	Nonnenkranich	Zhao et. al 2016

	<i>Grus vipio</i>	Weißnackenkranich	Zhao et. al 2016
Passeriformes			
<i>Corvidae</i>	<i>Corvus frugilegus</i>	Saatkrähe Spitzschwanz- Bronzemännchen	Perec-Matysiaka et. al. 2017
<i>Estrildidae</i>	<i>Lonchura striata</i>	Binsenastrild	Deng et. al. 2019
	<i>Neochmia ruficauda</i>	Zebrafink	Lobo et. al. 2006
	<i>Taeniopygia guttata</i>	Kanarienvogel	Deng et. al. 2019
<i>Fringillidae</i>	<i>Serinus canarius f. domestica</i>	Weißohrbülbül	Kašičkova et. al. 2009
<i>Pyconotidae</i>	<i>Pyconotus leucotis</i>	Haubenmaina	Tavallaa et. al 2018
<i>Sturnidae</i>	<i>Acridotheres cristatellus</i>	Beo	Deng et. al 2019
	<i>Gracula religiosa</i>	Pagodenstar	Tavallaa et. al 2018
	<i>Temenuchus pagodarum</i>		Kašičkova et. al. 2009
Psittaciformes			
<i>Psittacidae</i>	<i>Agapornis canus</i>	Grauköpfchen	Kašičkova et. al. 2009
	<i>Agapornis fischeri</i>	Pfirsichköpfchen	Kašičkova et. al. 2009
	<i>Agapornis nigrigenis</i>	Rußköpfchen	Kašičkova et. al. 2009
	<i>Agapornis personatus</i>	Schwarzköpfchen	Kašičkova et. al. 2009
	<i>Agapornis roseicollis</i>	Rosenköpfchen	Kašičkova et. al. 2009
	<i>Agapornis sp.</i>		Lobo et. al. 2006, Deng et. al 2019
	<i>Alisterus scapularis</i>	Königssittich	Kašičkova et. al. 2009
	<i>Amazona aestiva</i>	Blaustirnamazone	Kašičkova et. al. 2009
	<i>Amazona leucocephala</i>	Kubaamazone	Kašičkova et. al. 2009
	<i>Aratinga auricapilla</i>	Goldscheitelsittich	Kašičkova et. al. 2009
	<i>Aratinga nenday</i>	Nenday-Sittich	Kašičkova et. al. 2009
	<i>Barnadius zonarius</i>	Ringsittich	Kašičkova et. al. 2009
	<i>Cyanoramphus novaezelandiae</i>	Ziegensittich	Kašičkova et. al. 2009
	<i>Melopsittacus undulatus</i>	Wellensittich	Kašičkova et. al. 2009, Lallo et. al. 2012, Tavallaa et. al 2018, Deng et. al. 2019
	<i>Myiopsitta monachus</i>	Mönchssittich	Kašičkova et. al. 2009
	<i>Neophema splendida</i>	Glanzittich	Kašičkova et. al. 2009
	<i>Neophema pulchella</i>	Schönsittich	Kašičkova et. al. 2009
	<i>Nymphicus hollandicus</i>	Nymphensittich	Lobo et. al. 2006, Kašičkova et. al. 2009
	<i>Platycercus caledonicus</i>	Gelbbauchsittich	Kašičkova et. al. 2009
	<i>Platycercus elegans</i>	Pennantsittich	Kašičkova et. al. 2009
<i>Platycercus eximius</i>	Rosellasittich	Kašičkova et. al. 2009	
<i>Polytelis alexandrae</i>	Alexandrasittich	Kašičkova et. al. 2009	
<i>Polytelis swainsonii</i>	Schildersittich	Kašičkova et. al. 2009	
<i>Poicephalus senegalus</i>	Mohrenkopfpapagei	Kašičkova et. al. 2009	
<i>Psittacara mitratus</i>	Mitrasittich	Kašičkova et. al. 2009	

	<i>Psittacus erithacus</i>	Graupapagei	Lobo et. al. 2006, Kašičkova et. al. 2009
	<i>Pyrrhura sp.</i>	Rotschwanzsittiche	Kašičkova et. al. 2009
	<i>Thectocercus acuticaudatus</i>	Spitzschwanzsittich	Kašičkova et. al. 2009
Struthioniformes			
<i>Struthionidae</i>	<i>Struthio camelus</i>	Afrikanischer Strauß	Lallo et. al. 2012

2.3.2 *E. bieneusi* bei anderen Tiergruppen

Bei den Säugetieren ist die Anzahl erwiesener Wirtsspezies gegenüber derjenigen bei Vögeln deutlich höher. Auch liegen hier deutlich mehr Nachweise von wildlebenden Individuen vor. Die befallenen Arten finden sich hier in den Ordnungen der Raubtiere, der Huftiere, der Primaten, der Nagetiere und der Hasenartigen.

Als Haustiere gehaltene Hunde- und Katzen wurden schon mehrfach als Träger von *E. bieneusi* identifiziert (Mathis, et al., 1999; Dengjel, et al., 2001; Li, et al., 2018). Auch wilde Karnivoren tragen den Erreger, in Spanien z.B. ist er bei Rotfuchs, Dachs und Steinmarder entdeckt worden, in Korea bei Marderhund. In Korea gelang auch der Erstnachweis in wilden *Felidae*, nämlich bei der Bengalkatze (*Pronailurus bengalensis*) (Santin, et al., 2017; Amer, et al., 2019).

Von domestizierten Schweinen, Ziegen, Rindern, Lamas und Pferden ist *E. bieneusi* ebenfalls bekannt (Dengjel, et al., 2001; Buckolt, et al., 2002; Lores, et al., 2002; Udonsom, et al., 2019; Zhao, et al., 2019). In Australien und Korea konnte er bei unterschiedlichen wildlebenden Cerviden gefunden werden, von denen drei Spezies, Damhirsch, Rothirsch und Reh auch in Mitteleuropa vorkommen (Zhang, et al., 2018; Deng, et al., 2019). Aus Österreich und anderen Staaten des östlichen Mitteleuropas ist die Infektion von Wildschweinen bekannt (Němejc, et al., 2014).

Bei Nagern ist *E. bieneusi* von als Heimtiere gehaltenen Meerschweinchen aus Peru bekannt (Cama, et al., 2007). Der Nachweis bei wilden Hausmäusen gelang in der Slowakei und an der Deutsch-Tschechischen Grenze (Sak, et al., 2011; Danišová, et al., 2015). In den USA gelang er an einer ganzen Reihe unterschiedlicher Arten, in verschiedenen Familien, einschließlich der Hamsterartigen- und Neuweltmäuse (*Cricetidae*) und der Hörnchen (*Sciuridae*) (Guo, et al., 2014).

Innerhalb der Primaten konnten Nachweise sowohl bei Feucht- als auch bei Trockennasenprimaten erbracht werden. Ein Großteil dieser Nachweise stammt von Tieren in menschlicher Obhut, bei Menschenaffen jedoch ist *E. bieneusi* auch in wildlebenden Individuen identifiziert worden (Karim, et al., 2015; Mynarova, et al., 2016).

Neben der großen Artenzahl innerhalb der Klassen der Vögel und Säugetiere kennt man *E. bieneusi* lediglich bei zwei Spezies der Reptilien. Die in der Studie beprobten Kobras (*Naja naja*) und Rattennattern (*Ptyas mucosa*) stammten von Züchtern in der chinesischen Provinz Guanxi (Karim, et al., 2014).

2.3.3 *E. bieneusi* beim Menschen

Die Erstbeschreibung des Erregers *E. bieneusi* geschah im Jahr 1985. Entdeckt wurde er als neues Mikrosporidium bei AIDS-Patienten in Haiti (Desportes, et al., 1985). Nachweise folgten aus verschiedenen Ländern Afrikas und Europas. In Österreich wurde *E. bieneusi* erstmalig 1993 identifiziert, ebenfalls bei AIDS-Patienten (Reinthal, et al., 1993). Von einem Krankheitsgeschehen sind zumeist Menschen mit reduzierter Immunkompetenz betroffen. Konkret fand man erkrankte Personen vor allem unter HIV-Infizierten und AIDS-Patienten, bei Kindern, älteren Menschen und bei Personen, die nach Transplantationen mit immunsuppressiven Medikamenten behandelt wurden. Auch Reisende und Kontaktlinienträger sind Gruppen mit einem erhöhten Risiko (Desportes, et al., 1985; Pol, et al., 1992; Reinthal, et al., 1993; Cegielski, et al., 1999; Didier & Weiss, 2006; Cama, et al., 2007; Bednarska, et al., 2013).

Für das Auftreten und die Ausprägung der Symptomatik ist der Immunstatus des jeweiligen Patienten von entscheidender Bedeutung. Bei immungeschwächten AIDS-Patienten können persistierende, wässrige Diarrhoe, Gewichtsverlust und Abdominalschmerzen auftreten. Bei gesunden Menschen, deren Immunsystem bisher keinen Kontakt zu *E. bieneusi* hatte, z.B. Kinder oder Reisende, kommt es zu vorübergehenden Durchfällen (Didier & Weiss, 2006). In seltenen Fällen kann *E. bieneusi* Entzündungen der Gallengänge oder pulmonale Infektionen verursachen (Pol, et al., 1992; Sodqi, et al., 2004). Die effektivsten Therapiemaßnahmen gegen *E. bieneusi* setzen auf die Stärkung des eigenen Immunsystems des Patienten. Albendazol zeigte sich wenig wirksam, während Fumagillin zwar effektiv gegen *E. bieneusi* wirkt aber schwere Nebenwirkungen verursacht (Didier & Weiss, 2006). Aus den USA ist eine erfolgreiche Behandlung mit Nitrazoxanid beschrieben worden (Saffo & Mirza, 2019).

