



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

**Fakulteten för veterinärmedicin
och husdjursvetenskap**
Institutionen för biomedicin och veterinär
folkhälsvetenskap

Diagnostik av *Encephalitozoon cuniculi* hos kaniner

Sophie Dahl

*Uppsala
2015*

Kandidatarbete 15 hp inom veterinärprogrammet

Kandidatarbete 2015:26

Diagnostik av *Encephalitozoon cuniculi* hos kaniner

Diagnosis of *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits

Sophie Dahl

Handledare: Johan Höglund, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Ev. Biträdande handledare: Eva Tydén, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Examinator: Eva Tydén, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Kandidatarbete i veterinärmedicin

Omfattning: 15 hp

Nivå och fördjupning: grund nivå, G2E

Kurskod: EX0700

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2015

Serienamn: Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen / Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Delnummer i serie: Kandidatarbete 2015: 26

Elektronisk publicering: <http://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: *Encephalitozoon cuniculi*, *encephalitozoonosis*, kanin, diagnostik

Key words: *Encephalitozoon cuniculi*, *encephalitozoonosis*, rabbit, diagnosis

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning	1
Summary	2
Inledning.....	3
Material och metoder.....	4
Litteraturoversikt.....	4
Kliniska symptom	4
Behandling	4
Patologi och patofysiologi.....	5
Differentialdiagnoser.....	5
Diagnostiska metoder.....	6
Ante mortem.....	6
Uteslutande av differentialdiagnoser.....	6
Serologi	6
DNA-detektion	8
CSF-analys	8
Post mortem.....	9
Histopatologi	9
Immunohistokemi.....	10
PCR	10
Diskussion	11
Slutsats	13
Litteraturförteckning	13

SAMMANFATTNING

Encephalitozoon cuniculi är en obligat intracellulär parasit som orsakar sjukdomen encephalitozoonos hos kaniner. Infektion kan även ses hos människor och parasiten är därmed zoonotisk. *E.cuniculi*-infektion sker via intag eller inhalation av sporer, överföring *in utero* eller okulär överföring. Predilektionsställen för parasiten är centrala nervsystemet, njurar eller linsen. *E.cuniculi* är en vanlig parasit hos kaniner men den exakta förekomsten i Sverige är okänd.

Att diagnostisera *E.cuniculi*-infektion hos kaniner är viktigt för korrekt prognos och behandling samt på grund av parasitens zoonotiska potential. Diagnostik *in vivo* är dock svårt och i nuläget erhålls klinisk diagnos genom neurologiska och oftamologiska undersökningar som kan kombineras med serologiska tester samt uteslutande av differentialdiagnoser. Den här litteraturstudien beskriver olika diagnostiska metoder som finns att tillgå och diskuterar fördelar och nackdelar med respektive metod. Vidare redovisas kliniska symptom, behandling, patologiska förändringar samt differentialdiagnoser.

E.cuniculi kan detekteras både före och efter döden. Bland *ante mortem* metoder finns uteslutande av differentialdiagnoser, serologiska tester, DNA-detektion i kroppsvätskor genom PCR och analys av cerebrospinalvätska (CSF) att tillgå. Av dessa metoder verkar påvisande av antikroppar med serologiska tester vara mest användbar. En nackdel är att det inte går att skilja mellan subkliniskt och kliniskt infekterade kaniner och ett positivt testresultat kan vara svårt att tolka. Uteslutande av differentialdiagnoser kan inte användas självständigt och DNA-detektion samt CSF-analys behöver utvärderas vidare. Diagnostik *post mortem* kan utföras genom histopatologi, immunohistokemi eller PCR av vävnadsprover, där PCR har högst sensitivitet. Ett hinder med histopatologi är att andra organismer kan ge en liknande histologisk bild och att sporer inte alltid kan detekteras. Immunohistokemi kan användas för en mer definitiv diagnos om sporer inte skulle vara detekterbara vid histopatologi.

Min slutsats är att alla diagnostiska metoder har såväl fördelar som nackdelar. Det krävs därför en kombination av olika metoder för att säkerställa *E.cuniculi* som orsak till sjukdom hos kaniner. Som *post mortem* metod är PCR av vävnadsprover att föredra på grund av dess höga sensitivitet. Ska kaninen däremot diagnostiseras *in vivo* rekommenderas en kombination av uteslutande av differentialdiagnoser, serologi och eventuellt PCR av urinprov. PCR har stor potential och skulle i framtiden kunna utvecklas vidare till en självständig diagnostisk metod för detektion av *E.cuniculi* hos kaniner. Detta skulle förenkla den diagnostiska processen för veterinärer och dra ner kostnaderna för djurägare.

SUMMARY

Encephalitozoon cuniculi is an obligate intracellular parasite that causes encephalitozoonosis in rabbits. The parasite is considered to be zoonotic. *E.cuniculi* infects rabbits by ingestion or inhalation of spores, intrauterine transmission or ocular transmission and the brain, the kidneys or the lens are predilection sites. *E.cuniculi* is a common parasite in rabbits but the prevalence in Sweden is unknown.

To diagnose infection with *E.cuniculi* in rabbits is important for an accurate prognosis and treatment and also because of its zoonotic potential. Diagnosis *in vivo* is, however, difficult and a clinical diagnosis is currently received by clinical, neurological and ophthalmological examinations in combination with serological tests and by excluding differential diagnoses. This literature review describes different diagnostic methods that are available and discusses the advantages and disadvantages of each method. Furthermore, clinical symptoms, treatment, pathological changes and differential diagnoses are also reported.

E.cuniculi can be diagnosed both before and after death. Excluding differential diagnoses, serology, DNA-detection in body fluids by PCR and analysis of cerebrospinal fluid (CSF) are available *ante mortem*. Among these methods, serology appear to be preferred but the method can not distinguish between subclinically and clinically infected rabbits and a positive result can be difficult to interpret. Excluding differential diagnoses can not be used alone and DNA-detection and CSF-analysis need to be evaluated further. *Post mortem* diagnosis can be performed by histopathology, immunohistochemistry or PCR of tissue samples, where PCR is the one offering the highest sensitivity. A disadvantage with histopathology is the difficulties to distinguish between infections with *E.cuniculi* and with other organisms. Furthermore, spores are not always detectable. Immunohistochemistry can be used for a definitive diagnosis when spores are not detectable by histopathology.

