

trophoblastic neoplasia. *Int J Gynecol Cancer*, 23(6), 1150-1156.

7. **K.D. Bagshawe** (2009). Choriocarcinoma: A model for tumour markers. *Acta Oncologica*, 31(1), 99-106.

8. **L.A. Cole** (2010). Biological functions of hCG and hCG-related molecules. *Reprod Biol Endocrinol*, 8, 102.

9. **H.N. Duc, N.E. van Trommel, F.C. Sweep** et al (2006). Clinical utility of

hyperglycosylated hCG in serum taken before hydatidiform mole evacuation to predict persistent trophoblastic disease. *Int J Biol Markers*, 21(1), 45-49.

10. **M. Ozturk, R. Berkowitz, D. Goldstein** et al (1988). Differential production of human chorionic gonadotropin and free subunits in gestational trophoblastic disease. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 158(1), 193-198.

ĐÁNH GIÁ TÌNH TRẠNG NHIỄM TÁC NHÂN ENCEPHALITOZOON CUNICULI TRÊN THỎ SPF SẢN XUẤT TẠI POLYVAC

**PHẠM THỊ THƯỢC, NGUYỄN THỊ NGUYỆT,
PHẠM HỮU TIẾN, PHẠM ANH THỤ,
NGUYỄN ĐĂNG HIỀN, NGÔ THU HƯỜNG**

Trung tâm Nghiên cứu Sản xuất Vắc xin và Sinh phẩm Y tế (POLYVAC), Hà Nội

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm đánh giá tình trạng nhiễm tác nhân *Encephalitozoon cuniculi* trên thỏ SPF (Specific pathogen free) sản xuất tại Polyvac từ năm 2017 đến nay. Thỏ được kiểm tra tác nhân *E.cuniculi* trên 3 nhóm tuổi: thỏ con (< 11 tuần tuổi), thỏ trưởng thành trẻ (12-23 tuần tuổi) và thỏ trưởng thành (>6 tháng tuổi). Kiểm tra bệnh lý chi tiết được thực hiện trên não và thận. Kết quả cho thấy trên cả 3 nhóm tuổi ở tất cả các cá thể nghiên cứu đều không xuất hiện tổn thương bệnh lý điển hình (viêm não màng não u hạt không có mũ và viêm thận kẽ) của bệnh do *E.cuniculi* gây ra. Điều này góp phần chứng tỏ chất lượng của thỏ SPF sản xuất tại Polyvac.

Từ khóa: Thỏ SPF, *Encephalitozoon cuniculi*, *Encephalitozoonosis*, POLYVAC.

SUMMARY

EVALUATION OF ENCEPHALITOZOON CUNICULI INFECTION IN SPF RABBITS PRODUCED AT POLYVAC

Chịu trách nhiệm: Phạm Thị Thuộc

Email: ptthuoc@gmail.com

Ngày nhận: 17/9/2020

Ngày phản biện: 19/10/2020

Ngày duyệt bài: 27/10/2020

This study was conducted to evaluate the status of *Encephalitozoon cuniculi* infection in SPF rabbits (Specific pathogen-free rabbits) produced at Polyvac from 2017 to the present. These rabbits were examined pathologically for *E.cuniculi* on 3 age groups: leveret (< 11 weeks of age), young adult rabbits (12 - 23 weeks of age), and adult rabbits (> 6 months of age). A detailed pathological examination was performed on the brain and kidneys. The results showed that all 3 age groups were not observed typical histopathological changes (nonsuppurative granulomatous meningoencephalitis and interstitial nephritis) due to *E.cuniculi*. The quality of the SPF rabbit produced at Polyvac is confirmed further.

Keywords: SPF rabbits, *Encephalitozoon cuniculi*, laboratory rabbits, POLYVAC.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Nhiễm trùng tác nhân *Encephalitozoon cuniculi* (*E. cuniculi*) gây bệnh *Encephalitozoonosis* được báo cáo lần đầu tiên trên thỏ nuôi vào năm 1922 [1]. Từ đó, có nhiều công trình nghiên cứu về bệnh này đã được công bố trên khắp thế giới. *E.cuniculi* là một vi bào tử ký sinh nội bào bắt buộc, thuộc họ Microsporida. Phạm vi vật chủ rất đa dạng bao

gồm động vật gặm nhấm, thỏ, ngựa, động vật ăn thịt và người, tuy nhiên vật chủ chính của *E.cuniculi* là thỏ [2]. Thỏ con, thỏ trưởng thành trẻ và thỏ trưởng thành đều mắc cảm với bệnh Encephalitozoonosis. Thỏ bị mắc bệnh do tiêu hóa thức ăn và nước uống nhiễm bào tử *E.cuniculi* [3]. Tổn thương bệnh lý điển hình là viêm não màng não u hạt và viêm thận kẽ mãn tính, xuất hiện sẹo trên bề mặt thận [4-5]. Những năm gần đây, đã có báo cáo chứng minh Encephalitozoonosis là một bệnh truyền lây sang người. Một số quốc gia trên thế giới đã đưa ra những báo cáo điều tra và xác nhận đây là một bệnh nghiêm trọng trên thỏ.