2.3.4 *E. bienewisi* als Zoonoseerreger

Mit einer Vielzahl verschiedener Genotypen kann *E. bienewisi* sowohl bei Menschen als auch bei Tieren gefunden werden. Da anfangs bei Tieren detektierte Subtypen nicht mit denjenigen übereinstimmten, die bei Menschen gefunden worden waren, blieb die Möglichkeit einer Tier-Mensch-Übertragung zunächst unbekannt. Das grundsätzliche zoonotische Potenzial von *E. bienewisi* steht seit der Feststellung der Tatsache, dass identische Genotypen neben dem Menschen auch tierische Wirte befallen können, zur Diskussion (Dengjel, et al., 2001; Didier, 2005; Leśniańska & Perek-Matysiak, 2017). Die Ansteckung geschieht dabei am wahrscheinlichsten über die orale Aufnahme von mit Sporen kontaminiertem Wasser oder kontaminierter Nahrung. Tierische oder pflanzliche Lebensmittel können dabei gleichermaßen betroffen sein (Reetz, et al., 2002; Jedrzejewski, et al., 2007; Stentiford, et al., 2016; Li, et al., 2019). Auch direkter Kontakt mit infizierten Menschen und Tieren bzw. deren Ausscheidungen birgt eine Infektionsgefahr (Leelayoova S., et al., 2005; Cama, et al., 2007). Dabei sind bestimmte Umstände prädisponierend für eine Infektion, z.B. das Leben in unterentwickelten Regionen mit schlechter Infrastruktur, mangelhafte hygienische Verhältnisse oder engem Mensch-Tier-Kontakt (Leśniańska & Perek-Matysiak, 2017).

In diesem Zusammenhang spielt die Verbreitung der Wildtierreservoirs in der Umgebung menschlichen Siedlungsraumes eine Rolle. Positiv auf *E. bienewisi* getestete *Cervidae* lebten in unmittelbarer Nähe der Trinkwassereinzugsgebiete von Melbourne (Zhang, et al., 2018). Es konnte auch festgestellt werden, dass die Prävalenz von *E. bienewisi* bei Tierarten mit sozialer Lebensweise gegenüber solchen, die eher solitär leben, erhöht war. So waren Dachse (23,2%, n=69) gegenüber anderen Karnivoren im selben Lebensraum häufiger befallen als wildlebende Füchse (9,2%, n=87). Wurden Füchse dagegen in großer Dichte auf Farmen zum Zwecke der Pelzproduktion gehalten, zeigten sie eine deutlich höhere Prävalenz (16,4%, n=110) (Zhao, et al., 2015; Santin, et al., 2017).

Bei wildlebenden Vögeln konnten zoonotisch bedeutsame Genotypen sowohl bei der Haustaube als auch bei verschiedenen Spezies der Singvögel nachgewiesen werden. Bei der Haustaube fand man die Genotypen D, Peru-6, Peru 6-like und EbpA (Lobo, et al., 2006; Bart, et al., 2008; Lallo, et al., 2012). Bei Saatkrähen, die auf Friedhöfen der polnischen Stadt Breslau beprobt worden waren, fand man die Genotypen D und Peru 6 (Perek-Matysiaka, et al., 2017). In menschlicher Obhut gehaltene Falken in den Vereinigten Arabischen Emiraten trugen ebenfalls Erreger des Genotyps D (Müller, et al., 2008). Bei Sittichen und Papageien

sowie einem Binsenstrild (*Neochmia ruficauda*), die als Heimtiere gehalten wurden, fand man die zoonotischen Genotypen Peru-6 und Peru-6 var. (Lobo, et al., 2006).

2.4 Nachweis von Enterocytozoon

Die Symptome der Enterocytozoonose sind unspezifisch und beschränken sich auf chronische, teilweise wässrige Diarrhoe, Gewichtsverlust und Abdominalschmerzen. Eine Erregersuche mit Rücksicht auf Mikrosporidien, findet also meist bei entsprechenden Risikogruppen statt. Bei Tieren ist der Befall meist symptomlos und die Nachweise sind das Ergebnis einer gezielten Suche nach dem Erreger, die Prävalenzen anhand einer großen Strichprobenmenge detektiert.

2.4.1 Elektronenmikroskopischer Nachweis

Die Entdeckung und Erstbeschreibung von *E. bienewisi* geschah mithilfe der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM). Als Probe wurde dabei Darmbiopsiematerial von Patienten mit chronischem Durchfall verwendet (Desportes, et al., 1985). Dabei erwies sich die Verwendung von Mucosa als ausreichend, was mit dem Tropismus zu Epithelzellen zu erklären ist (Schwartz, et al., 1994).

2.4.2 Lichtmikroskopischer Nachweis

Kurze Zeit nach dem TEM-Nachweis wurde eine erste Methode entwickelt, um die Sporen von Mikrosporidien aus Stuhlproben und Dünndarm-Lavagen mithilfe einer Trichochrom-Färbung nachzuweisen (Weber, et al., 1992). Ein Jahr später entwickelten Reinthaler et. al. eine erste Methode, um die Sporen im Stuhl auch Lichtmikroskopisch identifizieren zu können. Die Färbung mit Calcifluor mit anschließender Fluoreszenzdarstellung zeigte sich als erster Suchtest als geeignet, positive Proben ließen sich in darauffolgender Überprüfung mit dem TEM bestätigen. Unreife Sporen wurden mit der Methode allerdings nur unzureichend erkannt, ließen sich jedoch durch Giemsa-Färbung sicher definieren (Reinthaler, et al., 1993). Problematisch bei mikroskopischer Probenanalyse kann gesehen werden, dass Sensitivität und Spezifität dabei sehr von der Erfahrung des Untersuchers abhängen (Katzwinkel-Wladarsch, et al., 1996). Dies liegt an ihrer geringen Größe und hängt mit der für den ungeübten Betrachter teilweise schwierigen Differenzierbarkeit von Bakterien zusammen.

2.4.3 Zellkulturtechnischer Nachweis

Der Versuche einer Anzucht unter Zellkulturbedingungen erwiesen sich als erfolgreich, allerdings überlebten die in vitro-Kulturen nur knappe 6 Monate und produzierten nur eine geringe Sporenmenge (Visvesvara, et al., 1995).

2.4.4 Molekularbiologischer Nachweis

Der erste Nachweis mithilfe molekularbiologischer Methoden gelang mittels PCR der kleinen Untereinheit der rRNA. Als Ausgangsmaterial dienten dabei ebenfalls Sporen aus Stuhlproben (da Silva, et al., 1996). Eine andere PCR-Methode setzt an den sogenannten ITS (*internal transcribed spacers*) an (Katzwinkel-Wladarsch, et al., 1996). Die ITS sind Nukleotidsequenzen, Abschnitte auf der rRNA, die bei der anschließenden Transkription entfernt und abgebaut werden, da sie nicht für das entsprechende Gen codieren (White, et al., 1990). Da die ITS relativ häufig mutieren und dabei auch stark in ihrer Länge variieren, eignen sie sich hervorragend, um die einzelnen Genotypen von *E. bieneusi* durch anschließende Sequenzierung des Amplifikats voneinander zu differenzieren. Diese Methode hat sich als Standard zum Nachweis von *E. bieneusi* entwickelt. Zur weiteren Spezifizierung des konkreten Genotyps wird der PCR häufig eine Sequenzierung des amplifizierten Materials angeschlossen (Buckolt, et al., 2002).

2.5 Krähenvögel in Österreich

2.5.1 In Österreich vorkommende Krähenvögel und deren Verbreitung

Grundsätzlich sind 9 Arten der *Corvidae* in Österreich heimisch. Die *Corvidae* sind eine Familie innerhalb der Ordnung der Sperlingsvögel, *Passeriformes*. Zwei Arten, die Alpendohle (*Pyrrhocorax graculus*) und die Alpenkrähe (*P. pyrrhocorax*) sind dabei streng auf montane Lebensräume beschränkt. Die Alpendohle ist ein häufiger Brutvogel mit einer stabilen Population von 7000 – 10000 Tieren (Bauer & Berthold, 1997). Die Alpenkrähe hingegen gilt in Österreich als ausgestorben (Brendel, 1998).

Als spezialisierter Bewohner dichter Nadel- und Mischwälder ist der Tannenhäher (*Nucifraga caryocatactes*) flächendeckend in geeigneten Habitaten zu finden. Seine Bestandsgröße wird landesweit auf 15000-20000 Individuen geschätzt. Der weitaus häufigste Krähenvogel in Österreich ist der Eichelhäher (*Garrulus glandarius*), der mit 25000 - 40000 Exemplaren

nahezu überall zu finden ist. Die Elster (*Pica pica*) ist hingegen mit 4000 – 5000 Tieren in Österreich deutlich seltener als in anderen Regionen Mitteleuropas. Beide Arten zeigen einen leicht abnehmenden Bestandstrend, der beim Eichelhäher bei 1,5 % und bei der Elster bei 1,8 % jährlich liegt (Bauer & Berthold, 1997; Teufelbauer, et al., 2017).