It can be concluded that all of the diagnostic methods have both advantages and disadvantages. Therefore, it requires a combination of methods to detect if *E.cuniculi* causes disease in rabbits. As *post mortem* diagnosis, PCR of tissue samples is preferred, due to the high sensitivity. In contrast, if the rabbit will be diagnosed *in vivo*, a recommendation would be a combination of exclusion of differential diagnoses, serology and possibly a PCR of urine samples. PCR has a great potential and could be developed further for routine diagnosis for detecting *E.cuniculi* in rabbits. Thereby the procedure would be simplified for veterinarians and lower the cost for pet owners.

INLEDNING

Encephalitozoon cuniculi är en obligat intracellulär parasit som tillhör fylum *Microsporidia* (Wasson & Peper, 2000). Parasiten upptäcktes hos laboratoriekaniner med paralys i början av 1920-talet (Wright & Craighead, 1922). Hos kaniner orsakar den sjukdomen encephalitozoonos. *E. cuniculi* kan även infektera andra däggdjur inklusive människor, där infektion ses främst hos immunosupprimerade individer som HIV-patienter (Künzel & Joachim, 2010). Det förekommer tre olika stammar av *E. cuniculi*, vardera en hos kaniner, möss och hundar. Kaniner infekteras endast av kaninstammen. Människor kan däremot infekteras av både kaninstammen och hundstammen som är zoonotiska (Mathis *et al.*, 2005).

Kaniner utskiljer sporer av *E. cuniculi* via urinen (Csokai *et al.*, 2009a) medan infektion sker via oralt intag, inhalation eller överföring *in utero* (Harcourt-Brown, 2004). Okulär överföring är en annan möjlig smittväg, även om den anses vara mindre vanlig. Kaniner av båda könen urinmarkerar sina territorier och kan på så sätt sprida sporer som smittar till andra kaniner och människor (Jeklova *et al.*, 2010a). Predilektionsställen för parasiten är centrala nervsystemet och njurarna. Vid överföring *in utero* kan parasiten även nå linsen i ögat (Csokai *et al.*, 2009a). Organen kan infekteras var och för sig eller i kombination (Harcourt-Brown, 2004). Graden av infektion kan variera från latent och kroniska infektioner till dödsfall (Jeklova *et al.*, 2010a) och infekterade kaniner uppvisar oftast neurologiska symptom, njurdysfunktion och uveitis (Leipig *et al.*, 2013).

E. cuniculi anses vanligt förekommande hos kaniner men hur vanlig parasiten är i Sverige är okänt. I en studie om kaniner från Stockholmsregionen var seroprevalensen endast 6,6 % men begränsningar i form av storlek på studiepopulationen och området de undersökta kaninerna kom ifrån måste beaktas (Eriksson, 2007). I utländska studier har en högre prevalens noterats, exempelvis var 52 % av de undersökta kaninerna seropositiva i en studie ifrån Storbritannien (Keeble & Shaw, 2006).

Diagnostik av *E. cuniculi* hos kaniner är av stor vikt för fastställandet av korrekt prognos, behandling och utvärdering av eventuell zoonotisk potential (Csokai *et al.*, 2009b). Klinisk diagnos av encephalitozoonos erhålls i nuläget genom neurologiska och oftamologiska undersökningar, antikroppsbaseerade tester samt genom uteslutande av olika differentialdiagnoser (Künzel *et al.*, 2008). Att diagnostisera parasiten *in vivo* är dock svårt, då många kaniner är subkliniskt infekterade (Csokai *et al.*, 2009b). Diagnostik kan ske såväl före som efter döden och det finns flera diagnostiska metoder (Leipig *et al.*, 2013). Syftet med den här litteraturstudien är att redogöra för vilka metoder som finns att tillgå för att diagnostisera *E. cuniculi* hos kaniner och diskutera fördelar och nackdelar med respektive metod. Övriga frågeställningar är att redovisa vilka kliniska symptom som ses, vilka behandlingar det finns, hur patologiska förändringar ser ut samt vilka differentialdiagnoser det finns till encephalitozoonos.

MATERIAL OCH METODER

Till litteratursökningen utfördes sökningar i databaserna Web of Knowledge, PubMed samt Google Scholar. Sökorden som användes var (Encephalitozoon cuniculi OR encephalitozoonosis) AND rabbit AND diagnosis och även (Encephalitozoon cuniculi OR encephalitozoonosis) AND rabbit AND treatment. I Web of Knowledge användes språk och djurslag som avgränsningar, eftersom artiklar om studier av kaniner prioriterades. Referenslistor från översiktsartiklar har också varit till hjälp för att hitta ytterligare referenser.

LITTERATURÖVERSIKT

Kliniska symptom

Hos sällskapskaniner med misstänkt encephalitozoonos var vestibulärt syndrom det vanligaste observerade neurologiska symptomet och kännetecknades av ataxi, head tilt, nystagmus, rotation och hopp i cirklar (Künzel *et al.*, 2008). Neurologiska symptom som kramper, pares och tremor tycks dominera vid infektion med *E. cuniculi*. Beteendeförändringar inklusive aggression är andra neurologiska tecken på sjukdom (Künzel & Joachim, 2010).

I njurarna kan kronisk interstitiell nefrit uppstå med azotemi som följd. Infekterade kaniner uppvisar ofta icke-specifika symptom så som inappetens, slöhet, viktförlust och dehydrering (Künzel & Joachim, 2010). Vid kronisk njursvikt har även polyuri, polydipsi och urininkontinens påvisats (Harcourt-Brown, 2004).

Vid ögoninfektion kan phacoclastic uveitis och katarakt påvisas. En vit massa i ögat kan också många gånger ses hos kaniner (Künzel & Joachim, 2010). Hos yngre individer sågs phacoclastic uveitis, katarakt och vit intraokulär massa såväl endast i det ena ögat (Künzel *et al.*, 2008). Enligt en studie av Ashton *et al.* (1976) som undersökte katarakt hos en kanin med encephalitozoonos, kan det även förekomma bilateralt (Ashton *et al.*, 1976).

