

**Rui Filipe Galinho Patrício**

**Seroprevalência de *Encephalitozoon cuniculi* em  
coelhos assintomáticos da região de Lisboa**

**Orientador: Doutor Pedro Faísca**

**Co-Orientador: Dr.Filipe Martinho**

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias**

**Faculdade de Medicina Veterinária**

**Lisboa**

**2014**

**Rui Filipe Galinho Patrício**

**Seroprevalência de *Encephalitozoon cuniculi* em  
coelhos assintomáticos da região de Lisboa**

Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de Mestre em  
Medicina Veterinária no curso de Mestrado Integrado em  
Medicina Veterinária conferido pela Universidade Lusófona de  
Humanidades e Tecnologias

Orientador: Doutor Pedro Faísca

Co-Orientador: Dr.Filipe Martinho

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias**

**Faculdade de Medicina Veterinária**

**Lisboa**

**2014**

## **Agradecimentos**

A toda a minha família pelo apoio incondicional e em especial à minha mulher Aline pela paciência.

A todos os meus professores por tudo o que me ensinaram.

A todos os meus alunos pelo que me ensinam e me deixam ensinar.

A todos os animais exóticos por existirem e tornarem esta área tão fascinante.

Aos colegas,

- Dra. Ana Sofia Ribeiro pela ajuda na recolha de material

- Dr. Filipe Martinho pelo companheirismo, partilha de conhecimento e amizade

- Doutor Pedro Faísca pela paciência e inestimável auxílio na elaboração da tese

- Dr. Mauro Bragança pela ajuda na análise estatística

A todos os colegas, amigos e clientes que acreditam no meu trabalho.

## Resumo

O *Encephalitozoon cuniculi* é um fungo unicelular, intracelular obrigatório, pertencente ao Filo Microsporidia, que afeta vários mamíferos, incluindo o homem, no entanto o seu hospedeiro preferencial é o coelho. Vários estudos foram efetuados nos últimos anos, acerca da prevalência da Encephalitozoonose em coelhos assintomáticos, mas não existe no nosso país nenhum estudo semelhante. Dado o aumento de casos detetado pelo autor nos últimos anos, parece-lhe importante avaliar qual o risco potencial de manifestação de sinais clínicos em coelhos assintomáticos na região de Lisboa.

Este trabalho pretende avaliar a situação serológica dos coelhos de estimação e a eventual necessidade de efetuar uma terapêutica preventiva ou controle dos animais reprodutores, de modo a diminuir os riscos de manifestação de sinais clínicos, bem como a disseminação do agente. Para tal foram realizados testes serológicos através de imuno-ensaio de carbono, a cerca de 55 coelhos, sem qualquer sinal de doença, de várias idades e sexos. Destes, cerca de 26 animais foram positivos para *Encephalitozoon cuniculi*, ou seja 42,7%.

Este resultado é convergente com estudos efetuados em outros países, pelo que poderemos afirmar, que na região de Lisboa, a prevalência de *E.cuniculi*, é também elevada e será aconselhável adotar uma terapêutica preventiva em coelhos assintomáticos com a administração de febendazole 20 mg/Kg Sid durante 28 dias, de modo a evitar a manifestação de sinais clínicos.

**Palavras-chave:** *Encephalitozoon cuniculi*, coelho, prevalência, assintomático e terapêutica preventiva

## Abstract

The *Encephalitozoon cuniculi* is a fungus, unicellular, obligate intracellular, belonging to the Phylum Microsporidia, which affect various mammals including man, however its preferred host is the rabbit. Several studies have been made in recent years about the prevalence of asymptomatic encephalitozoonosis in rabbits, but there is no study in our country like this. Given the increase in cases, detected by the author in recent years, it seems important to assess what is the potential risk of clinical signs manifestation in asymptomatic rabbits in Lisbon

This study aims to assess the serological status of pet rabbits and the necessity for making a therapeutic or preventive control of breeding animals in order to reduce the risk of manifestation of clinical signs, as well as the dissemination of the agent. This serological tests were conducted by carbon immunoassay, with about 55 rabbits without any sign of illness , of various ages and sexes. Of these, about 26 animals were positive for *Encephalitozoon cuniculi* (42,7%).

This result is convergent with studies conducted in other countries, so we can say that in the Lisbon region, the prevalence of *E.cuniculi* is high and it will be advisable to adopt a preventive therapy in asymptomatic rabbits with febendazole administration of 20 mg /kg SID for 28 days to prevent the manifestation of clinical signs.

**Key-words:** *Encephalitozoon cuniculi*, rabbit, prevalence, asymptomatic and preventive therapy

## Lista de Abreviaturas

|       |                                                               |
|-------|---------------------------------------------------------------|
| ADN   | Ácido desoxirribonucleico                                     |
| AFT   | “Acid Fast Trichome”                                          |
| ARN   | Ácido ribonucleico                                            |
| BID   | <i>bis in die</i> (duas vezes por dia)                        |
| CIA   | “Carbon Imuno Assay” (imuno ensaio de carbono)                |
| CRP   | “C-reactive protein” (proteína C-reativa)                     |
| ELISA | “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay” (ensaio imuno-enzimático) |
| Fig   | Figura                                                        |
| IFI   | Imunofluorescência indireta                                   |
| IV    | Intravenosa                                                   |
| Mbp   | “Millions base pairs” (milhões de pares de bases)             |
| PBS   | Phosphate Buffered Saline                                     |
| PCR   | “Polymerase Chain Reaction” (reação em cadeia da polimerase)  |
| PO    | <i>per os</i> (por via oral)                                  |
| SID   | <i>semel in die</i> (uma vez por dia)                         |
| TID   | <i>ter in die</i> (três vezes por dia)                        |
| VIH   | Vírus da Imunodeficiência Humana                              |

## Índice

|                                           |    |
|-------------------------------------------|----|
| <b>1-Introdução</b>                       | 10 |
| 1.1-Microsporidiose                       | 10 |
| 1.2- <i>Encephalitozoon cuniculi</i>      | 12 |
| 1.2.1-Epidemiologia e hospedeiros         | 12 |
| 1.2.3-Patologia e patofisiologia          | 13 |
| 1.3-Sinais Clínicos                       | 16 |
| 1.3.1-Manifestações neurológicas          | 18 |
| 1.3.2-Manifestações oculares              | 19 |
| 1.3.3-Manifestações renais                | 20 |
| 1.3.4-Diagnósticos diferenciais           | 21 |
| 1.4-Diagnóstico                           | 23 |
| 1.4.1-Ante-mortem                         | 24 |
| 1.4.1.1-Microscopia                       | 24 |
| 1.4.1.2-Serologia                         | 25 |
| 1.4.1.3-Proteinograma                     | 28 |
| 1.4.1.4-“Polimerase Chain Reaction” (PCR) | 29 |
| 1.4.1.5- Outros meios de diagnóstico      | 30 |
| 1.4.2-Post-mortem                         | 31 |
| 1.4.2.1-Histopatologia                    | 31 |
| 1.4.2.1.1-Lesões Renais                   | 32 |
| 1.4.2.1.2-Lesões Cerebrais                | 33 |
| 1.4.2.1.3-Lesões noutros órgãos           | 33 |
| 1.4.2.2-Imunocitoquímica                  | 33 |
| 1.4.2.3-PCR em tempo real                 | 33 |
| 1.5-Tratamento                            | 34 |
| 1.5.1-Tratamento etiológico               | 34 |
| 1.5.2- Tratamento sintomático             | 35 |
| 1.6-Prevenção                             | 36 |
| 1.7-Potencial zoonótico                   | 37 |
| 1.8-Objectivos do estudo                  | 38 |
| <b>2-Materiais e Métodos</b>              | 38 |
| 2.1-Local de colheita                     | 38 |

|                                              |    |
|----------------------------------------------|----|
| 2.2-Critério de escolha da população         | 38 |
| 2.3-Colheita da amostra                      | 39 |
| 2.4-Tamanho da amostra                       | 39 |
| 2.5-Recolha de dados                         | 39 |
| 2.6-Desenho de estudo                        | 39 |
| 2.6-Imuno-ensaio de carbono (CIA)            | 40 |
| 2.8-Análise estatística                      | 41 |
| <b>3-Resultados</b>                          | 41 |
| 3.1- Amostra                                 | 41 |
| 3.2- Determinantes e relação com a doença    | 45 |
| 3.2.1-Determinantes intrínsecos              | 45 |
| 3.2.1.1-Sexo                                 | 45 |
| 3.2.1.2-Raça                                 | 45 |
| 3.2.1.3-Idade                                | 45 |
| 3.2.2- Determinantes extrínsecos             | 46 |
| 3.2.2.1- Proveniência                        | 47 |
| 3.2.2.2- Número de coelhos com que co-habita | 47 |
| <b>4-Discussão</b>                           | 48 |
| <b>5-Conclusão</b>                           | 50 |
| <b>6-Referências bibliográficas</b>          | 52 |

## Índice de Tabelas

|                                                                                                                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 - Interpretação de testes ELISA IgG (Adaptado de Keeble,2011)                                                                                          | 28 |
| Tabela 2 - Título de anticorpos determinados por ELISA em diferentes grupos clínicos (Adaptado de Rich,2010)                                                    | 28 |
| Tabela 3 - Variação do proteinograma de acordo com o grupo clínico (Adaptado de Rich, 2010)                                                                     | 29 |
| Tabela 4 - Meios de diagnóstico Ante-mortem de acordo com a manifestação clínica (Adaptado de Keeble,2011)                                                      | 31 |
| Tabela 5 – Distribuição dos animais positivos e negativos ao <i>E.cuniculi</i> de acordo com a raça                                                             | 45 |
| Tabela 6 - Distribuição dos animais positivos e negativos ao <i>E.cuniculi</i> de acordo com a proveniência                                                     | 47 |
| Tabela 7 - Distribuição dos animais positivos e negativos ao <i>E.cuniculi</i> de acordo com o número de outros coelhos com que habita                          | 47 |
| Tabela 8 - Distribuição dos animais positivos e negativos ao <i>E.cuniculi</i> que vivem sozinhos e acompanhados                                                | 48 |
| Tabela 9 - Prevalência de <i>E.cuniculi</i> em coelhos assintomáticos determinada por serologia, em diversos países (Adaptado de Kunzel <i>et</i> Joachim,2010) | 50 |

## Índice de Figuras

|                                                                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 - Esquema do esporo de um microsporidio (Adaptado de Franzen, 2005)                                      | 11 |
| Figura 2 - Ciclo simplificado do <i>Encephalitozoon sp.</i> (Retirado de Wasson and Peper,2000)                   | 15 |
| Figura 3 - Ciclo de infecção do <i>E.cuniculi</i> (Adaptado de Keeble, 2011)                                      | 17 |
| Figura 4 - Uveíte facoclástica (Foto do autor)                                                                    | 20 |
| Figura 5 - Catarata (Foto do autor)                                                                               | 20 |
| Figura 6 - <i>Encephalitozoon cuniculi</i> em raspagem de conjuntiva (Retirado de Franzen <i>et</i> Müller, 1999) | 25 |
| Figura 7 - Lesões renais num coelho com <i>E.cuniculi</i> (Retirado de Valenkova, 2008)                           | 32 |

|                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 8 – Imagem microscópica (400x) de uma amostra positiva no teste CIA                               | 40 |
| Figura 9 - Caraterização da amostra de acordo com a proveniência                                         | 41 |
| Figura 10 - Caraterização da amostra de acordo com o sexo                                                | 42 |
| Figura 11 - Caraterização da amostra de acordo com a raça                                                | 42 |
| Figura 12 - Caraterização da amostra de acordo com o resultadado do CIA<br>para <i>Encephalitozoon</i>   | 43 |
| Figura 13 - Comparação dos animais positivos e negativos de acordo com o<br>sexo                         | 43 |
| Figura 14 - Comparação dos animais positivos e negativos de acordo com a<br>raça                         | 43 |
| Figura 15 - Comparação dos animais positivos e negativos de acordo com a<br>proveniência                 | 43 |
| Figura 16 – Histograma dos animais positivos e negativos de acordo com<br>a idade                        | 44 |
| Figura 17 – Distribuição dos animais positivos e negativos ao <i>E.cuniculi</i><br>de acordo com a idade | 46 |

## 1-Introdução

### 1.1-Microsporidiose

Embora os microsporídeos sejam organismos eucariotas, apresentam algumas características atípicas, como a ausência de alguns organelos como as mitocôndrias (Harcourt-Brown, 2002). Apesar de não possuírem mitocôndrias, foram detetadas enzimas com funções mitocondriais (Katinka *et al.*, 2001) e o aparelho de Golgi é atípico, o ARN ribossomal é mais parecido com os procariotas do que com os eucariotas (Kunzel *et Joachim*, 2010). Embora classificados como protozoários (Wasson *et Peper*, 2000; Didier *et al.*, 2004) em alguns artigos, tendo por base análises bioquímicas e moleculares, pensa-se atualmente, que evoluíram dos fungos (Mathis *et al.*, 2000; Didier *et al.*, 2000), de um ancestral dos zigomicetos (Lee *et al.*, 2008). Os microsporídeos são caracterizados por apresentarem pequenos esporos com uma cápsula em um dos polos (Harcourt-Brown *et Holloway*, 2003).

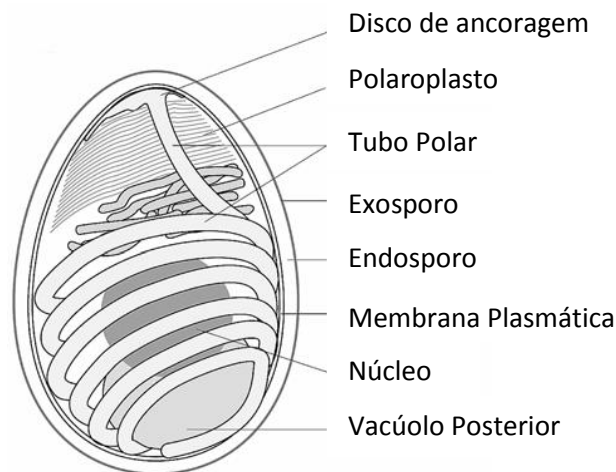
A microsporidiose é uma infecção por protistas unicelulares, eucariotas, do Filo Microsporidia, que comporta cerca de 1200 espécies (Didier *et Weiss*, 2008). Todos os microsporídeos são parasitas intracelulares obrigatórios, embora existam diferenças em termos de patogenia. O seu nome provém do esporo, pequeno e resistente característico deste grupo (Cali *et al*, 2011). Ao contrário dos esporos das bactérias, que são criados como resposta a condições ambientais adversas, os esporos dos microsporídeos desenvolveram-se como a forma madura e infetante do seu ciclo de vida. Estes esporos são resistentes e sobrevivem por longos períodos de tempo no ambiente (Didier *et Weiss*, 2008).

Estes esporos unicelulares (Fig.1), são a fase ambiental infetante para as células, através de um aparato único que compreende um tubo polar que descarrega o esporoplasma na célula hospedeira (Franzen, 2005). Após multiplicação assexuada (merogonia), os esporos desenvolvem-se na célula hospedeira (esporogonia), e no caso do *Encephalitozoon*, dentro de um vacúolo que separa o parasita do citoplasma da célula hospedeira (Franzen, 2005). Quando a célula é destruída os esporos são libertados para o ambiente. Estes esporos, com 1-10 µm, consistem num tubo polar enrolado ao redor do esporoblasto que contém o núcleo, o vacúolo posterior e os ribossomas, rodeado pela membrana plasmática.

Outra característica única dos microsporídeos é o seu genoma extremamente pequeno, cerca de 2,9 Mbp, para o *E.cuniculi* (Katinka *et al*, 2001). O genoma foi reduzido consideravelmente como resultado da compactação da informação genética, encurtamento dos

genes que codificam proteínas e perda de genes envolvidos em circuitos metabólicos, que não se apresentavam relevantes para um estilo de vida parasitária (Katinka *et al.*, 2001).

Os microsporídeos são ubiqüitários em animais (inicialmente insetos, peixes e mamíferos) de regiões temperadas e tropicais, e emergiram como agentes patogénicos oportunistas quando a infeção pelo vírus da imunodeficiência humana se tornou pandémica (Cali *et al.*, 2011). Antes do aparecimento do VIH apenas oito casos estavam descritos em humanos (Weber *et al.*, 1994). O agente mais comum a infetar humanos é o *E.bieneusi* e o *E.intestinalis*, embora também já tenham sido isolados o *E.cuniculi* e o *E.hellem* (Mathis *et al.*, 2005).