Die verbleibenden 4 Arten sind allesamt den Eigentlichen Raben und Krähen der Gattung *Corvus* zuzuordnen. Der Kolkrabe *Corvus corax* weist dabei landesweit mit 2500 – 3500 Individuen geringe Bestandszahlen auf. Langfristig wird die Bestandsentwicklung, v. A. aufgrund seiner Arealausdehnung, als positiv eingeschätzt (Bauer & Berthold, 1997; Glandt, 2003).

Die Saatkrähe *Corvus frugilegus* ist zwar als Zugvogel saisonbedingt häufig anzutreffen, weist aber mit 400 – 550 Individuen die geringsten Brutbestände in Österreich innerhalb der Gattung *Corvus* auf. Zu Beginn des 19. Jahrhunderts gab es innerhalb Mitteleuropas deutlich größere Bestände. Im Zuge der Verfolgung der Saatkrähe als Ackerbauschädling sind die Zahlen europaweit deutlich gesunken (Bauer & Berthold, 1997; Wolf, et al., 1997).

Die Dohle (*Corvus monedula*) ist mit 3500 – 4500 Exemplaren österreichweit vertreten. Während in einigen Regionen Europas die Bestände seit den 60er und 70er Jahren des 20. Jahrhunderts angestiegen sind, zeigt sich in Österreich ein abnehmender Trend. Verantwortlich dafür sind vor allem Lebensraum- und Brutplatzverluste. Die Aaskrähe (*Corvus corone*) ist mit bis zu 30.000 Individuen neben dem Eichelhäher mit Abstand der häufigste Krähenvogel Österreichs (Bauer & Berthold, 1997). Während man früher in Österreich noch zwischen den zwei Unterarten Aaskrähe (*C. c. corone*) und Nebelkrähe (*C. c. cornix*) unterschied, gilt *Corvus corone* mittlerweile als monotypische Art. Weder morphometrische noch molekularbiologische Untersuchungen stützen die Existenz zweier Unterarten in Mitteleuropa (Haring, et al., 2012).

2.5.2 In Wien vorkommende Krähenvögel

Vier verschiedene Vertreter der Gattung *Corvus* treten auf dem Stadtgebiet Wiens auf. Die seltenste Art ist dabei der Kolkrabe (*Corvus corax*). Nach starken Bestandsrückgängen bis zur Mitte des vorangegangenen Jahrhunderts, deren Ursache vorrangig die Bejagung war, erholen sich seitdem die Bestände langsam (Glandt, 2003). Geeigneten Lebensraum findet der größte einheimische Rabenvogel vor allem im Osten Wiens, wo noch auf Stadtgebiet der Nationalpark Donauauen beginnt. Bruten konnten noch nicht nachgewiesen werden, jedoch nehmen die Sichtungen von Einzelvögeln und Paaren wieder zu (Dorn, 2019).

Häufiger als der Kolkrahe ist die Dohle (*Corvus monedula*). Sie nutzt zur Brut auch Kirchtürme, Mauernischen oder Dachböden und ist deshalb besser an das Leben im urbanen Raum angepasst. Der Bestandstrend folgt demjenigen im übrigen Österreich, ist also leicht rückläufig. Neben sechs kleinen Brutkolonien aus dem Prater und dem 21. Bezirk, gibt es lediglich wenige Einzelbruten. Gegenwärtig wird von einer Anzahl von ca. 55 Brutpaaren ausgegangen (Donnerbaum, 2003).

Mit großen jahreszeitlichen Schwankungen ist die Saatkrähe (*Corvus frugilegus*) ein häufig zu sehender Vogel Wiens. Die Stadt nimmt eine besondere Stellung ein, da sie eines der wichtigsten Überwinterungsareale für Individuen dieser Art, die aus Mittel- und Osteuropa migrieren, darstellt. Die Anzahl der Wintergäste ist ansteigend. Sie betrug Mitte der 1980er Jahre ca. 100.000 Vögel und stieg auf 190.000 im Jahre 1997 an (Wolf, et al., 1997). Als Brutvogel tritt die Saatkrähe dagegen wesentlich seltener auf. Nachdem 1942 die letzte Brutkolonie erlosch, siedelten sich erst 1985 wieder brütende Individuen an, deren Bestand nur langsam wächst. Mitte der 1990er Jahre wurden 37 Brutpaare bestätigt (Peter, 1995).

Der häufigste unter den Raben Wiens, die Aaskrähe (*Corvus corone*), ist ein ausgesprochener Kulturfolger. Seit Mitte des 20. Jahrhunderts lässt sich eine zunehmende Verstärkung der Bestände feststellen, die vorrangig nahrungsökologische Aspekte zur Grundlage hat. In Wien erreicht die Aaskrähe Siedlungsdichten von 24,7 Brutpaare pro km². Bei einer Gesamtfläche von 414,6 km² ergibt sich somit ein Bestand ca. 20.500 brütenden Individuen zuzüglich der Jungvögel. Damit lebt ein Großteil des österreichweiten Gesamtbestandes innerhalb der Grenzen der Hauptstadt (Bauer & Berthold, 1997; Holzer, 2002). Außerhalb der Brutzeit akkumulieren Individuen in geeigneten Arealen. So konnten allein auf dem Areal des Schönbrunner Parks 322 markierte Aaskrähen nachgewiesen werden (Uhl, et al., 2018).

3. Material und Methodik

3.1. Art und Herkunft des Tiermaterials

Die zur Untersuchung zur Verfügung stehenden 23 Krähen wurden von der Universitätsklinik für Vögel und Reptilien zur Verfügung gestellt. Alle Tiere stammten aus dem Großraum Wien und wurden als Findlinge von Privatpersonen oder Tierschutzorganisationen dort abgegeben. Der exakte Fundort konnte im Nachhinein nicht mehr ermittelt werden. Ein Teil der Tiere erlag den bei Auffinden bereits vorhandenen Verletzungen oder Vorerkrankungen, das Gros der Individuen musste jedoch aus Tierschutzgründen euthanasiert werden. Bei allen Individuen wurden das ungefähre Alter sowie das Körpergewicht ermittelt. Eine Altersschätzung kann bei den meisten Corviden über die Ausprägung der Färbung der Schnabelschleimhäute erfolgen. Diese färbt sich von einem hellen Ton beim juvenilen Vogel im Verlauf immer dunkler, bis sie beim Adulti schließlich völlig schwarz ist .

3.2. Methodik

3.2.1. Sektion und Organentnahme

Nach dem Wiegen, der Altersschätzung und einer augenscheinlichen Betrachtung wurden alle Tierkörper seziiert. Zuerst wurde die Leibeshöhle eröffnet um Proben von Leber, Niere und Darm zu gewinnen. Im Anschluss wurde zur Entnahme von Hirnmaterial der Schädel geöffnet. Zur weiteren Untersuchung wurden nur diejenigen Proben verwendet, die aus Darm und Darminhalt bestanden.

3.2.2. DNA-Isolation

Die Isolation der DNA aus den Darm- bzw. Darminhaltproben fand direkt nach der Organentnahme statt. Dazu wurde das ZR Fecal DNA MiniPrep™ (Zymo Research, USA) Isolationskit verwendet. Die Extraktion wurde im molekularbiologischen Labor des Institutes für Parasitologie durchgeführt.

Im ersten Schritt wurden 100mg Probematerial in das „ZR Bashing Bead_(0,5mm)™ Lysis Tube“ gegeben. 750 µl „Lysis Solution“ wurden zugesetzt. Für 5 Minuten wurde der Ansatz mithilfe eines Vortexers homogenisiert und im Anschluss bei 10000 x g abzentrifugiert. Nun wurde der „Zymo Spin IV Spin Filter“ (orange top) zur Hand genommen, dessen Ende vor Gebrauch abgebrochen werden muss. In diesen wurden 400 µL des Überstandes des homogenisierten Ansatzes überführt. Im „Zymo Spin IV Spin Filter“ erfolgte eine weitere Zentrifugation bei 8000 x g. Das Filtrat wurde mit 1200 µl „Fecal DNA Binding Buffer“ versetzt und vermischt. Von

dieser Zusammensetzung wurden 800 µl in das „Zymo Spin™ IIC Column“ pipettiert und bei 10000 x g zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen und der Rest aus der Zusammensetzung mit Binding Buffer wurde erneut auf die „Zymo Spin™ IIC Column“ gegeben, woraufhin erneut bei 10000 x g zentrifugiert wurde. In diesem Schritt fand das Binden der DNA an die Filtersäule statt. Mit der Zugabe von 200 µl „DNA Pre-Wash Buffer“ auf die Filtersäule und Zentrifugation bei 10000 x g wurde das Filtrat gereinigt. Im Folgenden wurden 500 µl „Fecal DNA Wash Buffer“ auf die Filtersäule gegeben, um wieder bei 10000 x g zu zentrifugieren. Diese Waschschriffe hatten zur Folge, dass neben DNA nur noch eine geringe Menge an anderen Nukleinsäuren und Proteinen im späteren Isolat vorhanden waren. Die Filtersäule wurde nun auf ein 1,5 ml Eppendorf-Tube® verbracht, mit 100µl „DNA Elution Buffer“ versetzt und ebenfalls bei 10000 x g zentrifugiert, in diesem Schritt aber für 30 s. Jetzt wurde das „Zymo Spin™ IV-HRC Filter“ (green top) verwendet, dessen Ende ebenfalls weggebrochen werden musste. Weiterhin musste man es vor Verwendung durch vortexen gebrauchsfertig machen und in ein „Collection Tube“ setzen. In dieses „Zymo Spin™ IV-HRC Filter“ (green top) wurde die eluierte DNA pipettiert, eine Zentrifugation fand bei 8000 x g für 1 Minute statt. Bis zur weiteren Bearbeitung wurde die so gewonnene DNA bei -20 °C gelagert.

