

Evaluación anatomopatológica de riñones lepóridos y determinación de la prevalencia de encefalitozoonosis en la hacienda El Progreso de la Universidad de Antioquia

Berardo J Rodríguez^{1,3}, MV, Esp.; Liliam Cañas^{2,3}, Lic Bact.; Marcela Zapata³, Bact. Esp; Lyda C. Alvarez^{1,3}, Bact.; Silvia Rico^{1,3}, MV, Esp. ; Francisco J. Garay^{1,3}, MV.

¹Facultad De Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia, AA 1226*

²Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia

³Grupo de Enfermedades Infecciosas de los animales GEIA

(Recibido: 6 marzo, 2001; aceptado: 30 mayo, 2001)

Resumen

*La encefalitozoonosis es una enfermedad zoonótica emergente causada por el microsporidio *Encephalitozoon cuniculi*, el cual se diagnosticó recientemente por primera vez en el departamento de Antioquia. Con el objetivo de determinar la prevalencia de esta enfermedad y caracterizar las lesiones renales, se realizó el estudio anatomopatológico de los riñones de 100 conejos asintomáticos al momento del sacrificio en la Hacienda El Progreso de la Universidad de Antioquia. El diagnóstico se basó en los hallazgos macroscópicos de las lesiones renales y la histopatología utilizando la coloración de rutina de Hematoxilina – Eosina y la confirmación del parásito mediante las coloraciones especiales de Sandiford, Ziehl - Neelsen, y Warthin – Starry. El análisis estadístico se efectuó utilizando estadística descriptiva y la prueba de independencia y contingencia de Chi cuadrado para establecer el grado de asociación entre algunas variables en estudio. La prevalencia de la encefalitozoonosis en los conejos fue del 5% y estuvo siempre relacionada con la presentación de nefritis intersticial por lo que se concluye que ésta enfermedad tiene una alta tasa de presentación de la forma subclínica y que en consecuencia en el departamento de Antioquia existe una nueva enfermedad emergente afectando a la industria cunícola, constituyéndose en un factor de riesgo potencial para la salud pública.*

Palabras clave: conejo, *Encephalitozoon cuniculi*, nefritis intersticial, riñón.

Introducción

La encefalitozoonosis es una enfermedad causada por el *Encephalitozoon cuniculi*, un parásito intracelular obligatorio que pertenece al orden Microsporidia del phylum Microspora, que afecta conejos, ratones, hámsters, cobayos, perros, gatos, zorros, visones, primates no humanos y al hombre (5,19). La infección se establece luego de ingerir alimentos contaminados, generalmente con orina, aunque también se ha observado infección transplacentaria en algunas especies animales (3,8).

El parásito tiene afinidad por células del túbulo renal, células endoteliales y macrófagos (1,3), existiendo un tropismo preferente por tejido nervioso, renal, cardíaco, hepático y pulmonar en los que causa encefalitis granulomatosa, nefritis intersticial, focos necróticos, degeneración hialina, necrosis hepática focal no supurativa y neumonía intersticial respectivamente, como lesiones características en conejos (10,13,14). En humanos con SIDA se ha encontrado el parásito produciendo hepatitis, necrosis hepática (20), peritonitis, nefritis túbulo-intersticial, cistitis, bronquitis, neumonía, conjuntivitis y sinusitis (12,26,27,28).

* Dirección para solicitar reimpresos

En muchas especies animales infectadas la sintomatología clínica es variable pudiéndose presentar en forma aguda, crónica y frecuentemente latente (5,13,15). En algunos casos de infección con sintomatología evidente se ha observado falta de apetito, pérdida de peso, trastornos en la piel, depresión y muerte (5). Cuando se presentan signos nerviosos estos consisten en hiperestesia, ataxia, opistótonos y tortícolis (28). La enfermedad muestra toda su agresividad al existir otros estados patológicos concurrentes (5). En muchos casos la infección es inaparente, observándose a lo sumo fiebre ligera (10). También se observan animales asintomáticos que pueden excretar permanentemente el microorganismo en la orina (5,10,13).