**Figura 1-** Esquema do esporo de um microsporidio (Adaptado de Franzen, 2005)

No Homem, os microsporídeos causam infeções localizadas (olho, sistemas respiratório e urinário, fígado, cérebro e peritoneu) ou sistémicas. As espécies de Microsporidia que afetam seres humanos já foram identificadas em animais, o que leva a que sejam considerados um problema de saúde pública pelo seu potencial zoonótico (Wasson *et al.*, 2000; Chan *et al.*, 2003; Didier *et al.*, 2004; Mathis *et al.*, 2005).

## **1.2-*Encephalitozoon cuniculi***

O *E.cuniculi* foi descrito pela primeira vez em coelhos de laboratório com paralisia por Wright e Craighead (1922) e o seu nome foi atribuído por Levaditi *et al.* (1923). Foi classificado no Filo Microsporidia em 1964 como sinónimo do género *Nosema*. Em 1971 foi reclassificado como pertencente ao Género Microsporídia e descrito em coelhos, murganhos e hamsters. O critério definitivo para o incluir no Filo Microsporidia é a presença de um organelo conhecido como filamento polar, que se encontra enrolado dentro do esporo (Wasson *et al.*, 2000). Já foi descrito em cerca de 30 mamíferos diferentes, incluindo humanos, nestes pela primeira vez em 1987 (Terada *et al.*, 1987). O *E.cuniculi* é provavelmente o microsporídeo mais estudado (Cali *et al.*, 2011) e representa uma das mais pequenas espécies conhecidas até à data, com esporos variando entre os 1 µm e os 2,5 µm de diâmetro (Franzen *et al.*, 1999).

### **1.2.1- Epidemiologia e hospedeiros**

O hospedeiro principal do *E.cuniculi* é o coelho e a taxa de seroprevalência em populações de coelhos de estimação é elevada 37%-68% (Harcourt-brown *et al.*, 2003). A prevalência é menor em populações selvagens, enquanto, em colónias para experimentação parece ser mais elevada (Mathis *et al.*, 2005; Kunzel *et al.*, 2008).

Foram identificadas 3 estirpes de *Encephalitozoon cuniculi* (Didier *et al.*, 1995), a estirpe I associada a coelhos, a estirpe II a roedores e a estirpe III a cães. Esta última foi também isolada de pacientes humanos imunocomprometidos, o que leva a pensar no potencial zoonótico desta estirpe (Snowden, 1999). Não existe diferença morfológica entre as estirpes, sendo apenas diferenciadas pelo seu ADN, e não se sabe se são espécie específicas ou se conseguem passar livremente entre os diferentes hospedeiros.

Existem relatos esporádicos de *Encephalitozoon* a provocar doença em várias espécies, nomeadamente cavalos, cães, hamsters, porcos, ovelhas, gatos, ratos e macacos (Valencakova, 2008). A miocardite, encefalite, placentite e aborto são lesões associadas ao *E.cuniculi* nestas espécies (Paterson-Kane *et al.*, 2003; Snowden *et al.*, 2009). O *E.cuniculi* é a causa de catarata cortical anterior focal e uveíte anterior em gatos (Benz *et al.*, 2011). Em porcos da Índia, foi descrito encefalite e nefrite (Illanes *et al.*, 1993; Gannon, 1980) e está associado com a síndrome de “morte neonatal súbita” (Snowden *et al.*, 2009). O organismo

foi isolado de pombos, caturras e galinhas (Kasicková *et al.*, 2007; Bart *et al.*, 2008) e foram detetados anticorpos em vacas e cabras (Cisláková *et al.*, 2001). Os esporos de *E.cuniculi* foram detetados em fezes e urina de coatis selvagens (Lallo *et al.*, 2012).

Alguns microsporídeos, incluindo o *E.cuniculi*, têm o potencial de provocar doença em humanos (Deplazes *et al.*, 1996). Em humanos provoca diarreias, rinosinusites, queratoconjuntivites, nefrites e hepatites, mas apenas foram descritos casos esporádicos em pessoas imunodeprimidas. Não foi ainda demonstrada uma ligação direta entre os coelhos de estimação e os casos encontrados em humanos pelo que o risco de contágio entre as pessoas e o seu coelho de estimação é negligenciável. Não foi ainda descrito nenhum caso de Encephalitozoonose em pessoas não imunodeprimidas, pelo que, apesar de ser considerada uma zoonose o risco de contágio é mínimo (Harcourt-Brown, 2010).

Existem várias espécies de *Encephalitozoon* onde se incluem o *E.cuniculi*, o *E. intestinalis*, o *E. hellem*, o *E. bieneusi* e o *E.septata*, a maioria dos quais podem ser agentes oportunistas em pessoas imunodeprimidas.

A distribuição do *Encephalitozoon* é mundial, com relatos da doença nos EUA, Reino Unido, América do Sul, Itália, Espanha, Israel, Turquia, Austrália, Eslováquia, Áustria e Alemanha (Harcourt-Brown, 2010).

### **1.2.2-Patologia e patofisiologia**

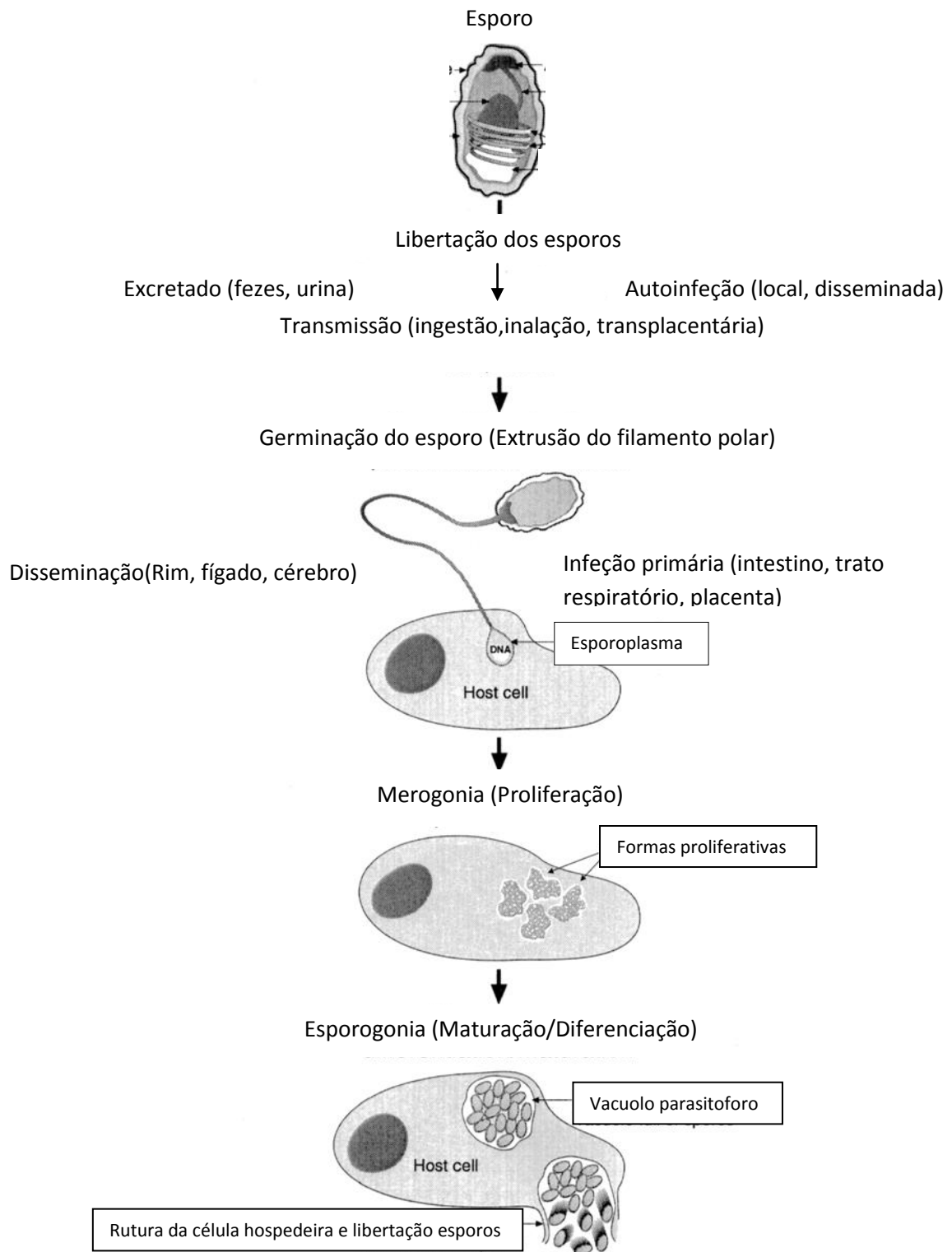
O ciclo de vida (Fig.2) inclui um estágio proliferativo de merogonia (divisão celular), seguido da esporogonia, na qual ocorre a diferenciação e maturação (Didier, 2005).

Os esporos do *E.cuniculi* são ovais e medem cerca de 2,5x1,5 µm. Dentro do esporo existe um filamento polar que pode ser libertado e ancorado a uma célula vizinha. Após a penetração da parede celular, o esporoplasma e o núcleo do esporo são transferidos através do tubo polar para um vacúolo que se forma na célula hospedeira. No interior da célula hospedeira, a extremidade do tubo polar envolve o esporoplasma de modo a formar a membrana externa do parasita (Jordan *et al.*, 2006a). Esta é a 1ª fase do ciclo de vida (Schottelius *et al.*, 2000). Na 2ª fase, o esporoplasma divide-se na célula hospedeira para formar merontes, que podem sofrer várias divisões antes de se converterem em esporontes, que são estruturas encadeadas (Jordan *et al.*, 2006a). Na 3ª fase os esporontes subdividem-se em esporoblastos que se transformam em esporos. Esta multiplicação ocorre no vacúolo até estar tão distendido que rebenta e liberta os esporos. Quando a célula hospedeira está repleta

de esporos maduros, rutura-se e estes são libertados (Didier *et al.*, 2004; Jordan *et al.*, 2006a), podendo invadir as células vizinhas. Se as células dos túbulos renais são as células hospedeiras, então os esporos serão libertados na urina.

A infeção dos coelhos por *Encephalitozoon cuniculi* pode ser vertical ou horizontal (Fig.3). A transmissão vertical foi confirmada através da demonstração de ADN de *E. cuniculi* em placentas e fetos de coelhas (Baneux *et Pognan*, 2003). A transmissão horizontal pode ser provocada pela ingestão de alimentos contaminados com urina ou inalação de esporos. O maior período de contaminação ocorre entre a coelha e as crias entre a quarta e a sexta semana de vida. As crias seroconvertem durante a 7<sup>o</sup> e a 9<sup>o</sup> semana de vida (Harkness *et Wagner*, 1995). Os esporos podem sobreviver longos períodos no meio ambiente, cerca de quatro semanas a 22°C, em ambiente seco (Harcourt-Brown *et Holloway*, 2003; Keeble, 2006; Nast, 1996; Waller, 1979), e, locais com muitos coelhos, como centros de reprodução ou lojas, podem armazenar esporos, embora os desinfetantes mais comuns sejam efetivos a eliminá-los.

Após ingestão, os esporos invadem o epitélio intestinal e o tecido linfoide associado, antes de se disseminarem na corrente sanguínea, quer como esporos livres, quer em monócitos.



**Figura 2-** Ciclo simplificado do *Encephalitozoon* sp. (Adaptado de Wasson et Peper, 2000)

infetados, até atingirem outros órgão como os rins, cérebro, fígado e coração, sendo os rins e o cérebro os órgãos mais afetados (Harkness *et al.*, 1995; Harcourt-Brown, 2010).

Durante a transmissão intrauterina os esporos de *E.cuniculi* podem atingir a cápsula anterior do cristalino (Wolfer *et al.*, 1993).

Foi demonstrado experimentalmente que a infecção por *E.cuniculi* em coelhos pode ser transmitida por diversas vias (oral, intravenosa, intratraqueal e retal). Os anticorpos desenvolvem-se 21 dias após a infecção e os esporos são excretados na urina, de forma intermitente, durante aproximadamente 63 dias. As infecções iniciais (30 dias pós-infecção) localizam-se no pulmão, rim, e fígado e as infecções tardias (98 dias pós-infecção) localizam-se no coração, cérebro e rim.

Nos coelhos, os anticorpos maternos anti-*E. cuniculi* passam para a descendência e persistem até às quatro semanas de idade (Harkness *et al.*, 1995). Das quatro às oito semanas de idade os coelhos são seronegativos (Dipineto *et al.*, 2008; Santaniello *et al.*, 2009) e, às dez semanas, inicia-se a produção de anticorpos nos coelhos infetados *in utero* (Harcourt-Brown *et al.*, 2003).

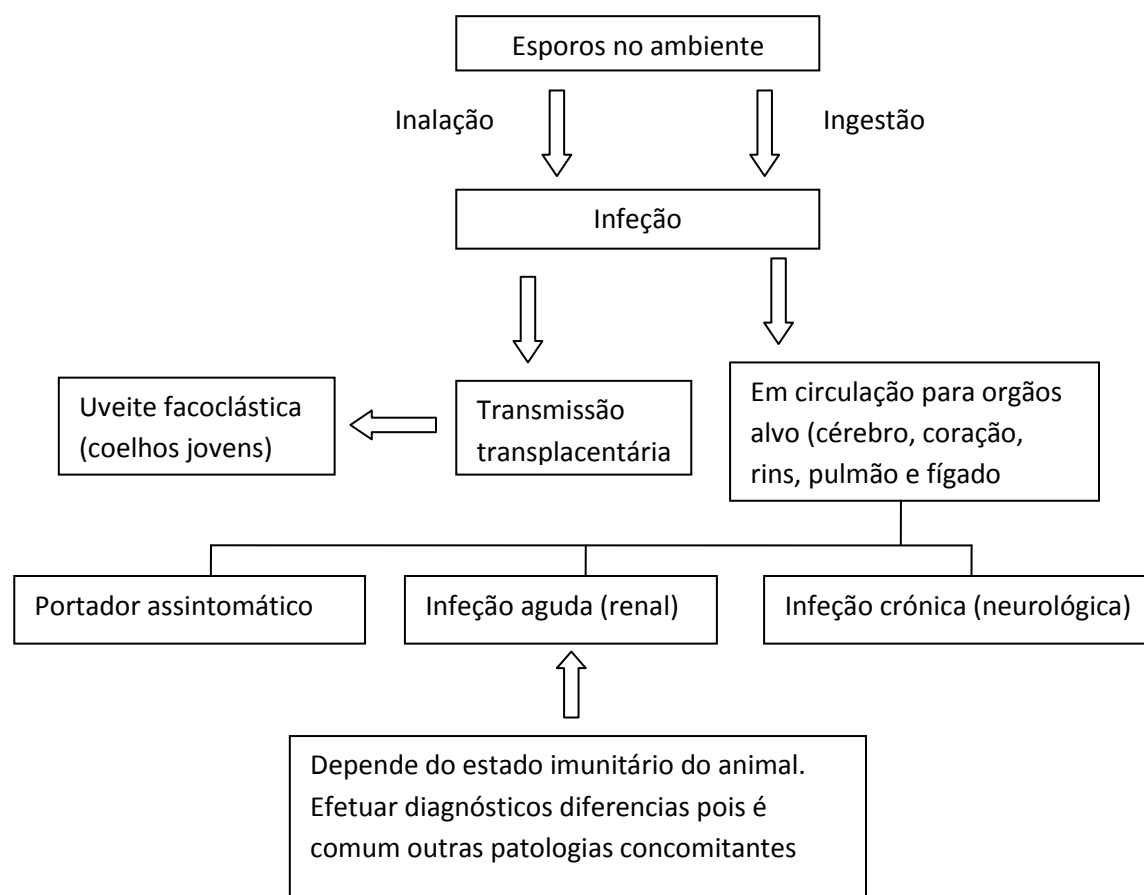
O *Encephalitozoon cuniculi* é o único microsporídeo conhecido capaz de provocar doença espontânea em coelhos (Wasson *et al.*, 2000). Não estão descritas infecções experimentais em coelhos por *E.intestinalis*, *E.hellem* e *E.bieneusi*.

Muitos fatores estão envolvidos no aparecimento dos sinais clínicos, como o estado imunitário do coelho, via de infecção e a quantidade de esporos infetantes. Todos estes fatores contribuem para o fato de nem todos os coelhos infetados apresentarem sintomas. Portadores e animais assintomáticos são extremamente comuns (Keeble, 2006).