Behandling

Det finns inga enhetliga protokoll för behandling av *E.cuniculi*-infektion hos kaniner (Künzel & Joachim, 2010). De flesta data baseras på *in vitro* studier eller har extrapolerats från humana studier (Harcourt-Brown, 2004). Infektioner med *E.cuniculi* är ofta latent och kaniner kan tillfriskna spontant utan behandling (Harcourt-Brown, 2003), vilket gör det svårt att utvärdera effekten av olika läkemedel (Harcourt-Brown, 2004). Bedömning av behandlingar är dessutom subjektiv, då det oftast är djurägarna som avgör huruvida deras kanin mår bättre eller inte (Harcourt-Brown, 2004).

Vid behandlingar av encephalitozoonos rekommenderas understödjande terapi med kortikosteroider för att dämpa inflammatoriska reaktioner i kombination med albendazol, fenbendazol eller oxitetracyklin som ges för att avdöda parasiten (Harcourt-Brown, 2003). Vid *in vitro* studier (Beauvais *et al.*, 1994) hade både albendazol och fenbendazol en hög inhibitorisk effekt och anses vara de effektivaste preparaten. För kaniner är fenbendazol att föredra, då albendazol är embryotoxiskt och teratogent (Sieg *et al.*, 2012). Vid vestibulära

symptom rekommenderas behandling med antibiotika eftersom infektion med *Pasteurella multocida* är en vanlig differentialdiagnos (Kunstýr & Naumann, 1985). Effekten av antibiotika mot *E.cuniculi* anses däremot inte vara hög (Waller, 1979). För kaniner med njursvikt är behandlingen symptomatisk och vätsketerapi samt en diet med lågt kalciuminnehåll är viktigt (Harcourt-Brown, 2004). Vid okulära symptom kan kaniner behandlas topiskt med dexametason (Harcourt-Brown, 2003) för att dämpa inflammation.

För att hindra spridning av infektion i kaninpopulationer bör seropositiva kaniner separeras från övriga kaniner för att motverka spridning av parasitens sporer. Desinfektion av burar och annan utrustning är nödvändigt. För att avdöda sporeerna krävs kokning i 5 minuter eller autoklavering vid 120 °C i minst 10 minuter (Waller, 1979).

Patologi och patofysiologi

De patologiska förändringarna observeras främst i hjärna och njurar (Cox *et al.*, 1979). Förändringar i hjärnan kännetecknas av fokal nonsuppurativ granulomatös encephalit med perivaskulära manchetter och granulom. Förändringarna är vanligast förekommande i cerebrum, leptomeninger och hjärnstammen men även ryggmärgen kan påverkas (Csokai *et al.*, 2009a).

Enligt Flatt & Jackson (1970) kan fokal granulomatös nefrit ses i njurarna med infiltration av mononukleära celler samt lymfocyter. I studien var förändringarna mer vanligt förekommande i medulla än i cortex. Precis som i hjärnan kan granulom också förekomma i njurarna. Också ärrvävnad, orsakad av områden av fibros, med lymfocyter, plasmaceller och rester av njurtubuli observeras (Flatt & Jackson, 1970).

Vid förändringar i ögat sker en infiltration av inflammatoriska celler såsom heterofiler och makrofager och där iris samt ciliarkroppen infiltreras av plasmaceller och lymfocyter. Nekros och degeneration av linsfibrer, linsluxation, synechiae samt skador på cornea är andra typiska förändringar (Giordano *et al.*, 2005).

Differentialdiagnoser

Vestibulärt syndrom kan, förutom vid encephalitozoonos, förekomma hos kaniner vid *otitis media/interna*, oftast orsakad av *Pasteurella multocida* (Kunstýr & Naumann, 1985). Vid infektion med *P.multocida* ses tecken på respiratorisk infektion i form av nysningar, näsflöde och stridor, vilket inte gäller vid infektion med *E.cuniculi*. Neurologisk sjukdom hos kanin kan också bero på meningoencephalit orsakad av bakterier eller virusinfektioner som herpes simplex, bornavirus eller rabiesvirus. Toxoplasmos orsakad av den encelliga parasiten *Toxoplasma gondii* kan ge samma histologiska bild i hjärnan som encephalitozoonos, i form av granulomatös encephalit (Künzel & Joachim, 2010). Kunstýr & Naumann (1985) hävdar dock att toxoplasmos har liten relevans eftersom organismen inte påvisades hos någon av de kaniner som deltog i deras studie. Head tilt som är ett vanligt symptom hos *E.cuniculi*-infekterade kaniner kan också bero på en *otitis externa*, orsakad av skabbdjuret *Psoroptes cuniculi*, men trots det menar författarna att örönskabb inte är en trolig orsak (Kunstýr &

Naumann, 1985). Andra orsaker till head tilt kan vara neoplasi i form av lymfom, trauma eller infektion med spolmasken *Baylisascaris*, som är vanligt förekommande i Nordamerika. Förutom vid infektion med *E.cuniculi* kan kaniner uppvisa pares och ataxi vid ryggmärgsfraktur, sublaxation och spondylos. Även osteoartrit, ömma och svullna hasar samt muskelsvaghet kan orsaka ataxi (Harcourt-Brown, 2004).

Differentialdiagnos vid njursvikt kan vara njursten (Künzel & Joachim, 2010), olika bakteriella infektioner, neoplasi eller kalcifiering av njurar (Csoaki *et al.*, 2009a). En eventuell urininkontinens kan vara till följd av urinvägsinfektion, urinsten eller en oförmåga att lyfta bakbenet på grund av ömma och svullna hasar, artrit och övervikt (Harcourt-Brown, 2004).

Förutom vid encephalitozoonos kan phacoclastic uveitis observeras hos kaniner vid bakteriell uveitis orsakad av *P.multocida*, vid keratit, trauma eller på grund av främmande kropp i ögat (Künzel & Joachim, 2010). Abscesser och neoplasi i iris kan ge en liknande bild i ögat som vid infektion med *E.cuniculi* (Giordano *et al.*, 2005).