Debido a sus variados síntomas, sus estados subclínico, su cronicidad y la presencia de estados patológicos colaterales, esta enfermedad ha sido difícil de diagnosticar (13,14); con este fin se han utilizado varios métodos tales como la observación de lesiones macroscópicas (13), la demostración del parásito en cortes histológicos o en orina mediante tinciones especiales (Gram, Giemsa, Warthim-Starry, Ziehl-Neelsen y coloraciones tricrómicas) (1,13,18,26,28), la identificación utilizando microscopía electrónica y de luz polarizada (16,21,26), también se han empleado pruebas serológicas como IFI (4,24), ELISA (6,7,8) y carbón-inmunoensayo (23); además, análisis inmunohistoquímicos (14), reacción en cadena de polimerasa (PCR) e Inmunoblot (24). Algunos autores informan de su aislamiento y propagación en cultivos celulares (19).

En la actualidad, el *E. cuniculi* está siendo estudiado en varios países del mundo, conociéndose en muchos de ellos prevalencias muy altas en conejos y la comprobación de casos de humanos afectados (5,13). A nivel de Latinoamérica, Argentina y Cuba informan prevalencias entre un 50 y 70% en explotaciones cunícolas y bioterios causando pérdidas económicas e interfiriendo en el desarrollo de trabajos de investigación (5,13,18). En un estudio realizado por Bustos y Cols. (2) en conejos procedentes del departamento de Cundinamarca (Colombia) en el año de 1978, describieron por primera vez en el país las lesiones histopatológicas de la encefalitis enzoótica de los conejos. Mas recientemente Rodríguez y Cols. (17) realizaron la descripción histopatológica del primer caso de encefalitozoonosis en el departamento de Antioquia (Colombia), mediante el hallazgo del *E. cuniculi* en un conejo nativo, que fue confirmado por el centro de Estudio y Control de Enfermedades de Atlanta (CDC).

Con todo lo anterior y debido a que la encefalitozoonosis se ha convertido en una causa importante de enfermedad oportunista en pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana y a que en Colombia y específicamente en el departamento de Antioquia no se cuenta con información epidemiológica sobre este problema, se realizó el presente estudio con el propósito de determinar la prevalencia del parásito *E. cuniculi* en conejos asintomáticos de una hacienda universitaria, mediante la evaluación anatomopatológica de tejido renal y la demostración del parásito con coloraciones histoquímicas especiales.

Materiales y métodos

Población estudiada

Este trabajo de investigación consistió en un estudio piloto de tipo descriptivo, que se efectuó en la explotación cunícola de la Hacienda El Progreso de la Universidad de Antioquia, conejera que contaba regularmente con un promedio de 300 animales.

Para la toma de las muestras se seleccionaron los primeros 100 animales de ambos sexos sometidos a faenado. Los conejos fueron asintomáticos y se caracterizaron por tener promedios de edad y peso de 98.43 días y 2.74 Kg. respectivamente. Las muestras se tomaron en 6 intervalos de tiempo, considerando que el promedio de animales por sacrificio fue de 16.6. El método de sacrificio utilizado en todos los conejos fue la insensibilización por medio de golpe frontal con degüello y exanguinación posterior.

Examen Post-mortem

Luego del sacrificio de cada animal se extrajeron ambos riñones, se lavaron con agua de grifo, se retiró la cápsula, se abrieron longitudinalmente y se sometieron a inspección macroscópica con el propósito de determinar sus lesiones más frecuentes.

Procesamiento histológico

Los tejidos fueron fijados en formalina al 10% bufferada (PBS 7.2), incluidos en parafina, cortados a 4 micrómetros de espesor y teñidos con las coloraciones de Hematoxilina-Eosina, Ziehl-Neelsen, Sandiford (Gram para tejidos) y Warthin Starry modificado (22)

Evaluación microscópica

La lectura histopatológica de las placas se efectuó en el laboratorio de Patología animal de la Univer-

sidad de Antioquia mediante microscopía de luz por dos patólogos que desconocían para cada muestra el resultado de la evaluación macroscópica. Ambos patólogos realizaron la caracterización de las lesiones microscópicas en las placas coloreadas con Hematoxilina-Eosina y efectuaron la determinación inicial del parásito *E. cuniculi* con el objetivo de inmersión bajo aumento de 100x, luego corroboraron el diagnóstico de dicho agente con el uso de las coloraciones especiales mencionadas anteriormente.