### **1.3-Sinais Clínicos**

A infecção de coelhos com *E.cuniculi* pode realizar-se através de ingestão ou inalação de esporos bem como por via transplacentária (Fig.3). Na fase aguda da infecção, que dura cerca de 30 dias, o organismo replica-se nos pulmões, fígado e rins (Wasson *et al.*, 2000). Esta fase é normalmente assintomática e as lesões limitadas (Harcourt-Brown, 2004). Na fase crónica (noventa dias pós infecção) o parasita localiza-se no cérebro, rins e olho (Jordan *et al.*, 2006a). A maioria das infecções nos coelhos, pelo menos inicialmente, é inaparente.

Quando ocorre doença, os sinais neurológicos, renais e oculares são os mais comuns, podendo aparecer em conjunto ou separadamente (Kunzel *et al.*, 2009).



**Figura 3** – Ciclo de infecção do *E.cuniculi* (Adaptado de Keeble, 2011)

Os sinais clínicos podem ser tão subtis que apenas proprietários atentos os conseguem detetar, ou então tão severos que provocam morte súbita, com história de convulsões ou lesões no miocárdio (Harcourt-Brown, 2004). A Encephalitozoonose pode persistir sem sinais clínicos durante anos, com manifestações clínicas severas esporádicas, e aparentemente não relacionadas com predisposição sexual ou etária dos animais afetados. No entanto, surtos da doença provocando cerca de 15% de morbilidade foram descritos em animais jovens (Suter *et al.*, 2001).

Num estudo efetuado por Kunzel *et al.* (2008), o prognóstico em coelhos seropositivos com suspeita clínica de Encephalitozoonose varia de acordo com a sintomatologia apresentada. Os que apresentaram uma uveíte facoclástica sem outros sinais sobreviveram todos durante o estudo, de entre os que tinham sintomatologia neurológica, cerca de 54,2% (45/83) recuperaram em alguns dias e os que manifestaram sinais de insuficiência renal, morreram ou tiveram de ser eutanasiados.

### 1.3.1-Manifestações neurológicas

As manifestações neurológicas são comuns e podem surgir em coelhos de qualquer idade (Harcourt-Brown, 2004). De acordo com um estudo recente os sinais neurológicos são a forma de apresentação clínica mais frequente de Encephalitozoonose em coelhos de estimação (Kunzel *et al*, 2008). De início normalmente súbito, e após um evento stressante, a síndrome vestibular é o sinal clínico de mais fácil percepção para o proprietário (Harcourt-Brown *et al*, 2003), podendo variar em gravidade, desde uma ligeira lateralização da cabeça até à incapacidade total de se colocar de pé. A síndrome vestibular normalmente é atribuída à rutura aguda das células e inflamação (Feaga, 1997). O grau de lateralização da cabeça é importante no prognóstico dos coelhos com síndrome vestibular, pois um período de imobilização após um episódio agudo pode limitar a recuperação da disfunção vestibular (Thomas, 2000).

Outros sinais neurológicos comuns são, a fraqueza e a paresia dos membros posteriores (Okewole, 2008; Csokai *et al.*, 2009), com perda de reflexos posturais e com reflexos espinais lentos (Harcourt-Brown, 2004; Jordan *et al.*, 2006a). A ataxia, com ou sem atonia da bexiga, e incontinência urinária são sinais que podem também estar relacionados com *E.cuniculi* (Paul-Murphy, 1997). Surdez e alterações de comportamento foram também detetados em animais seropositivos (Harcourt-Brown, 2002).

O exame neurológico do coelho não é fácil e o diagnóstico definitivo é muitas vezes impossível, mesmo *post-mortem*, pelo que, em muitos casos é difícil distinguir entre uma síndrome vestibular periférica ou central apenas através do exame neurológico. Sinais clínicos mais severos como ataxia, nistagmos, convulsões e mesmo morte súbita são normalmente atribuídos ao *Encephalitozoon*, no entanto as convulsões podem também resultar de alterações na circulação, por mineralização da artéria aorta, devido a insuficiência renal crónica (Harcourt-Brown, 2004). Num estudo recente acerca de alterações histopatológicas no cérebro de 118 coelhos com sinais neurológicos, verificou-se que, além de o *E.cuniculi* estar presente em muitos casos, outros problemas, poderiam provocar os sinais neurológicos, como linfoma, otite média, aspergilose, encefalopatia hepática, hipocalcemia, hipoglicemia, doença cardíaca e alterações estruturais do cérebro (Gruber *et al.*, 2009).

Apesar de a síndrome vestibular ser a manifestação clínica mais comum de Encephalitozoonose, um estudo em 71 coelhos demonstrou que os esporos e as lesões inflamatórias são encontradas mais frequentemente no cérebro do que no sistema vestibular

(Csokai *et al.*, 2009). A severidade das lesões cerebrais não apresenta correlação com a severidade dos sinais clínicos. Muitos coelhos podem ter um estado mental alterado, apresentando apenas inatividade e falta de reação, o que pode ser entendido como apenas um coelho muito manso (Harcourt-Brown, 2010). No entanto, e apesar do tratamento para *E.cuniculi* poder resultar numa recuperação temporária ou permanente, os estudos histopatológicos raramente confirmam esta relação (Harcourt-Brown, 2010). O estado geral e o apetite, mesmo em animais com síndrome vestibular grave, não se apresentam alterados (Kunzel, 2010).

### 1.3.2-Manifestações oculares

As cataratas (Fig. 4), o hipópion ou uveíte podem ser causadas por *Encephalitozoon cuniculi* e os coelhos com estes sinais são invariavelmente seropositivos (Felche *et al.*, 2002; Donnelly, 2003; Giordano, 2005). A causa mais frequente de rutura do cristalino em coelhos é o *E.cuniculi* (Sandmeyer, 2011), e a uveíte facoclástica é a segunda manifestação mais comum de *E.cuniculi* (Kunzel, 2008). A uveíte facoclástica está descrita em vários animais domésticos, mas o coelho é único em relação ao facto de que a rutura da cápsula se induz sem trauma anterior (Wolfer *et al.*, 1993). A maioria dos coelhos que apresentam uveíte facoclástica são animais jovens, com uma média de idade de 2 anos (Kunzel *et al.*, 2008).

As manifestações oculares de Encephalitozoonose são frequentes quando ocorre transmissão transplacentária (Jordan *et al.*, 2006a; Wagner *et al.*, 2007). Estas alterações devem-se a uma rutura da lente. A cápsula anterior do cristalino rutura espontaneamente e provoca uma uveíte granulomatosa zonal com inflamação próxima ao ponto de descontinuidade (Jordan *et al.*, 2006a; Harcourt-Brown, 2004). Pensa-se que os esporos infetam o cristalino durante o desenvolvimento *in utero*, enquanto a sua cápsula é fina ou ausente (Harcourt-Brown, 2004; Giordano *et al.*, 2005). Mais tarde, o parasita causa a rutura do cristalino na porção anterior mais fina, libertando o material na câmara anterior e provocando uma uveíte facoclástica (Fig.5), normalmente unilateral.



**Figura 4** – Catarata (Foto do autor)



**Figura 5** – Granuloma ocular (Foto do autor)

### **1.3.3-Manifestações renais**

Os sinais clínicos de insuficiência renal crónica são inespecíficos (Künzel *et al.*, 2008). A perda de peso, letargia, anorexia, poliúria, polidipsia e incontinência urinária podem estar relacionados com insuficiência renal, mas também com outras patologias (Harcourt-Brown, 2004; Kunzel *et al.*, 2008). As dermatites na região perineal são frequentes, devido á perda de urina, enquanto, o aumento de ureia e creatinina apenas surge em fases avançadas de doença renal. Nos coelhos, a hipercalcemia está normalmente presente em animais com doença renal e pode estar associada a calcificação de tecidos moles e osteoesclerose, especialmente se associado a hiperfosfatémia. A nefrolitíase é frequente e os coelhos afetados são quase todos seropositivos para *E.cuniculi* (Harcourt-Brown, 2007), embora os esporos raramente sejam encontrados. Tal facto, deve-se talvez por os sinais clínicos advirem de

lesões tecidulares crônicas, mais do que de inflamações agudas. Os esporos de *E.cuniculi* podem ser detetados no tecido renal cerca de 4 semanas após a seroconversão (Cox *et al.*, 1978).

A patologia renal é típica das infecções por *Encephalitozoon* e o aspeto cicatricial da superfície dos rins é um achado *post-mortem* comum, mesmo em animais que morreram sem qualquer sinal de insuficiência renal ou Encephalitozoonose. Casos de insuficiência renal aguda devido a *E.cuniculi* são raros, não estão descritos na literatura, mas já foram encontrados por Harcourt-Brown (2010).

Para alguns autores é mesmo a causa mais frequente de insuficiência renal em coelhos (Reusch, 2006; Melillo, 2007), embora a maioria dos casos de nefrite intersticial crônica devido ao *E.cuniculi* sejam subclínicos (Künzel *et al.*, 2008).

#### 1.3.4-Diagnosticos diferenciais

Em todos estes casos deve ser efetuado um exame neurológico completo, que deve incluir avaliação dos nervos craniais, reação postural e reflexos medulares. Um exame completo é difícil em coelhos e é necessário uma interpretação cuidadosa, pois os coelhos são espécies-presa e têm tendência a reagir de forma diferente da dos cães numa situação de stress, ficando parados (Keeble, 2006).

Além do *E.cuniculi*, a otite média/interna representa o principal diagnóstico diferencial para os distúrbios vestibulares. Em muitos casos a *Pasteurella multocida* pode ser isolada do empiema da bula timpânica de coelhos afetados e normalmente é bilateral (Kunstýr, 1985). No entanto os animais com síndrome vestibular provocada por otite média/interna apresentam sinais de infeção do trato respiratório superior (espirros, corrimento nasal) e ocasionalmente pneumonia (Künzel *et al.*, 2008).

Outros diagnósticos diferenciais num coelho com sinais neurológicos como síndrome vestibular inclui: meningoencefalite provocada por *Pasteurella multocida*, *Toxoplasma gondii* ou listeriose (Wasson *et al.*, 2000; Csokai *et al.*, 2009). Infecções virais (herpes simplex 1), doenças vasculares, doenças degenerativas ou neoplasias são menos comuns mas também estão descritas (Künzel, 2008). Nos EUA, espécies de *Baliscaris* (Harkness *et al.*, 1995; Harcourt-Brown, 2004) são uma causa conhecida de nematodíase cerebrosplinal que pode provocar os mesmos sinais que o *Encephalitozoon*.

A otite média/interna, causada principalmente por *Pasteurella multocida*, por via ascendente da cavidade nasal através das trompas de Eustáquio, continua a ser o principal diagnóstico diferencial em coelhos domésticos (Harcourt-Brown, 2002). A primeira causa síndrome vestibular periférica e a segunda síndrome vestibular central, apesar de a infecção por *P. multocida* poder causar uma síndrome vestibular central se existirem abscessos ao longo do trato vestibular (Harcourt-Brown, 2004; Jordan *et al.*, 2006a). Em colônias intensivas de coelhos a pasteurelose é mais comum do que o *E. cuniculi*, ao contrário do que acontece com os coelhos de estimação onde este último é mais frequente (Harcourt-Brown, 2004). O diagnóstico definitivo é difícil, pois é possível haver infecção simultânea com *Pasteurella* e *Encephalitozoon*. A hematologia, a serologia e a imagiologia das bulas timpânicas podem ajudar no diagnóstico. A hematologia pode ser útil na diferenciação uma vez que, em infecções por *E. cuniculi* normalmente não se observam alterações e nas por *P. multocida* existe neutrofilia com desvio à esquerda (Harcourt-Brown, 2004; Jordan *et al.*, 2006a). Na imagiologia (TAC ou RM) das bolhas timpânicas podem observar-se alterações em otites médias crônicas causadas por *P. multocida* (Harcourt-Brown, 2004).

A toxoplasmose é uma causa pouco comum de doença neurológica em coelhos e as infecções são normalmente subclínicas. Contrastando com a Encephalitozoonose, os coelhos com toxoplasmose apresentam sinais inespecíficos como letargia, inapetência e febre. O *Toxoplasma gondii* pode provocar meningoencefalites granulomatosas semelhantes, mas pode ser diferenciado através de testes serológicos, morfologia dos tecidos e imunohistoquímica (Dubey *et al.*, 1992). O *Toxoplasma gondii* deve ser no entanto considerado como diagnóstico diferencial em problemas neurológicos e oculares em coelhos (Jeklova *et al.*, 2010).

No caso de paresia ou paralisia, o trauma medular, como resultado de luxações ou fraturas, hérnias discais, anomalias congénitas (“splay leg”), espondilose, osteoartrite ou intoxicações (chumbo) deve ser considerado como diagnóstico diferencial (Keeble, 2006). A ataxia também pode ser uma manifestação de doença cardíaca, hepática ou renal (Harcourt-Brown, 2004). As lesões neoplásicas, mais frequentemente o linfoma, também podem envolver o sistema nervoso central (Gruber *et al.*, 2009).

O mais importante diagnóstico diferencial no caso de uveíte facoclástica é uma uveíte bacteriana, provocada por *P. multocida* (Williams, 1999), podendo também ser provocada por queratites severas ou trauma (Harcourt-Brown, 2002).

No caso de incontinência urinária também existem vários diagnósticos diferenciais como infecção urinária, sedimento na urina, urolitíase, problemas medulares, obesidade ou artrite (Harcourt-Brown, 2010).

#### **1.4-Diagnóstico**

Nos anos mais recentes, vários estudos acerca do *E.cuniculi* em coelhos de estimação foram publicados e da utilidade de testes diagnósticos como PCR, exame de LCR e urina, títulos serológicos, proteinogramas e colorações específicas de tecidos *post-mortem* (Harcourt-Brown, 2010). O *Encephalitozoon* causa vários tipos de manifestações clínicas nos coelhos de estimação e os portadores subclínicos são a fonte principal de exposição à doença em grupos de coelhos domésticos, lojas de animais e criadores. Os coelhos jovens podem ser infectados por um progenitor doente nos primeiros dias de vida e as infecções naturais resultam em seroconversão às 8-10 semanas de idade (Rich, 2010).

Vários estudos demonstraram que os coelhos desenvolvem anticorpos circulantes 2 a 3 semanas após a infecção oral, nasal ou intratraqueal (Cox *et al.*, 1978) (Lyngset, 1980), com um pico perto das 9 semanas (Jordan *et al.*, 2006a), e cerca de 4 semanas antes de serem visíveis alterações histopatológicas nos rins ou da excreção de esporos na urina. As alterações histopatológicas no cérebro são detetáveis mais tarde, cerca de 8 semanas após a detecção dos anticorpos no sangue (Paul-Murphy *et al.*, 2003) (Rich, 2010).

O título de anticorpos aumenta nas semanas seguintes e pode manter-se durante cerca de 400 dias após a infecção (Waller *et al.*, 1978). À medida que a infecção se torna crónica o título de anticorpos baixa e as alterações histopatológicas tornam-se mais evidentes (Csokai *et al.*, 2008).

O diagnóstico definitivo do *Encephalitozoon* é difícil. Análises sanguíneas, radiologia, ressonância magnética e TAC podem ser úteis para excluir ou confirmar outras patologias ou para demonstrar exposição ao *E.cuniculi*, mas sem nunca dar um diagnóstico definitivo. Este só pode ser efetuado através da demonstração da presença do organismo e da relação com a manifestação da doença (Harcourt-Brown, 2010).

#### 1.4.1-Ante-mortem

Um diagnóstico definitivo *ante-mortem* é normalmente impossível (Harcourt-Brown, 2004). O *E.cuniculi* foi detetado em coelhos vivos, na urina, lágrimas e no cristalino removido durante facoemulsificação (Giordano, 2005), mas apenas em alguns casos. Não existe nenhum “gold standart” para o diagnóstico *ante mortem* (Cray *et al.*, 2009).

##### 1.4.1.1-Microscopia

Os esporos são a única fase da vida do *Encephalitozoon* facilmente reconhecível, que pode sobreviver fora do hospedeiro e na qual pode ser identificada a espécie (Keeling *et al.*, 2002).

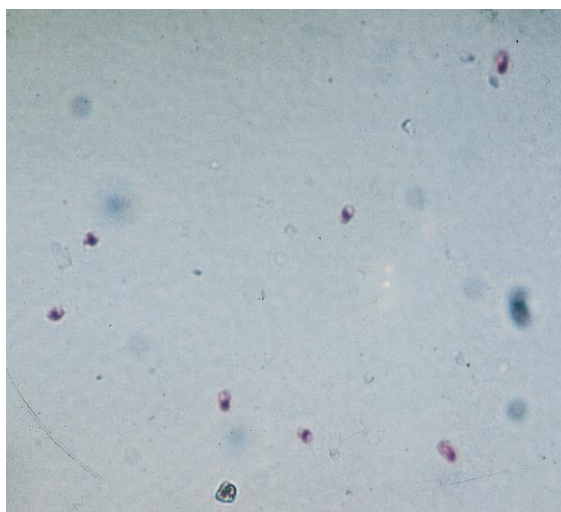
A visualização, através de microscopia electrónica, da ultraestrutura do esporo com o seu tubo polar enrolado, é diagnóstica. Em amostras de urina, é possível identificar o género. É altamente específico, mas a técnica perde sensibilidade quando usada em fluídos corporais, e requer muito tempo para a preparação e observação da amostra (Franzen *et al.*, 1999).