Tại Việt Nam, trước đây chưa có báo cáo khoa học về kiểm tra bệnh Encephalitozoonosis trên thỏ nói chung, đặc biệt là thỏ SPF nói riêng. Từ năm 2016 đến 2017, chúng tôi đã nghiên cứu về bệnh Encephalitozoonosis trên thỏ thí nghiệm được sản xuất tại một cơ sở chăn nuôi ở Việt Nam và xác nhận có sự xuất hiện của bệnh này [6].

Hiện nay, Trung tâm Nghiên cứu Sản xuất Vắc xin và Sinh phẩm Y tế, Bộ Y tế (Polyvac) đã tự sản xuất được thỏ SPF (Specific pathogen free) phục vụ cho sản xuất vắc xin bán thành phẩm Rubella và các thử nghiệm kiểm định chất lượng vắc xin. Theo tiêu chuẩn của WHO TRS, 840 và tiêu chuẩn Nhật Bản thỏ SPF phải được kiểm soát đảm bảo không nhiễm một số vi sinh vật cụ thể, trong đó có tác nhân *E.cuniculi* gây bệnh Encephalitozoonosis [8]. Kiểm tra bệnh lý trên não và thận được xem là một phương pháp hiệu quả để chẩn đoán tác nhân này trên thỏ.

Tại Polvac, thỏ SPF thường được sử dụng ở nhóm tuổi thỏ con < 11 tuần tuổi cho sản xuất vắc xin, thỏ trưởng thành trẻ từ 11-24 tuần tuổi cho các thử nghiệm kiểm định chất lượng và thỏ trưởng thành > 6 tháng tuổi cho kiểm tra vi sinh vật định kỳ để kiểm soát chất lượng đàn thỏ. Cả 3 nhóm tuổi thỏ này đều có khả năng mắc cảm với tác nhân *E.cuniculi*.

Từ tình hình thực tế trên, chúng tôi thực hiện đề tài: “Đánh giá tình trạng nhiễm tác nhân *Encephalitozoon cuniculi* trên thỏ SPF sản xuất tại POLYVAC” nhằm kiểm tra tác nhân *E.cuniculi* trên thỏ SPF sản xuất tại Polvac.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu

Thỏ SPF được sản xuất POLYVAC. Những thỏ này được kiểm tra tác nhân *E.cuniculi* trên 3 nhóm tuổi: 10 thỏ con (< 11 tuần tuổi), 12 thỏ trưởng thành trẻ (12-23 tuần tuổi) và 10 thỏ trưởng thành (> 6 tháng tuổi).

Thỏ được giám sát theo dõi sức khỏe tại nhà động vật – Polvac. 4 hạng mục giám sát sức khỏe chính bao gồm: tình trạng phân, lượng thức ăn, lượng nước uống và tình trạng vận động.

3. Kiểm tra giải phẫu

Sau thời gian giám sát sức khỏe, thỏ được gây chết nhân đạo bằng cacbonđioxyde và tiến hành giải phẫu quan sát đại thể. Sau đó lấy mẫu não và thận cố định ngay trong dung dịch formaline 10%.

4. Kiểm tra bệnh lý vi thể

Tiến hành lấy các mẫu thận (thận trái và thận phải) và hệ thần kinh trung ương (ở các khu vực đại não, màng não, hành tủy, đồi thị, cầu não, tiểu não), xử lý mẫu và làm tiêu bản nhuộm HE theo quy trình thường quy [7], nhúng và đúc trong parafine, cắt lát mỏng 3-4 μ m và nhuộm hematoxylin eosin (HE) [7]. Quan sát tiêu bản bằng kính hiển vi quang học và đánh giá cấp độ tổn thương trên hệ thần kinh trung ương và thận căn cứ vào mật độ, kích thước của tổn thương, mức độ viêm (số lượng tế bào lympho bào, tương bào, đại thực bào) hoặc xơ hóa (nguyên bào sợi, sợi collagen). Các cấp độ tổn thương bao gồm không tổn thương (-), mức độ nhẹ (+), mức độ trung bình (++) và mức độ nặng (+++). Trong đó mức độ nhẹ (+) đặc trưng bởi tổn thương khu trú (focal), khu vực tổn thương có kích thước nhỏ, số lượng tế bào thâm nhiễm hoặc tăng lên ít. Mức độ trung bình (++) đặc trưng bởi tổn thương phân bố rộng hơn, tổn thương kích thước lớn hơn và số lượng tế bào thâm nhiễm hoặc xơ hóa nhiều hơn. Mức độ nặng (+++) khi tổn thương phân bố lan tỏa (diffuse), có kích thước lớn và số lượng tế bào thâm nhiễm rất nhiều hoặc xơ hóa nặng.