Análisis estadístico

Los resultados se evaluaron mediante estadística descriptiva calculando proporciones, error de muestreo, intervalo de confianza y desviación estándar. Mediante prueba de Chi cuadrado se calculó el grado de asociación entre las variables en estudio.

Resultados

En este estudio se encontró una prevalencia de encefalitozoonosis en los conejos de la Hacienda el progreso al momento del sacrificio del 5% (Véase Tabla 2), la cual se determinó por la identificación de sus lesiones anatomopatológicas características en riñón y la presencia simultánea del parásito *E. cuniculi* en las muestras evaluadas; además, se determinó un intervalo de confianza para el 95% que fluctuó entre el 0.73% y el 9.27% ($0.73% < P < 9.27%$).

Las lesiones macroscópicas renales que se hallaron con mayor frecuencia en los conejos de este estudio fueron congestión, superficie moteada de blanco, hemorragia, corteza arrugada y contraída; ninguno de los riñones se evidenció completamente normal (Véase Tabla 1).

La evaluación microscópica reveló una variedad amplia de lesiones (Véase Tabla 2) las cuales se presentaron simultáneamente en algunos riñones y se caracterizaron histológicamente de la siguiente manera:

Lesiones glomerulares

- *Atrofia numérica glomerular*: los glomerulos se observaron disminuidos de tamaño, con un espacio de Bowman aumentado y presencia ocasional de necrosis segmentaria (Ver Figura 1)
- *Glomerulonefritis membrano-proliferativa*: Los glomerulos se evidenciaron aumentados de tamaño, hipercelulares, con engrosamiento de las membranas basales; presencia ocasional de neutrófilos o eosinófilos, un ovillo glomerular lobulado y proteína ocasional en el espacio de Bowman (Ver Figura 2), en algunos casos se observó aumento del tejido conectivo pericapsular, razón por la cual se dio el Diagnóstico de GMP crónica.

Lesiones tubulares:

- *Nefrosis tubular*: Esta lesión presentó tres modalidades; nefrosis vacuolar, nefrosis grasa y nefrosis colémica. La nefrosis vacuolar fue la más frecuente de las tres y se caracterizó por la presencia de vacuolas de tamaño variable y bordes irregulares en el citoplasma de las células tubulares. Esta alteración se encontró de manera regular en los túbulos de la región corticomedular. La nefrosis grasa se observó como vacuolas intracitoplasmáticas tubulares de gran tamaño y bordes bien definidos; mientras que la nefrosis colémica se identificó por la presencia de un pigmento globular pardo-amarillento en el epitelio de las células tubulares.
- *Necrosis tubular*: Esta alteración se caracterizó por la presencia de células tubulares aisladas presentando picnosis, cariorexis, cariólisis y una intensa acidofilia citoplasmática.

Lesiones intersticiales.

- *Nefritis intersticial*: Esta lesión se reconoció por la infiltración difusa o multifocal predominante de linfocitos, y ocasional de plasmocitos en el inters-

Tabla 1. Frecuencia y ubicación de lesiones macroscópicas en riñones de conejos de la Hacienda El Progreso.

Lesión	Corteza	Limite corticomedular	Medula	Subcapsular	Riñones Afectados
Moteado	4	1	0	33	34
Congestión	3	89	44	46	97
Hemorragia	2	0	1	3	5
Retracción	0	0	0	25	25

Tabla 2. Frecuencia de lesiones microscópicas en riñones de conejos de la Hacienda El Progreso.