Diagnostiska metoder

Ante mortem

Uteslutande av differentialdiagnoser

Att utesluta andra möjliga orsaker än *E.cuniculi* är viktigt vid misstanke om encephalitozoonos (Latney *et al.*, 2014). För kaniner som uppvisar vestibulärt syndrom kan skullröntgen genomföras för att utesluta otitis media, där förtjockat ben i tympanic bullae och ökad täthet på grund av exsudat kan observeras (Künzel *et al.*, 2008). För att utesluta bakteriell otit, orsakad av exempelvis *P.multocida*, utförs endo-otoskopisk undersökning av yttre hörselgången och där bakteriell otit kan uteslutas genom cytologi av öronsvabb (Jeklova *et al.*, 2010b). Även serologi och haematologi kan utesluta infektion med *P.multocida*. Med hjälp av klinisk undersökning, röntgen samt haematologisk och biokemisk utvärdering kan ryggmärgsfraktur, spondylos och osteoartrit uteslutas som orsaker vid ataxi och pares (Harcourt-Brown, 2004). Genom serologi, histopatologi eller immunohistokemi kan encephalitozoonos även särskiljas från toxoplasmos. För att utesluta njursten som en orsak till njursvikt kan njursten lätt detekteras med hjälp av röntgen eller ultraljud (Künzel & Joachim, 2010). Oftalmisk undersökning av ögat kan ge svar på orsak till ögonproblem och därmed utesluta differentialdiagnoser till phacoclastic uveitis (Giordano *et al.*, 2005).

Serologi

Den vanligaste metoden vid diagnos av *E. cuniculi* hos levande kaniner är genom att påvisa antikroppar i blod med olika serologiska tekniker (Künzel *et al.*, 2008). Antikroppar mot *E.cuniculi* utvecklas inom tre veckor efter infektion och kan detekteras minst 2 veckor innan organismen påvisas och 4 veckor innan histopatologiska förändringar uppträder. Samtidigt kan höga antikropps nivåer kvarstå flera månader efter exponering. Närvaro av antikroppar indikerar dock endast exponering för *E.cuniculi* och besvarar därmed inte frågan om parasiten är orsak till sjukdom, då det finns en stor andel subkliniskt infekterade individer (Künzel &

Joachim, 2010). Serologiska provsvar är därför svårtolkade, då ett positivt testresultat kan betyda både att kaninen är exponerad, att den är subkliniskt infekterad utan symptom eller kliniskt infekterad med uppvisande av symptom (Latney *et al.*, 2014). Ett negativt testresultat utesluter däremot *E.cuniculi* (Künzel & Joachim, 2010).

Förekomst av IgM antikroppar indikerar tidig, akut infektion medan en kombination av både IgM och IgG antikroppar indikerar aktiv infektion. Förekomst av endast IgG antikroppar indikerar däremot kronisk/latent infektion. I en studie av Jeklova *et al.* (2010b) undersöktes IgG och IgM antikroppar i blodet såväl från kaniner med kliniska symptom som med andra sjukdomar och från friska kaniner. Hos 32,4 % av kaninerna detekterades IgM antikroppar och hos 68 % av kaninerna detekterades IgG antikroppar. En hög andel av de kliniskt friska kaninerna var seropositiva för såväl IgM som IgG antikroppar, vilket indikerar att många individer var subkliniskt infekterade. Studien visar att samtidig detektion av IgM och IgG antikroppar kan ge en indikation på infektionsstatus vilket därmed rekommenderas, för att särskilja mellan akut och kronisk infektion (Jeklova *et al.*, 2010b).

Det finns flera serologiska tester för detektion av antikroppar mot *E.cuniculi* så som enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), indirekt immunofluorescens (IIF) och carbon immunoassay (CIA) (Jeklova *et al.*, 2010b).

I en studie av Cray *et al.* (2009) analyserades blod från kaniner med misstänkt encephalitozoonos, sjuka kaniner utan misstanke om encephalitozoonos samt från kliniskt friska kaniner, med ELISA och proteinelektrofores (PE). PE används för att detektera inflammatoriska processer där en minskning av albumin/globulin (A/G) kvoten och en ökning av gammaglobuliner ses som tecken på pågående infektion. Resultaten från både ELISA och PE skiljde sig signifikant mellan friska kaniner och misstänkt *E.cuniculi*-infekterade kaniner, där en högre andel var seropositiva. Infekterade kaniner hade dessutom en lägre A/G kvot och en högre halt av gammaglobulin än de kliniskt friska. Samma förändringar kunde dock även observeras hos sjuka kaniner utan misstanke om encephalitozoonos. Enligt författarna är en ökning i gammaglobulin ett komplement till annan diagnostik men metoden bör inte användas ensam för detektion av *E.cuniculi* hos kaniner (Cray *et al.*, 2009).

För att jämföra ELISA, IIF och CIA undersöktes blod från såväl kaniner i vilka encephalitozoonos hade bekräftats histologiskt som från kaniner utan konfirmerad diagnos (Boot *et al.*, 2000). Inga skillnader sågs i andelen seropositiva prover och testerna ansågs därför jämförbara. Tolv prover från infekterade kolonier uppvisade dock olika resultat i de olika testerna. Enligt författarna kan detta förklaras med att ELISA testet och IIF påvisar både IgG och IgM antikroppar medan CIA endast mäter ett IgG svar. Tidig infektion med endast IgM svar kan alltså vara negativ i CIA medan det är positivt i de övriga testerna. Enligt studien fanns ingen signifikant skillnad i sensitivitet och specificitet mellan de olika testerna. Samtliga hade hög sensitivitet och är därmed lämpliga att användas vid diagnostik av *E.cuniculi*-infektion (Boot *et al.*, 2000).

DNA-detektion

DNA från sporer av *E. cuniculi* kan detekteras i urin och cerebrospinalvätska (CSF) med hjälp av PCR (Künzel & Joachim, 2010). Inom humanmedicinen har PCR utvecklats som rutindiagnostik vid detektion av mikrosporidier. Med PCR kan *E.cuniculi* påvisas med specifika primers riktade mot rRNA genen i bland annat avföringsprover. Fördelen är att PCR är en exakt och idag relativt billig diagnostisk metod för detektion av *E.cuniculi* och som dessutom har hög sensitivitet (Kock *et al.*, 1997). PCR används dock ännu inte rutinmässigt på veterinärsidan (Csokai *et al.*, 2009b).