O exame citológico de fluidos corporais através de microscopia óptica permite o diagnóstico de infeções por microsporídeos, mas não permite a diferenciação do género ou espécie (Franzen *et al.*, 1999), o que, no caso dos coelhos não se torna relevante pois o *E.cuniculi* é o único a infetar naturalmente esta espécie (Mathis, 2000). Os esporos podem ser visualizados usando microscopia óptica com as colorações de Giemsa, Ziehl-Neelsen, Brown e Brenn, Brown e Hopps, tricrômico de Weber's, Warthin-Starry, e fluorescência. A hematoxilina-eosina não é particularmente útil (Cali *et al.*, 2011).

A coloração cromotrópica desenvolvida por Weber *et al.* (1992), melhorou a deteção de esporos nas fezes e fluidos corporais. A coloração tricrômica modificada (Cromotrópico 2R concentrado 10x) é mais sensível na identificação de *E.cuniculi* na urina quando comparada com a técnica convencional (Fig.6). Quando examinada com elevada ampliação (1000x), os esporos aparecem com a coloração rosa avermelhada em contraste com um fundo verde ou azul (Fedorko *et al.*, 1996; Weber *et al.*, 1992). As leveduras também coram de rosa, no entanto, os esporos de *E.cuniculi* podem ser distinguidos, devido à presença de uma banda central rosada que representa o tubo polar, e pelo vacúolo posterior. Esta coloração é altamente sensível mas apresenta uma preparação trabalhosa e demorada (Fedorko *et al.*, 1996).

1996; Weber *et al.*, 1992). A coloração “Acid Fast Trichome” (AFT) também pode ser utilizada para a identificação de esporos em sedimento de urina (Melillo, 2007).

Os agentes quimiofluorescentes como Calcofluor White, Uvitex 2b e Fungifluor ligam-se à quitina do esporo fazendo com que adquira uma fluorescência branca ou turquesa quando observado num microscópio de fluorescência. (Franzen *et Müller*, 1999). Estes microscópios são dispendiosos pelo que não estão disponíveis na prática clínica. A coloração fluorescente parece mais sensível e rápida quando comparada com as colorações cromotrópicas (Didier *et al.*, 1995a).



**Figura 6-***Encephalitozoon cuniculi* em raspagem de conjuntiva de um paciente com VIH  
(Retirado de Franzen and Müller, 1999)

O método de coloração mais sensível, mas não específico (os esporos podem ser confundidos com bactérias), para Microsporidia é “Calcofluor white M2R” (CW-M2R), uma coloração quimiofluorescente que pode ser utilizada em amostras de urina ou fezes (Jordan *et al.*, 2006b).

#### **1.4.1.2-Serologia**

A deteção serológica de anticorpos é o meio de diagnóstico mais sensível durante a fase inicial da infeção (Csokai *et al.*, 2009b).

Uma grande variedade de testes serológicos: o ensaio imuno-enzimático (ELISA do inglês “enzyme-linked immunosorbent assay”), o imuno-ensaio de carbono (CIA do inglês

“carbon imunoassay”), a imunofluorescência indirecta (IFI) e o Western Blotting, foram desenvolvidos para detetar IgG e IgM de microsporídeos, em especial *E.cuniculi*. Alguns destes testes são usados frequentemente em várias espécies animais. Destes, provavelmente a IFI e o ELISA são os mais úteis, pois são fáceis de realizar, embora a sensibilidade e especificidade seja por vezes desconhecida (Franzen *et Müller*, 1999). O método preferencial é a IFI, sendo considerados positivos, segundo estudos mais recentes, títulos iguais ou superiores a 40 (Suter *et al.*, 2001), mas o ELISA e o CIA também podem ser utilizados, e ambos são igualmente sensíveis e específicos (Dipineto *et al.*, 2008) (Boot *et al*, 2000).

A ocorrência de pequenas diferenças de sensibilidade e especificidade nos testes efetuados por diferentes laboratórios deve ser tida em conta, especialmente em colónias com baixa prevalência (Boot *et al*, 2000).

A presença de anticorpos circulantes não é diagnóstica e apenas confirma a exposição ao agente (Harcourt-Brown, 2004). Um título de anticorpos negativo, exclui normalmente a infeção, apesar de, raras vezes serem encontrados esporos, na ausência de anticorpos, principalmente nas fases iniciais da infeção, infeções em animais muito jovens ou com doenças primárias imunossupressivas (Csokay *et al*, 2009b). Em coelhos de laboratório, os anticorpos contra *E.cuniculi* desenvolvem-se cerca de 3 semanas após a infeção (Cox *et al*, 1979). A seroconversão pode ser demonstrada 2 semanas antes de os organismos serem detetados intracelularmente e 4 semanas antes das lesões histopatológicas no rim ou esporos na urina poderem ser detetados. As lesões cerebrais apenas se observam cerca de 8 semanas após o início da resposta serológica (Cox *et Gallichio*, 1978). Os títulos de anticorpos permanecem elevados durante vários meses após a exposição e depois diminuem ligeiramente e podem permanecer durante anos com valores flutuantes (Waller *et al*, 1978).

A pesquisa de anticorpos é o teste mais comum usado na prática privada para diagnóstico de *E.cuniculi* (Melillo, 2007), embora não consiga distinguir entre uma infeção ativa, aguda, crónica ou reativada (Tabela 1). As IgG apenas revelam exposição ao agente, embora com um teste negativo, num coelho adulto com sinais clínicos, se possa definitivamente excluir a hipótese de infeção por *E.cuniculi* (Harcourt-Brown *et Halloway*, 2003, Csokai *et al.*, 2008). No entanto uma análise negativa num coelho aparentemente saudável não exclui a possibilidade de uma infeção recente, anterior à seroconversão, pelo que deve ser testado novamente 4 semanas depois (Meredith, 2008). No caso de uma análise positiva, um aumento do título de anticorpos 4 semanas depois é indicativo de infeção ativa. Uma análise simultânea de IgM, que é mais indicativa de uma infeção ativa, pode no entanto

dar uma melhor indicação do estado do animal (Jass *et al.*, 2008). Com medições seriadas o título de IgM mantém-se estável ou diminui com o tratamento. Futuros estudos poderão indicar o valor diagnóstico de valores elevados de IgM, bem como a relevância ou não para o prognóstico (Cray, 2012). Em infecções experimentais, a IgM eleva-se rapidamente até ao 17º dia pós-infecção, desaparecendo totalmente ao 35º dia pós-infecção. A presença de IgM é indicativa de infecção recente (aguda). A presença só de IgG, significa infecção crónica/latente e os animais encontram-se em risco, de em caso de stress ou imunossupressão reativarem a infecção. No caso de ambas, IgG e IgM estarem elevadas, a infecção está ativa (aguda, reativada ou reinfeção) (Jeklova, 2010).

Deve-se ter em atenção que em coelhos com infecção aguda não existe correlação entre o título de anticorpos e a quantidade de esporos excretados ou a severidade das lesões encontradas na necrópsia (Harcourt-Brown, 2004). No entanto, os coelhos suspeitos de terem infecção por *E.cuniculi* apresentam maior probabilidade de serem seropositivos e apresentam um título de anticorpos 1,7 vezes superior aos coelhos clinicamente normais (Cray, 2009) (Tabela 2), apesar de para Csokai *et al.* (2009a) não existir uma diferença significativa entre os títulos de anticorpos em animais com e sem sintomatologia. Em coelhos seropositivos existe correlação entre a manifestação de sinais clínicos e a eliminação de esporos, pois é mais provável que animais com sintomatologia eliminem esporos do que animais com doença subclínica (Cox *et al.*, 1978).

Os coelhos jovens com sinais clínicos são muitas vezes seronegativos, mas seroconvertem em algumas semanas, provavelmente devido à interferência da imunidade materna. Os coelhos mais velhos, seropositivos quando jovens, podem tornar-se seronegativos com o avançar da idade (Harcourt-Brown, 2010). Em infecções experimentais observou-se que, os anticorpos desenvolvem-se aos 21 dias pós-inoculação e que os esporos são eliminados na urina durante aproximadamente 63 dias (Wasson *et al.*, 2000). Nos coelhos, os anticorpos maternos anti-*E. cuniculi* passam para a descendência e persistem até às quatro semanas de idade (Harkness *et al.*, 1995; Mathis *et al.*, 2005). Das quatro às oito semanas de idade os coelhos são seronegativos (Dipineto *et al.*, 2008; Santaniello *et al.*, 2009) e, às dez semanas, inicia-se a produção de anticorpos nos coelhos infetados *in utero* (Harcourt-Brown *et al.*, 2003).

**Tabela 1** – Interpretação de testes ELISA IgG (Adaptado de Keeble,2011)

| ELISA (IgG) | Coelhos saudáveis                                                   | Coelhos com sinais clínicos                                 |
|-------------|---------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| Negativo    | Não elimina, infecção recente (<2 semanas) repetir 4 semanas depois | Elimina <i>E.cuniculi</i> como diagnóstico                  |
| Positivo    | Indica quer infecção recente, crónica ou prévia com recuperação     | Pode sugerir infecção recente. Eliminar outros diferenciais |

**Tabela 2** – Título de anticorpos determinados por ELISA em diferentes grupos clínicos (Adaptado de Rich,2010)

| Grupo clínico                   | Título         |
|---------------------------------|----------------|
| Clinicamente normal             | 794,0 +- 171,9 |
| Não suspeitos de EC mas doentes | 742,3+- 245,0  |
| Suspeitos EC                    | 1324,0+-138    |
| -Sinais neurológicos            | 1679,0+-218,5  |
| -Sinais oculares                | 334,5+-382,7   |
| -Sinais Renais                  | 628,6+-560,2   |

#### 1.4.1.3-Proteinograma

O proteinograma é usado em medicina veterinária como um meio de diagnóstico e prognóstico acessório (Tabela 3). Um estudo (Cray *et al.*, 2009), evidenciou que existe um aumento de  $\gamma$ -globulinas em coelhos suspeitos de *E.cuniculi* bem como uma diminuição concomitante do ratio albumina/globulina, da albumina e da  $\alpha$ 2-globulinas, no entanto tais alterações foram também identificadas em coelhos doentes, mas não suspeitos de *E.cuniculi*.

Os coelhos doentes mas não suspeitos de *E.cuniculi* apresentaram também um aumento nas  $\beta$ -globulinas, o que não aconteceu nos coelhos suspeitos ou clinicamente saudáveis. Estes valores não são inesperados pois a albumina é uma proteína de fase aguda negativa, ou seja diminui em caso de processos inflamatórios. Embora muitas vezes as

infecções por *E.cuniculi* possam parecer agudas, são classificadas como um processo crónico (Rich, 2010) Os resultados deste estudo indicam que, as alterações no proteinograma, não devem ser usadas como meio de diagnóstico único de *E.cuniculi*, mas como meio acessório.

| Proteinograma    | Suspeito EC | Doente não suspeito EC |
|------------------|-------------|------------------------|
| Proteínas totais | -           | -                      |
| Ratio A/G        | Diminuído   | Diminuído              |
| Albumina         | Diminuído   | Diminuído              |
| Alfa 1           | -           | -                      |
| Alfa 2           | Diminuído   | Diminuído              |
| Beta             | -           | Aumentado              |
| Gama             | Aumentado   | Aumentado              |

**Tabela 3** – Variação do proteinograma de acordo com o grupo clínico  
(Adaptado de Rich, 2010)

#### 1.4.1.4-Reacção em cadeia da polimerase (PCR do inglês Polymerase Chain Reaction)

Várias tentativas de usar PCR para diagnosticar *E.cuniculi* de forma rápida e precisa foram avaliadas (Csokai *et al*, 2009) (Rich,2010), no entanto, tanto na urina como no líquido cefalorraquidiano não foram consideradas fiáveis para a sua deteção, tanto em animais portadores como em animais que manifestaram doença clínica (Kunzel *et al*, 2008). Há que considerar, que os esporos são eliminados esporadicamente, na urina de animais infetados durante 3-5 semanas após a seroconversão, pelo que a sua deteção nem sempre é possível. Tendo em conta que os esporos podem estar presentes na urina de animais com sintomas ou assintomáticos, a sua presença não deve ser usada como um método válido para o diagnóstico de doença clínica (Csokai *et al.*, 2009). No entanto o PCR de material retirado por facoemulsificação de animais com uveíte facoclástica revelou ser uma forma sensível para deteção de *E.cuniculi* (Rich, 2010) (Tabela 4).

#### 1.4.1.5 – Outros meios de diagnóstico

A análise de líquido cefalorraquidiano pode dar alguma informação, quer através de citologia ou PCR. O aumento da concentração em proteína e pleocitose linfomonocítica ocorre em coelhos com distúrbios neurológicos provocados pelo *E.cuniculi*, pelo que a análise do LCR pode suportar um diagnóstico de *E.cuniculi*, embora vírus, encefalites imunomediadas ou protozoárias e linfoma no sistema nervoso central possam provocar alterações semelhantes (Jesse *et al.*, 2008).

O ratio proteína/creatinina não pode ser usado como meio de diagnóstico de *E.cuniculi*, pois não foram encontradas diferenças significativas entre coelhos positivos e negativos serologicamente (Reusch, 2009).

De acordo com um estudo, foram encontrados IgG anti-*E.cuniculi* na urina de coelhos seropositivos, pelo que os anticorpos presentes na urina podem aportar mais informação do que os anticorpos sanguíneos em relação a infeções latentes. No entanto os resultados indicam que os anticorpos anti-parede do esporo e tubo polar apenas foram encontrados em animais com elevada seroreatividade numa colónia com elevada seroprevalência (Furuya *et al.*, 2009).

Numa comunicação apresentada em 2012, Carolyn Cray, observou que cerca de 59% dos coelhos com suspeita de *E.cuniculi* do estudo, apresentaram elevação de Proteína C-reativa (CRP) acima do valor de referência de 0-20 mg/L. Existindo uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo de coelhos clinicamente normal (6,8 mg/L) e o de coelhos suspeitos de *Encephalitozoon* (63,8 mg/L). Deste modo os valores da proteína C-reativa podem apresentar informação importante no diagnóstico e prognóstico desta doença.

Num estudo mais recente, para avaliar a aplicação de proteínas de fase aguda no diagnóstico de *E.cuniculi*, mais de metade dos coelhos com sinais clínicos compatíveis com *E.cuniculi* manifestaram níveis elevados de Proteína C-reativa, no entanto em animais com sintomatologia ocular ou renal esses valores foram inferiores aos que apresentavam sintomatologia neurológica. Não houve diferença nos valores da Haptoglobina (HP) nem da Soro Amiloide A (SAA) entre animais suspeitos e não suspeitos de *E.cuniculi* (Cray *et al.*, 2013).

**Tabela 4** – Meios de diagnóstico Ante-mortem de acordo com a manifestação clínica  
(Adaptado de Keeble,2011)

|                                                 |                                                                                                                                        |
|-------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Assintomático</b>                            | IgG elevada<br>Fosforo baixo                                                                                                           |
| <b>Infeção aguda ativa<br/>(doença renal)</b>   | PCR urina – durante 5 semanas após seroconversão,<br>citologia de urina com coloração específica, IgG e IgM<br>elevadas, fósforo baixo |
| <b>Infeção crónica<br/>(doença neurológica)</b> | Biopsia renal e PCR, IgG elevada<br>Fósforo baixo                                                                                      |
| <b>Uveíte facoclástica</b>                      | Sinais clínicos, aspiração da lente e PCR                                                                                              |

#### 1.4.2-Post-mortem

Mesmo *post-mortem*, o diagnóstico de *Encephalitozoon* é muitas vezes presuntivo e baseado mais nas características inflamatórias das lesões dos tecidos do que na presença do organismo. No entanto a sua ausência no exame histopatológico não significa que não estejam presentes, significa apenas que o patologista não o encontrou (Harcourt-Brown,2010).

