



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

PREVALENCIA DE MICROSPORA DURANTE UN CICLO DE
PRODUCCION EN CONEJOS NUEVA ZELANDA

TESIS PRESENTADA ANTE LA
DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES DE LA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
DE LA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA
POR
AYDEE FLORES GARCIA

ASESORES: M.V.Z. JUAN ANTONIO FIGUEROA CASTILLO
M.V.Z. MARISELA JUAREZ ACEVEDO



MEXICO, D. F.

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

DEDICATORIA.

A mis Padres:

SERGIO FLORES JIMÉNEZ Y VIRGINIA GARCÍA DE FLORES quienes con su apoyo, cariño y ejemplo, me han otorgado las habilidades y capacidades que me permitirán, el día de mañana enfrentar la vida con éxito.

A mi Novio Jorge:

Por todo el amor y el apoyo que he recibido de su parte a lo largo de estos años y que han sido parte fundamental para la realización de este proyecto y de muchos que todavía están por realizarse, Muchas Gracias por estar a mi lado en todo momento.

A Dios:

Quien me ha enseñado que no solo es importante alcanzar la meta, sino lo que se logra en el intento por alcanzarla.

A mi familia.....

AGRADECIMIENTOS:

A MIS ASESORES:

M.V.Z Juan Antonio Figueroa Castillo, por todos los conocimientos y apoyo que me ha brindado como mi profesor y asesor de tesis.

M.V.Z Marisela Juárez Acevedo, por todos sus conocimientos transmitidos en el área de cunicultura durante mi servicio social, que me han sido de gran utilidad para este proyecto y en mi desarrollo profesional.

AL CENTRO DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN PRODUCCIÓN AVÍCOLA, por permitirme realizar el muestreo de mi tesis en el área de cunicultura.

Al Doctor José Luis Tapia Malagón, del Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica (INDRE), por todas las facilidades otorgadas para la realización de esta tesis, y sobre todo por todos los conocimientos y experiencias que me transmitió en todo este tiempo.

A MI JURADO DE TESIS, los Médicos Veterinarios Zootecnistas: Fernando Constantino Casas, Irene Cruz Mendoza, Verónica Graullera Rivera y Gloria Macias Herrera, por revisar este trabajo, por sus conocimientos y sugerencias desde el inicio de las mismas.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Aydeé Flores

FECHA: 11 / octubre / 2004

FIRMA: 

CONTENIDO

| | <u>Página</u> |
|-------------------------|---------------|
| RESUMEN..... | 1 |
| INTRODUCCIÓN..... | 2 |
| MATERIAL Y MÉTODOS..... | 16 |
| RESULTADOS..... | 23 |
| DISCUSIÓN..... | 24 |
| LITERATURA CITADA..... | 28 |
| CUADROS..... | 35 |
| FIGURAS..... | 39 |

RESUMEN

FLORES GARCÍA AYDEÉ. Prevalencia de microspora durante un ciclo de producción en conejos Nueva Zelanda (Bajo la dirección del M.V.Z Juan Antonio Figueroa Castillo y M.V.Z Marisela Juárez Acevedo).

Con la finalidad de determinar la prevalencia de esporas de microspora en una granja productora de conejo Nueva Zelanda blanco, ubicada en la Delegación Tláhuac de la Ciudad de México, se recolectaron 177 muestras de orina de animales en diferentes etapas de producción, la recolección de muestras fue de forma individual. Con la orina se realizaron frotis que se tiñeron con Blanco de Calcofluor M2R, esta técnica se utilizó como una prueba tamiz. Los frotis en donde se encontraron estructuras compatibles con esporas se tiñeron con Weber y Gram-Cromotropo para la confirmación del diagnóstico. Con la prueba tamiz se observaron 6 muestras sugerentes a microspora lo que representaba una prevalencia del 3.3%, sin embargo, en las pruebas confirmatorias sólo 2 muestras de orina fueron positivas, una en la etapa de engorda y en un semental, representando una prevalencia final de 1.1%. Se concluye que la prevalencia de microspora en los conejos de la granja estudiada es muy baja.

INTRODUCCIÓN

El reconocimiento de los "**microsporidios**" como entidad de seres diferenciados del resto de Protozoos se debe a Balbini en 1882, al proponer la creación de un nuevo orden entre los esporozoos: protozoos que al final de su ciclo forman esporas de resistencia; en aquel momento, *Nosema bombycis* era la única especie de microsporidio conocida⁽¹⁾.

A lo largo del siglo XX, se propusieron varias clasificaciones para este grupo de Protozoos como fue el caso de Martínez Fernández en 1995, y Sprague quien en 1977 crea el Phylum Microspora dentro del subreino Protozoa, para agrupar a todos los microsporidios. La confusión creada por esta denominación, no ha sido finalmente resuelta, Becnel y Sprague en el año de 1998 consideraron que debería de ser Microsporidia, como lo propuso Balbín en 1882, sin embargo, algunos autores, proponen incluir a estos organismos en un nuevo taxón que reúna a los eucariotas sin mitocondrias^(2,3).
(Cuadro 1)

El phylum Microspora esta formado por un diverso grupo de eucariontes intracelulares oportunistas, conocidos como microsporidia y caracterizados por poseer un aparato de infección altamente especializado, llamado túbulo polar⁽⁴⁾.

Los microsporidios son considerados verdaderos Eucariontes, porque tienen un núcleo con una membrana envolvente y membranas intracitoplasmáticas ordenadas. La configuración nuclear es diferente entre los géneros de microsporidios; en algunos se presentan dos núcleos juntos llamados Diplocaryon, mientras que en otros solo existe un solo núcleo que es constante como en *Encephalitozoon* o doble como en el género *Nosema*⁽⁵⁾.

Si bien estos protozoarios, fueron descubiertos desde hace más de 100 años, es a raíz de la aparición del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) en el hombre, que se reconocen como patógenos importantes y en la actualidad se les considera emergentes incluso en pacientes inmunocompetentes⁽⁶⁾.(Cuadro 2)

La aparición de entidades nosológicas fuertemente inmunosupresoras, han influido para que una serie de organismos de vida libre o parásitos de animales vertebrados e invertebrados, tales como los microsporidios, sean capaces de infectar al hombre, habituarse a él y finalmente producirle alguna patología importante, no obstante las infecciones humanas por microsporidios, que siempre han sido raras y puntuales están cobrando auge y ocasionando así revisiones exhaustivas, además de que las especies de

microsporidios que afectan al hombre difieren entre si en cuanto a su morfología. (Cuadro 3)

En cualquier caso, el contagio de la especie humana es muy bajo, estando su capacidad infectiva muy condicionada por la capacidad de respuesta de su sistema inmunitario⁽⁷⁾.