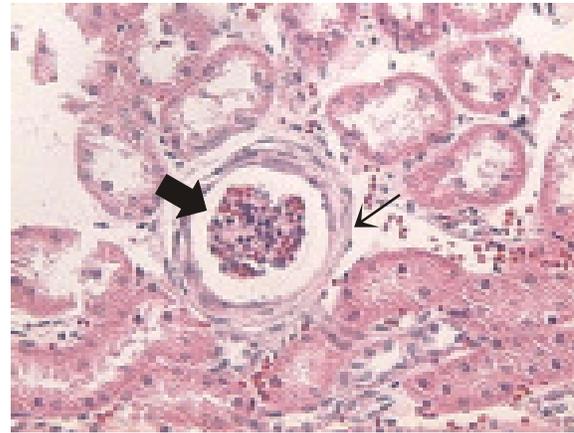
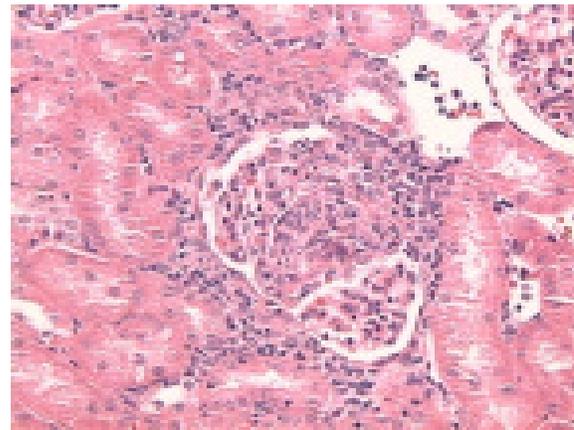
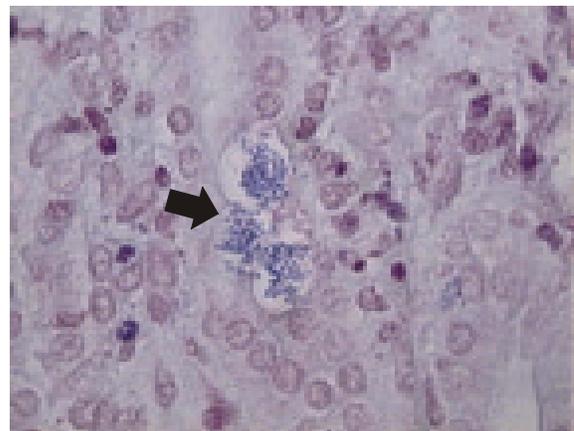
Lesión	Presente	Ausente
Glomerulonefritis	54	46
Glomerulonefritis aguda	31	69
Glomerulonefritis crónica	23	77
Nefrocalcinosis	69	31
Atrofia Glomerular	100	0
Nefrosis Vacuolar	97	3
Nefritis Intersticial	19	81
Necrosis Tubular	83	17
Presencia del Parásito	5	95

ticio renal, en cuyo caso se le denominó nefritis intersticial subaguda; en otras muestras hubo acompañamiento concomitante de tejido conectivo proliferante, razón por la cual se denominó como nefritis intersticial crónica.

- *Nefrocalcinosis*: Esta fue una lesión que se encontró tanto en los túbulos como en el intersticio renal y correspondió histológicamente al hallazgo de precipitados tubulares cristaloides o granulares intensamente basófilos.

Este estudio reveló asociación estadística significativa ($p < 0.05$) entre la presentación macroscópica de riñones con su superficie moteada de blanco y el hallazgo histopatológico de nefritis intersticial, también hubo asociación ($p < 0.05$) entre la observación de riñones con presencia de corteza arrugada y contraída y el hallazgo microscópico de inflamación crónica, sin establecer diferencia en su naturaleza glomerular o intersticial. No se encontró asociación estadística ($p > 0.05$) entre la presentación de riñones moteados de blanco y la presencia de glomerulonefritis.

La evaluación histológica reveló en el 5% de las muestras (5/100), la presencia de microorganismos con forma de bastón y extremos romos, de 3 micrómetros de longitud aproximadamente, ubicados principalmente en el epitelio tubular formando vacuolas parasitóforas; estos microorganismos se tiñeron pobremente con la coloración de Hematoxilina – Eosina y se visualizaron con claridad con las coloraciones de Ziehl – Neelsen y Warthin – Starry ; con la coloración de Sandiford se determinó que eran gram positivos (véase figura 3) . Todas las muestras en que se observó el parásito presentaron nefritis intersticial.

**Figura 1.** Riñón, Conejo, Atrófia glomerular, presentando disminución del tamaño del ovillo glomerular (Flecha gruesa). H-E 400x.**Figura 2.** Riñón ,Conejo,Glomerulonefritis Membranoproliferativa, presentando engrosamiento de la membrana basal, hiper celularidad, neutrófilos y lobulación del ovillo glomerular. H-E 400x.**Figura 3.** Riñón, Conejo, Vacuola parasitófora de *Encephalitozoon cuniculi* (Flecha gruesa), se observa reacción inflamatoria intersticial leve. Sandiford 1000x.