##### 1.4.2.1-Histopatologia

Até à presente data a histopatologia é considerada o método mais eficaz para a obtenção de um diagnóstico definitivo de infeção por *E.cuniculi* (Leipig *et al.*,2012) No exame *post mortem* podem ser evidentes alterações em órgãos alvo, como o rim e o cérebro. A histopatologia continua a ser o método mais comum de identificação *post-mortem* da meningoencefalite granulomatosa e da nefrite intersticial crónica provocada pelo *E.cuniculi*. A sensibilidade da deteção histopatológica de esporos de *Encephalitozoon cuniculi* , mesmo usando colorações específicas, pode ter resultados variáveis (Csokai *et al*, 2009;Kunzel, 2010). Os parasitas corados com hematoxilina-eosina podem passar despercebidos mesmo a patologistas experientes. Colorações Gram, Brown-Brenn ou Brown-Hopps parecem ser fiáveis na identificação de microsporídeos em secções de tecidos em parafina. A coloração dos esporos de microsporídeos variam com as colorações Gram, no entanto, coram de azul

escuro ou vermelho, num fundo castanho amarelado. As colorações fluorescentes são fáceis e rápidas de realizar e a sua sensibilidade é muito elevada (Franzen *et Müller*, 1999).

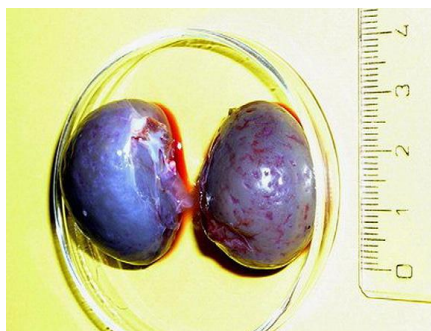
O cérebro é o órgão de eleição para a deteção de *Encephalitozoon* através de histopatologia e da imunocitoquímica (Leipig *et al.*, 2012). A coloração de Ziehl-Neelsen pode ser utilizada em amostras de rim e cérebro, sendo ligeiramente mais sensível que a AFT (Csokai *et al.*, 2008).

Foram encontrados esporos e lesões histopatológicas em alguns coelhos seronegativos em contato com um coelho seropositivo. Os autores postularam que os coelhos desenvolveram lesões antes de haver uma resposta imunitária (Csokai *et al.*, 2009).

#### 1.4.2.1.1- Lesões renais

Ao exame macroscópico (Fig.7) é frequente encontrar os rins atrofiados, fibróticos e pálidos, com pequenas depressões na superfície renal e manchas irregulares branco-acizentadas (Harkness *et al.*, 1995; Harcourt-Brown, 2004).

De acordo com Leipig *et al.* (2012), as lesões renais foram subclassificadas em agudas, crónicas ou ambas. As lesões agudas são caracterizadas por uma necrose tubular focal com infiltrados inflamatórios de heterófilos, macrófagos, linfócitos e plasmócitos. As lesões crónicas caracterizam-se por um infiltrado intersticial monocelular primariamente no córtex. Nos rins com lesões predominantemente crónicas não foram encontrados esporos.



**Figura 7** – Lesões renais num coelho com *E.uniculi*  
(Retirado de Valenkova, 2008)

#### **1.4.2.1.2-Lesões cerebrais**

Alterações histopatológicas só são observáveis aproximadamente oito semanas após a seroconversão ou seja 12 semanas após a infecção (Valencakova *et al.*, 2008).

Existe uma grande variedade de lesões histológicas que coexistem no cérebro, de acordo com as diferentes fases da doença (Leipig *et al.*, 2012).

Num estudo, em cerca de 40 cérebros observados, de animais com esporos detetados, cerca de 97,5% apresentava lesões cerebrais, 95% nas leptomeninges. A maioria dos animais apresentava infiltrados inflamatórios perivasculares (92,5%) enquanto que, em 77,5% foram encontrados granulomas (Csokai, 2009).

#### **1.4.2.1.3-Lesões noutros órgãos**

Em casos de infeções ativas podem observar-se infiltrados granulomatosos nos pulmões, fígado e coração de coelhos infetados (Leipig *et al.*, 2012).

#### **1.4.2.2-Imunocitoquímica**

A imunocitoquímica é um bom método complementar á histologia para a deteção de esporos, especialmente, em casos de pequena carga parasitária dos tecidos observados (Leipig *et al.*, 2012). A imunocitoquímica apresenta resultados mais favoráveis na deteção de *E.cuniculi* nos rins onde os vacúolos parasitóforos e os esporos são menos prevalentes do que no sistema nervoso central.

#### **1.4.2.3-PCR em tempo real**

O PCR em tempo real, em tecido cerebral, renal e pulmonar, é o método mais sensível para confirmação da infeção por *Encephalitozoon cuniculi* (Leipig *et al.*, 2012) .

## 1.5-Tratamento

Até ao momento nenhum medicamento foi aprovado para o tratamento da infecção por *E.cuniculi* em coelhos. Ao longo dos tempos, vários estudos *in vitro* foram realizados para avaliar a susceptibilidade do *E.cuniculi* a vários princípios ativos. Antibióticos como a fumagilina e oxitetraciclina, e antihelmínticos como o albendazole, oxibendazole, tiabendazole e febendazole demonstraram ser os mais efetivos (Kunzel *et al.*, 2010; Suter, 2001; Franssen *et al.*, 1995; Waller, 1979).

O tratamento tem por objetivo eliminar o parasita, suprimir a resposta inflamatória e tratar sintomaticamente os sinais clínicos (Keeble, 2006).

### 1.5.1-Tratamento etiológico

O tratamento do *Encephalitozoon cuniculi* é quase tão problemático como o seu diagnóstico. No caso do parasita ainda se encontrar nos tecidos, um tratamento parasiticida não implica reverter as alterações crônicas que já ocorreram. No entanto, episódios agudos como a síndrome vestibular, podem recuperar mesmo sem tratamento, pelo que é difícil avaliar a eficácia do mesmo (Harcourt-Brown, 2004). Os casos de sintomatologia nervosa e renal grave podem não responder favoravelmente ao tratamento (Valencakova *et al.*, 2008). Vários estudos foram efetuados acerca do uso de benzimidazóis no tratamento de *E.cuniculi* em coelhos (Franssen, 1995). Estes medicamentos são inibidores dos microtúbulos (Ridoux *et al.*, 1998), pelo que bloqueiam a extrusão do filamento polar, prevenindo a infecção celular. Antes de 2001, o albendazole era o único tratamento recomendado devido à sua eficácia no tratamento de pacientes humanos (Kotler *et al.*, 1999; Harcourt-Brown, 2010), apesar de este poder provocar mielossupressão e insuficiência hepática (Mortiz, 2004). Vários estudos *in vitro* mostraram que o albendazole é efetivo como agente antimicrosporídeo e mata os esporos de *E.cuniculi* em culturas de células renais de coelhos sem alterações citopáticas. A duração do tratamento com albendazole não está estabelecida em coelhos, mas está descrita uma dose empírica de 20 mg/Kg SID durante 3 a 14 dias (Harcourt-Brown, 2004). Não deve ser utilizado em fêmeas gestantes devido aos seus efeitos teratogénicos (Suter *et al.*, 2001).

Num modelo com murganhos, o tratamento com albendazole aparentemente eliminou a infecção. No entanto, a microsporidiose foi reativada após imunossupressão com

dexametasona. Isto implica que a população de *E.cuniculi* que não foi detetada por PCR permaneceu intacta, mesmo após o tratamento com albendazole, e que esta se expandiu após a imunossupressão (Kotkova, 2013). Johnson-Delaney (2008), usa oxibendazole, 30 mg/Kg PO SID durante 1-2 semanas e depois 10 mg/Kg PO SID até à estabilização dos sinais clínicos.

Atualmente o febendazole é o medicamento de eleição para o tratamento do *E.cuniculi* e mostrou ser efetivo na redução dos sinais clínicos numa infeção ativa bem como na prevenção da infeção em animais expostos quando administrada a 20 mg/Kg SID durante 28 dias (Suter *et al.*, 2001; Jordan *et al.*, 2006a). O tratamento pode ser repetido cada 6 meses ou menos, se os sinais clínicos reaparecerem (Harcourt-Brown, 2004). Tem a desvantagem de apresentar uma absorção menor que o albendazole quando administrado por via oral (Harcourt-Brown, 2004). O uso de febendazole durante 9 dias antes de haver infeção, parece conferir alguma proteção, pelo que está a ser recomendado pelo fabricante (Harcourt-Brown, 2010). A administração oral de febendazole antes da infeção experimental foi efetivo no bloqueio do estabelecimento da infeção no coelho hospedeiro (Suter *et al.*, 2001).

### 1.5.2-Tratamento sintomático

Os corticosteroides são usados com frequência em caso de sintomatologia neurológica aguda associada ao *E.cuniculi*. Parecem ser efetivos e estão indicados na supressão da resposta inflamatória associada à rutura celular. A dose usada é de 0,5-2 mg/Kg SID de Dexametasona. Se for necessário tratamento antiinflamatório adicional por um curto período deve ser usada a dose antiinflamatória (Harcourt-Brown, 2010). No entanto a terapêutica prolongada com corticosteroides em coelhos está contraindicada devido aos efeitos imunossupressores (Harcourt-Brown, 2003). Além disto, a administração de corticosteróides pode conduzir a um aumento da carga parasitária pelo seu efeito imunodepressor (Jordan *et al.*, 2006a). Podem ser usados outros antiinflamatórios como a flunixinina meglumina ou inibidores Cox-2. No caso de uma síndrome vestibular aguda deve ser implementada uma terapêutica antibiótica pois um dos principais diagnósticos diferenciais são infeções por *P.multocida* (Valencakova *et al.*, 2008). Podem utilizar-se antibióticos de largo espectro como trimetopim-sulfadiazina (15-30 mg/kg, PO, BID) ou enrofloxacina (10 mg/kg PO, BID), por 7 a 10 dias (Keeble, 2006). Em caso sintomatologia neurológica aguda podem ser úteis benzodiazepinas, como o diazepam (0,5mg/kg, SC ou IV) ou o midazolam (0,5-2mg/kg, SC

ou IV) (Harcourt-Brown, 2004; Keeble, 2006). O midazolam é também efetivo se administrado por via intranasal (Harcourt-Brown, 2004).

Além da terapêutica antiparasitária e antiinflamatória, existem outras opções paliativas de acordo com o tipo de manifestação clínica. O tratamento de coelhos com insuficiência renal crônica é sintomático. É necessário assegurar que bebem água suficiente e em caso de necessidade, fluidoterapia (Reusch, 2006; Künzel *et al.*, 2008). Está indicada uma dieta baixa em cálcio para evitar calcificação de tecidos moles e aumento da sua excreção e deve ser aumentado o consumo de vegetais e fruta devido ao seu teor em água (Harcourt-Brown, 2004).

No caso de uveíte facoclástica o tratamento sistémico para *E.cuniculi* não resulta e a terapia antiinflamatória tópica é pouco efetiva (Wagner *et Feher*, 2007). Se o animal se apresenta na fase final da doença o melhor tratamento é a enucleação (Wolfer, 1993) (Giardano, 2005; Kirschner, 1997). Se avaliado no início, antes do desenvolvimento de sinequias, ou glaucoma, a facoemulsificação associada a terapia antiinflamatória é uma opção (Sandmeyer, 2011; Felche, 2002). Harcourt-Brown (2004) prescreve terapêutica parasiticida em caso de cataratas mas não trata os sinais intraoculares a menos que existam sinais evidentes de inflamação, como hipópion. Segundo Suter *et al.* (2001) a combinação de fenbendazole (20mg/kg/dia), por via oral, com prednisolona a 1% tópica durante oito semanas resolve a uveíte. De acordo com Donnelly (2003), mesmo com o tratamento tópico, a uveíte conduz, invariavelmente, à atrofia do olho, podendo haver exceções apenas quando o tratamento é iniciado numa fase muito precoce da doença.

## **1.6-Prevenção**

A seleção de coelhos livres de *E.cuniculi* é o melhor método de prevenir a infeção de uma colónia (Keeble, 2006; Harkness *et Wagner*, 1997). Todos os coelhos devem ser testados serologicamente e os positivos eliminados. Devem ser testados mais 2 vezes com intervalos de 30 dias e todos os positivos eliminados (Bywater, 1978). Qualquer animal introduzido deve ser testado após 30 dias de quarentena. (Harcourt-Brown, 2004).

Um elevado grau de higiene e limpeza das jaulas, especialmente em locais com elevada densidade populacional, evitando o contacto da urina com a água contribui para a prevenção da transmissão de *E.cuniculi* (Santaniello *et al.*, 2009). O fenol a 2% ou formol a 10% tornam os esporos não infetantes e previnem a transmissão (Okewole, 2008). O etanol a 70% e o

hipoclorito de sódio a 1%, aplicados por 30 segundos, inativam os esporos (Jordan *et al.*, 2006), sendo um modo eficaz para a limpeza de jaulas ou outras superfícies possivelmente contaminadas.

O uso estratégico de febendazole antes da infecção por *E.cuniculi* pode ser um método válido para o controlo de novas infeções em coelhos de estimação (Suter *et al.*, 2001).

A administração de febendazole, durante 9 dias antes da infecção, parece apresentar caráter protetivo, e recomendado pelos fabricantes como medida profilática (Harcourt-Brown, 2010).

### **1.7-Potencial zoonótico**

O primeiro caso de *E.cuniculi* em humanos ocorreu em 1959, no Japão (Weber *et al.*, 1994) e o primeiro a ser comprovado por análise molecular em 1994, no Reino Unido (Mathis *et al.*, 2005).

Três estirpes de *E.cuniculi* foram identificadas até à data e apesar de nos Estados Unidos a isolada de humanos foi a estirpe III, na Europa tem sido principalmente a estirpe I. As infeções em humanos são consideradas oportunistas e afetam pessoas imunodeprimidas, no entanto, apesar do risco ser pequeno, os proprietários de coelhos infetados devem ser avisados (Harcourt-Brown, 2004).

É muito pouco provável que o *E.cuniculi* seja um agente natural em humanos e a sua origem zoonótica é evidente. Os poucos pacientes infetados com *E.cuniculi*, apresentam historiais de exposição a coelhos ou cães (Mathis *et al.*, 2005; Deplazes *et al.*, 1995). No entanto, num estudo realizado em 2011 por Sak *et al.*, em 15 pessoas assintomáticas e imunocompetentes, mas com risco de exposição a animais contaminados, cerca de 14 apresentaram serologias positivas para *E.cuniculi*.

## **1.8-Objectivos**

Este trabalho pretende contribuir para a avaliação do estado serológico de coelhos assintomáticos, mantidos como animais de estimação, de modo a justificar a utilização de medidas preventivas, quer da transmissão do agente, entre os animais existentes para venda ao público, quer da manifestação de sinais clínicos em animais que apresentam titulações positivas mas permanecem assintomáticos.

Pretende também efetuar a caracterização da população de coelhos positivos de modo a conseguir minimizar os possíveis fatores que poderão contribuir para a manifestação e disseminação desta doença.

## **2-Materiais e métodos**

### **2.1-Local de colheita**

Para este estudo foram recolhidas, entre Dezembro de 2012 e Agosto de 2013, amostras de sangue de coelhos em cerca de 7 centros de atendimento veterinário do distrito de Lisboa.

### **2.2-Critérios de escolha da população**

A população deste estudo apresentou como único critério de inclusão o fato de os animais não terem manifestado qualquer sinal clínico de doença, quer de *E.cuniculi* quer de outro tipo. Nenhum dos animais, anteriormente à recolha de sangue, tinha tido qualquer tipo de sintomatologia compatível com infeção por *E.cuniculi*. Os animais em causa foram à consulta para vacinação de rotina, exame pré-cirúrgico para cirurgia eletiva (ovariohisterectomia, castração) ou para exame pós-compra. Apenas foram sujeitos a exame clínico e os recém comprados a exame fecal por esfregaço a fresco (negativo em todos os animais).

### **2.3-Colheita da amostra**

Foram recolhidas amostras de sangue, através de colheita de cerca de 1 ml de sangue por punção da veia safena, e colocadas em tubo seco, até formação de coágulo. As amostras foram depois centrifugadas e recolhido o soro, que se manteve congelado a -20°C até à realização dos testes.

Todas as amostras sanguíneas foram recolhidas com consentimento dos proprietários, após sedação dos animais com midazolam e butorfanol e com colocação de xilocaína em pomada no local da recolha, previamente preparado de forma asséptica.

### **2.4-Tamanho da amostra**

O tamanho da amostra foi calculado usando a fórmula para estudos caso-controlo (Schesselman, JJ.,1982), assumindo uma proporção de exposição nos controlos de 50% e seis vezes mais risco relativo de desenvolvimento de *Encephalitozoon cuniculi* associado à exposição aos determinantes estudados, uma significância de 5% e um poder estatístico de 80%. O tamanho de amostra de acordo com estes cálculos é de 26 casos.