5. Nhuộm Gram và nhuộm hóa mô miễn dịch

Trường hợp quan sát thấy tổn thương ở não và thận trên tiêu bản nhuộm HE thì tiếp tục tiến hành nhuộm Gram và IHC để xác định sự tồn tại của tác nhân *E.cuniculi*.

Nhuộm Gram: Mẫu não và thận được cắt lát mỏng 3 μ m và tiến hành nhuộm Gram [7].

Nhuộm hóa mô miễn dịch: Sử dụng bộ kit Histofine Simple Stain (Nichirei Bioscience., Japan) để thực hiện nhuộm hóa mô miễn dịch cho một loạt lát cắt mỏng 3 μ m của mô não và thận. Các lát cắt mô được khử paraffin bằng xylen và làm ưa nước bằng một loạt bể cồn với các nồng độ giảm dần (100% - 90%-80%). Tiến hành khử peroxydase nội sinh trong các lát cắt mô bằng dung dịch hydrogen peroxide (H₂O₂) 0.3% trong methanol ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Các lát cắt được gắn với kháng thể bậc 1

(Rat anti-*Encephalitozoon cuniculi* antibody - Medicago, Uppsala, Sweden) với nồng độ pha loãng 1: 50.000 ở 4°C qua đêm. Sau đó gắn tiếp kháng thể bậc 2 (Peroxydase labelled anti Rat Mouse IgG) ở nhiệt độ phòng trong 30 phút.

Nhỏ dung dịch cơ chất DAB (3, 3'-diaminobenzidine) để tạo phản ứng màu. Nhuộm nhân với dung dịch Mayer's hematoxylin.

KẾT QUẢ

Kiểm tra *E.cuniculi* trên thỏ SPF con (< 11 tuần tuổi)

Kiểm tra sức khỏe

Kết quả kiểm tra cho thấy cả 10 thỏ đều không xuất hiện bất thường, hoàn toàn khỏe mạnh.

Kiểm tra đại thể và vi thể

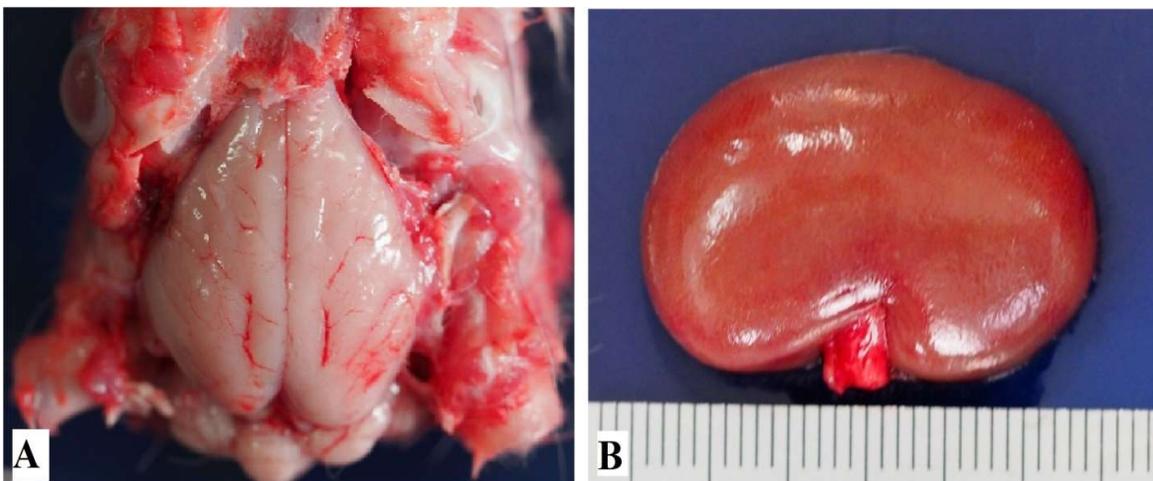
Kết quả quan sát đại thể và vi thể của mô não và thận của 10 thỏ SPF < 11 tuần tuổi thu được ở bảng 1.

Bảng 1. Kết quả kiểm tra đại thể và vi thể trên não và thận của thỏ SPF nhóm thỏ con (< 11 tuần tuổi)