ENCEFALITOOZONOSIS EN CONEJOS

La encefalitozoonosis, es una enfermedad parasitaria producida por *Encephalitozoon cuniculi*, descubierto en 1922 en el cerebro de conejos por Wright y Craighead⁽⁸⁾ y reconocido con ese nombre en 1923 por Levaditi, Nicolau y Schoen⁽⁹⁾, confirmado y redescrito por Weiser en 1964⁽¹⁰⁾. Desde entonces su capacidad infectiva ha sido descrita en más de 30 especies de aves y mamíferos, incluido el hombre, siendo la gravedad de la infección muy variable entre los diferentes hospedadores⁽⁷⁾.

En los animales domésticos, *E. cuniculi* es una de las especies de *Microspora* que puede ocasionar enfermedad manifiesta y subclínica, en sus hospederos y puede haber transmisión cruzada entre algunas especies.⁽¹¹⁾ En los conejos, es el protozoario que con mayor frecuencia se asocia a parálisis y enfermedad vestibular⁽¹²⁾.

Existen diferentes cepas o genotipos de *E. cuniculi*, nombradas de acuerdo al huésped de donde se aislaron

inicialmente: Tipo I de conejo, Tipo II de ratón y Tipo III de perro^(13,14,15). Sin embargo, no indican que estos sean los huéspedes naturales, debido a que el tipo II también se ha encontrado en ratas⁽⁶⁾ y zorro azul⁽¹⁶⁾, mientras que en el hombre y conejo se han aislado los 3 tipos^(17,18,19).

MORFOLOGÍA

Encephalitozoon cuniculi, produce esporas de forma oval, gram positivas, que miden 1.5 por 2.5 μm ⁽²⁰⁾, y que se encuentran protegidas por dos gruesas capas externas, la "exospora" de naturaleza proteica y la "endospora", quitinosa, lo que da una idea de su resistencia en el ambiente. Tiene un núcleo típicamente eucariota, inmerso en un citoplasma en el que existe retículo endoplásmico rugoso y un primitivo aparato de Golgi, no posee mitocondrias⁽⁷⁾.

Su filamento polar tiene de 6 a 8 vueltas o espirales. Los merontes son redondos u ovalados y miden de 2 a 6 por 1 a 3 μm . Los esporontes aparecen libres en el centro de una vacuola parasitófora, como sucede con todos los estados evolutivos del género *Encephalitozoon* y se dividen en dos esporoblastos que finalmente se van a madurar dando las esporas⁽²¹⁾. (Figura 1)

CICLO BIOLÓGICO

Probablemente los conejos se infectan vía oral a muy temprana edad por las esporas que elimina la madre en la orina, aunque hay evidencia de transmisión sexual ⁽²²⁾ y congénita⁽²³⁾.

Otro mecanismo de infección es el ocasionado por la ingestión de material contaminado (agua o pienso) con esporas, procedentes de la orina de los animales infectados, esta eliminación se realiza de forma esporádica.

Una vez en el tubo digestivo se desconoce cuál es el mecanismo *in vivo* por el que lo atraviesan hacia el interior del hospedero. *In vitro* se observa que de la espora se desprende su casquete polar y que el túbulo o filamento polar sale de aquella⁽⁷⁾.

La espora infecta la célula huésped introduciendo el filamento polar hacia una vacuola parasitófora donde transfiere su esporoplasma, el parásito tiene afinidad por células del túbulo renal y células endoteliales y macrófagos⁽²⁴⁾.

Una vez infectada la célula, comienza una fase proliferativa o merogonia, en la que por fisión binaria se producen los merontes dentro de una vacuola parasitófora. La maduración de los mismos conduce a la fase de esporogonia, con formación de esporontes binucleados, que al dividirse se

transforman en esporoblastos uninucleados. En éstos últimos se va depositando una sustancia densa en las paredes hasta la formación de esporas⁽²⁴⁾.

Cuando esto sucede dentro de las células del túbulo renal, las esporas salen en la orina, y de ahí al ambiente. Si las células no tienen salida al exterior, se va repitiendo el ciclo hasta que el desarrollo de anticuerpos va controlando la invasividad del parásito, ya que en presencia de estas inmunoglobulinas son mucho más sensibles a la acción de los macrófagos, dicho parásito tiene tropismo por el tejido nervioso, renal, cardiaco, hepático y pulmonar⁽⁷⁾.

El periodo prepatente es de 30 días, el patente de 63 y el pospatente no se ha definido, el parásito puede permanecer latente durante años y reactivarse cuando hay inmunosupresión. (Figura 2) Los animales infectados experimentalmente eliminan esporas entre los 30 y 60 días postinfección. Luego cesa la eliminación hasta los 90 días, en que comienza nuevamente, pero en menor cuantía y de forma intermitente⁽²⁴⁾.

INMUNIDAD

El desarrollo de inmunidad comienza con una subida rápida de las tasas de IgM, a los 17 días ya es más abundante la presencia de IgG, a los 35 días ya no es posible hallar

tasas de IgM, mientras que la IgG persiste durante mucho más tiempo, como se sabe la IgG es producida por las células plasmáticas del bazo, los linfonodos y la médula ósea. Es la inmunoglobulina de mayor concentración en la sangre, razón por lo cual desempeña la función más importante en los mecanismos de defensa mediados por anticuerpos. La IgM también es producida por células plasmáticas del bazo, los linfonodos y la médula ósea. En la mayoría de los mamíferos es la segunda en términos de concentración en suero después de la IgG. La IgM es la clase de inmunoglobulina que se produce en mayor cantidad en una respuesta inmunitaria primaria, si bien se produce en una cantidad relativamente pequeña la IgM es mucho más eficiente que la IgG⁽⁷⁾.