Csokai *et al.* (2009b) undersökte förekomsten av *E.cuniculi* med PCR i prov från urin, CSF och linsmaterial från seropositiva kaniner och som hade bekräftats infekterade med *E.cuniculi* histologiskt. Efter undersökning med konventionell PCR visade det sig att alla prover från ögat var positiva. Urinprov och prov från CSF testades vidare med nested PCR, som anses ha en högre sensitivitet än konventionell PCR. Hos 29,7 % av kaninerna kunde DNA detekteras i urin medan alla prover från CSF var negativa och saknar därmed diagnostisk relevans. Kaniner utskiljer sporer intermittent i urinen, vilket förklarar de negativa resultaten även hos kliniskt sjuka kaniner. Enligt författarna är därmed PCR en opålitlig metod för diagnostik *in vivo*, med undantag vid undersökning av linsmaterial. PCR fungerar utmärkt för att diagnostisera *E.cuniculi* hos kaniner med phacoclastic uveitis medan hos kaniner med neurologiska symptom är serologi fortfarande den mest tillförlitliga metoden (Csokai *et al.*, 2009b).

I en studie av Jeklova *et al.* (2010a) infekterades kaniner experimentellt okulärt respektive oralt med en låg eller hög dos av sporer. Med hjälp av PCR kunde spor-DNA detekteras i urin hos kaniner som infekterats med en hög dos. Däremot vid en låg dos av sporer detekterades inte DNA och författarna hävdar därför att PCR är beroende av infektionsstatus och antalet sporer som individen utskiljer. Samtliga prover från CSF gav negativt resultat (Jeklova *et al.*, 2010a).

CSF-analys

Analys av CSF kan användas för att diagnostisera olika inflammationer i CNS. Endast ett fåtal studier har gjorts för att utvärdera CSF-analys vid diagnostik av encephalitozoonos hos kaniner. I en studie analyserade CSF från friska kaniner och från kaniner med misstänkt encephalitozoonos genom cytologisk utvärdering och proteinkoncentrationer (Jass *et al.*, 2008). Det visade sig att CSF från kaniner med misstänkt infektion innehöll fler leukocyter och hade högre proteinkoncentrationer än kliniskt friska kaniner. Vid cytologisk utvärdering sågs lymfo-monocytisk pleocytos hos de misstänkt *E.cuniculi*-infekterade kaninerna och encephalitozoonos kan därför karaktäriseras av dessa förändringar. Författarna påpekar dock att samma förändringar i CSF kan även observeras vid virusinfektioner, andra protozoer eller vid immunmedierad encephalit (Jass *et al.*, 2008).

Post mortem

Histopatologi

E.cuniculi kan diagnostiseras *post mortem* genom histopatologisk undersökning (Csokai *et al.*, 2009b). Vid histopatologisk diagnos ses karaktäristiska förändringar så som nonsuppurativ granulomatös encephalit, infiltrat av lymfocyter och plasmaceller samt granulomatösa infiltrat i vävnaderna (Latney *et al.*, 2014). För att kunna identifiera vävnadsförändringar måste proverna färgas, oftast med hematoxylin-eosin-färgning (Latney *et al.*, 2014). Förutom påvisande av histologiska förändringar bör även sporer av *E.cuniculi* detekteras för att säkerställa diagnosen (Csokai *et al.*, 2009b), då det finns flera andra infektioner med en liknande histologisk bild (Latney *et al.*, 2014). Sporer observeras enklast i vävnaderna efter Gram-färgning, Ziehl Neelsen (ZN)-färgning eller trikromfärgning (Latney *et al.*, 2014). Förekomsten är högst i njurar och hjärna, 4 respektive 8 veckor efter det att antikroppar har detekterats i blodet (Künzel & Joachim, 2010).

Csokai *et al.* (2009a) undersökte hjärna, njurar, lever, lunga, mjälte, tunntarm och öga från kaniner som bedömdes infekterade vid tecken på encephalit och/eller interstitiell nefrit eller när sporer sågs. Förändringarna i hjärnan var ofta perivaskulära manschetter och ibland med granulom. Författarna rekommenderar detektion av sporer i de fallen med inflammatoriska infiltrat men avsaknad av granulom. ZN-färgning gav positivt resultat i 93,9 % och trikromfärgning i 85,7 % av hjärnorna som undersöktes. ZN visade sig ha en högre sensitivitet än trikrom. Ofta påvisades endast ett fåtal sporer. En förklaring är att sporer inte alltid kan detekteras hos seropositiva djur, trots att de har histologiska förändringar i hjärna och njurar. Samtidigt kan detektion av sporer ske i vävnader utan inflammatoriska förändringar. Studien visade också att trots förändringar i hjärna eller njurar kunde kaninerna vara kliniskt friska. Histopatologi kan därmed inte användas självständigt vid diagnostik av *E.cuniculi* (Csokai *et al.*, 2009a).

Vid experimentell infektion undersöktes vävnad från lever, njurar, lunga, hjärna, leptomeninger, medulla oblongata, tarm och ögon histologiskt hos kaniner som exponerats oralt eller okulärt med hög eller låg dos av sporer (Jeklova *et al.*, 2010a). Arton veckor efter det att kaninerna inokulerats sågs ibland förändringar i hjärna, leptomeninger och medulla oblongata medan lunga, lever och njurar var de kraftigast angripna organen. Efter 98 dagar observerades de största förändringarna i hjärnan och njurarna medan förändringarna i levern och lungan var mindre vanliga. Inga histologiska förändringar påvisades i ögat, trots att kaninerna hade exponerats okulärt. Enligt författarna beror detta troligen på att phacoclastic uveitis endast förekommer efter *in utero* överföring av *E.cuniculi* (Jeklova *et al.*, 2010a).

I en studie (Leipig *et al.*, 2013) undersöktes hjärna, hjärta, lungor, tarm, lever och njurar histologiskt. Enligt denna var granulomatös encephalit och lymfoplasmacytisk meningoencephalit samt interstitiell nefrit de mest karaktäristiska förändringarna vid infektion med *E.cuniculi*. Hos 41 % av kaninerna sågs typiska förändringar och *E.cuniculi* hittades främst i hjärna och njurar. Sporer detekterades endast hos 16 % av de infekterade kaninerna. Genom att detektera *E.cuniculi*-DNA i dessa vävnader, kunde även de histologiska förändringarna associeras till organismen (Leipig *et al.*, 2013).