Discusión

La prevalencia de un 5% de encefalitozoonosis encontrada en la Hacienda El Progreso, permite confirmar el hallazgo realizado en un estudio anterior, en el que se diagnosticó por primera vez el parásito *E. cuniculi* en el Departamento de Antioquia (17); aunque éste valor parece bajo si se compara con datos registrados en otros países, en los que se reportan valores de prevalencia en criaderos entre el 50 y el 70%, es importante resaltar que este estudio se realizó en conejos asintomáticos al momento del sacrificio y no consideró animales que posiblemente mueren a causa de ésta enfermedad en cualquier momento de su crianza; además, si bien es cierto que la histopatología es una prueba diagnóstica altamente específica para la identificación del microorganismo, no es lo bastante sensible para su determinación, pudiendo así ocasionar el diagnóstico de falsos negativos (13,21).

Las características morfológicas y de tinción evidenciadas en los parásitos encontrados en ésta investigación están de acuerdo con lo comunicado por otros autores anteriormente, al estudiar cortes de conejos que sufrieron encefalitozoonosis (13,17,28), razón por la cual se puede afirmar que las coloraciones especiales empleadas en éste estudio son de gran ayuda para la identificación del agente causal.

El *E. cuniculi* es un parásito de gran similitud morfológica en cortes histológicos al *Toxoplasma gondii*; no obstante, el primero es un microorganismo gram positivo y el segundo gram negativo, lo que se verificó en éste estudio al comparar los microorganismos problema con muestras de referencia de *E. cuniculi* y *T. gondii* almacenadas en el laboratorio, que fueron obtenidas en estudios anteriores y que fueron verificadas en el centro de control y prevención de enfermedades infecciosas de Atlanta (CDC) (17,18).

La mayoría de los parásitos que se observaron estuvieron contenidos en vacuolas parasitóforas en el epitelio de los túbulos colectores de la médula renal, lo que indica una forma de tránsito hacia su eliminación final por la orina como medio fundamental de nuevas infecciones (25).

Todos los parásitos que se encontraron estuvieron relacionados con nefritis intersticial, como lo han reportado otros autores (13,17,21); la observación de al-

teraciones macroscópicas renales como superficie moteada de blanco estuvo asociada ($p < 0.05$) a la presentación de nefritis intersticial, y no a otras lesiones macroscópicas por lo que éstas alteraciones pueden constituir un indicador muy sugestivo de la presencia del *E. cuniculi* al realizar evaluaciones de necropsias o al efectuar inspecciones post – mortem en los mataderos.

En éste estudio se evidenció una proporción alta de lesiones vasculares como congestión y algunas hemorragias, que en parte pueden explicarse, por el método de sacrificio utilizado y por el tiempo de agonía que en algunos animales excede a los 40 segundos, produciendo así, estasis sanguíneo y hemorragias ocasionales (22), en algunos casos la congestión también estuvo relacionada con nefritis. La muerte prolongada de éstos animales generalmente se acompaña de anoxia tisular, lo que explica posiblemente la alta frecuencia de necrosis de células aisladas en el epitelio de los túbulos renales (22).

La lesión microscópica que se observó con mayor frecuencia fue atrofia numérica glomerular (véase tabla 2), lesión que se apreció como una disminución de tamaño de los glomerulos como consecuencia de necrosis segmentaria; ésta lesión al igual que la alta proporción de glomerulonefritis del tipo membrano-proliferativa, se debieron en ésta granja posiblemente a una alta incidencia de neumonías concomitantes ocurridas en algún momento del levante de estos animales, lo cual pudo llevar a estados crónicos de hipoxia glomerular con una consecuente disminución de tamaño de estas estructuras (11); además las glomerulonefritis membrano – proliferativas se produjeron tal vez, por la liberación a circulación de antígenos bacterianos posiblemente de tipo estreptococcico y la formación posterior de complejos inmunes circulantes que se depositaron en las membranas basales glomerulares estimulando allí una reacción inflamatoria, como se ha descrito anteriormente (9).