Zur Bestimmung der Konzentration der aus den Proben extrahierten DNA wurde eine fotospektroskopische Analyse mithilfe eines „NanoDrop™ 2000“ durchgeführt. Dazu wurden die Proben gevortext und kurz zentrifugiert. 0,5µL des Extrakts wurden auf den Probentisch aufgetragen. Die Messergebnisse sind in den Ergebnissen aufgeführt (s. Tab. 9).

3.2.3 Vorversuche zur Modifikation der PCR I

Für die Detektion eventuell vorhandener *Enterocytozoon*-DNA wurde eine Nested PCR durchgeführt. Das dazu genutzte Protokoll sah eine Amplifizierung in zwei Schritten vor. Im ersten Schritt wurden dazu die Primer EB ITS 3 und EB ITS 4 eingesetzt (Buckolt, et al., 2002). Zunächst sollte dazu die optimale Primermenge ermittelt werden. Das Reaktionsgemisch für den ersten Schritt folgte dabei einem üblichen Protokoll für die Amplifizierung der ITS von *E. bieneusi* (Buckolt, et al., 2002). Als Probe wurde ein Isolat verwendet, das gesichert DNA von *E. bieneusi* enthält. Es wurden drei verschiedenen Verdünnungsstufen eingesetzt (1:1, 1:10 & 1:100). Die zehnfach verdünnte Probe wurde zusätzlich mit drei verschiedenen Primermengen amplifiziert (5pM, 10pM & 15pM) (s. Tab. 3). Es wurde bei allen durchgeführten

3.2.4 Gelelektrophorese

Zur Darstellung der Amplifikate wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Hierzu wurde ein Agarosegel (2%) hergestellt. Dafür wurden 1,3 g Agarose mit 66 ml 1 x Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE) in einem Erlenmeyerkolben gemischt, 35 ml Milli-Q®-Wasser wurden zugesetzt. Das Gemisch wurde unter Einwirkung von 600 Watt für 10 Minuten in der Mikrowelle erhitzt und kurz aufgeköcht. Zur Sichtbarmachung der DNA im Gel wurde 3 µl „Midori Green“ (10 mg/ml) hinzugefügt, nachdem das Gel abgekühlt, jedoch noch flüssig war. Zur Herstellung von Geltaschen wurden ins Gel ragende Kämmen an der Gussvorrichtung befestigt. Sie wurden nach einer Stunde Aushärtezeit entfernt, was unter dem Abzug geschah. Das Gel wurde nun in eine Elektrophoresekammer gegeben. Es wurde ein DNA-Marker hergestellt. Dazu wurden 3 µl der 100 bp-Leiter von Promega (Madison, WI, USA), mit 3 µl „Loading Dye Blue Marker“ und 9 µl Milli-Q®-Wasser vermischt. Er wurde in die erste Geltasche gefüllt, je 10 µl der Proben und eine negative Kontrolle wurde in die weiteren Geltaschen überführt. In Folge wurde die Elektrophoresekammer mit 1 x TBE-Puffer gefüllt und für 70 Minuten eine 120 Volt Spannung in der Kammer angelegt. Nach Vollendung dieser Laufzeit wurde das Gel aus der Kammer entnommen und zur Detektion in den UV-Lichtscanner überführt, wo die Ergebnisse aufgezeichnet wurden (ChemiBIS, DNR Bio-Imaging Systems Ltd., ISR).

3.2.5 Vorversuche zur Modifikation der PCR II

Im zweiten Teil der Nested-PCR wurden die Amplifikate der Proben 1,2,3 & 5 verwendet, um diese ein weiteres Mal, nun mithilfe der Primer EB ITS 1 & EB ITS 2.4, zu amplifizieren. Dabei wurden die Ansätze jeweils mit einer Primermenge von 10pm und 5pm durchgeführt (s. Tab. 4, Tab. 5).

Tab. 4 Reaktionsgemisch für die NESTED PCR NEST 2 Ansatz A

Nummer	1	2	3	5	-
Reagenz	Volumen je Reagenz [μL]				
H ₂ O	13,875	13,875	13,875	13,875	14,875
Green Go Taq-Puffer	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
dNTP's (40mM)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
EB- ITS 1 (10pM/ μL)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
EB- ITS 2 (10pM/ μL)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
MgCl ₂ (2,5 mM)	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
GO Taq-Polymerase (10U/ μL)	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125
Probe	1,0	1,0	1,0	1,0	0,0
Gesamt:	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0

Tab. 5 Reaktionsgemisch für die NESTED PCR NEST 2 Ansatz B

Nummer	1	2	3	5	-
Reagenz	Volumen je Reagenz [μL]				
H ₂ O	12,875	12,875	12,875	12,875	13,875
Green Go Taq-Puffer	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
dNTP's (40mM)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
EB- ITS 1 (10pM/ μL)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
EB- ITS 2 (10pM/ μL)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
MgCl ₂ (2,5 mM)	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
GO Taq-Polymerase (10U/ μL)	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125
Probe	1,0	1,0	1,0	1,0	0,0
Gesamt:	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0

Dieser Ansatz wurde ebenso wie im vorher erläuterten Cycleprotokoll amplifiziert (s. Tab. 2) Im Anschluss wurden die Amplifikationsprodukte auf ein Agarose-Gel aufgetragen und nach Auftrennung der Fraktionen unter Einsatz des UV-Lichtscanners detektiert, die Bedingungen sind mit denjenigen unter 3.2.4 identisch.

3.2.6 Modifikation der PCR

Da sich die in den Vorversuchen eingesetzten Primermengen als zu groß erwiesen, wurde die NESTED-PCR mit angepassten Mengen erneut durchgeführt. Hierzu wurde eine Verdünnungsreihe der Primer EB-ITS 3 und EB-ITS 4 aufgestellt um Lösungen mit 10pM/μL, 5pm/μL, 2,5pM/μL und 1,25pM/μL zu erhalten. Diese Primermengen wurden erneut der Positivkontrolle zugesetzt (Tab. 6).

Tab. 6 Reaktionsgemisch der NESTED PCR unter modifizierten Bedingungen NEST 1

Reagenz	Primerkonzentration				
	10pM/ μ L	5pM/ μ L	2,5pM/ μ L	1,25pM/ μ L	-
	Volumina je Reagenz [μ L]				
H ₂ O	12,875	12,875	12,875	12,875	13,875
Green Go Taq-Puffer	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
dNTP's (40mM)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
EB- ITS 3	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
EB- ITS 4	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
MgCl ₂ (2,5 mM)	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
Taq-Polymerase (10U/ μ L)	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125
Probe	1,0	1,0	1,0	1,0	0,0
Gesamt:	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0

Dieser Ansatz wurde ebenso wie im vorher erläuterten Cyclerprotokoll amplifiziert (s. Tab. 2) Im Anschluss wurden die Amplifikationsprodukte auf ein Agarose-Gel aufgetragen und nach erfolgter Auftrennung der Fraktionen unter Einsatz des UV-Lichtscanners detektiert, die Bedingungen waren mit denjenigen unter 3.2.4 identisch.

Die anschließende NEST 2 wurde mit den Proben der Primermengen 5pm/ μ L, 2,5pM/ μ L und 1,25pM/ μ L durchgeführt. Die dazu notwendigen Primer EB IST 1 und EB IST 2.4 wurden dazu in gleicher Weise verdünnt, wie im vorangegangenen Schritt um wiederum Primerkonzentration von 10pM/ μ L, 5pm/ μ L, 2,5pM/ μ L und 1,25pM/ μ L zu erhalten. Ein entsprechendes Reaktionsgemisch wurde nach dem folgenden Schema erstellt (Buckolt, et al., 2002)(s. Tab. 7).

Tab. 7 Reaktionsgemisch der NESTED PCR unter modifizierten Bedingungen NEST 2

Reagenz	Primerkonzentration												-
	10pM/ μ L			5pM/ μ L			2,5pM/ μ L			1,25pM/ μ L			
	eingesetzte Volumina je Reagenz [μ L]												
H ₂ O	12,875	12,875	12,875	12,875	12,875	12,875	12,875	12,875	12,875	12,875	12,875	12,875	13,875
Green Go Taq-Puffer	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
dNTP's (40mM)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
EB- ITS 3	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
EB- ITS 4	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
MgCl ₂ (2,5 mM)	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
GO Taq-Polymerase (10U/ μ L)	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125
Probe 2	1,0	-	-	1,0	-	-	1,0	-	-	1,0	-	-	0,0
Probe 3	-	1,0	-	-	1,0	-	-	1,0	-	-	1,0	-	0,0
Probe 4	-	-	1,0	-	-	1,0	-	-	1,0	-	-	1,0	0,0
Gesamt:	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0

Dieser Ansatz wurde ebenso wie im vorher erläuterten Cycleprotokoll amplifiziert (Tab. 3) Im Anschluss wurden zur Überprüfung der Eignung einer jeweiligen Proben- bzw. Primerkonzentration die Amplifikationsprodukte auf ein Agarose-Gel aufgetragen und nach

erfolgter Auftrennung der Fraktionen unter Einsatz des UV-Lichtscanners detektiert, die Bedingungen sind mit denjenigen unter 3.2.4 identisch.