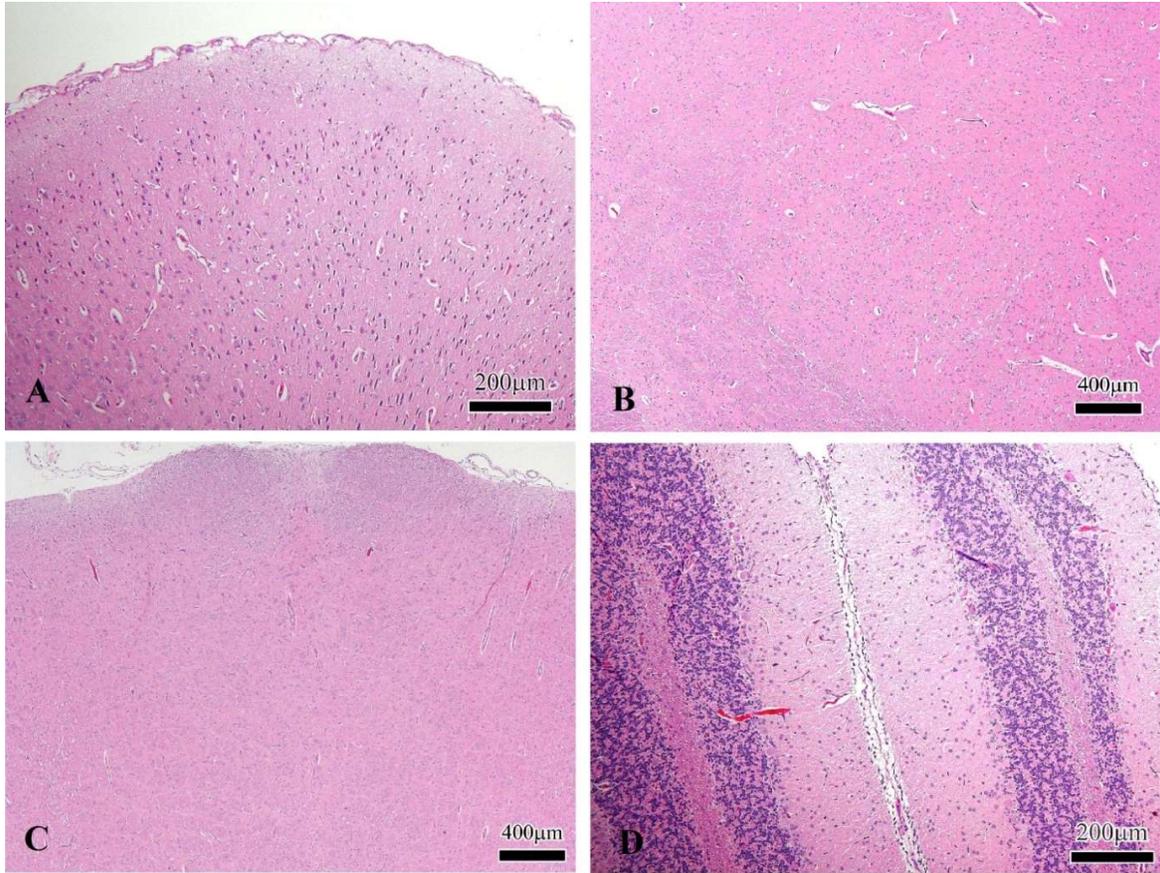
Cơ quan	Đại thể /Vi thể	Khu vực	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Não	Đại thể		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Vi thể	Đại não	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Màng não	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Hành tủy	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Đồi thị	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Cầu não	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Tiểu não	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Thận	Đại thể	Thận trái	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Thận phải	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Vi thể	Thận trái	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Thận phải	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Chú thích: -: Không xuất hiện tổn thương

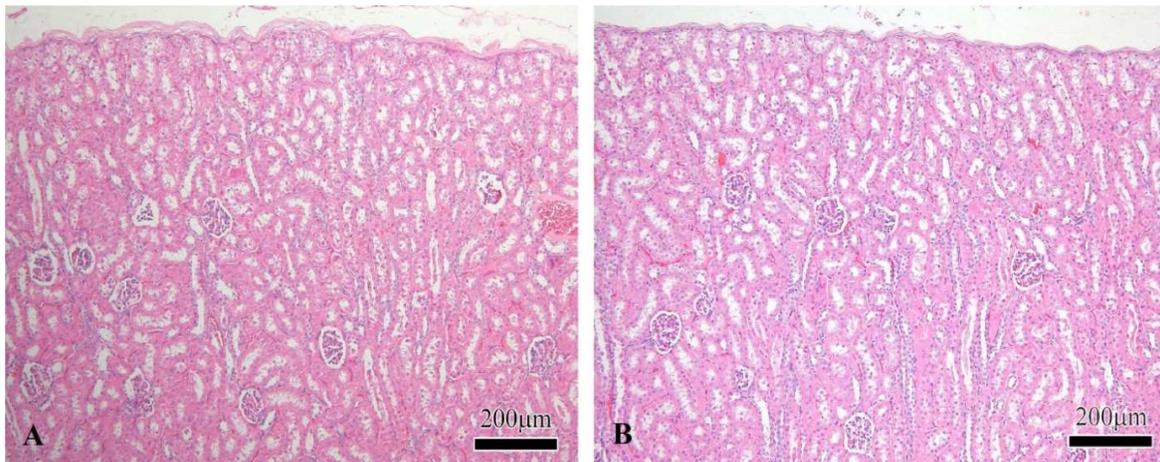
Bảng 1 cho thấy kết quả kiểm tra đại thể của não (hình 1A) và thận (hình 1B) của 10 thỏ ở nhóm thỏ con < 11 tuần tuổi không thấy có sự bất thường. Kết quả kiểm tra vi thể trên não (các khu vực đại não, màng não, hành tủy, cầu não, tiểu não) và trên cả 2 bên thận (trái và phải) của cả 10 thỏ ở nhóm thỏ con < 11 tuần tuổi không thấy có sự tổn thương nói chung cũng như những tổn thương điển hình của bệnh Encephanitozoonosis trên thỏ (hình 2 và hình 3).