Immunohistokemi

Om sporer av *E.cuniculi* inte kan påvisas histopatologiskt kan immunohistokemi användas som *post mortem* metod för en mer exakt diagnos (Latney *et al.*, 2014). Immunohistokemi bygger på att primära antikroppar riktade mot *E.cuniculi* binder till antigenet, som i sin tur detekteras med sekundära antikroppar riktade mot de primära antikropparna. De sekundära antikropparna är konjugerade med enzymet peroxidase och ett färgomslag kan ses efter tillsats av färgämnet kromogen (Leipig *et al.*, 2013).

I en studie av Leipig *et al.* (2013) kunde *E.cuniculi*-antigen detekteras med hjälp av immunohistokemi i minst ett organ i 42 % av infekterade kaniner och i 48 % av kaniner med påvisade histologiska förändringar. Antigenförekomsten var högst i vävnadsprover från hjärnan och njurarna. Med hjälp av immunohistokemi kunde antigen påvisas i alla fall där sporer hade detekterats. Samtliga fall med positiva resultat från den immunohistokemiska undersökningen uppvisade även histologiska förändringar som karaktäriserade en *E.cuniculi*-infektion. Författarna anser att immunohistokemi är att föredra när vävnaderna är måttligt drabbade av organismen och är särskilt bra vid detektion av *E.cuniculi* i njurar, där sporer förekommer i mindre grad än i CNS (Leipig *et al.*, 2013).

PCR

E.cuniculi-DNA kan även detekteras i vävnader *post mortem* med hjälp av PCR (Künzel & Joachim, 2010). Det finns flera PCR protokoll som kan användas: konventionell PCR, realtids PCR samt nested PCR. Nested PCR har högst sensitivitet men risken är större för kontamination jämfört med realtids PCR. För detektion av DNA i vävnader anses konventionell PCR endast vara tillräckligt känslig för detektion av sporer i linsen (Leipig *et al.*, 2013).

Leipig *et al.* (2013) testade vävnadsprover med hjälp av realtids PCR från kaniner där encephalitozoonos hade konstaterats genom histopatologi samt hos kaniner utan några förändringar förknippade med *E.cuniculi* liksom hos de med möjlig *E.cuniculi*-infektion. *E.cuniculi*-DNA detekterades hos 86 % av kaninerna i minst ett organ och hos 83 % av kaninerna med typiska histologiska förändringar. Hos 5 kaniner var resultatet efter realtids PCR negativt trots att histologiska förändringar sågs både i hjärna och njurar. Vävnadsprover från hjärna och njurar var de proven där DNA kunde detekteras i störst utsträckning men enligt författarna kan DNA även detekteras i lungvävnad. Leipig *et al.* (2013) hävdar att realtids PCR har högre sensitivitet vid diagnos av encephalitozoonos än histopatologi och immunohistokemi (Leipig *et al.*, 2013).

I en studie när vävnadsprover från ögon från kaniner med phacoclastic uveitis testades med konventionell PCR var alla prover positiva (Csokai *et al.*, 2009b). Däremot testades endast 25,4 % av kaninerna utan uveitis positivt vid undersökning av hjärna, njurar, hjärta, lever, lungor, mjälte och lins med konventionell PCR. Vävnadsproverna testades även med nested PCR och hos kaniner med misstänkt *E.cuniculi*-infektion var 63,6 % av provsvaren positiva. DNA detekterades i högre utsträckning i hjärna än i njurar. Hjärnan är följaktligen det organ

som anses vara mest lämpligt att utföra PCR på, för att diagnostisera *E.cuniculi*. De negativa resultaten menar författarna beror på en koncentration av sporer i de undersökta vävnaderna som ligger under detektionsnivån. Det fanns en signifikant skillnad mellan konventionell PCR och nested PCR i att detektera DNA i vävnadsprover, där nested PCR har en högre sensitivitet och bör användas framför konventionell PCR (Csokai *et al.*, 2009b).

Vidare i en annan studie undersöktes vävnadsprover från *E.cuniculi*-seropositiva kaninmödrar samt deras foster och placenta med hjälp av nested PCR (Baneux & Pognan, 2003). Alla kaninhonor var positiva i minst ett organ och DNA var vanligast förekommande i hjärnan. Totalt 39 % av kaninernas foster testade positivt i minst ett organ och förekomsten var högst i placentan. Detektion av DNA hos såväl mödrar som deras foster genom nested PCR styrker misstanken om att överföring *in utero* förekommer hos kaniner (Baneux & Pognan, 2003).

DISKUSSION

För prognos och behandling av infektion med *E. cuniculi* hos kaniner och med tanke på parasitens zoonotiska potential, är det viktigt att det finns tillförlitliga diagnostiska metoder (Csokai *et al.*, 2009b). Flera diagnostiska metoder kan användas, såväl *ante mortem* som *post mortem*. Som det ser ut idag erhålls klinisk diagnos genom neurologiska och oftamologiska undersökningar som kan kombineras med serologisk undersökning samt uteslutande av differentialdiagnoser (Künzel *et al.*, 2008). Syftet med den här litteraturstudien var att beskriva vilka diagnostiska metoder som finns att tillgå samt fördelar och nackdelar med respektive metod.

Ante mortem diagnostik är att föredra eftersom de ger svar till varför kaninen är sjuk varefter en korrekt behandling kan sättas in. Då det finns många möjliga orsaker till att kaniner uppvisar neurologiska symptom, njurdysfunktion eller uveitis, är uteslutande av differentialdiagnoser en viktig process inom diagnostiken (Latney *et al.*, 2014). Genom röntgen, ultraljud, kliniska undersökningar och serologi kan bland annat *Pasteurella multocida*, njursten och trauman exkluderas som bakomliggande orsaker till sjukdom (Künzel *et al.*, 2008; Jeklova *et al.*, 2010b; Harcourt-Brown, 2004; Künzel & Joachim, 2010; Giordano *et al.*, 2005). Då uteslutande av differentialdiagnoser inte kan bekräfta en *E.cuniculi*-infektion utan endast tala om vilka agens som inte är orsaken, kan det endast användas i kombination med andra diagnostisk metod.