LESIONES

En el conejo con encefalitozoonosis es frecuente encontrar lesiones granulomatosas en riñones, cerebro, hígado y pulmones, produce además focos necróticos, degeneración hialina, necrosis hepática no supurativa y neumonía intersticial. Sin embargo, después de tres meses ya no es posible poner en evidencia al parásito en hígado y pulmones, en cambio la infección tiende a centrarse con el tiempo en riñones y cerebro. En otros órganos, como el corazón es posible encontrar ocasionalmente algún granuloma⁽⁷⁾.

En el cerebro la imagen histológica es la de una encefalitis granulomatosa, con la formación de granulomas focales constituidos por un área central de necrosis rodeada de linfocitos, células plasmáticas, células de la glía y en ocasiones células epitelioides. La localización de las lesiones no sigue un patrón, pero es más frecuente encontrarlas en la cercanía de los ventrículos cerebrales y vasos sanguíneos⁽⁷⁾.

En los riñones se observan áreas focales de nefritis intersticial, con infiltrados de linfocitos y células plasmáticas, fibrosis, dilatación y degeneración tubular. Conforme el proceso se hace crónico, los glomérulos y túbulos afectados se van sustituyendo por fibras de colágeno, que al retraerse, tiran de la cápsula renal, produciendo depresiones típicas de la corteza y cápsula⁽⁷⁾.

SIGNOLOGÍA

Algunos de los signos observados son letargia, temblor, parálisis general, polidipsia, poliuria, tortícolis, pérdida de peso y en ocasiones signos neurológicos⁽²⁵⁾.

Si bien el cuadro clínico nervioso, está bien descrito en la literatura científica, en la práctica apenas se han encontrado granjas donde aparecen animales con signos nerviosos asociables a encefalitozoonosis, por lo que se

entiende que en condiciones de granja no es el signo más revelador de la enfermedad. El único cuadro nervioso frecuente es la neuritis de los nervios motores de las extremidades posteriores, observando a los conejos abiertos de patas (*splay-leg*), de estos animales, el 90% presentan lesiones compatibles con encefalitozoonosis⁽⁷⁾.

Los conejos son animales muy bien adaptados a la enfermedad, de manera que la gravedad de las lesiones encontradas no tiene necesariamente correlación con las manifestaciones clínicas de la misma, pudiendo encontrarse con frecuencia animales aparentemente sanos, en los que de forma macro y microscópica se aprecia una infección muy extendida. Esto es especialmente válido para las lesiones nerviosas, que pueden ser muy abundantes y sin embargo, no manifestar el animal vivo signo nervioso alguno. De hecho, en las granjas prácticamente no se encuentran animales muertos de forma natural únicamente por encefalitozoonosis, siempre presentan lesiones de otra enfermedad, normalmente infecciosa, que suele ser la causa directa de la muerte⁽⁷⁾.

Los animales afectados de forma crónica presentan un peso en general bajo para su edad, hasta un 30% menos⁽²⁶⁾.

DIAGNÓSTICO

Debido a los variados signos, su estado subclínico, su cronicidad y la presencia de estados patológicos colaterales, este parásito ha sido difícil de diagnosticar⁽²⁷⁾.

En los criaderos de conejos se utilizan técnicas serológicas e histopatológicas, sin embargo, no siempre resultan las más indicadas, principalmente en los animales inmunodeficientes, que no desarrollan una respuesta basada en anticuerpos o bien el diagnóstico se realiza *post mortem*.

El examen microscópico de orina es un método de diagnóstico que tiene como ventajas que se realiza *in vivo* y demuestra esporas, que son en ese momento las formas infectantes⁽⁴⁾.

TRATAMIENTO

Estudios *in vitro* han demostrado la sensibilidad de *Encephalitozoon cuniculi* ante las oxitetraciclinas, por lo que este antibiótico se ha indicado en animales con signología nerviosa⁽²⁸⁾.

En estudios experimentales se ha demostrado que el albendazol (benzimidazol antihelmíntico), durante 3 a 10 días a una dosis de 20mg/kg ha resultado benéfico en conejos y el hombre⁽²⁸⁾.

En el tratamiento de conejos con albendazol, se debe de tener cuidado, debido a su potencial teratogénico y no se debe de administrar por tal razón a hembras gestantes⁽²⁸⁾.

El uso de corticosteroides en el tratamiento de signos neurológicos asociados con *E. cuniculi* es controversial, ya que puede ser utilizado para disminuir la respuesta inflamatoria del cerebro, causada por la ruptura de las células, así como por la encefalitis granulomatosa que produce dicha enfermedad, por lo que se ha demostrado que el uso de bajas dosis de dexametasona puede ayudar, pero a la vez es bien sabido que los corticosteroides en conejos con encefalitozoonosis producen efectos de inmunosupresión⁽²⁸⁾.

PROFILAXIS

Debido a que los mecanismos de transmisión de estos parásitos, así como las fuentes de infección todavía son poco conocidas, la prevención de las microsporidiosis no se puede establecer claramente. Sin embargo, tomando en cuenta algunos datos que se conocen acerca de la sensibilidad de las esporas al calor y a la congelación, se puede sugerir la aplicación de estos medios físicos para evitar infecciones⁽²⁹⁾.

Desinfectantes que se revelan eficaces experimentalmente son la formalina al 1% y los yodóforos al 0.5%, pero la alta prevalencia que se observa en granjas donde el manejo de la

desinfección es bueno, hace pensar que una parte importante de los contagios se deben producir con anterioridad a la entrada de los animales en la granja. La radiación ultravioleta es muy efectiva en la destrucción de esporas⁽⁷⁾.

Debido a que frecuentemente los animales orinan en el bebedero y comedero, debe de realizarse un lavado y una desinfección correctos de ambos, no aprovechando nunca los restos del alimento para volver a llenar los comederos⁽⁷⁾.

IMPORTANCIA

Considerando el enorme potencial zoonótico que tiene *Encephalitozoon cuniculi* y los efectos negativos que ejerce en la producción cunícola, la Asociación Federal Europea de Laboratorios de la Ciencia Animal (FELASA), recomienda monitoreos periódicos en los conejos de laboratorio y granja⁽³⁰⁾.

Sin embargo en México, los informes de *E. cuniculi* son escasos, se le ha encontrado en necropsias de perros y conejos⁽³¹⁾, pero en conejos vivos no se ha diagnosticado, ni se ha precisado en que etapa del ciclo productivo es más frecuente⁽³²⁾.