### **2.5-Recolha de dados**

Os dados foram recolhidos através dos sistemas informáticos dos centros de atendimento bem como através da consulta direta das fichas clínicas ou através da anamnese nos animais que foram observados pela primeira vez.

Foram recolhidos dados referentes à idade, sexo, raça, local de compra (loja/criador), presença de mais coelhos e estado de saúde.

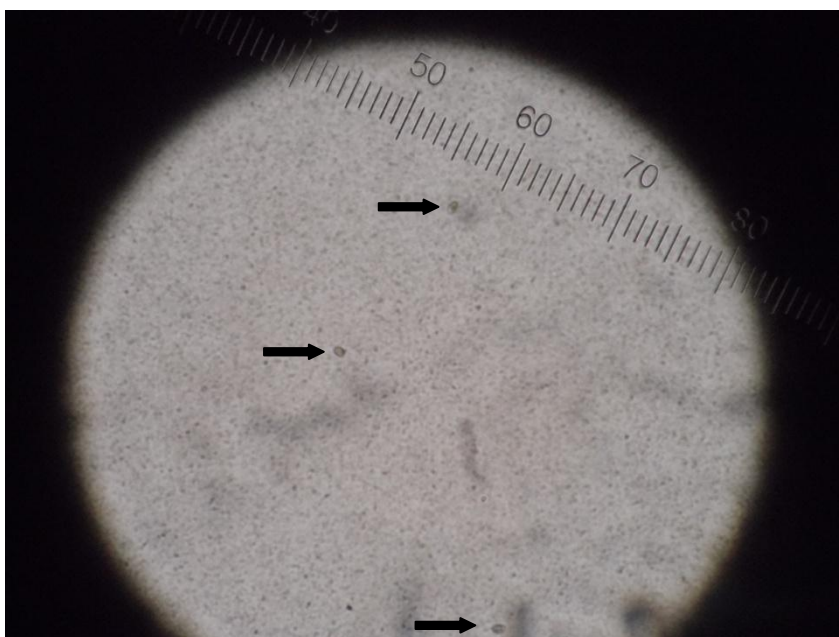
### **2.6-Desenho de estudo**

O presente estudo é do tipo analítico - observacional do tipo caso-controlo. Para efeitos deste tipo de estudo, consideraram-se casos, todos os animais que foram positivos à presença de *Encephalitozoon*. Os casos foram emparelhados com controlos, animais testados negativos à doença, de acordo com os critérios mencionados anteriormente. O

emparelhamento utilizado foi de um caso para um controlo. Para efeitos de análise excluíram-se 3 casos por não ter sido possível arranjar controlos.

## 2.7-Imuno-Ensaio de Carbono (CIA)

O teste utilizado foi o imuno-ensaio de carbono (CIA), de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante (Medicago®, Suécia). Os resultados foram lidos imediatamente, através de microscopia optica a 400x. As partículas de carbono ligam-se às IgG da amostra, permitindo a visualização dos anticorpos ligados aos esporos de *E.cuniculi*. Em amostras positivas os esporos coram de cinza/negro num fundo com as partículas de carbono (Fig. 8) enquanto em amostras negativas o esporo aparece branco num fundo escuro. Não foram efetuadas titulações e as amostras foram diluídas a 1:40 em PBS, valor a partir do qual se considerou o título positivo.



**Figura 8** – Imagem microscópica (400x) de uma amostra positiva no teste CIA. As setas indicam esporos com membrana celular negra devido à presença de IgG (Foto do autor)

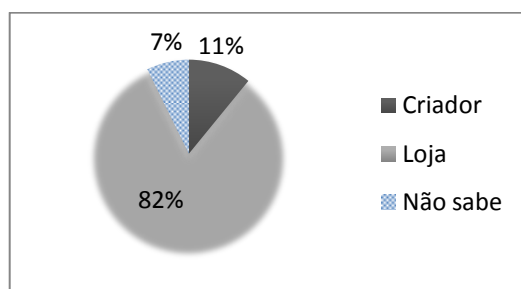
## 2.8-Análise estatística

Para efeitos de análise estatística utilizou-se o *software* SPSS versão 20 (c) IBM Corp. (c) SPSS (r) STATISTICS para análise descritiva, nomeadamente no cálculo de medidas de tendência central e de dispersão, de variáveis numéricas e contagens nas tabelas de contingência de variáveis categóricas. Adicionalmente para a estatística inferencial utilizou-se o teste Exacto de Fisher para avaliar a relação das variáveis dicotómicas, assim como o teste de Qui-quadrado para avaliar a relação das variáveis categóricas, com a seropositividade para *Encephalitozoon*. Para a avaliação da relação das variáveis contínuas, como a idade, com a doença efetuaram-se o teste de normalidade de Shapiro-Wilk, subsequentemente aplicando o teste paramétrico preconizado (teste t ou ANOVA). Nos casos em que não se verificou normalidade efetuaram-se as alternativas não paramétricas (Mann-Whitney e Kruskal-Wallis).

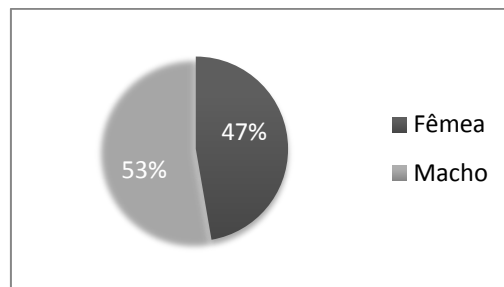
## 3-Resultados

O presente estudo incidiu numa amostra de cinquenta e cinco leporídeos de três proveniências distintas (Fig.9): loja 81,8% (n=45), criador 10,9% (n=6) e desconhecida 7,3% (n=4) – que se apresentaram à consulta entre Dezembro de 2012 e Agosto de 2013. Em relação ao sexo (Fig.10) e idade, a amostra apresenta 47,3% de fêmeas (n=26) e 52,7% de machos (n=29), com idades compreendidas entre os 0,17 (2 meses) e oito anos. Em relação à raça, a amostra é composta por cinco coelhos de raça Belier (9,1%), cinco de raça Lion Head (9,1%), três de raça Anã (5,5%), dois coelhos da raça Angora (3,6%) e de raça Holandês (3,6%), e os restantes 69,1% de raça indeterminada (Fig. 11). Cerca de 44 animais vivem sozinhos (80%).

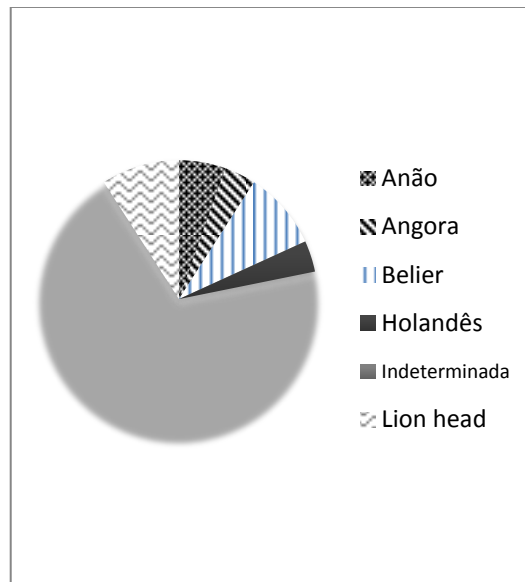
### 3.1- Amostra



**Figura 9:**Caraterização da amostra de acordo com a proveniência

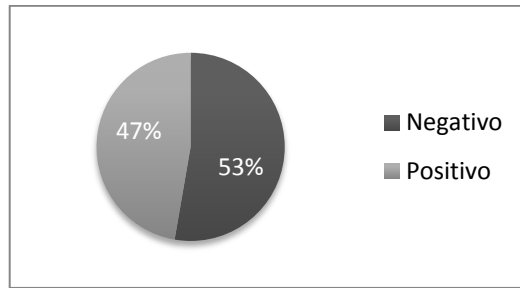


**Figura 10:** Caraterização da amostra de acordo com o sexo

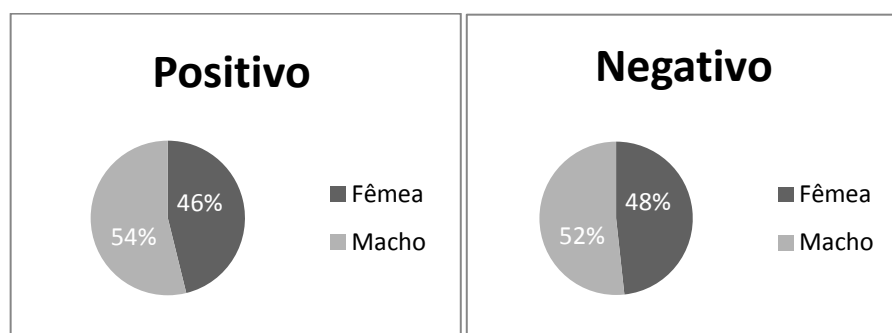


**Figura 11:** Caraterização da amostra de acordo com a raça

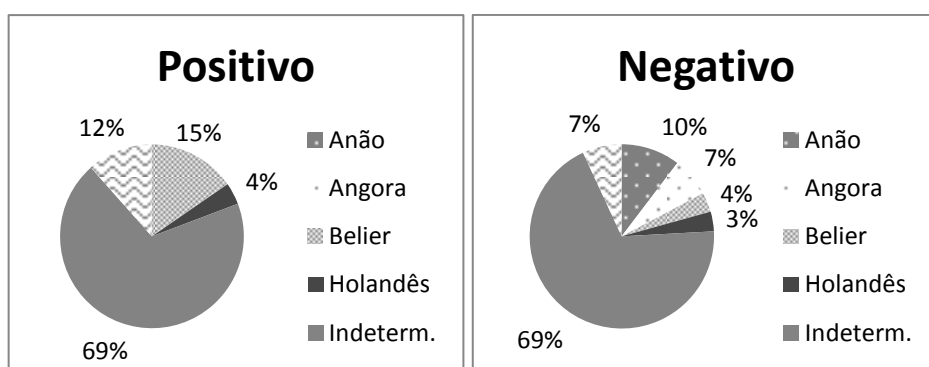
Esta amostra contempla 52,7% de animais sãos (n=29) e 47,3% (n=26) de animais seropositivos para *Encephalitozoon* (Fig.12). Destes 26 animais, 46% são fêmeas (n=12), e 54% são machos (n=14) (Fig.13) e cerca de 69% (n=18) não têm raça definida (Fig.14). A maioria foi adquirida em lojas de animais, cerca de 81% (n=21) (Fig.15), e vivem sozinhos 84% (n=22). Apresentam idades compreendidas entre os 0,33 e os 7 anos com uma média de 3 anos de idade (Fig.16).



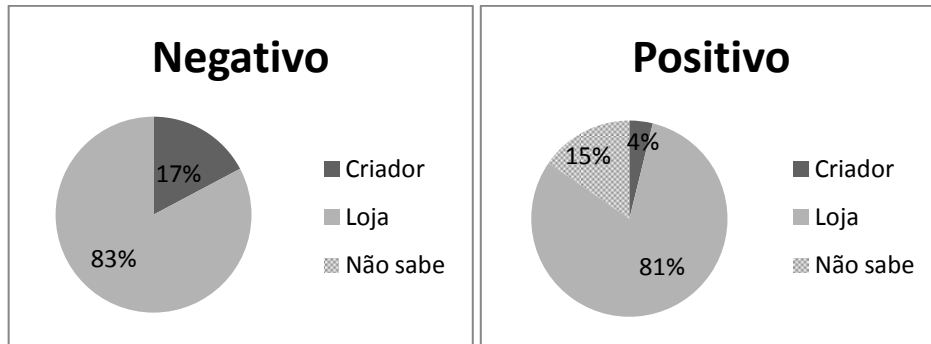
**Figura 12:** Caraterização da amostra de acordo com o resultado do CIA para *Encephalitozoon*



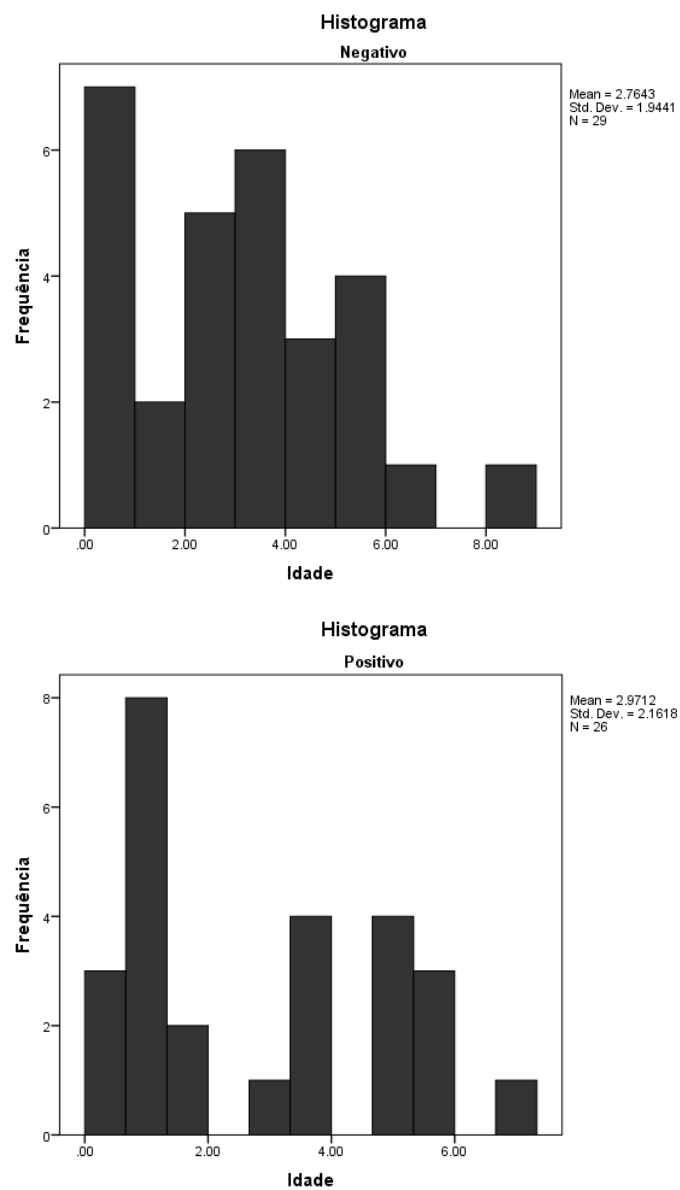
**Figura 13-**Comparação dos animais positivos e negativos de acordo com o sexo



**Figura 14-**Caraterização dos animais positivos e negativos de acordo com a raça



**Figura 15-**Caraterização dos animais positivos e negativos de acordo com a proveniência



**Figura 16 –** Caraterização dos animais positivos e negativos de acordo com a idade

## 3.2- Determinantes e relação com a doença

### 3.2.1-Determinantes intrínsecos

Para a avaliação das características individuais (determinantes intrínsecos) e a sua relação com a seropositividade para *E.cuniculi*, avaliou-se: o sexo, a raça e a idade.

#### 3.2.1.1- Sexo

O teste Exato de Fisher sugere que não existe relação estatisticamente significativa entre o sexo e a presença de anticorpos anti-*Encephalitozoon* ( $p=0,875$ ).