3.2.7 PCR des Tiermaterials mit modifizierter Variante

Den Ergebnissen der Vorversuche folgend wurde die NEST1 mit Primerkonzentrationen von 2,5ng/ μ L sowohl für EB-ITS 3 als auch EB-ITS 4 durchgeführt. Von den unter 3.2.2 beschriebenen DNA-Isolaten wurden jeweils 5,0mL verwendet. Zusätzlich wurden eine Positivkontrolle(+) und eine Negativkontrolle(-) mitgeführt. In der NEST2 wurden 5pM/ μ L der Primer EB-ITS 1 und EB-ITS 2.4 eingesetzt. Als Probe wurden jeweils 1,0 μ L des Amplifizierungsproduktes der NEST1 genutzt. Das Reaktionsgemisch setzen sich nach dem folgenden Schema zusammen (Tab. 8).

Tab. 8 Reaktionsgemische für die PCR der isolierten DNA

Reagenz	NEST1			Reagenz	NEST2		
	isolierte DNA	+	-		isolierte DNA	+	-
	Volumina je Reagenz [μ L]				Volumina je Reagenz [μ L]		
H2O	8,875	12,875	12,875	H2O	12,875	12,875	12,875
Green Go Taq-Puffer	5,0	5,0	5,0	Green Go Taq-Puffer	5,0	5,0	5,0
dNTP's (40mM)	0,5	0,5	0,5	dNTP's (40mM)	0,5	0,5	0,5
EB- ITS 3 (2,5 pM/ μ L)	1,0	1,0	1,0	EB- ITS 3 (5pM/ μ L)	1,0	1,0	1,0
EB- ITS 4 (2,5 pM/ μ L)	1,0	1,0	1,0	EB- ITS 4 (5pM/ μ L)	1,0	1,0	1,0
MgCl2 (2,5 mM)	3,5	3,5	3,5	MgCl2 (2,5 mM)	3,5	3,5	3,5
GO Taq-Polymerase (10U/ μ L)	0,125	0,125	0,125	GO Taq-Polymerase (10U/ μ L)	0,125	0,125	0,125
Probe	5,0	1,0	1,0	Probe	1,0	1,0	1,0
Gesamt:	25,0	25,0	25,0	Gesamt:	25,0	25,0	25,0

Die Amplifizierung erfolgte unter Anwendung des in Tab. 1 beschriebenen Protokolls. Danach wurde erneut eine Gelelektrophorese wie unter 3.2.4 beschrieben durchgeführt, um ein Vorhandensein von *E. bieneusi* bei den beprobten Krähen zu untersuchen.

4. Ergebnisse und Auswertung

4.1 Differenzierung des Probematerials

Bei den 23 Vögeln handelt es sich um 22 Aaskrähen (*Corvus corone*) und eine Saatkrähe (*Corvus frugilegus*). Ein Großteil der untersuchten Tiere war zwischen zwei und 24 Monate alt, lediglich sechs waren bereits adult, darunter die einzelne Saatkrähe.

4.2 Konzentrationsbestimmung der DNA

Tab. 9 Konzentrationsbestimmung der isolierten DNA

n	c [ng/μL]	n	c [ng/μL]
1	10,6	13	12,7
2	14,2	14	16,2
3	16,5	15	15,6
4	18,1	16	16,8
5	18,3	17	8,1
6	19,5	18	26,0
7	17,9	19	16,7
8	22,5	20	45,6
9	18,1	21	16,3
10	18,7	22	17,0
11	14,1	23	16,4
12	16,6		

4.3 Etablierung der PCR

Die erste durchgeführte PCR wurde nach der Gelelektrophorese sowohl hinsichtlich der Menge an eingesetzter DNA als auch hinsichtlich der eingesetzten Primermenge untersucht.

Das entstandene Produkt war zwischen 400bp & 500bp lang und entsprach damit dem für die angewendeten Primer erwarteten Ergebnis. Bei der unverdünnt eingesetzten DNA lieferte die PCR eine große Menge amplifizierten Materials, die sich durch eine starke Bande im Gel auszeichnete. Die zehnfache Verdünnung lieferte ebenfalls eine sichtbare Bande, jedoch war diese so schwach, dass sich alle damit angesetzten Proben an der unteren Grenze der Auswertbarkeit bewegen. Bei hundertfacher Verdünnung war keine Bande mehr zu detektieren.

Zur Ermittlung der idealen Primerkonzentration wurde dieselbe DNA-Menge (zehnfache Verdünnung) mit drei unterschiedlichen Primerkonzentrationen amplifiziert. Die Größe der

Primerwolke nahm dabei mit geringer werdender Primerkonzentration erwartungsgemäß ab. Selbst bei der geringsten angewendeten Menge (5pM) war die entstandene Primerwolke sehr groß.

Auch in der NEST II wurde das erwartete Amplifikationsprodukt mit ca. 350bp erzielt. Die dabei entstandenen Rückstände aus Primerdimeren waren so groß, dass die PCR n der Folge unter Verwendung geringerer Primermengen modifiziert wurde.

In der NEST 1 mit angepassten Primermengen wurde die beste Kombination aus Schärfe der Bande und geringer Primerwolke unter dem Einsatz von 2,5pM der Primer EB-ITS 3 & EB-ITS 4 erzielt. In der NEST 2 lieferten diejenige PCR das beste Ergebnis, die mit 5pM der Primer angesetzt worden war.

4.3 Untersuchung des Probematerials

In keiner der untersuchten Krähen konnte *Enterocytozoon* nachgewiesen werden.

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde das Vorkommen der zoonotischen Spezies von *Enterocytozoon bieneusi* bei wildlebenden Krähenvögeln untersucht. Dafür wurde eine PCR-Methode zur Detektion dieses Erregers etabliert.

Die Hypothese war, dass *Enterocytozoon* bei Krähen in Wien vorkommt, und sich mit der etablierten PCR-Methode auch nachweisen lässt.

E. bieneusi konnte in keiner der untersuchten Proben nachgewiesen werden.

Ein nicht Erkennen des Erregers durch die zur Untersuchung angewandte Methode ist unwahrscheinlich, da die PCR eine sehr sensitive und spezifische Methode ist. Sie erwies sich auch in dieser Studie als sehr sicher, da die eingesetzte Positivkontrolle immer detektiert wurde, während es nie zur Kontamination der Negativkontrolle kam. Einzig wenn das Probenmaterial ungeeignet gewesen, oder ein Fehler bei der Extraktion der DNA passiert, bzw. ein fehlerhaftes Kit verwendet worden wäre, hätten hier auch falsch-positive Ergebnisse generiert werden können. Da aber Darmmaterial, die Hauptlokalisierung des Erregers, und ein speziell für dieses Substrat entwickeltes Extraktionskit verwendet wurde, kann die Wahrscheinlichkeit von falsch-negativen Proben als sehr gering angesehen werden. Die DNA-Menge war in den meisten Proben mit <20 ng/ μ l recht wenig, hätte beim Vorliegen von *Enterocytozoon*-DNA aber wahrscheinlich dennoch zum Nachweis ausgereicht.

Allerdings kann aufgrund der geringen Stichprobenmenge nicht der Schluss gezogen werden, dass der Erreger bei Krähen in Wien nicht vorkommt. Für den Raum Wien kann im Jahresverlauf von Individuenzahlen von ca. 20.000 Aaskrähen (*Corvus corone*) und ca. 200.000 Saatkrähen (*C. frugilegus*) ausgegangen werden (Peter, 1995; Wolf, et al., 1997; Holzer, 2002). Bei einer angenommenen Prävalenz von 10% wäre eine Stichprobe von ca. 140 Tieren notwendig gewesen, um diese bei einem Konfidenzniveau von 0,95 zu erkennen (Sergeant, 2017). Die Stichprobe lag deutlich unter diesem Wert und ließ sich auch nicht erhöhen, da bereits alle zur Verfügung stehenden Vögel untersucht wurden. In der hier vorliegenden Pilotstudie wäre daher nur eine positive Probe der Beweis für das Vorkommen dieses Erregers bei Krähen in Wien und damit Österreich, gewesen, während der fehlende Nachweis das Vorkommen nicht ausschließen kann und nur sehr eingeschränkt Spekulationen über die Prävalenz zulässt. Es gibt die Erkenntnis, dass Krähen Träger von *E. bieneusi* sein können, die Methode ebenjener Studie lässt jedoch keinen Rückschluss auf die Prävalenz zu (Perec-Matysiaka, et al., 2017). Neben vielen Nachweisen bei Heimtieren und Geflügel

konnten Nachweise an wildlebenden Vögeln lediglich an Tauben erbracht werden. Hier liegt die Prävalenz zwischen 1,4% und 44% (Lobo, et al., 2006; Bart, et al., 2008; Lallo, et al., 2012; Zhao, et al., 2016). Daraus leitet sich ein gewissen Gefahrenpotenzial der Ansteckung durch Wildvögel ab, da *E. bieneusi* nicht nur durch direkten Kontakt, sondern durchaus auch Aerosole oder Stäube, die mit Vogelkot kontaminiert sind, als auch durch verunreinigte Wasserreservoirs übertragen werden kann (Graczyk, et al., 2007). Zwei weitere Aspekte machen ein Vorkommen von *E. bieneusi* bei Krähenvögeln wahrscheinlich. Sie kommen in riesigen Zahlen im Stadtgebiet vor und sammeln sich abends in relativ kleinen Arealen, sodass gerade bei der Saatkrähe sehr hohe Dichten erreicht werden, die eine Übertragung begünstigen. Dazu legen viele Individuen weite Strecken zurück und steuern dabei zur täglichen Rast immer wieder neue Ruheplätze auf dem Verlauf der Route an. Dadurch entstehen viele Gelegenheiten zur Infektion, denn bei jedem Halt werden Nahrung und Wasser aufgenommen. Um eine Aussage über die tatsächliche Prävalenz von *E. bieneusi* bei Wiens Krähenvögeln tätigen zu können, muss eine deutlich höhere Stichprobenmenge untersucht werden. Dazu wären Voruntersuchungen von Sammelkotproben an den Übernachtungsplätzen ein guter erster Indikator.