La forma más rápida de saber si una granja es sospechosa de tener animales con encefalitozoonosis es la observación de las lesiones al momento de realizar la necropsia, y

posteriormente enviar muestras al laboratorio, donde se confirme el diagnóstico⁽²⁶⁾.

Debido a lo anterior, se consideró pertinente proceder a determinar la prevalencia de conejos positivos a esporas de *Microspora* durante un ciclo de producción de carne de conejo, mediante la recolección de orina y realización de tres diferentes técnicas de tinción para el diagnóstico.

HIPÓTESIS

La prevalencia de conejos positivos a esporas de Microspora es mayor al final de la engorda.

OBJETIVO

Determinar la prevalencia de esporas de Microspora en la orina de conejos.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se llevo acabo en el área de producción cunícola del Centro de Enseñanza Investigación y Extensión en Producción Avícola (CEIEPA), ubicado en la calle de Salvador Díaz Mirón s/n, Col. Zapotitlán, Delegación Tláhuac, D.F.

Se analizaron en total 177 muestras de orina de conejos distribuidos de la siguiente forma:

Conejas durante la etapa de gestación (n = 17), hembras en etapa de lactación (n = 17), hembras vacías (n = 55), hembras que se encontraban gestantes y en periodo de lactación (n = 7), sementales (n = 10) reemplazos del pie de cría (n = 19), gazapos lactantes (n = 12), cada uno de los animales mencionados se encontraban alojados de manera individual.

En los animales de engorda la muestra se colecto por jaula (22 jaulas con 5 animales c/u), por lo que la muestra se trabajó de forma grupal dando lugar a (n = 22) muestras colectadas y dependiendo de los resultados que se obtuvieron, se procedió a tomar la orina de forma individual y finalmente se colectó orina de 18 animales al momento de su sacrificio para el abasto.

RECOLECCIÓN DE LA ORINA

Los conejos se encuentran alojados dentro de jaulas distribuidas de manera horizontal formando una línea que corre a lo largo de la nave (tipo Flat-Deck), lo cual permite una observación adecuada de los animales y facilita su manejo, al mismo tiempo que proporciona una buena ventilación y exposición a la luz de forma homogénea.

Las jaulas donde se encuentran alojados los conejos cuentan con las siguientes medidas: 90 cm largo x 60 cm ancho x 40 cm de altura, en el caso de las conejas reproductoras y los sementales, y con respecto a los reemplazos, tanto hembras como machos se encuentran alojados en jaulas con medidas de 90 cm de largo x 30 cm de ancho y 40 cm de altura, ya que el espacio que requieren estos animales, es menor comparado con las demás etapas productivas.

A través de observaciones etológicas previas, se ha podido determinar que los conejos eligen un área dentro de la jaula para orinar, la cual se identifica fácilmente por el rastro de orina que dejan, justo en ese lugar por debajo de las jaulas se colocaron bolsas de plástico de 20 cm de ancho x 30 cm de largo, sujetadas a las jaulas por medio de ganchos de metal.

Las bolsas se instalaron por la mañana y se les mantuvo en observación durante algunas horas, inmediatamente después

de que los conejos orinaron, se les retiro la bolsa y así se minimizó la contaminación de la orina con heces.

En el caso de los animales para abasto que fueron sacrificados al término de la engorda, la orina se colectó directamente de la vejiga, después de llevar acabo el sacrificio indicado, que es el que permite una muerte rápida y un adecuado desangrado del conejo, el más común es el desnucado, se sujeta al conejo de las patas posteriores con una mano y con la otra se sujeta a la altura de la nuca, procurando que el dedo pulgar se proyecte en forma perpendicular, hacia su articulación occípito-atloidea, para posteriormente aplicar la suficiente fuerza con su mano para desarticular la unión de estas vértebras. Posteriormente se realiza el desangrado colgando al conejo de sus extremidades posteriores para después cortar la cabeza y producir un rápido desangrado, una vez retirada la cabeza se cortan también las extremidades anteriores a nivel de la primera articulación. El desollado consiste en retirar la piel del cuerpo, se debe realizar un corte alrededor de las extremidades posteriores por las que el conejo está colgado, después cortar a lo largo de cada muslo hasta el inicio del vientre, por último, se sujeta la piel firmemente y se jala hacia abajo, hasta que salga completamente del cuerpo. Para el eviscerado, se realiza un corte longitudinal a lo largo

del cuerpo para retirar todos los órganos internos, en este punto es cuando se retira la vejiga realizando un corte a la altura de la uretra para retirarla del cuerpo del conejo⁽⁴³⁾ y posteriormente, la orina se transfirió a un recipiente de plástico y se identificó con los datos del animal (edad, género, etapa productiva, fecha de recolección), y se mantuvo en refrigeración hasta ser procesada.

Las muestras de orina recolectadas, se procesaron en el Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica (INDRE), en el laboratorio de Protozoología.

El método estadístico que se utilizó para la obtención de la prevalencia fue la fórmula: **PREVALENCIA** = Número de casos de una enfermedad / Población en riesgo x 10ⁿ.

ANALISIS DE LAS MUESTRAS

▪ Tinción con Blanco de Calcofluor M2R.

Todas las muestras se analizaron mediante la técnica de Blanco Calcofluor M2R, que se utilizó como prueba tamiz.

Las muestras de orina se transfirieron a tubos y se lavaron con solución amortiguada de fosfatos pH 7.2 mediante 2 ciclos de centrifugación (3,000 rpm/ 12 minutos) y decantación. La pastilla se resuspendió y de ella se realizaron frotis en portaobjetos, se dejaron secar al aire libre y se fijaron con metanol durante 10 minutos.

Los frotis de orina fijados se tiñeron con blanco calcofluor M2R durante 15 minutos, de acuerdo con la técnica propuesta por Didier *et al*⁽³³⁾, y se examinaron en un microscopio de fluorescencia con el objetivo de 100x.

Las paredes celulares de los hongos y esporas fijan el colorante Blanco de Calcoflúor aumentando considerablemente su visibilidad en los tejidos y otras muestras.

En el caso de las muestras, que se creyó que podrían ser positivas a la presencia de esporas de microspora, se confirmó o rechazó el diagnóstico con el apoyo de otras dos tinciones: Weber y Gram-Cromotropo⁽³³⁾.

