

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE  
DE LISBOA



SEROPREVALÊNCIA DE *ENCEPHALITOOZON CUNICULI*  
NUM GRUPO DE 32 COELHOS DE ESTIMAÇÃO SINTOMÁTICOS

ROSA ROMÃO PARDAL

ORIENTADOR:

Doutor Virgílio da Silva Almeida

TUTOR:

Doutor Xavier Valls Badia

2021

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE  
DE LISBOA



SEROPREVALÊNCIA DE *ENCEPHALITOOZON CUNICULI*  
NUM GRUPO DE 32 COELHOS DE ESTIMAÇÃO SINTOMÁTICOS

ROSA ROMÃO PARDAL

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

JÚRI

PRESIDENTE:

Doutora Isabel Maria Soares  
Pereira da Fonseca Sampaio

VOGAIS:

Doutor Virgílio da Silva Almeida  
Doutora Sandra de Oliveira  
Tavares de Sousa Jesus

ORIENTADOR:

Doutor Virgílio da Silva Almeida

TUTOR:

Doutor Xavier Valls Badia

2021

## DECLARAÇÃO RELATIVA ÀS CONDIÇÕES DE REPRODUÇÃO DA TESE OU DISSERTAÇÃO

Nome: Rosa Romão Pardal

Título da Tese ou Dissertação:

Seroprevalência de *Encephalitozoon cuniculi* num grupo de 32 coelhos de estimação sintomáticos

Ano de conclusão: 2021

Designação do curso de Mestrado ou de Doutoramento: Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Área científica em que melhor se enquadra:

- |  |  |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> Clínica             | <input type="checkbox"/> Produção Animal e Segurança Alimentar |
| <input type="checkbox"/> Morfologia e Função | <input checked="" type="checkbox"/> Sanidade Animal            |

Declaro sob compromisso de honra que a tese ou dissertação agora entregue corresponde à que foi aprovada pelo júri constituído pela Faculdade de Medicina Veterinária da ULISBOA.

Declaro que concedo à Faculdade de Medicina Veterinária e aos seus agentes uma licença não-exclusiva para arquivar e tornar acessível, nomeadamente através do seu repositório institucional, nas condições abaixo indicadas, a minha tese ou dissertação, no todo ou em parte, em suporte digital.

Declaro que autorizo a Faculdade de Medicina Veterinária a arquivar mais de uma cópia da tese ou dissertação e a, sem alterar o seu conteúdo, converter o documento entregue, para qualquer formato de ficheiro, meio ou suporte, para efeitos de preservação e acesso.

Retenho todos os direitos de autor relativos à tese ou dissertação, e o direito de a usar em trabalhos futuros (como artigos ou livros).

Concordo que a minha tese ou dissertação seja colocada no repositório da Faculdade de Medicina Veterinária com o seguinte estatuto:

1.  Disponibilização imediata do conjunto do trabalho para acesso mundial;
2.  Disponibilização do conjunto do trabalho para acesso exclusivo na Faculdade de Medicina Veterinária durante o período de  6 meses,  12 meses, sendo que após o tempo assinalado autorizo o acesso mundial\*;

\* Indique o motivo do embargo (OBRIGATÓRIO)

Nos exemplares das dissertações de mestrado ou teses de doutoramento entregues para a prestação de provas na Universidade e dos quais é obrigatoriamente enviado um exemplar para depósito na Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa deve constar a seguinte declaração:

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA TESE/TRABALHO (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, 9 de julho de 2021

Assinatura: RosaPardal

*Ao eterno amigo e companheiro,  
que partiu sem assistir ao final desta jornada.  
A ti, Hugo.*

*«Sólo cabe progresar cuando se piensa en grande, sólo es posible avanzar cuando se mira  
lejos.» - José Ortega y Gasset*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por todo o apoio e motivação que me transmitiram ao longo destes anos, principalmente nas épocas mais difíceis. Por todas as vezes em que fizeram vossas as minhas frustrações e desilusões. Nem sempre estamos de acordo, mas não há maior e melhor pilar na minha vida que vocês.