Bei Tieren in menschlicher Obhut liegen Prävalenzen zwischen 3,8% und 33,3%. In vielen der zugrundeliegenden Studien stammen die Vögel allerdings aus demselben Bestand, sodass kaum zwischen einer autochthonen Infektion der einzelnen Individuen und einer Übertragung innerhalb des Bestandes unterschieden werden kann. Außerdem kamen hier häufig Genotypen mit zoonotischem Potenzial vor (Kašičková, et al., 2009; Lallo, et al., 2012; Zhao, et al., 2016). In diesen Fällen kann nur spekuliert werden, ob die gehaltenen Vögel ein Infektionsrisiko für den Halter darstellen oder aber die Tiere von den jeweiligen Pflegern infiziert worden waren. Bei Vögeln in Frei- oder Volierenhaltung besteht ein zusätzliches Infektionsrisiko durch die Ausscheidungen freilebender Vögel. Mehrfachnachweise für bestimmte Vogelspezies lassen sich kaum durch eine erhöhte Anfälligkeit für den Erreger erklären. Vielmehr sind diese Arten (Wellensittich, Nymphensittich und Graupapagei) besonders häufig in Haltung und stehen deshalb häufiger zur Beprobung zur Verfügung. (Lobo, et al., 2006; Kašičková, et al., 2009; Lallo, et al., 2012).

Bei Vögeln auf landwirtschaftlichen Betrieben traten Prävalenzen zwischen 9,7% (n=151) und 30,8% (n=16) auf (Reetz, et al., 2002; da Cunha, et al., 2016). Hier ist der Erreger von besonderer Bedeutung, da aufgrund der Verwendung zur Produktion von Eiern oder Fleisch

eine Übertragung auf den Menschen durch die orale Aufnahme von Sporen mit großem Risiko erfolgen kann.

Um das Ausmaß der Verbreitung der Enterocytozoonose und das damit verbundene Zoonoserisiko abschätzen zu können, wären daher weiterführende Untersuchungen wünschenswert, die besonders solche Vogelarten umfassen, die häufig in der Nähe des Menschen vorkommen.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden wildlebende Krähenvögel auf das Vorkommen von *Enterocytozoon bieneusi* untersucht. Zur Identifikation des Erregers wurde eine PCR etabliert. Die dazu verwendeten Vögel wurden von der Universitätsklinik für Kleintiere, Abteilung Ziervögel und Reptilien, der Veterinärmedizinischen Universität Wien zur Verfügung gestellt.

Diese Krähen wurden einer ersten Untersuchung unterzogen, wobei für jede Krähe das Körpergewicht in Gramm und die Spezies bestimmt, sowie das ungefähre Alter festgestellt wurde. Danach wurden die Krähen sezirt und Organproben von Gehirn, Leber, Niere, Milz, Darm mit Kot und die Linsen der Augen entnommen. Von diesen Organproben wurde DNA extrahiert, um damit eine PCR-Untersuchung durchzuführen. Die Ergebnisse der PCR wurden mittels Gelelektrophorese ausgewertet.

Durch Anpassung der Primermengen in den jeweiligen Amplifizierungsschritten konnte die PCR positiv modifiziert werden.

Keine der untersuchten Krähen zeigte einen Befall mit *E. bieneusi*.

Eine mögliche Erklärung hierfür ist die geringe Stichprobengröße. Allein die Anzahl der sich alljährlich als Wintergäste in Wien aufhaltenden Saatkrähen übersteigt die Zahl der untersuchten Individuen um das 10.000fache.

Die Möglichkeit eines Befalls mit *E. bieneusi* besteht dennoch, er konnte zumindest in Polen für eine Saatkrähenpopulation bewiesen werden.

Eine verstärkte Suche nach *E. bieneusi* wäre daher aufgrund des zoonotischen Potenzials auch vor dem Hintergrund möglicher gesamtgesellschaftlicher gesundheitlicher und ökonomischer Folgen wünschenswert.

7. Summary

For this study, corvids were examined for the occurrence of *Enterocytozoon bieneusi*. For this, a PCR for the identification of the pathogen was established. The birds analysed for this study were provided by the university clinic for companion animals, department for exotic birds and reptiles of the Vetmeduni Vienna.

During the first examination all crows were weighted, the species and the approximate age were estimated. Then, the crows were dissected and the organs brain, liver, kidney, spleen, intestine with feces and the lenses of the eyes were obtained. From these organs the DNA was extracted and further analyzed by PCR. The results of the PCR were visualized by gelelectrophoresis.

Due to adjustments in the amounts of the primers used in the particular amplification steps the PCR was modified positively.

In none of the examined crows an infection with *E. bieneusi* could be detected.

A possible explanation for this could be the small sample size. The number of rooks overwintering in Vienna every year alone exceeds the number of the examined individuals by 10.000.

Thus, there is still a possibility for an infestation in corvids in Austria as the pathogen was detected in rooks in Poland.

Further research for this potentially zoonotic pathogen therefore would be advisable especially regarding potential economic and medical consequences for the society as a whole.

8. Literaturverzeichnis

Amer, S., Kim, S., Han, J.-I. & Na, K.-J., 2019. Prevalence and genotypes of *Enterocytozoon bieneusi* genotypes of wildlife in Korea: A public health concern. *Parasites & Vectors*, Issue 12.

Anon., 2019. www.ncbi.nlm.nih.gov. [Online] Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=481877> [Zugriff am 4 12 2019].

Askari, Z. et al., 2015. Molecular Detection and Identification of Zoonotic Microsporidia Spore in Fecal Samples of Some Animals with Close-Contact to Human. *Iran J Parasitol*, pp. 381-388.

Bart, A. et al., 2008. Frequent Occurrence of Human-Associated Microsporidia in Fecal Droppings of Urban Pigeons in Amsterdam, The Netherlands. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 7056–7058.

Bart, A. et al., 2008. Frequent Occurrence of Human-Associated Microsporidia in Fecal Droppings of Urban Pigeons in Amsterdam, The Netherlands. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, p. 7056–7058.

Bauer, H.-G. & Berthold, P., 1997. *Die Brutvögel Mitteleuropas*. Wiesbaden: AULA-Verlag.

Bednarska, M. et al., 2013. The first case of *Enterocytozoon bieneusi* infection in Poland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, Issue 20, pp. 227-228.

Brendel, U., 1998. *Vögel der Alpen*. Stuttgart: Eugen Ulmer.

Buckolt, M. A., Lee, J. H. & Tzipori, S., 2002. Prevalence of *Enterocytozoon bieneusi* in Swine: an 18-Month Survey at a Slaughterhouse in Massachusetts. *Applied and Environmental Microbiology*, May, pp. 2595-2599.

Cama, V. A. et al., 2007. Transmission of *Enterocytozoon bieneusi* between a Child and Guinea Pigs. *Journal of Clinical Microbiology*, p. 2708–2710.

Cegielski, J. P. et al., 1999. Cryptosporidium, *Enterocytozoon*, and *Cyclospora* Infections in Pediatric and Adult Patients with Diarrhea in Tanzania. *Clinical Infectious Diseases*.

- da Cunha, M. J., Cury, M. C. & Santin, M., 2016. Widespread presence of human-pathogenic *Enterocytozoon bieneusi* genotypes in chickens. *Veterinary Parasitology*, Band 217, pp. 108-112.
- da Silva, A. et al., 1997. Diagnosis of *Enterocytozoon bieneusi* (microsporidia) infections by polymerase chain reaction in stool samples using primers based on the region coding for small-subunit ribosomal RNA. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, August, Issue 121, pp. 874-879.
- da Silva, A. J. et al., 1996. Sensitive PCR Diagnosis of infections by *Enterocytozoon bieneusi* (Microsporidia) Using Primers Based on the Region Coding for Small-Subunit rRNA. *Journal of Clinical Microbiology*, April, pp. 986-987.
- Danišová, O. et al., 2015. First report of *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon intestinalis* infection of wild mice in Slovakia. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 22(2), pp. 251-252.
- Dengjel, B. et al., 2001. Zoonotic potential of *Enterocytozoon bieneusi*. *Journal of Clinical Microbiology*.
- Deng, L. et al., 2019. New genotypes and molecular characterization of *Enterocytozoon bieneusi* in pet birds in Southwestern China. *IJP: Parasites and Wildlife*, pp. 164-169.
- Deplazes, P. et al., 1996. Immunologic and molecular characteristics of *Encephalitozoon-like microsporidia cuniculi* is a zoonotic parasite. *Clinical Infectious Diseases*, pp. 557-559.
- Deplazes, P., Mathis, A., Muller, C. & Weber, R., 1996. Molecular epidemiology of *Encephalitozoon cuniculi* and first detection of *Enterocytozoon bieneusi* in faecal samples in pigs. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, Issue 43, p. 93.
- Desportes, I. et al., 1985. Occurrence of a new microsporidan: *Enterocytozoon bieneusi* n.g., n. sp., in the enterocytes of a human patient with AIDS. *J. Protozool.*, Issue 32, pp. 250-254.
- Didier, E. S., 2005. Microsporidiosis: An emerging and opportunistic infection in humans and animals. *Acta Tropica*, 24 February, Band 94, pp. 61-76.
- Didier, E. S. & Weiss, L. M., 2006. Microsporidiosis: current status. *Curr Opin Infect Dis*, Oktober, pp. 485-492.
- Donnerbaum, K., 2003. *Birdlife Austria*. [Online] [Zugriff am 16 Dezember 2019].