Hình 1. Hình ảnh đại thể trên não và thận của nhóm thỏ con (A) Não, (B) Thận



Hình 2. Hình ảnh vi thể não của nhóm thỏ con: (A) Đại não và màng não, (B) Khu vực đồi thị, (C) khu vực cầu não, (D) khu vực tiểu não



Hình 3. Hình ảnh vi thể thận của nhóm thỏ con: (A) Thận trái, (B) Thận phải

2. Kiểm tra *E.cuniculi* trên thỏ SPF trẻ trưởng thành (11-24 tuần tuổi)

Kiểm tra sức khỏe

Kết quả kiểm tra cho thấy cả 12 thỏ nghiên cứu đều không xuất hiện bất thường và thỏ hoàn toàn khỏe mạnh.

Kiểm tra đại thể và vi thể

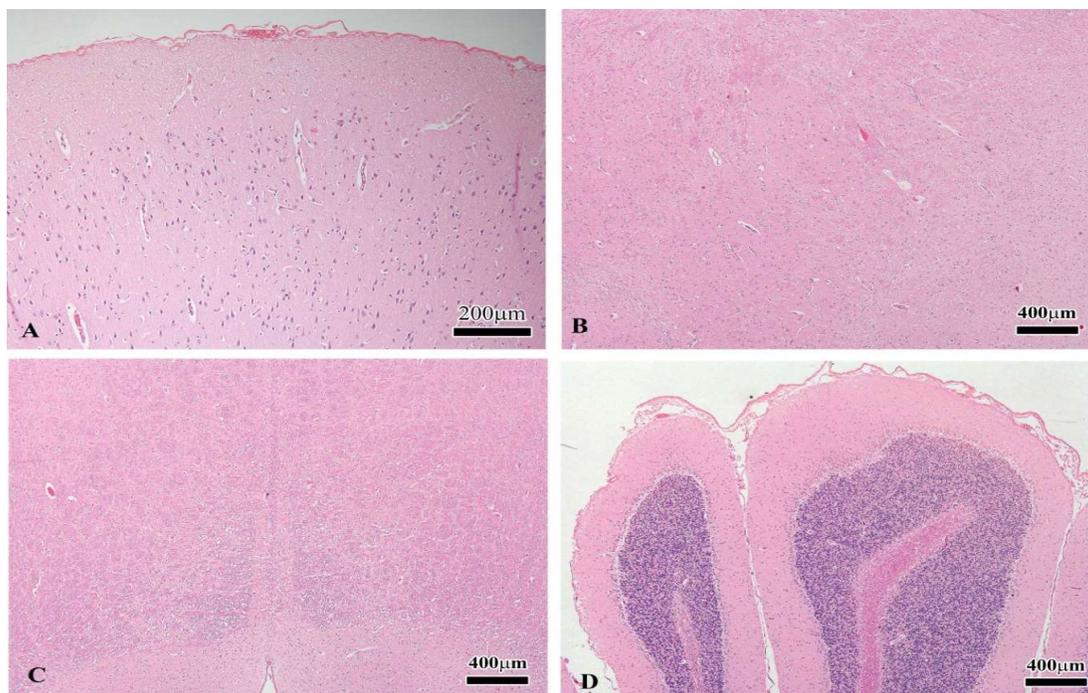
Kết quả quan sát đại thể và vi thể của mô não và thận của 12 thỏ SPF SPF 11-24 tuần tuổi thu được ở bảng 2

Bảng 2. Kết quả kiểm tra đại thể và vi thể trên não và thận của thỏ SPF nhóm thỏ trẻ trưởng thành (11-24 tuần tuổi)