À minha família: tios, primos, madrinha e padrinho. Pela constante preocupação com o meu percurso académico e pela forma como sempre tenho sido acarinhada.

Aos meus amigos, pela paciência, amizade, companheirismo e apoio, especialmente durante as terríveis épocas de exames, em que ouviram um sem fim de lamentações e resmunguices.

Aos Professores, colegas e restante comunidade da FMV, por todos os ensinamentos, tanto a nível profissional como pessoal, ao longo dos 5 anos passados nesta instituição.

Ao Professor Doutor Virgílio Almeida, pela disponibilidade e paciência demonstradas ao longo da realização deste trabalho. Por me ajudar e encaminhar desde o início do estágio curricular até ao final desta etapa.

A toda a equipa da Clínica Veterinària Exòtics. Pela simpatia e profissionalismo com que me acolheram desde o primeiro dia. Por toda a capacidade de ensino e pelos esclarecimentos às minhas mil e uma dúvidas. Por me motivarem diariamente a fazer mais e melhor, em prol dos fantásticos animais exóticos. Em especial, ao Doutor Xavi Valls, um enorme agradecimento. Pelos infinitos conhecimentos transmitidos, pela persistência em fazer com que dominasse a identificação de parasitas e células ao microscópio e por me fazer apaixonar, ainda mais, pelo mundo dos répteis, anfíbios e quelónios. ¡Gracias por todo!

Aos pacientes da clínica e seus tutores, por colaborarem com a recolha de dados e a realização das análises que serviram de base a este estudo.

E por fim, mas não menos importante, a todos os que, de alguma forma, se cruzaram no meu caminho e contribuíram para que seja a pessoa que sou atualmente. Todos os momentos e lições, levo comigo para a vida.

## RESUMO

### **Seroprevalência de *Encephalitozoon cuniculi* num grupo de 32 coelhos de estimação sintomáticos**

O agente etiológico da encefalitozoonose, *Encephalitozoon cuniculi*, é um parasita intracelular obrigatório, produtor de esporos, pertencente ao filo Microspora, com potencial zoonótico. O seu hospedeiro definitivo é o coelho (*Oryctolagus cuniculus*), mas além de infetar uma variedade de mamíferos, pode infetar seres humanos, principalmente quando imunossuprimidos.

O presente estudo avaliou um grupo de 32 coelhos de estimação, com suspeita clínica de infecção por *E. cuniculi*. A seroprevalência foi determinada por titulação de anticorpos e calculada em 87,5%, das quais 82,1% eram infecções crônicas e 17,9% infecções ativas. A frequência de apresentações clínicas de encefalitozoonose foi a seguinte: neurológica (56,3%); ocular (18,8%); renal (6,3%); com sinais clínicos múltiplos, renais e neurológicos (6,3), oculares e neurológicos (3,1%) ou inespecíficos (9,4%).

Não foram encontradas associações estatísticas entre a raça, o sexo e a idade dos coelhos investigados, quer com a frequência de infecção quer com o tipo de infecção por *E. cuniculi*.

O diagnóstico de encefalitozoonose é desafiante porque o desenvolvimento de doença depende sobretudo da capacidade de resposta do sistema imunitário do animal. É importante conhecer as várias apresentações clínicas da doença para fazer o seu diagnóstico precoce, tratamento e prevenção, de forma a reduzir cadeias de transmissão entre animais, e a eventuais titulares imunossuprimidos, e promover a saúde e o bem-estar dos coelhos. Os testes de titulação de anticorpos anti-*E. cuniculi* revelaram-se muito úteis para validar o diagnóstico clínico de encefalitozoonose e devem ser realizados periodicamente nos coelhos de estimação.