Dorn, E., 2019. *Nationalpark Donauauen*. [Online] Available at: <https://blog.donauauen.at/von-echten-und-sogenannten-raben/> [Zugriff am 17 Dezember 2019].

Feng, S.-Y. et al., 2019. First report of *Enterocytozoon bieneusi* and *Cryptosporidium* spp. in peafowl (*Pavo cristatus*) in China. *Parasites and Wildlife*, Issue 9, pp. 1-6.

Feng, Y. et al., 2011. Development of a Multilocus Sequence Typing Tool for High-Resolution Genotyping of *Enterocytozoon bieneusi*. *Applied and Environmental Microbiology*, Mai, XIV(77), pp. 4822-8.

Franzen, C. & Müller, A., 1999. Cryptosporidia und Microsporidia - Waterborne Diseases in the Immunocompromised Host. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*, Issue 34, pp. 245-262.

Glandt, D., 2003. Der Kolkrabe.

Graczyk, T. K., Majewska, A. C. & Schwab, K. J., 2008. The role of birds in dissemination of human waterborne enteropathogens. *Trends in parasitology*, Band 24.

Graczyk, T. K., Sunderland, D., M. Rule, A. & J. da Silva, A., 2007. Urban Feral Pigeons (*Columba livia*) as a Source for Air- and Waterborne Contamination with *Enterocytozoon bieneusi* Spores. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, p. 4357–4358.

Guo, Y. et al., 2014. Host specificity and source of *Enterocytozoon bieneusi* genotypes in a drinking source watershed. *Applied and Environmental Microbiology*, Issue 80, pp. 218-225.

Haring, E. et al., 2012. Genetic divergences and intraspecific variation in corvids of the genus *Corvus* (Aves: Passeriformes: Corvidae) - a first survey based on museum specimens. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, Mai, Issue 50, pp. 230-246.

Holzer, T., 2002. Siedlungsdichte und Nistplatzwahl der Aaskrähne (*Corvus corone* L.) auf einer Wiener Probefläche 2001. *Egretta*, Issue 45, pp. 91-103.

Jedrzejewski, S. et al., 2007. Quantitative Assessment of Contamination of Fresh Food Produce of Various Retail Types by Human-Virulent Microsporidian Spores. *Applied and Environmental Microbiology*, Issue 73, pp. 4071-4073.

Karim, M. et al., 2015. Predominance and new genotypes of *Enterocytozoon*. *PLoS One*.

- Karim, M. R., Fuchang, Y., Jian, L. & Junqiang, L., 2014. First molecular characterization of enteric protozoa and the human pathogenic microsporidian, *Enterocytozoon bienewisi*, in captive snakes in China. *Parasitol Res.*
- Kašičková, D., Sak, B., Kvác, M. & O., D., 2009. Sources of potentially infectious human microsporidia: Molecular characterisation of microsporidia isolates from exotic birds in the Czech Republic, prevalence study and importance of birds in epidemiology of the human microsporidial infections. *Veterinary Parasitology*, Band 165.
- Katzwinkel-Wladarsch, S. et al., 1996. Direct amplification and species determination of microsporidian DNA from stool specimens. *Tropical medicine and International Health*, pp. 373-378.
- Kondova, I. et al., 1998. Transmission and serial propagation of *Enterocytozoon bienewisi* from humans and rhesus macaques in gnotobiotic piglets. *Infectious Immunology*, pp. 5515-5519.
- Lackner, M., 2018. *Encephalitozoon in Krähen in Wien*. Veterinärmedizinische Universität Wien: s.n.
- Lallo, M. A., Calábriab, P. & Milanelo, L., 2012. Encephalitozoon and Enterocytozoon (microsporidia) spores in stool from pigeons and exotic birds, Microsporidia spores in birds. *Veterinary Parasitology*, Issue 190, pp. 418-422.
- Leelayoova S., et al., 2005. Transmission of *Enterocytozoon bienewisi* genotype A in a Thai orphanage. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, pp. 104-107.
- Leśniańska, K. & Perek-Matysiak, A., 2017. Wildlife as an environmental reservoir of *Enterocytozoon bienewisi* (Microsporidia) – analyses of data based on molecular methods. *Annals of Parasitology*, 63(4), pp. 265-281.
- Li, J. et al., 2019. Identification of human pathogenic *Enterocytozoon bienewisi*, *Cyclospora cayentanensis*, and *Cryptosporidium parvum* on the surfaces of vegetables and fruits in Henan, China. *International Journal of Food Microbiology*, Issue 307.
- Li, N. et al., 2018. Host-adapted *Cryptosporidium* and *Enterocytozoon bienewisi* Genotypes in straw-coloured fruit bats in Nigeria. *International Journal for Parasitology: Parasites and wildlife*, Dezember.
- Linz, U. & Degenhardt, H., 1990. Die Polymerase-Kettenreaktion. *Naturwissenschaften*, 77(11), pp. 515-530.

- Liua, Y.-M. et al., 2018. Quantitative detection method of *Enterocytozoon hepatopenaei* using TaqMan probe real-time PCR. *Journal of Invertebrate Pathology*, Band 151, pp. 191-196.
- Li, W., Feng, Y. & Santin, M., 2019. Host Specificity of *Enterocytozoon bieneusi* and Public Health Implications. *Trends in Parasitology*, Juni.
- Li, W.-C., Qin, J., Wang, K. & Gu, Y.-F., 2018. Genotypes of *Enterocytozoon bieneusi* in Dogs and Cats in Eastern China. *Iran J Parasitol*, pp. 457-465.
- Lobo, M. et al., 2006. Identification of potentially human-pathogenic *Enterocytozoon bieneusi* genotypes in various birds. *Applied and environmental microbiology*, 11(72), p. 7380–7382.
- Lom, J., 1967. Ultrastructural Observations on the Development of the Microsporidian Protozoon *Plistophora hypessobryconis* Schaperclaus. *The Journal of Protozoology*, Issue 1, p. 141.
- Lores, B., del Aguila, C. & Arias, C., 2002. *Enterocytozoon bieneusi* (Microsporidia) in Fecal Samples from Domestic Animals from Galicia, Spain. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Oktober, Issue 97, pp. 941-945.
- Mathis, A., Breitenmoser, A. C. & Deplazes, P., 1999. Detection of new *Enterocytozoon* genotypes in faecal samples of farm dogs and a cat. *Parasite Journal*, Juli.
- Mathis, A., Weber, R. & Deplazes, P., 2005. Zoonotic Potential of the Microsporidia. *Clinical Microbiology Reviews*, July, pp. 423-445.
- Matos, O., Lobo, M. L. & Xiao, L., 2012. Epidemiology of *Enterocytozoon bieneusi* Infection in Humans. *Journal of Parasitology Research*.
- Melde, M., 1969. *Raben- und Nebelkrähe*. Wiitenberg: A. Ziemsen Verlag.
- Müller, M., Kinne, J., R.K.Schuster & Walochnik, J., 2008. Outbreak of microsporidiosis caused by *Enterocytozoon bieneusi* in falcons. *Veterinary Parasitology*, Band 152, pp. 67-78.
- Mynarova, A. et al., 2016. Prevalence of *Cryptosporidium* spp., *Enterocytozoon bieneusi*, *Encephalitozoon* spp. and *Giardia intestinalis* in Wild, Semi-Wild and Captive Orangutans (*Pongo abelii* and *Pongo pygmaeus*) on Sumatra and Borneo, Indonesia. *PLOS ONE*, March.
- Němejc, K. et al., 2014. Prevalence and diversity of *Encephalitozoon* spp. and *Enterocytozoon bieneusi* in wild boars (*Sus scrofa*) in central Europe. *Parasitology Research*, Issue 13, pp. 761-767.