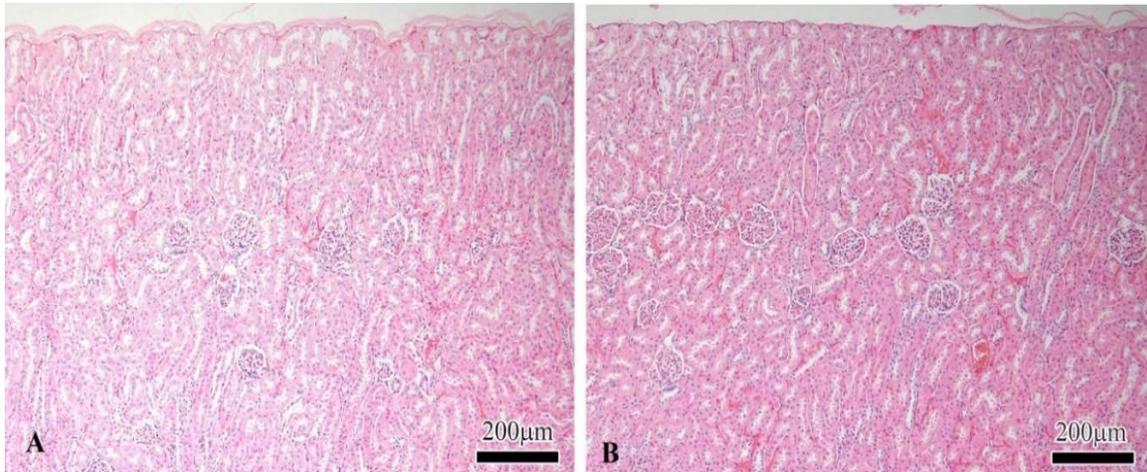
Thỏ số			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Cơ quan	Đại thể/Vi thể	Khu vực												
Não	Đại thể		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Vi thể	Đại não	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Màng não	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Hành tủy	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Đồi thị	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Cầu não	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Tiểu não	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Thận	Đại thể	Thận trái	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Thận phải	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Vi thể	Thận trái	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Thận phải	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Chú thích: -: Không xuất hiện tổn thương

Bảng 2 ta thấy kết quả kiểm tra đại thể của não và thận của 12 thỏ ở nhóm thỏ trẻ trưởng thành (11-24 tuần tuổi) không thấy có sự bất thường. Kết quả kiểm tra vi thể trên não (các khu vực đại não, màng não, hành tủy, cầu não, tiểu não) và trên cả 2 bên thận (trái và phải) của cả 12 thỏ ở nhóm thỏ trẻ trưởng thành (11-24 tuần tuổi) không thấy có sự tổn thương nói chung cũng như những tổn thương điển hình của bệnh Encephanitozoonosis trên thỏ (Hình 4 và hình 5).



Hình 4: Hình ảnh vi thể não của nhóm thỏ trẻ trưởng thành: (A) hình ảnh đại não và màng não, (B) Khu vực đồi thị, (C) khu vực cầu não, (D) khu vực tiểu não



Hình 5: Hình ảnh vi thể thận của nhóm thỏ trẻ trưởng thành: (A) Thận trái, (B) Thận phải

Kiểm tra *E.cuniculi* trên thỏ SPF trưởng thành (> 6 tháng tuổi)

Kiểm tra sức khỏe

Kết quả kiểm tra cho thấy cả 10 thỏ nghiên cứu đều không xuất hiện bất thường và thỏ hoàn toàn khỏe mạnh.

Kiểm tra đại thể và vi thể

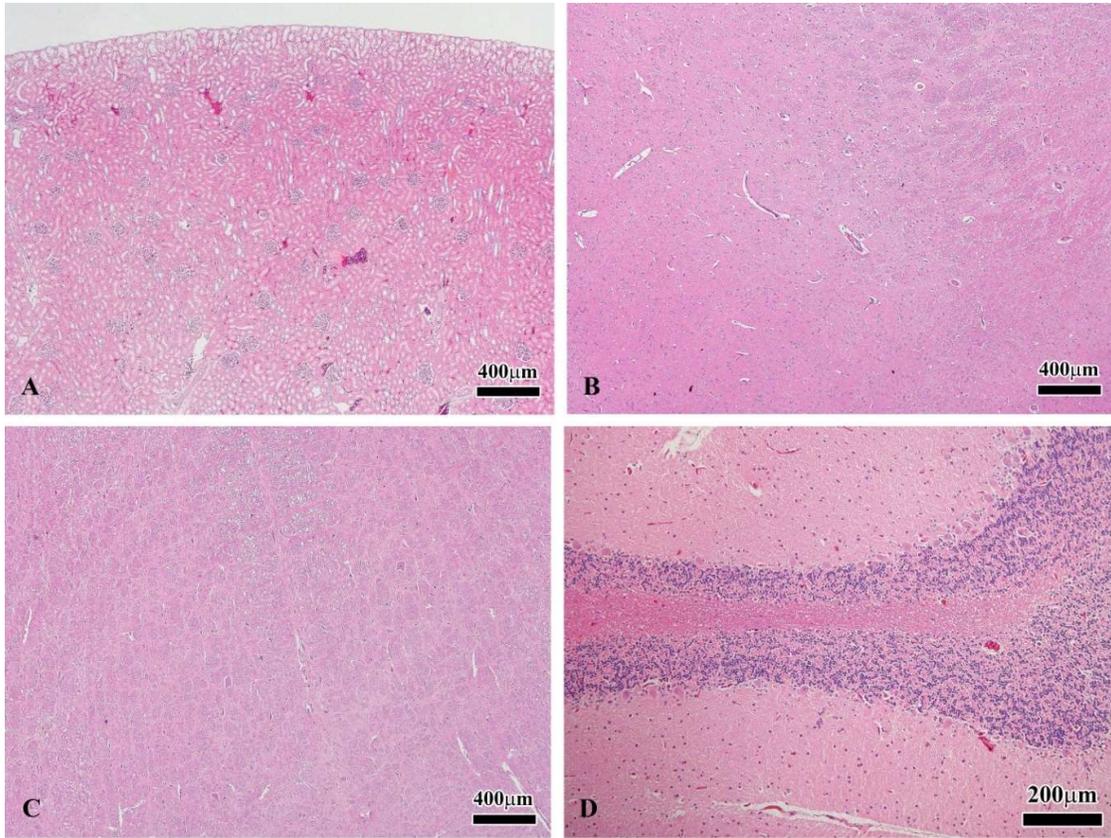
Kết quả quan sát đại thể và vi thể của mô não và thận của 10 thỏ SPF > 6 tháng tuổi thu được ở bảng 3.