▪ Tinción de Weber

La técnica de Weber es la usada en el Laboratorio de Protozoología para el diagnóstico de estos parásitos. Esta técnica tiñe las esporas rojo intenso que sobresale del color verde de contraste.

Los pasos para llevar acabo la tinción son los siguientes:

- 1.- Lavar la muestra con solución amortiguada de fosfatos pH 7.2 mediante 2 ciclos de centrifugación (3,000 rpm/ 12 minutos) y realizar la decantación.
- 2.- La pastilla se resuspende.
- 3.- Se coloca la muestra en un portaobjeto y se deja secar.
- 4.- Fijar con metanol.
- 5.- Agregar cristal violeta 2 minutos y lavar con agua bidestilada.
- 6.- Cubrir con lugol 2 minutos y decolorar con alcohol acetona y terminar de enjuagar con agua.
- 7.- Cubrir con el colorante de Weber y dejar reposar 1 hora a 55 C. Posteriormente lavar con alcohol ácido cromotrope y alcohol de 96 C.
- 8.- Introducir en alcohol absoluto durante 10 minutos.
- 9.- Por último introducir en Xilol durante 5 minutos, sacar y dejar secar.

10.- Observar al microscopio con en el objetivo de inmersión⁽³⁴⁾.

▪ **Tinción de Gram- Cromotropo**

Después de lavar y centrifugar las muestras, los pasos para llevar acabo la tinción son los siguientes:

- 1.- Colocar la muestra en un portaobjeto y dejar secar.
- 2.- Fijar con metanol.
- 3.- Agregar cristal violeta 2 minutos y lavar con agua bidestilada.
- 4.- Cubrir con lugol 2 minutos y decolorar con alcohol acetona abundante y terminar de enjuagar con agua.
- 5.- Cubrir con Gram-Cromotropo durante 1 hora a 55 C y lavar con alcohol ácido y alcohol de 96.
- 6.- Introducir en alcohol absoluto durante 10 minutos.
- 7.- Por último introducir en Xilol durante 5 minutos, sacar y dejar secar.
- 8.- Observar al microscopio con el objetivo de 100X⁽³⁵⁾.

La tinción de Gram cromotropo permite la observación con microscopio de luz, y en este caso las esporas se colorean rosado claro con un fondo verde azul, algunas aparecen transparentes, pero la mayoría muestran una pequeña línea central que corresponde al túbulo polar, lo que confirma el diagnóstico de microspora^(36, 37, 38, 39).

RESULTADOS

Mediante la tinción con Blanco Calcofluor M2R, en 6 muestras se evidenciaron estructuras compatibles con esporas, estas muestras corresponden a: 1 muestra en hembras gestantes, 1 muestra en hembras vacías, 1 muestra en un semental, 2 muestras en conejos en engorda y 1 muestra en conejos para abasto, utilizando la formula estadística para obtener la prevalencia:

$$\text{PREVALENCIA} = \frac{\text{Número de casos de la enfermedad}}{\text{Población en riesgo}} \times 10^n$$
$$\text{PREVALENCIA} = \frac{6}{177} = 0.03 \times 100 = 3.3\%$$

Se obtuvo como primer resultado una prevalencia del 3.3%, con la tinción de Weber y Gram-Cromotropo sólo en los sementales y animales para abasto se confirmó la presencia de esporas de *Encephalitozoon cuniculi* en la granja analizada, y al realizar nuevamente la formula, pero con los nuevos resultados:

$$\text{PREVALENCIA} = \frac{2}{177} = 0.01 \times 100 = 1.1\%$$

Se obtuvo una prevalencia final del 1.1%. (Cuadro 4)

DISCUSIÓN

En el Centro de Enseñanza e Investigación en Producción Avícola, en el área de cunicultura donde se realizó el estudio se tiene información sobre la presencia de *Encephalitozoon cuniculi* ⁽³²⁾ y *Toxoplasma gondii* ⁽⁴¹⁾, que son dos de los principales agentes que pueden causar signología nerviosa en los conejos.

Esporádicamente se observan animales con trastornos nerviosos, sin embargo, en la mayoría de los casos no se precisa el diagnóstico. ⁽³²⁾ Durante el desarrollo del presente estudio no se observaron animales con signología sugerente a encefalitozoonosis, incluso los conejos positivos a esporas no mostraron signos de enfermedad.

El diagnóstico de *E. cuniculi* ha sido difícil por el tamaño (1.5 a 2.5 μ m) y forma de la espora, que la hace fácilmente confundible con hongos, bacterias, levaduras o restos de colorante que se utiliza para realizar la tinción ^(41,42).

De las 177 muestras de orina examinadas, 6 fueron positivas mediante la tinción con Blanco de Calcofluor M2R.

La tinción con Blanco Calcofluor M2R se utiliza como una prueba tamiz, debido a que tiene una alta sensibilidad y requiere de poco tiempo, sin embargo, puede generar algunos falsos positivos debido a la gran similitud de las esporas de

microspora con las levaduras, por lo que fue necesario recurrir a otras técnicas para corroborar los resultados, las técnicas de Weber y Gram-Cromotropo, que confirmaron el diagnóstico de 2 muestras positivas a esporas de microspora, ya que aunque estas técnicas requieren de más tiempo de tinción si pueden discernir entre esporas y levaduras⁽³³⁾.

Las técnicas tintoriales empleadas en este estudio, únicamente son de utilidad durante el periodo en el que se están eliminando las esporas y no detectan al parásito en estado de latencia⁽¹⁾, por lo que se sugiere que se realicen además otras técnicas que pueden hacerlo, o bien repetir el examen de orina periódicamente principalmente en el pie de cría, que son los animales que se mantienen más tiempo en la granja y los que pueden transmitirlo a los gazapos.

La importancia de realizar estas técnicas, radica en que aunque sea difícil encontrar a la mayoría de los animales eliminando esporas, justo en el momento en que se realiza el muestreo, sirven como técnica de diagnóstico, que puede realizarse a los animales *in vivo*⁽³³⁾, sin someterlos a un estado de estrés, realizando la técnica de recolección de orina que se utilizó en el presente estudio, la cual demostró ser fácil de realizar y no ser un método invasivo para los conejos.

De tal manera que no se tiene que esperar hasta hallar lesiones compatibles con encefalitozoonosis al momento de la necropsia, la cual es un otra técnica de diagnóstico, pero con la desventaja de que los animales ya están muertos y no se les puede realizar un seguimiento⁽³²⁾.