- Nkinin, S. W., Asonganyi, T., Didier, E. S. & Kaneshiro, E. S., 2007. Microsporidian Infection Is Prevalent in Healthy People in Cameroon. *Journal of Clinical Microbiology*, September, Issue 45, pp. 2841-2846.
- Perec-Matysiaka, A., Wesółowskab, M., Lesnianskaa, K. & Bunkowska-Gawlika, K., 2017. Survey for Zoonotic Microsporidian Pathogens in Wild Living Urban Rooks (*Corvus frugilegus*). *Journal of Eukaryotic Microbiology*, Issue 64, pp. 721-724.
- Peter, H., 1995. Die Bestandsentwicklung der Saatkrähe (*Corvus frugilegus*) in Österreich 1955-1994. *Egretta*, Issue 38, pp. 99-108.
- Pol, S., Romana, C. & Amouyal, P., 1992. *Enterocytozoon infection in AIDS related cholangitis*. Paris, s.n.
- Reetz, J. et al., 2002. First detection of the microsporidium *Enterocytozoon bieneusi* in non-mammalian hosts (chickens). *Internationaional Journal for Parasitology*, Issue 32, pp. 785-787.
- Reichholf, J. H., 2009. *Rabenschwarze Intelligenz*. München: Herbig-Verlag.
- Reimschmidt, M. & Lambert, K.-H., 2006. *Papageien der Welt*. Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer.
- Reinthalder, F. F., Haßl, A., Weinmayr, B. & Ingolic, E., 1993. Epidemiologie und Diagnostik von Mikrosporidien (*Enterocytozoon bieneusi*) bei AIDS-Patienten. *Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol.*, Issue 15, pp. 207-212.
- Rodrigues da Cunha, M. J., Cury, M. C. & Santín, M., 2017. Molecular identification of *Enterocytozoon bieneusi*, *Cryptosporidium*, and *Giardia* in Brazilian captive birds. *Parasitol Res*, Issue 116, p. 487–493.
- Saffo, Z. & Mirza, N., 2019. Successful treatment of *Enterocytozoon bieneusi* gastrointestinal infection with nitrazoxanide in a immunocompetent patient. *IDCases*, Issue 18.
- Sak, B. et al., 2010. Microsporidia in exotic birds: Intermittent spore excretion of *Encephalitozoon* spp. in naturally infected budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *Veterinary Parasitology*, Issue 168, pp. 196-200.
- Sak, B. et al., 2011. The first report on natural *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon* spp. infections in wild East-European House Mice (*Mus musculus musculus*) and West-European House Mice (*M.m.domesticus*) in a hybrid zone across the Czech Republic-German border. *Veterinary Parasitology*, Issue 178, pp. 246-250.

- Santin, M. et al., 2017. Molecular Characterization of *Enterocytozoon bieneusi* in Wild Carnivores in Spain. *Eukaryotic Microbiology*, pp. 1-7.
- Santin, M. et al., 2017. Molecular Characterization of *Enterocytozoon bieneusi* in Wild Carnivores in Spain. *Eukaryotic Microbiology*, pp. 1-7.
- Schwartz, D., Bryan, R., R., W. & Visvesvara, G., 1994. Microsporidiosis in HIV positive patients: current methods for diagnosis using biopsy, cytologic, ultrastructural, immunological, and tissue culture techniques. *Folia Parasitologica*, Issue 41, pp. 101-109.
- Sergeant, 2017. *Epitools Epidemiological Calculators..* [Online] Available at: <https://epitools.ausvet.com.au/oneproportion> [Zugriff am 20 Mai 2020].
- Silva, A. J. D. et al., 1996. Sensitive PCR Diagnosis of Infections by *Enterocytozoon bieneusi* (Microsporidia) Using Primers Based on the Region Coding for Small-Subunit rRNA. *Journal of Clinical Microbiology*, April, pp. 986-987.
- Ślōdkowicz-Kowalska, A., Graczyk, T. K., Nowosad, A. & Majewska, A. C., 2013. First detection of microsporidia in raised pigeons in Poland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, Issue 20, pp. 13-15.
- Sodqi, M., Brazile, P., Gonzalez Canali, G. & Weiss, L., 2004. Unusual pulmonary *Enterocytozoon bieneusi* microsporidiosis in an AIDS patient: case report and review. *Infectious Diseases*, Februar, pp. 230-1.
- Stentiford, G. et al., 2016. Microsporidia - Emergent Pathogens in the Global Food Chain. *Trends in Parasitology*, Januar.
- Stentiford, G. D., Bass, D. & Williams, B. A., 2019. Ultimate opportunist - The emergent *Enterocytozoon* group Microsporidia. *PLoS Pathogens*, Mai.
- Tavallaa, M. et al., 2018. Molecular diagnosis of potentially human pathogenic *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon* species in exotic birds in Southwestern Iran. *Journal of Infection and Public Health*, Issue 11, pp. 192-196.
- Teufelbauer, N., S. Seaman, B. & Dvorak, M., 2017. Bestandsentwicklungen häufiger österreichischer Brutvögel im Zeitraum 1998-2016 – Ergebnisse des Brutvogel-Monitoring. *Egretta*, Issue 55, pp. 43-76.

- Teufelbauer, N., Seaman, B. & Steinmetz, M., 2019. *Birdlife Austria*. [Online] Available at: www.birdlife.at [Zugriff am 16 Dezember 2019].
- Tourtip, S. et al., 2009. Enterocytozoon hepatopenaei sp. nov. (Microsporida: Enterocytozoonidae), a parasite of the black tiger shrimp Penaeus monodon (Decapoda: Penaeidae): Fine structure and phylogenetic relationships. *Journal of Invertebrate Pathology*, September, Issue 102, pp. 21-29.
- Tzipori, S. et al., kein Datum Transmission and establishment of a persistent infection of Enterocytozoon bienewisi, derived from a human with AIDS, in simian immunodeficiency virus-infected rhesus monkeys. *Journal of Infectious Diseases*, pp. 1016-1020.
- Udonsom, R., Prasertbun, R. & Mahittikorn, A., 2019. Identification of Enterocytozoon bienewisi in goats and cattle in Thailand. *BMC Veterinary Research*.
- Uhl, F. et al., 2018. Counting crows: population structure and group size variation in an urban population of crows. *Behavioral Ecology*, Dezember.
- van Pelt-Verkuil, E., van Belkum, A. & Hays, J. P., 2008. *Principles and Technical Aspects of PCR Amplification*. Luxemburg: Springer Science & Business Media.
- Visvesvara, G. et al., 1995. Short-term in vitro culture and molecular analysis of the microsporidian, Enterocytozoon bienewisi. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, September, Issue 42, pp. 506-10.
- Wanga, S.-S. et al., 2018. Prevalence and genotypes of Enterocytozoon bienewisi in China. *Acta Tropica*, Issue 183, pp. 142-152.
- Wang, Z., Orlandi, P. A. & Stenger, D. A., 2005. Simultaneous Detection of Four Human Pathogenic Microsporidian Species from Clinical Samples by Oligonucleotide Microarray. *Journal of Clinical Microbiology*, September, Issue 43, pp. 4121-8.
- Weber, R. et al., 1992. Improved light-microscopical detection of microsporidia spores in stool and duodenal aspirates. *New England Journal of Medicine*, pp. 161-166.
- Weiss, L. & Becnel, J., 2014. *Microsporidia: Pathogens of Opportunity*. s.l.:Wiley Blackwell.
- Weiss, L. et al., 1994. Utility of microsporidian rRNA in diagnosis and phylogeny: a review. *Folia Parasitologica*, pp. 81-90.

- White, T., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*. s.l.:Academic Press, pp. 315-322.
- Wolf, B., Krenn, H. W. & Gereben-Krenn, B.-A., 1997. Der Bestand der Saatkrähen an den großen Winterschlafplätzen in Wien im Winter 1996/97. *Vogelkundliche Nachrichten aus Ostösterreich*, Issue 8, pp. 71-74.
- Zhang, Y. et al., 2018. First detection and genetic characterisation of *Enterocytozoon bieneusi* in wild deer in Melbourne's water catchments in Australia. *Parasites & Vectors*, 11(2).
- Zhao, A. et al., 2019. Molecular Detection and Genotyping of *Enterocytozoon bieneusi* in Racehorses in China. *frontiers in Microbiology*, August.
- Zhao, W. et al., 2016. Genotyping of *Enterocytozoon bieneusi* (Microsporidia) isolated from various birds in China. *Infection, Genetics and Evolution*, Issue 40, pp. 151-154.
- Zhao, W. et al., 2016. Genotyping of *Enterocytozoon bieneusi* (Microsporidia) isolated from various birds in China. *Infection, Genetics and Evolution*, Band 40, pp. 151-154.
- Zhao, W. et al., 2015. Genotyping of *Enterocytozoon bieneusi* in Farmed Blue Foxes (*Alopex lagopus*) and Raccoon Dogs (*Nyctereutes procyonoides*) in China. *PLoS ONE*, November.

9. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Übertragungszyklus von <i>Enterocytozoon bieneusi</i>	5
Tabelle 1: Nachgewiesene Wirtsspezies von <i>Enterocytozoon bieneusi</i> bei Vögeln.....	7
Tabelle 2: Temperaturprotokoll der NESTED PCR-Reaktionen.....	18
Tabelle 3: Reaktionsgemisch für die NESTED PCR NEST 1.....	18
Tabelle 4: Reaktionsgemisch für die NESTED PCR NEST 2 Ansatz A.....	20
Tabelle 5: Reaktionsgemisch für die NESTED PCR NEST 2 Ansatz B.....	20
Tabelle 6: Reaktionsgemisch der NESTED PCR unter modifizierten Bedingungen NEST 1...	22
Tabelle 7: Reaktionsgemisch der NESTED PCR unter modifizierten Bedingungen NEST 2...	23
Tabelle 8: Reaktionsgemische für die PCR der isolierten DNA.....	24
Tabelle 9: Konzentrationsbestimmung der isolierten DNA.....	25