Bảng 3. Kết quả kiểm tra đại thể và vi thể trên não và thận của thỏ SPF nhóm thỏ trưởng thành (> 6 tháng tuổi)

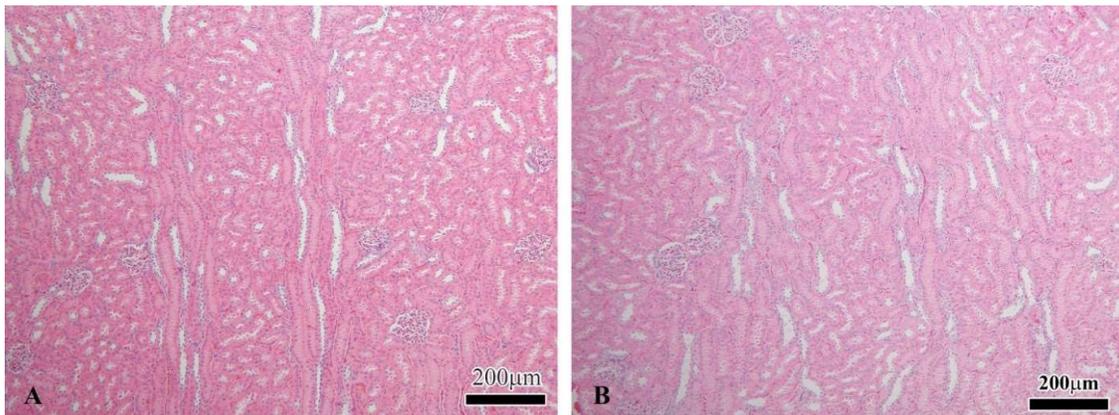
Thỏ số			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Cơ quan	Đại thể/Vi thể	Khu vực											
	Não	Đại thể		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vi thể		Đại não	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Màng não	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Hành tủy	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Đồi thị	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Cầu não	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tiểu não	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Thận	Đại thể	Thận trái	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Thận phải	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Vi thể	Thận trái	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Thận phải	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Chú thích: -: Không xuất hiện tổn thương

Bảng 3 ta thấy Kết quả kiểm tra đại thể não và thận của 10 thỏ ở nhóm thỏ trưởng thành (>6 tháng tuổi) không thấy có sự bất thường. Kết quả kiểm tra vi thể trên não (các khu vực đại não, màng não, hành tủy, cầu não, tiểu não) và trên cả 2 bên thận (trái và phải) của cả 10 thỏ ở nhóm thỏ trưởng thành (> 6 tháng tuổi) không thấy có sự tổn thương nói chung cũng như những tổn thương điển hình của bệnh Encephanitozoonosis trên thỏ (hình 6 và hình 7).



Hình 6. Hình ảnh vi thể não của nhóm thỏ trưởng thành: (A) hình ảnh đại não và màng não, (B) Khu vực đổi thị, (C) khu vực cầu não, (D) khu vực tiểu não



Hình 7. Hình ảnh vi thể thận của nhóm thỏ trưởng thành: (A) Thận trái, (B) Thận phải

BÀN LUẬN

Trong sản xuất và kiểm định chất lượng vắc xin có sử dụng nhiều loại động vật như thỏ. Các động vật sử dụng được quản lý chặt chẽ theo tiêu chuẩn GMP nhằm đảm bảo chất lượng của

sản phẩm cũng như thử nghiệm cho kết quả chính xác và có độ tin cậy cao. Các động vật được sử dụng cần được kiểm soát vi sinh vật một cách chặt chẽ [11].

Tại Việt Nam, POLYVAC sử dụng thỏ SPF là nguyên liệu đầu cho sản xuất vắc xin bán thành phẩm Rubella. Từ năm 2014 đến năm 2016 nguồn thỏ này được nhập khẩu từ Nhật Bản. Từ năm 2017, POLYVAC đã sản xuất thành công thỏ SPF nhờ chuyển giao công nghệ từ các chuyên gia Nhật Bản. Trong quá trình sản xuất thỏ SPF, Polyvac luôn tuân thủ các quy trình, đảm bảo các điều kiện về môi trường, thức ăn, nước uống... Đồng thời, duy trì kiểm tra vi sinh vật định kỳ nhằm đảm bảo thỏ đạt chất lượng theo tiêu chuẩn của WHO và tiêu chuẩn Nhật Bản. Những kết quả thu được trong nghiên cứu này góp phần đánh giá chất lượng thỏ SPF sản xuất tại Polyvac.