#### 3.2.1.2-Raça

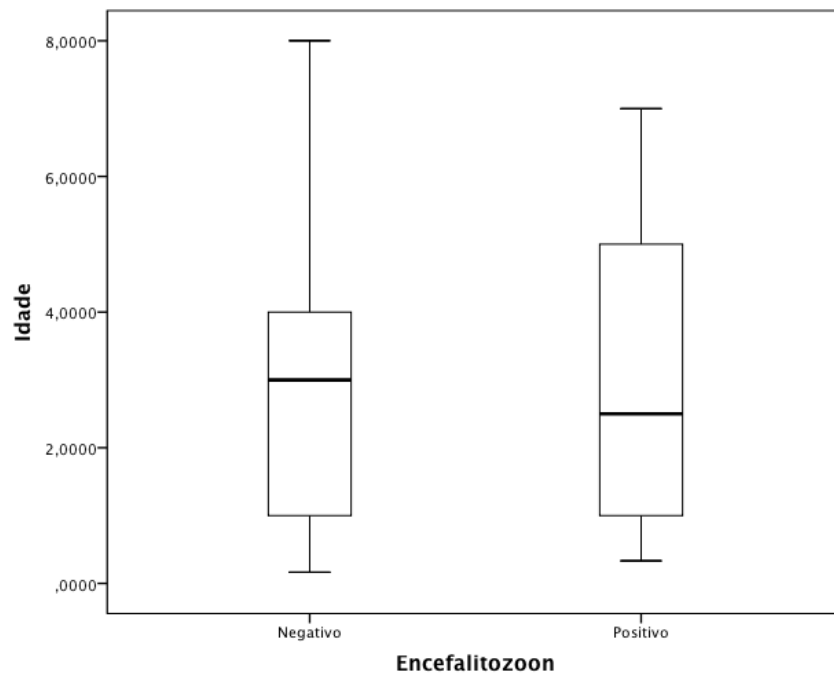
**Tabela 5** – Distribuição dos animais positivos e negativos ao *E.cuniculi* de acordo com a raça

|                 | Anão | Angorá | Belier | Holandês | Lionhead | Indeterminada | Total |
|-----------------|------|--------|--------|----------|----------|---------------|-------|
| <b>Negativo</b> | 3    | 2      | 1      | 1        | 2        | 20            | 29    |
| <b>Positivo</b> | 0    | 0      | 4      | 1        | 3        | 18            | 26    |
| <b>Total</b>    | 3    | 2      | 5      | 2        | 5        | 38            | 55    |

Para avaliação da raça agruparam-se as raças puras num grupo e a raça indeterminada noutra. O teste de Qui-quadrado sugere que não existe relação estatisticamente significativa entre ser de raça pura ou de raça indeterminada e a seropositividade para *Encephalitozoon* ( $p=0,983$ ).

#### 3.2.1.3-Idade

Os animais seronegativos da amostra (controlos) apresentam uma média de 2,76 anos com um Intervalo de confiança de 95% (I.C 95%) entre os 2,02 e os 3,5 anos, enquanto os animais seropositivos são um pouco mais velhos em média: 2,97 com IC 95% entre 2,09 e os 3,08 (Figura 17).



**Figura 17** –Distribuição dos animais positivos e negativos ao *E.cuniculi* de acordo com a idade

Para averiguação se existe diferenças estatisticamente significativas entre as médias de idades preconiza-se o teste t para amostras independentes. Este teste porém não foi executado por falha de pressuposto de normalidade, avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. A normalidade foi verificada no grupo controlo/negativo ( $p=0,0692$ ) mas falhou no grupo dos casos/positivos ( $p < 0,05$ ). Assim efetuou-se o teste de Mann-Whitney que sugere não existirem diferenças estatisticamente significativas entre as idades dos coelhos positivos e negativos ( $p=0,641$ ).

### 3.2.2- Determinantes extrínsecos

Para a avaliação das características ambientais (determinantes extrínsecos) e a sua relação com a seropositividade, avaliou-se: a proveniência e o número de coelhos com que co-habita.

### 3.2.2.1-Proveniência

**Tabela 6-** Distribuição dos animais positivos e negativos ao *E.cuniculi* de acordo com a proveniência

|                 | Local Compra | n  | %     | % válida |
|-----------------|--------------|----|-------|----------|
| <b>Negativo</b> | Criador      | 5  | 17,2  | 17,2     |
|                 | Loja         | 24 | 82,8  | 82,8     |
|                 | <b>Total</b> | 29 | 100,0 | 100,0    |
| <b>Positivo</b> | Criador      | 1  | 3,8   | 3,8      |
|                 | Loja         | 21 | 80,8  | 80,8     |
|                 | Não sabe     | 4  | 15,4  | 15,4     |
|                 | <b>Total</b> | 26 | 100,0 | 100,0    |

Avaliando a tabela comparativa (Tabela 6) dos casos (Positivo) e controlos (Negativo), verifica-se uma diferença marcada entre o número de animais provenientes de lojas (n=45) e de criadores (n=6). Poderemos afirmar que em 6 animais vindos de criadores apenas 1 é positivo (16%) enquanto, dos que vêm das lojas cerca de 21 são positivos (47%). Por só haver um caso positivo provenientes de criador não se procedeu à estatística inferencial.

### 3.2.2.2 – Número de coelhos com que co-habita

**Tabela 7 -** Distribuição dos animais positivos e negativos ao *E.cuniculi* de acordo com o número de outros coelhos com que habita

|                 | Nº de coelhos     | n  | %     | % válida |
|-----------------|-------------------|----|-------|----------|
| <b>Negativo</b> | 0                 | 22 | 75,9  | 81,5     |
|                 | 1                 | 1  | 3,4   | 3,7      |
|                 | 2                 | 4  | 13,8  | 14,8     |
|                 | Total com registo | 27 | 93,1  | 100,0    |
|                 | Sem registo       | 2  | 6,9   |          |
|                 | <b>Total</b>      | 29 | 100,0 |          |
| <b>Positivo</b> | 0                 | 22 | 84,6  | 84,6     |
|                 | 1                 | 3  | 11,5  | 11,5     |
|                 | 2                 | 1  | 3,8   | 3,8      |
|                 | <b>Total</b>      | 26 | 100,0 | 100,0    |

Em relação aos animais positivos (Tabela 7), observa-se que 84,6% (n=22) vive só, sendo que os restantes 15,4% (n=4) co-habita com pelo menos um outro coelho. Nos animais negativos 17,2% (n=5) da amostra co-habita com pelo menos um coelho.

**Tabela 8** - Distribuição dos animais positivos e negativos ao *E.cuniculi* que vivem sozinhos e acompanhados

|              | Vive só | Vive com outros | Total |
|--------------|---------|-----------------|-------|
| Negativo     | 22      | 5               | 27    |
| Positivo     | 22      | 4               | 26    |
| <b>Total</b> | 44      | 9               | 53    |

Para avaliar se o co-habitar com outros animais tem relação com a seropositividade, dividimos os coelhos no grupo dos que vivem só e no grupo dos que vivem com outros (Tabela 8). Para este efeito não foram avaliados os dois coelhos cuja presença, de outros animais, não foi registado. Esta avaliação pelo teste Exato de Fisher sugere que não existe associação estatisticamente significativa ( $p=0,981$ ).

## 5-Discussão

O *E.cuniculi* é reconhecido como causa de doença clínica em animais de laboratório, mas só recentemente começa a ser descrito como um problema em animais de estimação (Harcourt-brown *et* Holloway, 2003). Em estudos prévios (Tabela 11), efetuados na Europa, verificou-se que a prevalência em animais assintomáticos varia entre 18% num estudo da Alemanha (Hein *et al*, 2014) e os 71% de um outro na Eslováquia (Valencakova, 2008), embora este último tenha uma amostra reduzida.

Neste estudo, cerca de 47,2% dos animais foram serologicamente positivos. A deteção de anticorpos anti-*Encephalitozoon cuniculi* em 26 dos 55 animais testados determinam que o *E.cuniculi* está presente na população de coelhos de estimação na região de Lisboa, embora seja impossível diferenciar entre os animais com infeção ativa, infeção latente ou coelhos que criaram uma resposta imunitária mas que não se apresentam infetados. Para diferenciar entre estas possibilidades terá de ser efetuada uma avaliação da flutuação dos títulos de anticorpos ao longo do tempo, quer de IgG quer de IgM bem como um acompanhamento da evolução do estado clínico do animal.

Tal como demonstrado na estatística descritiva, neste estudo não existe relação significativa entre a idade e a seropositividade para *Encephalitozoon cuniculi*. Resultado idêntico foi obtido por outros autores (Keeble *et Shaw*, 2006) (Jeklova, 2010), no entanto Dipineto *et al* (2008) observou que a prevalência em animais adultos foi de 98,6% (em comparação com a de animais jovens 27,3%). Tal pode dever-se ao fato de a maioria dos coelhos jovens desse estudo terem entre 1 e 2 meses, idade em que ainda não desenvolveram anticorpos.

Neste estudo e de acordo com a literatura (Dipineto *et al*, 2008; Okewole, 2007; Keeble *et Shaw*, 2006; Jeklova, 2010) também não houve qualquer relação entre a positividade e o sexo dos animais. Em relação à raça, também não existe relação com a positividade, o que também foi observado nos estudos efetuados por Keeble *et Shaw* (2006) e Okewole (2007).

A percentagem de animais positivos provenientes de criadores parece ser várias vezes inferior (16%) à dos animais que testaram positivo provenientes de lojas (47%). Esta comparação é contudo baseada em contagens de animais, provenientes de criadores, muito baixas (n=6). Sugere-se que esta variável seja avaliada com grupos de tamanho maior. No entanto poderá ser interessante avaliar posteriormente quais as diferenças em relação ao manejo dos animais em criadores particulares e em lojas da especialidade.

No que diz respeito a viverem sozinhos ou com outros coelhos, neste estudo não houve qualquer relação com o fato de serem seropositivos para *E.cuniculi* o que concorda com os estudos efetuados por Keeble *et Shaw* (2006) e Jeklova (2010), no entanto, de acordo com outros autores (Okewole, 2007; Igarashi *et al*, 2008; Morera, 2012) existe maior seroprevalência entre os coelhos que vivem acompanhados por outros coelhos. Tal deve-se ao fato de poder haver maior probabilidade de contaminação por ingestão de esporos eliminados na urina.

Segundo o conhecimento do autor, este é o primeiro estudo realizado para avaliar a seroprevalência de *E.cuniculi* em coelhos assintomáticos na região de Lisboa. Mais estudos serão necessários para determinar a incidência em indivíduos assintomáticos, infetividade e disseminação da doença.

O propósito deste estudo, foi uma avaliação preliminar do estado serológico da população de coelhos de estimação assintomáticos, no distrito de Lisboa, e coincide com os resultados obtidos em outros países, revelando que o *E.cuniculi* está presente nesta população de animais numa percentagem elevada, pelo que deve ser considerado como diagnóstico

diferencial em patologias neurológicas, urinárias e oculares, em coelhos, e tomadas medidas preventivas para evitar a sua disseminação.

**Tabela 9-**Prevalência de *E.cuniculi* em coelhos assintomáticos determinada por serologia, em diversos países (Adaptado de Kunzel *et al*, 2010)

| País                | Autor                             | Método     | Total | Seropositivos |       |
|---------------------|-----------------------------------|------------|-------|---------------|-------|
|                     |                                   |            |       | N             | %     |
| Reino Unido         | Keeble and Shaw, 2006             | ELISA      | 97    | 50            | 52    |
| Reino Unido         | Harcourt-Brown and Holloway, 2003 | ELISA      | 38    | 14            | 36,8  |
| Austria             | Kunzel, 2008                      | IFAT       | 54    | 20            | 37    |
| Itália              | Dipineto <i>et al</i> , 2008      | CIA, ELISA | 47    | 32            | 68,1  |
| Japão               | Igarashi <i>et al</i> , 2008      | ELISA      | 195   | 113           | 57,9  |
| Nigéria             | Okewole, 2008                     | IFAT       | 100   | 10            | 16,5  |
| Eslováquia          | Valencakova, 2008                 | IFA        | 7     | 5             | 71    |
| Répubblica Checa    | Jeklova, 2010                     | ELISA      | 62    | 32            | 51,6  |
| Espanha (Barcelona) | Morera, 2012                      | IFA        | 55    | 25            | 45,45 |
| Alemanha (Sul)      | Hein <i>et al</i> , 2014          | IFAT, CIA  | 218   | 39            | 17,9  |

## 5-Conclusão

Tendo em conta os resultados obtidos, em que cerca de 47,3% dos animais testados foram serologicamente positivos para IgG de *E.cuniculi*, apesar de não apresentarem qualquer sinal de doença, o potencial para desenvolverem sinais clínicos é elevado, pelo que é recomendável e justificável efetuar tratamento preventivo com Febendazole, 20mg/Kg SID, 28 dias (Suter, 2001), a todos os animais, quer para evitar os sinais clínicos quer como preventivo de infeções posteriores.

A maioria dos animais testados são animais de companhia, solitários, e que após a compra não voltaram a ter contato com outros animais da sua espécie, o que leva a crer que a maioria das infeções foi adquirida desde o nascimento até à venda final. A forma mais provável de infeção é através da ingestão dos esporos eliminados na urina e que contaminam

alimentos e água, pois estes podem manter-se viáveis no ambiente durante longos períodos de tempo (Harcourt-Brown e Holloway, 2003; Keeble, 2006; Nast, 1996; Waller, 1979).

De salientar o papel importante que os distribuidores e lojas de animais devem ter no controle desta patologia, através da testagem dos animais para venda, bem como na implementação de adequadas medidas de higiene dos animais, que são criados e vendidos, bem como das suas instalações, uma vez que os esporos são destruídos facilmente com o uso de desinfetantes comuns, como etanol, formaldeído e hidróxido de sódio (Waller, 1979). O estabelecimento de centros reprodutivos livres de *E.cuniculi* foi descrito por Cox *et al* (1977), e, embora reconheça que seja dispendioso e leve algum tempo, essas medidas deveriam ser implementadas.

## IX-Bibliografia

- Baneux, P.J., Pognan, F. (2003). *In utero* transmission of *Encephalitozoon cuniculi* strain type 1 in rabbits. *Lab Animal*, 37, 132-138.
- Bart, A., Wentink-Bonnema, E.M., Heddema, E.R., Buijs, J., Van Gool, T. (2008). Frequent occurrence of human-associated microsporidia in fecal droppings of urban pigeons in Amsterdam, the Netherlands. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 7056-7058.
- Benz, P., Maab, G., Csokai, J., Fuchs-Baumgartinger, A., Schwendenwein, I., Tichy, A. *et al* (2011). Detection of *Encephalitozoon cuniculi* in the feline cataractous lens. *Veterinary Ophthalmology*, 14, Supplement 1, 37–47.
- Boot, R., Hansen, A. K., Hansen C. K., Nozari, N., Thuis H. C. W., (2000). Comparison of assays for antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits. *Laboratory Animals Ltd. Laboratory Animals*, 34, 281-289.
- Bywater, J., E., C., Kellett, B., S., (1978a). The eradication of *Encephalitozoon cuniculi* from a specific pathogen-free rabbit colony. *Lab Anim Sci* 28:402-404.
- Bywater, J., E., C., Kellett, B., S., (1978b). *Encephalitozoon cuniculi* antibodies in a specific-pathogen-free rabbit unit. *Infection and Immunity*, p360-364
- Cali, A., Neafle, R., C., Takvorian, P., M., (2011). Microsporidiosis. In: *Armed Forces Inst Of Pathology Washington Dc, Topics on the Pathology of Protozoan and Invasive Arthropod Diseases*.
- Chan, C. M., Theng, J.T., Li, L., Tan, D., T., (2003). Microsporidial keratoconjunctivitis in healthy individuals: a case series. *Ophthalmology*, 110:1420–1425.
- Cisláková, L., Literák, I., Bálent, P., Hipíkova, V., Levkutová, M., Trávnicek, M., *et al*. (2001). Prevalence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* (microsporidia) in angora goats—a potential risk of infection for breeders. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 8: 289-291.
- Cox, J.C., Gallicho, H.A., (1978) Serological and histological studies on adult rabbits with recent, naturally acquired encephalitozoonosis. *Vet Vet Sci* 24:260-261.
- Cray, C., Arcia, G., Schneider, R., Kelleher, S., Arhear, 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*, Vol 70, n°4.
- Cray, C., (2009). New testing option for the diagnosis of *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits, *Exotic DVM*, Vol 11, issue 2, 27-28.
- Cray, C., (2012). Application of IgM titers and CRP levels in the diagnosis of suspected ECUN infection in Rabbits, comunicação apresentada na 11<sup>th</sup> annual conference of Exotic mammal veterinarians.

Cray, C., Rodriguez, M., Fernandez, Y.,(2013).Acute phase protein levels in rabbits with suspected encephalitozoon cuniculi infection, Journal of exotic pet medicine, 22, 280-286

Csokai, J., Gruber A., Künzel F, Tichy A, Joachim A. (2009a).Encephalitozoonosis in pet rabbits (*Oryctolagus cuniculi*): pathohistological findings in animals with latent infection versus clinical manifestation. Parasitol Res, 104:629-635.

Csokai J, Joachim A, Gruber A, et al (2009b).Diagnostic markers for encephalitozoonosis in pet rabbits. Vet Parasitol, 163:18-26.

Didier, E. S., Orenstein, J. M., Aldras, A., Bertucci, D., Rogers, L. B. and Janney, F. A. (1995a). Comparison of three staining methods for detecting microsporidia in fluids, Journal of Clinical Microbiology **33**: 3138-3145.

Didier, E.S., Vossbrink, C.R., Baker, M.D., Rogers, L.B., Bertucci, D.C., Shadduck, J.A. (1995b).Identification and characterization of three *Encephalitozoon cuniculi* strains. *Parasitology*. 111: 411-421.