Al realizar muestreos periódicos de orina en las granjas de conejos, no solamente se estaría identificando animales portadores de *E. cuniculi*, sino que también nos ayudaría a tener una idea del grado de higiene y profilaxis que se maneja en las granjas, ya que como se menciona en el presente estudio, una de las vías de transmisión de este parásito y de muchas otras enfermedades en conejos es por medio del material contaminado con orina de animales infectados, por lo cual entre mejor se lleven a cabo este tipo de medidas preventivas, menor será el riesgo de que los animales se contagien⁽⁷⁾.

Se concluye que la prevalencia de esporas de *Encephalitozoon cuniculi* en los conejos examinados en el Centro de Enseñanza e Investigación Avícola, en el área de Cunicultura, fue muy baja (1.1%)

Con esta prevalencia tan baja, se puede decir que en esta granja los animales infectados con *E. cuniculi*, son muy pocos comparados con la población total muestreada, probablemente estos resultados tiene relación con el tipo de

sistema que se maneja en la granja el cual es del tipo tecnificado, y que cada animal se encuentra alojado en su jaula, evitando de esta manera la transmisión horizontal de enfermedades, a excepción de los animales de engorda que están en forma grupal⁽³²⁾.

Cabe mencionar que la limpieza de la granja analizada se realiza diariamente y que las medidas de higiene con las que se manejan a los animales son buenas, así como los métodos de desinfección de jaulas y áreas de la nave se realizan semanalmente.

Por último se sugiere, la realización de muestreos en otras granjas cunícolas, que cuenten con diferente sistema de producción y grado de tecnificación, para así poder determinar si la transmisión de *E. cuniculi* es mayor o menor, dependiendo de estos factores, así como la realización de necropsias a los animales que mueran en las granjas por causas desconocidas o conocidas, al igual de la revisión de los animales que se destinarán para el abasto, y así de este modo poder contar en un futuro con mayor información de la que se tiene hasta el momento con respecto al *E. cuniculi* en México.

LITERATURA CITADA

- 1.-Canning, Kreier, J.P. and Baker, R.J. Microsporidia. Parasitic protozoa 2nd ed., Vol. 6. Academic. Press in New York. E. U. 1993; 299-385.
- 2.-Bornay-Llinares FJ, da Silva AJ, Moura H, Schwartz DA, Visvesvara GS, Pieniazek NJ. Immunologic, microscopic, and molecular evidence of *Encephalitozoon intestinalis* (*Septata intestinalis*) infection in mammals other than humans. J Infect Dis 1998; 178 (3): 820-6.
- 3.-Didier ES. Microsporidiosis. Clin Infect Dis 1998; 27 (1): 1-7; quiz 8.
- 4.-Wasson K, Peper RL. Mammalian microsporidiosis. Vet Pathol 2000;37:113-128
- 5.-Muller A, Bialek R, Kamper A, Fatkenheuer G, Salzberger B, Franzen C. Detection of microsporidia in travelers with diarrhea. J Clin Microbiol 2001; 39(4): 1630-2.
- 6.-Müller-Doblies UU, Herzog K, Tanner I, Mathis A, Deplazes P. First isolation and characterisation of *Encephalitozoon cuniculi* from a free-ranging rat (*Rattus norvegicus*) Vet Parasitol 2002;107:279-285.
- 7.-Rosell Pujol JM. Enfermedades del conejo. 2 tomos. Ediciones Mundi Prensa.2000
- 8.-Wright J H, Craighead E M. Infectious motor paralysis in young rabbit. J Exp Med 1992; 36:135-140.

- 9.-Levaditi C, Nicolau S, Schoen R. L'agent etiologique de l'encéphalite epizootique du lapin (*Encephalitozoon cuniculi*). C.R. Soc Biol Paris 1923; 89:984-986.
- 10.-Weiser J. On the taxonomic position of the genus *Encephalitozoon* Levaditi, Nicolau & Schoen, 1923 (Protozoa, Microsporidia). *Parasitol* 1964; 54:749-751.
- 11.-Vavra J, Bedrnik P, And Cinatl J. Isolation and in vitro cultivation of the mammalian microsporidian *Encephalitozoon cuniculi*. *Folia Parasitologica (Praha)* 19- 349-354 1972.
- 12.-El Naas A, Levkut M, Revajova V, Levkutova M, Hipikova V, Letkova V. Immune response to *Encephalitozoon cuniculi* infection in laboratory mice. *Vet Parasitol* 1999; 82(2): 137-43.
- 13.-Biderre C, Mathis A, Deplazes P, Weber R, Metenier G, Vivares CP. Molecular karyotype diversity in the microsporidian *Encephalitozoon cuniculi*. *Parasitol* 1999;118:439-445.
- 14.-Sobottka I, Albrecht H, Visvesvara GS, Pieniazek NJ, Deplazes P, Schwartz DA, Laufs R, Elsner H-A. Inter and intra species karyotype variations among *Encephalitozoon* species as determined by pulsed-field gel electroforesis. *Scand J Infec Dis* 1999;31:555-558.

- 15.-Xiao L, Li L, Visvesvara GS, Mours H, Didier ES, Lal AA
Genotyping *Encephalitozoon cuniculi* by multilocus
analyses of genes with repetitive sequences. J Clin
Microbiol 2001;39:2248-2253.
- 16.-Mathis A, Akerstedt J, Tharaldsen J, Odegaard O, Deplazes
P. Isolates of *Encephalitozoon cuniculi* from farmed blue
foxes (*Alopex lagopus*) from Norway differ from isolates
from Swiss domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*).
Parasitol Res 1996;82:727-730.
- 17.-Mathis A, Michel M, Kuster H, Müller C, Weber R, Deplazes
P. Two *Encephalitozoon cuniculi* strains of human origin
are infectious to rabbits. Parasitol 1997;114:29-35.
- 18.-Rossi P, La Rosa G, Ludovisi, Tamburrini A, Gomez Morales
MA, Pozio E. Identification of a human isolate of
Encephalitozoon cuniculi type I from Italy. J Parasitol
1998;28:1361-1366.
- 19.-Snowden K, Logan K, Didier ES. *Encephalitozoon cuniculi*
strain III is a cause of encephalitozoonosis in both
humans and dogs. J Infec Dis 1999;180:2086-2088.
- 20.-Keeling JP, Fast NM. Microsporidia: biology and evolution
of highly reduced intracellular parasites. Annu Rev
Microbiol 2002;56:93-116.