Bệnh truyền nhiễm do *E.cuniculi* gây ra thông thường là bệnh nhiễm khuẩn cận lâm sàng. Tuy nhiên, trên các động vật nhỏ và động vật bị suy giảm miễn dịch có trường hợp tử vong, ít thấy biểu hiện thần kinh và suy thận. Nguyên nhân gây biểu hiện thần kinh (ngiên đầu, xoay tròn) có thể nghĩ tới là tổn thương tiền đình của thần kinh trung ương [10]. Mặt khác, trước đây đã có báo cáo về việc không xác nhận rõ mối tương quan giữa tổn thương trên hệ thần kinh trung ương với biểu hiện thần kinh, cũng như chưa có quan điểm thống nhất về mối liên quan giữa triệu chứng lâm sàng và tổn thương [9]. Encephalitozoonosis là bệnh lây nhiễm cận lâm sàng nên việc phát hiện ra bệnh chỉ bằng theo dõi sức khỏe rất khó khăn. Mặt khác, do tổn thương bệnh lý vi thể có thể ở mức độ nhẹ nên kiểm tra đại thể cũng có thể không phát hiện thấy bất thường. Vì vậy, khi chẩn đoán bệnh truyền nhiễm này nhất thiết phải kiểm tra bệnh lý vi thể chi tiết. Kiểm tra bệnh lý trên não và thận được xem là một phương pháp hiệu quả để chẩn đoán tác nhân này trên thỏ.

Các kết quả kiểm tra với thỏ sản xuất tại POLYVAC ở các lứa tuổi trong thời gian qua cho thấy không nhiễm tác nhân *E.cuniculi*, điều đó chứng tỏ các quy trình nhân giống, chăm sóc, các điều kiện về nhà xường, thức ăn, nước uống... đều được đảm bảo và duy trì tốt.

KẾT LUẬN

Qua kết quả kiểm tra bệnh lý trên thỏ SPF sản xuất tại Polyvac từ năm 2017 đến nay thấy rằng, trên cả 3 nhóm tuổi (nhóm thỏ con < 11 tuần tuổi, nhóm thỏ trẻ trưởng thành 11-24 tuần tuổi và nhóm thỏ trưởng thành > 6 tháng tuổi) ở

tất cả các cá thể nghiên cứu đều không nhiễm tác nhân *E.cuniculi*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **J. Homer Wright and Eugene M. Craighead.** Infectious motor paralysis in young rabbits. J Exp Med. 1922 Jun 30; 36(1): 135-140.
2. **Künzel F, Joachim A.** Encephalitozoonosis in rabbits. Parasitol Res (2010) 106: 299-309.
3. **Cox JC, Hamilton RC, Attwood HD.** An Investigation of the Route and Progression of *Encephalitozoon cuniculi* Infection in Adult Rabbits. J Protozool, 1979 May; 26(2):260-5.
4. **Suckow MA, Stevens KA. and Wilson RP.** The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other.
5. **Stephen W. Barthold, Stephen M. Griffey, Dean H. Percy.** Pathology of laboratory rodents and rabbits. Fourth edition. Wiley-Blackwell, 2016; 293-295.
6. **Phạm Thị Thuộc, Ikeda Manabu, Nguyễn Đăng Hiền, Nguyễn Thúy Hoàng, Ngô Thu Hoàng, Nguyễn Thị Nguyệt, Phạm Hữu Tiến.** Nhiễm trùng Encephalitozoon cuniculi trên thỏ thí nghiệm tại một cơ sở chăn nuôi ở Việt Nam năm 2015. Tạp chí Y học Dự phòng. 2018; 28(1): 68-76.
7. **Edna B. P, Bob M, Jacquelyn B, Arrington L. H. S.** Laboratory Methods in Histotechnology. American Registry of Pathology, 1994; 25-45, 53-58, 221-222.
8. **WHO -** Technical report series No.840 (Annex 3, p.142. 1994).
9. **Csokai J, Gruber A, Künzel F, Tichy A, Joachim A.** Encephalitozoonosis in pet rabbits (*Oryctolagus cuniculus*): pathohistological findings in animals with latent infection versus clinical manifestation, Parasitol Res. 2009; 104:629-635.
10. **Künzel F, Gruber A, Tichy A, Edelhofer R, Nell B, Hassan J, Leschnik M, Thalhammer JG, Joachim A.** Clinical symptoms and diagnosis of Encephalitozoonosis in pet rabbits. Vet. Parasitol, 2008; 151: 115-124.
11. **Fujikawa T, Hovel G. J. R, Hänninen O. K.** World Health Organization. Veterinary Public Health Unit. Guidelines for breeding and care of laboratory animals. World Health Organization, 1993; 169: 65-68.