En viktig *ante mortem* metod är användande av serologiska tester som kan detektera *E.cuniculi*-infektion före någon annan diagnostisk metod. Antikroppar mot *E.cuniculi* utvecklas relativt snabbt, ca 3 veckor efter att djuren infekterats och de kan därmed detekteras innan organismen eller histopatologiska förändringar kan påvisas. Antikroppar kan dessutom påvisas under flera månader efter exponering (Künzel & Joachim, 2010). Genom samtidig mätning av IgM och IgG kan akuta infektioner särskiljas från kroniska/latenta infektioner (Jeklova *et al.*, 2010b). Att fastställa infektionsstatus är viktigt eftersom om kaninen är akut infekterad krävs snabba åtgärder och eventuell isolering från andra djur, för att hindra en vidare spridning av infektionen. Om kaninen däremot är kroniskt/latent infekterad kan stress och andra faktorer vara utlösande för sjukdom. I en studie (Cray *et al.*, 2009) skiljde sig

resultat efter serologiska tester signifikant mellan friska kaniner och kaniner med misstänkt *E.cuniculi*-infektion, som gav ett positivt resultat i större utsträckning. I en annan studie (Csokai *et al.*, 2009b) sågs dock ingen signifikant skillnad. Vidare visade en tredje studie (Jeklova *et al.*, 2010b) att även kliniskt friska kaniner kan vara seropositiva. I dagsläget är serologi att föredra när det gäller *ante mortem* diagnostik. Nackdelen är dock att serologi inte kan användas självständigt för att skilja mellan subkliniskt och kliniskt infekterade kaniner. Positiva testresultat är därför svårtolkade. Likaså kan detektion av antikroppar inte bekräfta *E.cuniculi* som orsak till sjukdom utan endast tala om att individen är eller varit exponerad (Csokai *et al.*, 2009b).

PCR-detektion av sporer i kroppsvätskor är ytterligare en *ante mortem* metod som är snabb, billig och som har hög sensitivitet (Kock *et al.*, 1997). Enligt en studie (Csokai *et al.*, 2009b), var alla prover från ögat positiva vid PCR undersökning av linsmaterial från kaniner med phacoclastic uveitis. Däremot anses PCR av urinprov och prov från CSF inte lika tillförlitliga. Sporer utsöndras sporadiskt till urinen och är inte alltid närvarande, vilket gör att kliniskt sjuka kaniner ibland testas negativt (Csokai *et al.*, 2009b). PCR av CSF-prover var alltid negativa (Jeklova *et al.*, 2010a). Det förefaller som om PCR ännu inte är tillräckligt pålitlig och mer forskning behövs därför på veterinärsidan för att utvärdera och utveckla tekniken. Framgångar har däremot nåtts på humansidan (Kock *et al.*, 1997) vilket innebär att PCR även borde kunna anpassas till djur. Likaså finns det för få studier gjorda för att kunna göra en fullständig utvärdering av CSF-analys, som är en annan potentiellt användbar diagnostisk metod.

Vid utredning av dödsfall i en population för att eventuellt kunna behandla övriga levande djur, är *post mortem* metoder naturligtvis ett måste. En sådan metod är histopatologi. Genom att färga vävnadsprover kan karaktäristiska förändringar identifieras och genom specialfärgning kan även sporer av *E.cuniculi* detekteras. Enbart påvisande av histologiska förändringar bekräftar inte encephalitozoonos, då även andra organismer ger en liknande histologisk bild. Detektion av sporer krävs därför i de flesta fall (Latney *et al.*, 2014). Ett hinder med histopatologi (inklusive specialfärgning) är att endast ett fåtal sporer detekteras och att kaniner kan vara seropositiva med karaktäristiska histologiska förändringar utan detekterbara sporer. Likaså kan sporer påvisas utan att förändringar observeras i vävnadsprover (Csokai *et al.*, 2009a). En annan nackdel är att de histologiska förändringarna verkar vara påvisbara olika lång tid efter infektion. Enligt en studie (Jeklova *et al.*, 2010a) kunde förändringar inte påvisas i hjärnan förrän långt efter att förändringar kunnat observeras i exempelvis lungor och njurar. Däremot vid påvisbara förändringar i hjärnan, detekterades histologiska förändringar i mindre utsträckning i lungorna. Vävnadsprover från flera organ måste därmed undersökas för att inte missa förändringar, särskilt då tidpunkten för infektion är oklar.

Vidare, när sporer inte är detekterbara, kan immunohistokemi av vävnadsprover användas för definitiv diagnos (Latney *et al.*, 2014). Enligt en studie (Leipig *et al.*, 2013) var alla resultat positiva där sporer detekterades och där histologiska förändringar även kunde observeras. Immunohistokemi är därför att föredra när förekomsten av sporer i vävnaden är låg och vid diagnostik av encephalitozoonos i njurar. En tredje *post mortem* metod är PCR av

vävnadsprover som anses ha högre sensitivitet jämfört med histopatologi och immunohistokemi (Leipig *et al.*, 2013). Metoden fungerar bäst för vävnadsprover från hjärnan men kan ge falska negativa resultat när koncentrationen av sporer är låg. Skillnader i resultat kan också observeras beroende på vilken typ av PCR som används vid diagnostik. Nested PCR anses ha högre sensitivitet och är att föredra framför konventionell PCR, som endast gav resultat av diagnostisk relevans när prover togs från ögat (Csokai *et al.*, 2009b).