- 21.-Kotler DP, Orenstein JM. Prevalence of intestinal microsporidiosis in HIV-infected individuals referred for gastroenterological evaluation. *Am J Gastroenterol* 1994; 89(11): 1998-2002.
- 22.-Fuentelba IC, Mahoney NT, Shaddock JA, Harvill J, Wicher V, Wicher K. Hepatic lesions in rabbits infected with *Encephalitozoon cuniculi* administered per rectum. *Vet Pathol* 1992; 26:536-540.
- 23.-Hunt RD, King NW, Foster HL. Encephalitozoonosis: evidencia for vertical transmission. *J Infec Dis* 1972;126:212-214.
- 24.-Cox JC, Hamilton RC, Attwood HD: An investigation of the route and progression of *Encephalitozoon cuniculi* infection in adult rabbits. *J Protozool* 1979;26:260-265.
- 25.-Wilson JM. The biology of *Encephalitozoon cuniculi*. *Med Biol* 1979;57:84-101.
- 26.-Abaza SM, Makhlof LM, el-Shewy KA, el-Moamly AA. Intestinal opportunistic parasites among different groups of immunocompromised hosts. *J Egypt Soc Parasitol* 1995; 25(3): 713-27.
- 27.-Pakes, S.P. Gerrity, L.W. (1994) Protozoal diseases. In the *Biology of the Laboratory Rabbit*, 2nd edn (P.J. Manning, D.H. Ringler, C.E. Newcomer, eds). Pp 205-224. Academic Press.

28.-<http://www.rabbit.org/journal3-2/e-cuniculi.html>

- 29.-Weber R, Bryan RT, Schwartz DA, Owen RL. Human microsporidial infections. Clin Microbiol Rev 1994; 7(4): 426-61.
- 30.-Kraft V, Blanchet HM, Boot R, Deeny A, Hansen AK, Hem A, van Herck H, Kunstyr I, Needham JR, Nicklas W, Perrot A, Reh binder C, Richard Y, de Vroey G. Recommendations for health monitoring of mouse, rat, hamster, guineapig and rabbit breeding colonies. Lab An 1994;28:1-12.
- 31.-Valverde CG, Ramírez DG, Aburto ME. Encephalitozoonosis, informe de un caso. Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Pequeñas Especies, A.C. Memorias del XXIV Congreso Nacional Puebla, Pue. P129-132.
- 32.-Candanosa AE; Juárez AM, Juárez RM, Constantino CF, Salas G. Diagnóstico de *Encephalitozoon cuniculi* en conejos de una granja de la ciudad de México. Memorias de la XXXIX Reunión Anual de Investigación Pecuaria. México, D.F. 27 al 31 de Octubre del 2003. p 30
- 33.-Didier ES, Orenstein JM, Aldras A, Bertucci D, Rogers LB, Janney A. Comparación of tree staining methods for detecting microsporidia in fluids. J Clin Microbiol 1995;33:3138-3145.

- 34.-Weber R, Bryan RT, Owen RL. Improved light-microscopical detection of microsporidia spores in stool and duodenal aspirates. *N Engl J Med* 1992; 326:161-166.
- 35.-Ignatius R, Lehmann M, Miksits K, Regnath T, Arvand M, Engelmann E. A new acid-fast trichrome stain for simultaneous detection of *Cryptosporidium parvum* and microsporidial species in stool specimens. *J Clin Microbiol* 1997; 35(2): 446-9.
- 36.-Berg J, Diaz LE, Bender BS. Microsporidia in humans. *Ann Intern Med* 1996; 125(6): 522-3.
- 37.-Molina JM, Sarfati C, Beauvais B, Lemann M, Lesourd A, Ferchal F. Intestinal microsporidiosis in human immunodeficiency virus-infected patients with chronic unexplained diarrhea: prevalence and clinical and biologic features. *J Infect Dis* 1993; 167(1): 217-21.
- 38.Didier ES, Didier PJ, Snowden KF and Shaddock. Microsporidiosis in mammals. *Microbes and Infection* 2000; 2(5): 709-20.
- 39.-Rabeneck L, Gyorkey F, Genta RM, Gyorkey P, Foote LW, Risser JM. The role of Microsporidia in the pathogenesis of HIV-related chronic diarrhea. *Ann Intern Med* 1993; 119(9): 895-9.

- 40.-Duarte R, Victor Manuel. Seroprevalencia *Toxoplasma gondii* y factores de riesgo en tres diferentes Sistemas de Producción en conejos. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. México D,F 2004.
- 41.-García LS, Shimizu RY, Bruckner DA. Detection of microsporidial spores in fecal specimens from patients diagnosed with cryptosporidiosis. J Clin Microbiol 1994; 32(7): 1739-41.
- 42.-García LS, Shimizu RY. Evaluation of nine immunoassay kits (enzyme immunoassay and direct fluorescence) for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens. J Clin Microbiol 1997; 35(6):9-1526.
- 43.-Martínez CM. Cunicultura. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. México D.F 1993; 108.

CUADRO 1
MICROSPORIDIOSIS-RESUMEN HISTÓRICO.

| Año | Autores | Información |
|------|--------------------|--|
| 1857 | Nägeli | <i>Nosema bombycis</i> en el gusano de seda |
| 1882 | Balbiani | Crea el orden Microsporidia |
| 1887 | Moniez | Primer caso en vertebrados (<i>Glugea anomala</i>) en quistes subcutáneos en peces |
| 1903 | Zander | Hallazgo y descripción de <i>Nosema apis</i> |
| 1922 | Wright y Craighead | Microsporidios en conejos |
| 1923 | Levaditi et al | Da el nombre al <i>Encephalitozoon cuniculi</i> de conejos |
| 1962 | Nelson | Confirman a <i>Encephalitozoon cuniculi</i> como microsporidio |
| 1964 | Lainson et al | Idem |

Tomado de la referencia 21; Kotler DP, Orenstein JM. Prevalence of intestinal microsporidiosis in HIV-infected individuals referred for gastroenterological evaluation. Am J Gastroenterol 1994; 89(11): 1998-2002.