Didier, E.S., Didier, P.J., Snowden, K.F., Shadduck, J.A.,(2000). Microsporidiosis in mammals. Microbes and Infection. 2: 709-720.

Didier, E.S., Stovall, M.E., Green, L.C., Brindley, P.J., Sestak, K., Didier, P.J.,(2004) Epidemiology of microsporidiosis: sources and modes of transmission. Vet Parasitol, 126:145- -166.

Didier, E.S., Weiss, L.,M.,(2008). Overview of microsporidia and microsporidiose, Protistology 5 (4), 243–255.

Dipineto, L., Rinaldi, L., Santaniello, A., Sensale, M., Cuomo, A., Calabria, M., et al, (2008) Serological Survey for Antibodies to Encephalitozoon cuniculi in Pet Rabbits in Italy, Zoonoses and Public Health, 55, 173–175.

Deplazes P., Mathis A., Baumgartner R., Tanner I., Weber R., (1996). Immunological and molecular characteristics of Encephalitozoon-like microsporidia isolated from humans and rabbits indicate that *Encephalitozoon cuniculi* is a zoonotic parasite. Clinical Infectious Diseases, 22, 557-559

Donnelly, T.M., (2003). *Encephalitozoon cuniculi*-associated phacoclastic uveitis in the rabbit, Review: *Exotic Mammal Medicine and Surgery*. 1.1, 1-3.

Dubey, J.P., Brown, C.A., Carpenter, J.L., Moore, J.J., (1992).Fatal toxoplasmosis in domestic rabbits in the USA. Vet Parasitol, 44,305–309.

Feaga, W.P.,(1997). Wry Neck in Rabbits. Journal of the American Veterinary Medical Association. **210**:,480

Fedorko, D. P., Hijazi, Y. M., (1996). Application of molecular techniques to the diagnosis of microsporidial infection. Emerging Infectious Diseases, 2: 183-191.

- Furuya, K., Asakura, T., Igarashi, M., Morita, T.,(2009). Microsporidian *Encephalitozoon cuniculi* antibodies in rabbit urine samples, *Veterinary Record*, 165, 85-86
- Felche, L.M., Sigler,R.L. (2002). Phacoemulsification for the management of *Encephalitozoon cuniculi* induced phacoclastic uveitis in a rabbit. *Veterinary Ophthalmology*. 5: 211-215.
- Franssen, F.F.F.J., Lumeij, J.T., Knapen, F. van.,(1995). Susceptibility of *Encephalitozoon cuniculi* to several drugs in vitro. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 39.6: 1265-1268.
- Franzen, C., Müller, A.,(1999). Molecular techniques for detection, species differentiation, and phylogenetic analysis of microsporidia. *Clinical Microbiology Reviews* 12: 243-285.
- Franzen, C.,(2005). How do microsporidia invade cells?, *Folia Parasitologica* 52, 36-40.
- Gannon ,J., (1980). A survey of *Encephalitozoon cuniculi* in laboratory animal colonies in the United Kingdom, *Laboratory Animals*., 14: 91-94.
- Giordano, C., Weight, A., Vercelli, A., Rondena, M., Grilli, G., Ciudice C. (2005). Immunohistochemical identification of *Encephalitozoon cuniculi* in phacoclastic uveitis in four rabbits. *Veterinary Ophthalmology*. 8: 271-275.
- Gruber, A., Pakozdy, A., Weissenb ck, Csokai, J., Künzel, F. (2009). A retrospective study of neurological disease in 118 rabbits. *Journal of Comparative Pathology*. 40: 30-37.
- Harcourt-Brown F., (2002), In: Textbook of rabbit medicine. Butterworth-Heineman
- Harcourt-Brown, F., Holloway, H.K.R., (2003). *Encephalitozoon cuniculi* in pet rabbits. *Vet Rec*; 152:427-431.
- Harcourt-Brown ,F., (2004). *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbits. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, Vol 13, N°2: pp 86-93.
- Harcourt-Brown, F., (2007). Radiographic signs of renal disease in rabbits. *Veterinary Record*. 160: 787-794.
- Harcourt-Brown, F.,(2010). *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits: the mystery disease, Master class na AAVAC/UEPV Annual Conference, Hobart, Austrália.
- Harkness ,J.E., Wagner, J.E., (1997). *Encephalitozoonosis*. In: The biology and medicine of rabbits and rodents, 4<sup>th</sup> Ed, Williams & Wilkins, 204-207.
- Hein, J., Flock, U., Sauter-Louis, C., Hartmann, K., (2014). *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits in Germany: prevalence and sensitivity of antibody testing, *Veterinary Record*, 174 (14), 350
- Igarashi, M., Oohashi, E., Dautu, G., Ueno,A., Kariya, T., Furuya, K.,(2008). High Seroprevalence of *Encephalitozoon cuniculi* in Pet Rabbits in Japan, *J. Vet. Med. Sci.* 70(12): 1301–1304.

Illanes, O.G., Tiffani-Castiglioni, E., Edwards, J.F., Shadduck, J.A. (1993). Spontaneous encephalitozoonosis in an experimental group of guinea pigs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 5: 649-651

Jass, A., Matiassek, K., Henke, J., Kuchenhoff, H., Hartmann, K., Fisher, A., (2008) Analysis of cerebrospinal fluid in healthy rabbits and rabbits with clinically suspected encephalitozoonosis. *Veterinary Record*, 162: 618-622.

Jeklova, E., Jekl, V., Kovarcik, K., Hauptman, K., Koudela, B., Neumayerova, H. *et al*, (2010). Usefulness of detection of specific IgM and IgG antibodies for diagnosis of clinical encephalitozoonosis in pet rabbits. *Veterinary Parasitology*. 170: 143-148.

Jeklova, E., Leva, L., Kovarcik K., Matiasovic, J., Kummer, V., Mascova, J., et al, (2010) Experimental oral and ocular *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbits, *Parasitology*, 137, 1749–1757.

Johnson-Delaney, C. A., (2008) *E.cuniculi: what's new? Clinical update*, comunicação livre apresentada no NAVC Congress, Orlando Florida.

Jordan CN, Zajac AM, Lindsay DS. (2006a) *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbits. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian* 28, 108-116

Jordan, C.N., DiCristina, J.A., Lindsay, D.S., (2006b). Activity of bleach, ethanol and two commercial disinfectants against spores of *Encephalitozoon cuniculi*. *Vet Parasitol.*, 136:343-346.

Kasicková, D., Sak, B., Kvác, M., Ditrich, Q. (2007). Detection of *Encephalitozoon cuniculi* in a new host-cockateel (*Nymphicus hollandicus*) using molecular methods. *Parasitology Research*. 101: 1685-1688

Katinka, M. D., Duprat, S., Cornillot, E., Meateanier, G., Thomarat, F., Prensier, G., *et al*. (2001). Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*, *Nature*, Vol 414, pag 450-453

Keeble, E., (2006). Nervous and musculoskeletal disorders. Anna Meredith and Paul Flecknell (ed), In: *BSAVA Manual of Rabbit medicine and surgery*, 2nd edition,

Keeble, E. J., Shaw, D. J., (2006). Seroprevalence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in domestic rabbits in the United Kingdom, *Veterinary Record*, 158, 539-544,

Keeble, E. J. (2011). Encephalitozoonosis in rabbits - what we do and don't know. In *Practice* 33: 426-435.

Keeling, P. J. and Fast, N. M. (2002). Microsporidia: biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. *Annual Review of Microbiology* 56: 93-116.

Kirschner, S.E., (1997). Ophthalmologic diseases in small mammals, Hilleyer, E.V., Quesenberry, K.E., In: *Ferrets, rabbits and rodents – clinical medicine and surgery*. Philadelphia: WB Saunders, p. 339-342

- Kotkova ,M., Sak, B., Kvetonova, D., Kvac, M., (2013).Latent Microsporidiosis Caused by *Encephalitozoon cuniculi* in Immunocompetent Hosts: A Murine Model Demonstrating the Ineffectiveness of the Immune System and Treatment with Albendazole, PLOS ONE, April 2, Volume 8,Issue 4.
- Kunstýr, I., Naumann, S.,(1985). Head Tilt in rabbits caused by pasteurellosis and encephalitozoonosis. Lab.Ani 19, 208-213.
- Kunzel, F.,Gruber, A., Tichy, A. et al.,(2008). Clinical symptoms and diagnosis of encephalitozoonosis in pet rabbits. Veterinary parasitology 151, 115-124.
- Kunzel, F., Joachim, A., (2010). Encephalitozoonosis in rabbits. Parasitol Res 106:299–309.
- Lallo, M.A., Calábria, P., Bondan, E.F., Milaneloc, L.,(2012). Identification of *Encephalitozoon* and *Enterocytozoon* (Microsporidia) Spores in Stool and Urine Samples Obtained from Free-Living South American Coatis (*Nasua nasua*), Applied and Environmental Microbiology p. 4490–4492, Volume 78, Number 12.
- Lee, S.C., Corradi, N., Byrnes, E.J., Torres-Martinez ,S., Dietrich ,F.S., Keeling, P.J. *et al*,(2008). Microsporidia evolved from ancestral sexual fungi Curr Biol.11;18(21):1675-9.
- Leipig, M.,Matiassek, K., Rinder, H.,Janik,D., Emrich D., Baiker, K.,*et al*, (2012).Value of histopatology, immunohistochemistry, and real-time polymerase chain reaction in the confirmatory diagnosis of *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbits. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.
- Lyngset, A.,(1980). A survey of serum antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in breeding rabbits and their young. Lab An Sci 30:558-561.
- Mathis, A., Weber, R., Deplazes P., (2005). Zoonotic Potential of the Microsporidia, Clinical Microbiology Reviews, July, p. 423–445
- Melillo, A., (2007). Rabbit clinical pathology. J Exot Pet Med, 16:135-145.
- Meredith, A., (2008).Update on neurological Disease in the Rabbit. Comunicação livre no 33rd World Small Animal Veterinary Congress, Dublin, Ireland.
- Mortiz, C., (2004). Reactions in albendazole treated rabbits. Exotic DVM, 6.4, 21-22.
- Nast, R., Middleton, D.M., Wheler,C.L., (1996).Generalized encephalitozoonosis in a Jerseywooly rabbit. Can Vet J ; 37: 303-305.
- Okewole, E.A.,(2008). Seroprevalence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in domestic rabbits in Nigeria. Onderstepoort J Vet Res; 75:33-38.
- Patterson-Kane, J.C., Caplazi, P., Ruringirwa, F., Tramontin, R.R., Wolfsdorf, K. (2003). *Encephalitozoon cuniculi* placentitis and abortion in a quarterhorse mare. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. 15: 57-59.

Paul-Murphy, J., (1997). Reproductive and urogenital disorders. In: Hilleyer EV, Quesenberry KE, Ferrets, rabbits and rodents clinical medicine and surgery. Philadelphia: WB Saunders; p. 207-210.

Paul-Murphy, J., Paré, Jean, A ,(2003).Disorders of the Reproductive and Urinary Systems:In: Hilleyer, E.V., Quesenberry, K.E., Ferrets, Rabbits and Rodents Clinical Medicine and Surgery (ed 2), Saunders, Elsevier, St Louis.

Reusch, B., (2006). Urogenital system and disorders. In: Meredith A, Flecknell P, eds. BSAVA manual of rabbit medicine and surgery. 2nd ed. Gloucester, UK: British Small Animal Veterinary Association, 2006. p. 86-88.

Reusch, B., Murray, J.K., Papasouliotis, K., Redrobe, S.P.,(2009). Urinary protein: creatinine ratio in rabbits in relation to their serological status to *Encephalitozoon cuniculi*. Veterinary Record, March 7, 164: 293-295.

Rich,G.,(2010).Clinical Update on Testing Modalities for *Encephalitozoon cuniculi* in Clinically Sick Rabbits. Journal of Exotic Pet Medicine, Vol 19, No 3 ( July), pp 226–230.

Ridoux ,O., Drancourt M., (1998).In Vitro Susceptibilities of the Microsporidia *Encephalitozoon cuniculi*, *Encephalitozoon hellem*, and *Encephalitozoon intestinalis* to Albendazole and Its Sulfoxide and Sulfone Metabolites, Antimicrobial Agents and Chemoterapy,Dec. 1998, Vol. 42, No. 12 p. 3301–3303

Sak,B., Kvac,M., Kucerova, Z., Kvetonova,D., Sakova, K.,(2011).Latent Microsporidial Infection in Immunocompetent Individuals – A Longitudinal Study, Microsporidiosis in Immunocompetent Humans, May,Volume 5, Issue 5.

Santaniello, A., Dipineto, L., Rinaldi, L., Menna, L. F., Cringoli, G., Fioretti, A., (2009).Serological survey of *Encephalitozoon cuniculi* in farm rabbits in Italy, Research in Veterinary Science 87, 67–69.

Sandmeyer, L.S., Bauer, B.S.,Grahn, B.H.,(2011). Diagnostic Ophthalmology. The Canadian Veterinary Journal, Vol 52 , March, 327.

Schesselman, J.,J., (1982). Case-Control Studies: Design Conduct. Analysis. Oxford University Press  
pag 145-149. New York.

Schottelius, J., Schmetz, C., Kock, N.P., Schüler, T., Sobottka, I, Fleischer, B. (2000). Presentation by scanning electron microscopy of the life cycle of microsporidia of the genus *Encephalitozoon*.Microbes and Infection, 2: 1401-1406.

Snowden, K.F., Logan, K., Didier, E.S., (1999) *Encephalitozoon cuniculi* Strain III Is a Cause of Encephalitozoonosis in Both Humans and Dogs, The Journal of Infectious Diseases 1999;180:2086–8.

Snowden, K.F., Lewis,B.C., Hoffman,J., Mansell, J. (2009). *Encephalitozoon cuniculi* infections in dogs: a case series. Journal of the American Animal Hospital Association. 45: 225-231.

- Suter, C., Müller-Doblies, U.U, Hatt, J-M., Deplazes, P.,(2001). Prevention and treatment of *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits with fenbendazole. *Vet Rec*, 148:478- -480.
- Terada, S., Reddy, K.R., Jeffers, L.J., Cali, A., Schiff, E.R.,(1987). Microsporidan hepatitis in the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Intern Med*. 1987;107:61-62.
- Thomas, W.B., (2000). Vestibular Dysfunction. In: *Vet Clin. North Am., Small animal practice* 30,227-249.
- Valencakova, A., Balent, P., Petrovova, E., Novotny, F., Luptakova, L. (2008). Encephalitozoonosis in household pet Nederland Dwarf rabbits. *Veterinary Parasitology*. 153: 265-269.
- Wagner, F., Fehr, M.,(2007). Common Ophthalmic Problems in Pet Rabbits, *Journal of Exotic Pet Medicine*, Vol 16, N°3, July, pp 158-167.
- Waller, T., Morein, B., Fabiansson, E.,(1978). Humoral immune response to infection with *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits. *Lab Anim* 12:145-148.
- Waller, T. (1979). Sensitivity of *Encephalitozoon cuniculi* to various temperatures, disinfectants and drugs. *Lab Animal*, Jul;13(3):227-30.
- Wasson, K., Peper, R.L.,(2000). Mammalian microsporidiosis. *Vet Pathol*, 37:113-128.
- Weber, R., Bryan, R. T., Owen, R. L., Wilcox, C. M., Gorelkin, L., Visvesvara, G. S.,(1992) The Enteric Opportunistic Infections Working Group. Improved light-microscopical detection of microsporidia spores in stool and duodenal aspirates. *The New England Journal of Medicine* **326**: 161-166.
- Weiss, L.M., Michalakakis, E., Coyle, C.M., et al, (1994). The *in vitro* activity of albendazole against *Encephalitozoon cuniculi*. *J Eukaryotic Microbiol* 41:65S.
- Weber, R., Bryan, R. T., Schwartz, D.A., Owen, R.L., (1994). Human microsporidial infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 7:426–461.
- Williams, D.L., (1999). Laboratory Animal Ophthalmology. In: Gelatt, K.N., (ed), *Veterinary Ophthalmology*, 3rd ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, pp 1209–1236.
- Williams, D.L.,(2000). Ophthalmology. In: Flecknell, P., eds., *BSAVA manual of rabbit medicine and surgery*. 1st ed. Gloucester, UK: British Small Animal Veterinary Association, p. 63-67.
- Wolfer, J., Grahn, B., Wilcock, B., Percy, D., (1993). Phacoclastic uveitis in the rabbit. *Prog Vet Comp Ophthalmol*;3:92–97.