Slutsats

Sammanfattningsvis, finns det flera olika metoder som kan användas vid detektion av *E.cuniculi* och där samtliga har såväl fördelar som nackdelar. Likväl kan ingen metod på egen hand förklara om *E.cuniculi* är orsak till sjukdom, utan en kombination av flera diagnostiska metoder är att föredra för att kunna ställa rätt diagnos. När kaninen är död är PCR av vävnadsprover det bästa alternativet. Kommer en kanin in levande på kliniken med misstänkt *E.cuniculi*-infektion bör olika differentialdiagnoser först uteslutas. Om misstanke om *E.cuniculi* kvarstår, kan serologi användas och eventuellt kompletteras med PCR undersökning av urinprov. PCR har stor potential som bör utvecklas till en självständig metod för detektion av *E.cuniculi* hos kaniner. Detta skulle förenkla den diagnostiska processen för veterinärer och dra ner kostnaderna för djurägare.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Ashton, N., Cook, C., Clegg, F. (1976). Encephalitozoonosis (nosematosis) causing bilateral cataract in a rabbit. *The British Journal of Ophthalmology*, 60: 618-631
- Baneux, P.J.R., Pognan, F. (2003). In utero transmission of Encephalitozoon cuniculi strain type 1 in rabbits. *Laboratory Animals*, 37: 132-138
- Beauvais, B., Sarfati, C., Challier, S., Derouin, F. (1994). In vitro model to assess effect of antimicrobial agents on Encephalitozoon cuniculi. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38: 2440-2448
- Boot, R., Hansen, A.K., Hansen, C.K., Nozari, N., Thuis, H.C. (2000). Comparison of assays for antibodies to Encephalitozoon cuniculi in rabbits. *Laboratory Animals*, 34: 281-289
- Cox, J.C., Gallichio, H.A. (1978). Serological and histological studies on adult rabbits with recent, naturally acquired encephalitozoonosis. *Research in veterinary science*, 24: 260-261
- Cox, J.C., Hamilton, R.C., Attwood, H.D. (1979). An investigation of the route and progression of Encephalitozoon cuniculi infection in adult rabbits. *The Journal of Protozoology*, 26: 260-265
- Cray, C., Arcia, G., Schneider, R., Kelleher, S.A., Arheart, K. (2009). Evaluation of the usefulness of an ELISA and protein electrophoresis in the diagnosis of Encephalitozoon cuniculi infection in rabbits. *American Journal of Veterinary Research*, 70: 478-482
- Csokai, J., Gruber, A., Künzel, F., Tichy, A., Joachim, A. (2009a). Encephalitozoonosis in pet rabbits (*Oryctolagus cuniculus*): pathohistological findings in animals with latent infection versus clinical manifestation. *Parasitology Research*, 104: 629-635
- Csokai, J., Joachim, A., Gruber, A., Tichy, A., Pakozdy, A., Künzel, F. (2009b). Diagnostic markers for encephalitozoonosis in pet rabbits. *Veterinary Parasitology*, 163: 18-26
- Eriksson, A. (2007). *Seroprevalens av antikroppar mot Encephalitozoon cuniculi hos friska kaniner*. Examensarbete. Uppsala: Sveriges lantbruksuniversitet.

- Flatt, R.E., Jackson, S.J. (1970). Renal nosematosis in young rabbits. *Pathologia Veterinaria*, 7: 492-497
- Giordano, C., Weigt, A., Vercelli, A., Rondena, M., Grilli, G., Giudice, C. (2005). Immunohistochemical identification of *Encephalitozoon cuniculi* in phacoclastic uveitis in four rabbits. *Veterinary Ophthalmology*, 8: 271-275
- Harcourt-Brown, F.M., Holloway, H.K.R. (2003). *Encephalitozoon cuniculi* in pet rabbits. *The Veterinary Record*, 152: 427-431
- Harcourt-Brown, F.M. (2004). *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbits. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, 13: 86-93
- Jass, A., Matiasek, K., Henke, J., Küchenhoff, H., Hartmann, K., Fisher, A. (2008). Analysis of cerebrospinal fluid in healthy rabbits with clinically suspected encephalitozoonosis. *The Veterinary Record*, 162: 618-622
- Jeklova, E., Leva, L., Kovarcik, K., Matiasovis, J., Kummer, V., Maskova, J., Skoric, M., Faldyna, M. (2010a). Experimental oral and ocular *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbits. *Parasitology*, 137: 1749-1757
- Jeklova, E., Jekl, V., Kovarcik, K., Hauptman, K., Koudela, B., Neumayerova, H., Knotck, Z., Faldyna, M. (2010b). Usefulness of detection of specific IgM and IgG antibodies for diagnosis of clinical encephalitozoonosis in pet rabbits. *Veterinary Parasitology*, 170: 143-148
- Keeble, E.J., Shaw, D.J. (2006) Seroprevalence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in domestic rabbits in the United Kingdom. *The Veterinary Record*, 158: 539-544
- Kock, N.P., Petersen, H., Fenner, T., Sobottka, I., Schmetz, C., Deplazes, P., Pieniazek, N.J., Albrecht, H., Schottelius, J. (1997). Species-specific identification of microsporidia in stool and intestinal biopsy specimens by the polymerase chain reaction. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 16: 369-376
- Künzel, F., Gruber, A., Tichy, A., Edelhofer, R., Nell, B., Hassan, J., Leschnik, M., Thalhammer, J., Joachim, A. (2008). Clinical symptoms and diagnosis of encephalitozoonosis in pet rabbits. *Veterinary Parasitology*, 151: 115-124
- Künzel, F., Joachim, A. (2010). Encephalitozoonosis in rabbits. *Parasitology Research*, 106: 299-309
- Kunstýr, I., Naumann, S. (1985). Head tilt in rabbits caused by pasteurellosis and encephalitozoonosis. *Laboratory Animals*, 19: 208-213
- Latney, L.V., Bradley, C.W., Wyre, N.R. (2014), *Encephalitozoon cuniculi* in pet rabbits: diagnosis and optimal management. *Veterinary Medicine Research and Reports*, 5: 169-180
- Leipig, M., Matiasek, K., Rinder, H., Janik, D., Emrich, D., Baiker, K., Hermanns, W. (2013). Value of histopathology, immunohistochemistry and real-time polymerase chain reaction in the confirmatory diagnosis of *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbits. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 25: 16-26
- Mathis, A., Weber, R., Deplazes, P. (2006). Zoonotic potential of the microsporidia. *Clinical Microbiology Reviews*, 18: 423-445
- Sieg, J., Hein, J., Jass, A., Sauter-Louis, C., Hartmann, K., Fisher, A. (2012). Clinical evaluation of therapeutic success in rabbits with suspected encephalitozoonosis. *Veterinary Parasitology*, 187: 328-332

- Waller, T. (1979). Sensitivity of *Encephalitozoon cuniculi* to various temperatures, disinfectants and drugs. *Laboratory Animals*, 13: 227-230
- Wasson, K., Peper, R.L. (2000). Mammalian Microsporidiosis. *Veterinary Pathology*, 37: 113-128
- Wright, J.H., Craighead, E. (1922). Infectious motor paralysis in young rabbits. *The Journal of Experimental Medicine*, 36: 135-140