Este estudio reveló también, una frecuencia elevada de nefrosis tubular renal, una lesión que consiste en un proceso degenerativo de las células del epitelio tubular relacionada principalmente con procesos febriles o de hipoxia tisular previa (9). Esta lesión se presentó concomitantemente con otras lesiones como la nefritis intersticial, la glomerulonefritis, la atrofia glomerular y la nefrocalcinosis, razón por la cual es

posible que dicha lesión sea una consecuencia de las alteraciones anteriores.

La alta frecuencia de nefrocalcinosis encontrada, sugiere que el agua suministrada a estos animales en cuanto a su cantidad o sus propiedades físico – químicas, no era la mejor y que posiblemente esa calidad presentaba variaciones estacionales; ya que se observaron diferencias entre lotes sacrificados en cuanto a la frecuencia y la gravedad de éstas lesiones.

Con este estudio se confirmó la presencia del parásito *E. cuniculi* y se determinó una prevalencia alta en conejos asintomáticos sacrificados con fines comerciales en la Hacienda El Progreso de La Uni-

versidad de Antioquia, de lo que se concluye que en el Departamento de Antioquia existe una enfermedad emergente de carácter zoonótico afectando a la industria cunícola y constituyéndose en un factor de riesgo para la salud de la población humana, especialmente aquellas personas que tienen un contacto directo con la cría y el levante de conejos, ya que los animales infectados eliminan los microorganismos en la orina pudiendo de esta forma infectar al hombre. También se concluye que la inspección de los riñones en animales sacrificados constituye un indicador diagnóstico de la encefalitozoonosis y que las coloraciones especiales aquí empleadas son de gran utilidad para identificar el *E. cuniculi* en tejido y para realizar su diagnóstico diferencial de *T. gondii*.

Agradecimientos

Los autores desean expresar sus agradecimientos a la Universidad de Antioquia por la financiación del estudio a través del Comité para el Desarrollo de la Investigación CODI (Acta 280. Mayo26-97). Al personal administrativo del Departamento de Haciendas de la Universidad de Antioquia y al personal que labora en la Hacienda El Progreso por su colaboración al facilitarnos las instalaciones y los medios adecuados para la toma de muestras.

Summary

Anatomopathological evaluation of the leporides kidney and prevalence determination of encephalitozoonosis in "Hacienda El Progreso" of the Universidad de Antioquia.

Encephalitozoonosis is an emmerging zoonotic disease caused by the microsporidio Encephalitozoon cuniculi which was recently diagnosticated for the first time in the province of Antioquia (Colombia). Looking for the prevalence of this disease and the characterization of kidney's affections, an anathomopathological study was carried and in the kidneys of 100 asintomatic rabbits just when slaughtered at the "Hacienda El Progreso" of the Universidad de Antioquia..The diagnostic was based an the macroscopic find-out of the kidney lesions; Hithopathology by using the standard coloration Hematoxilina- Eosina and the parasite evidence by means of special coloration, Sandiford, Ziehl-Neelsen and Warthin- Starry, Statistics analyses was realised by using descriptive statistic and independence and contingency of Chi square to stablish the association level between some variables under the study. Encephalitozoonosis prevalence in rabbits was 5% and it was allways in relation with interstitial nephritis, since, it can be concluded that this disease has a high rat of subclinical presentation and thus that, in the province of Antioquia there is a new emmerging disease which affects the rabbit industry and represent a public health patiential risk factor.

Key words: rabbit, kidney, interstitial nephritis, *Encephalitozoon cuniculi*.

Referencias

1. Armed Forces Institute of Pathology. Laboratory Methods in Histotechnology. Washington, DC: American Registry of Pathology, 1994. 279.
2. Bustos F, Mogollón JD, Lozano F, González HF. Encefalitis enzoótica de los conejos. Revista ACOVEZ, 1979; 2: 37-39.
3. Canning EU, Hollister WS. Microsporidia of mammalswidespread pathogens or opportunistic curiosities?. Parasitol Today, 1987; 3: 267-273.