CUADRO 2
MICROSPORIDIOSIS EN EL HOMBRE
RESUMEN HISTORICO.

| | | |
|------------|-------------------------------|---|
| | Marsubayashi <i>et.al</i> | <i>Encephalitozoon.</i> |
| 1982 | Gourley | Primeros estudios. |
| 1984 | Connor y Neafie | Primeras descripciones. |
| 1985 | Desportes <i>et.al</i> | <i>Enterocytozoon bienewisi</i> (1ª. vez) |
| 1988 y sig | Cali, Canning, Bryan, etc. | Hallazgo y descripción de nuevos géneros y especies en el hombre. |

Tomado de la referencia 21; Kotler DP, Orenstein JM. Prevalence of intestinal microsporidiosis in HIV-infected individuals referred for gastroenterological evaluation. *Am J Gastroenterol* 1994; 89(11): 1998-2002.

CUADRO 3

CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE MICROSPORIDIOS
QUE INFECTAN AL HUMANO.

| Característica | <i>Encephalitozoon bienersi spp.</i> | <i>Encephalitozoon spp.</i> | <i>Nosema sp.</i> | <i>Vittaforma corneae spp.</i> | <i>Pleistophora sp.</i> |
|--------------------------------|---|--|---|--|--|
| Tamaño de la espora (µm) | 1.1-1.6 x 0.7-1.0 | 2.0-2.5 x 1.0-1.5 | 2.5-5.0 x 2.0-2.5 | 3.8-4.5 0.7-4.3 | 3.2-3.4 x 2.8 |
| Nº vueltas del túbulo polar | 5-7 | 5-7 | 7-12 | | 9-12 |
| Núcleo | Unicariótico | Unicariótico | Diplocariótico | Diplocariótico | Unicariótico |
| Vacuola | Sin vacuola en contacto directo con el citoplasma de la célula del hospedero | Vacuola parasitófora septada en <i>E.intestinalis</i> | Sin vacuola en contacto directo con el citoplasma de la célula del hospedero | Sin vacuola en contacto directo con el citoplasma de la célula del hospedero | Vesícula esporófora |
| Rasgos especiales | Túbulo polar se inicia desde el esponde | | Esporogonia esporoblástica | Esporogonia tetraesporoblástica | Plasmodio esporulado multinucleado |

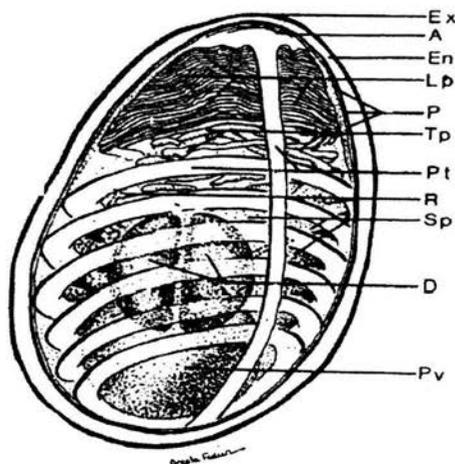
Tomado de la referencia 21; Kotler DP, Orenstein JM. Prevalence of intestinal microsporidiosis in HIV-infected individuals referred for gastroenterological evaluation. Am J Gastroenterol 1994; 89(11): 1998-2002.

Cuadro 4.**Número de muestras de orina de Conejo positivas a esporas de microspora**

| | Núm. Muestras examinadas | Positivas mediante Calcofluor | Positivas mediante Weber y Gram Cromotropo |
|------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------|--|
| Hembras gestantes | 17 | 1 | 0 |
| Hembras lactantes | 17 | 0 | - |
| Hem.en Gestac y lactacion | 7 | 0 | - |
| Hembras vacías | 55 | 1 | 0 |
| Gazapos | 12 | 0 | - |
| Engorda | 22 | 2 | 0 |
| Abasto | 18 | 1 | 1 |
| Sementales | 10 | 1 | 1 |
| Reemplazos | 19 | 0 | - |
| Total | 177 | 6 | 2 |

FIGURA 1

Diagrama de la estructura interna de un microsporidio.

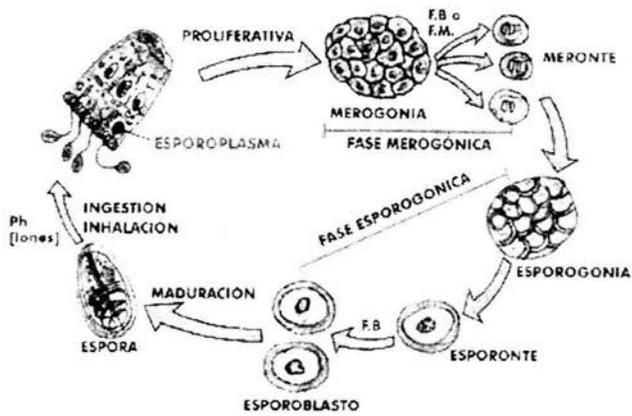


Capa externa electrodensa llamada exoespora y una capa translúcida, endospora. El aparato de extrucción compuesto por: disco de anclaje, filamento polar, polaroplasto lamelar y polaroplasto tubular; este aparato ocupa el mayor espacio de la espora es característico de los microsporidios. El número de vueltas del filamento polar varía entre las especies de microsporidios. Abreviaturas: **A.** Disco de anclaje. **D.** Diplocarion. **En.** Endospora. **Ex.** Exoespora. **LP.** Polaroplasto lamelar. **P.** Membrana unitaria. **Pt.** Filamento polar. **Pv.** Vacuola posterior. **R.** Ribosoma. **Sp.** Esporoplasma. **Tp.** Polaroplasto tubular.

Tomado de la referencia 21; Kotler DP, Orenstein JM. Prevalence of intestinal microsporidiosis in HIV-infected individuals referred for gastroenterological evaluation. *Am J Gastroenterol* 1994; 89(11): 1998-2002.

FIGURA 2

Ciclo de vida de los microsporidios



Fase infectiva. Fase de merogonia o proliferativa. Fase esporogónica.

F.B= Fisión binaria
F.M= Fisión múltiple

Tomado de la referencia 24; Cox JC, Hamilton RC, Attwood HD: An investigation of the route and progression of *Encephalitozoon cuniculli* infection in adult rabbits. J Protozool 1979;26:260-265.