4. Cox JC, Gallichio HA,. An evaluation of immunofluorescence in the serological diagnosis of *Nosema cuniculi* infection. Res Vet Sci, 1977; 22: 50-52.
5. González H, Zapata L Bagnis E. Encefalitozoonosis. Primera comunicación en Argentina. Vet Arg, 1987; 4: 144-149.
6. Hollister WS and Canning EU. An enzyme -linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* and its use in determination of infections in man. Paasitol, 1987; 94: 202-219.
7. Hollister WS, Canning EU, Willcox A. Evidence for widespread occurrence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* (Microspora) in man provided by ELISA and other serological test. Parasitol, 1991; 102: 33-43.
8. Hollister WS, Canning EU, Viney M. Prevalence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in stray dogs as determined by an ELISA. Vet Record, 1989; 124: 332-336.
9. Jones TC, Hunt RD. Veterinary Pathology 5th ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1983; 1792p.
10. Jubb KV, Kennedy PC, Palmer N. Nervous system. Pathology of Domestic Animals, vol 1. 4^a ed. San Diego: Academic press, INC; 1993, 574p.
11. Jubb KV, Kennedy PC, Palmer N. Urinary system. Pathology of Domestic Animals, vol 2. 4^a ed. San Diego: Academic press, INC; 1993, 582p.
12. Ledford DK, Overman MD, Gonzalvo D, *et al.* Microsporidiosis myositis in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. Ann Intern Med, 1985; 102: 628-630.
13. Merino M, Garcia G, Díaz C. Encefalitozoonosis asintomática en conejos de la provincia de La Habana . Rev. Salud Animal, 1990; 1: 29-34.
14. Park J, Ochiai K, Itakura CH. Direct ABC immunohistochemistry to *Encephalitozoon cuniculi*. J Vet Med Sci, 1993; 55: 325-328.
15. Protozoos : *Microspora sprague*. En: Soulsby EJ. Parasitología y Enfermedades Parasitarias en los Animales Domésticos. 7^a ed. México: Editorial Interamericana, 1987: 521-770.
16. Rijpstra AC, Canning EU, Van Kettel RJ, Eeftinck Schattenkerk JKM, Laarman JJ. Use of light microscopy to diagnose small-intestinal microsporidiosis in patients: with AIDS. J infect Dis, 1988; 157: 827-831.
17. Rodriguez BJ, Zapata M, Alvarez LC. Descripción histopatológica del primer caso de Encefalitozoonosis en Antioquia, Colombia. Rev Col Cienc Pec 1997; 10: 62-66.
18. Shadduk JA, Pakes SP. Encephalitozoonosis (Nosematosis) and Toxoplasmosis. Am J Pathol, 1971; 64: 657-672.
19. Shadduk JA, Bendele R, Robinson GT. Isolation of the causative organism of canine encephalitozoonosis. Vet Pathol, 1978; 15: 449-460.
20. Terada S, Reddy KR, Jeffers LJ, Lennox J, Cali A *et al.* Microsporidian hepatitis in the acquired immune deficiency syndrome. Ann Intern Med, 1987; 107: 61-62.
21. Tiner JD. Birefringent spores differentiate *Encephalitozoon* and others Microsporidia from *Coccidia*.. Vet Pathol, 1988; 25: 227-230.
22. Trigo FJ, Mateos A. Patología General Veterinaria, 2^a ed, México, Mc Graw Hill, 1993, 248p.
23. Van Dellen AF, Stewart CG, Botha WS. Studies of encephalitozoonosis in vervet monkeys (*Cercopithecus pygerythrus*) orally inoculated with spores of *Encephalitozoon cuniculi* isolated from dogs (*Canis familiaris*). Onderstepoort J. Vet. Res, 1989; 56: 1-22.
24. Visvesvara GS, Leitch GJ, Da Silva AJ, *et al.* Polyclonal and monoclonal antibody and PCR-Amplified small-subunit rRNA identification of a Microsporidian *Encephalitozoon hellem*, isolated from an AIDS patient with disseminated infection. J Clin Microbiol, 1994; 32: 2768-2769.
25. Wasson K, Peper RL. Mammalian Microsporidiosis. Vet Pathol, 2000; 37: 113-128.
26. Weber R, Bryan RT, Schwartz DA, Owen RL. Human microsporidial infections. Clin Microbiol Rev, 1994; 7:426-461.
27. Weber R, Bryan RT. Microsporidial infections in immunodeficient and immunocompetent patients. Clin Infect Dis, 1994; 19: 517-521.
28. Weber R, Deplazes P. Neue parasitäre erkrankungen beim menschen: Infektionen durch Mikrosporidien und Cyclospora species. Schweiz Med Wochenschr, 1995; 125: 909-923.