**Palavras-chave:** *Encephalitozoon cuniculi*, coelho, seroprevalência, apresentações clínicas, potencial zoonótico

## ABSTRACT

### **Seroprevalence of *Encephalitozoon cuniculi* in a group of 32 symptomatic pet rabbits**

The etiologic agent of encephalitozoonosis, *Encephalitozoon cuniculi*, is a spore-forming obligate intracellular parasite belonging to the phylum Microspora, with zoonotic potential. Its definitive host is the rabbit (*Oryctolagus cuniculus*), besides affecting a wide variety of mammals, it can infect humans, especially when immunocompromised.

The present study evaluated a group of 32 pet rabbits, with clinical suspicion of infection by *E. cuniculi*. Seroprevalence was determined by antibody titration and estimated at 87.5%, of which 82.1% were chronic infections and 17.9% active infections. The frequency of clinical presentations of encephalitozoonosis was as follows: neurological (56.3%); ocular (18.8%); renal (6.3%); with multiple clinical signs, renal and neurological (6.3%), ocular and neurological (3.1%) or nonspecific (9.4%).

No statistical associations were found between host determinants of disease, breed, gender and age, either with the frequency of infection or with the type of infection by *E. cuniculi*.

The diagnosis of encephalitozoonosis is challenging as its development depends mainly on the rabbit immune response. It is important to recognize the various clinical presentations of the disease to reach an early diagnosis, treatment and prevention, in order to reduce chains of transmission between animals, and eventual immunosuppressed holders, and to promote the health and well-being of rabbits. Antibody titration proved to be very useful to validate the clinical diagnosis of encephalitozoonosis and should be performed periodically on pet rabbits.

**Keywords:** *Encephalitozoon cuniculi*, rabbit, seroprevalence, clinical signs, zoonotic potential

## INDÍCE

1.	ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O ESTÁGIO CURRICULAR.....	1
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	3
2.1.	Introdução .....	3
2.2.	<i>Encephalitozoon cuniculi</i> .....	3
2.2.1.	Classificação e estrutura celular .....	3
2.2.2.	Ciclo de vida .....	4
2.2.3.	Transmissão e Fisiopatologia .....	5
2.2.4.	Hospedeiros suscetíveis.....	6
2.3.	Encefalitozoonose .....	7
2.3.1.	Sinais clínicos e lesões histopatológicas .....	8
2.3.1.1.	Manifestações neurológicas.....	8
2.3.1.2.	Manifestações renais .....	10
2.3.1.3.	Manifestações oculares.....	11
2.3.2.	Resposta imunológica .....	12
2.3.3.	Diagnósticos diferenciais .....	13
2.3.4.	Métodos de diagnóstico laboratorial .....	14
2.3.4.1.	Exames serológicos.....	15
2.3.4.2.	Reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês “ <i>Polimerase Chain Reaction</i> ”.....	16
2.3.4.3.	Proteinograma .....	17
2.3.4.4.	Hematologia e análises bioquímicas .....	17
2.3.4.5.	Outros meios auxiliares de diagnóstico .....	18
2.3.4.6.	Necropsia e diagnóstico <i>post mortem</i> .....	18
2.3.5.	Controlo e Prevenção.....	19
2.3.6.	Tratamento .....	20
2.3.6.1.	Tratamento sintomático.....	21
2.3.6.2.	Terapêutica de suporte .....	22
2.3.6.3.	Tratamento profilático .....	23
2.3.6.4.	Terapias alternativas.....	23

2.3.7.	Prognóstico e taxa de recuperação .....	24
2.4.	Potencial zoonótico.....	24
3.	SEROPREVALÊNCIA DE <i>E. CUNICULI</i> NUM GRUPO DE 32 COELHOS DE ESTIMAÇÃO SINTOMÁTICOS.....	27
3.1.	Objetivos do estudo .....	27
3.2.	Materiais e métodos .....	27
3.2.1.	Fontes de dados.....	27
3.2.2.	População em estudo e critérios de inclusão.....	27
3.2.3.	Procedimentos de diagnóstico.....	28
3.2.4.	Recolha e processamento das amostras biológicas .....	28
3.2.5.	Método de deteção de anticorpos utilizado.....	28
3.2.6.	Plano terapêutico.....	30
3.2.7.	Análise estatística.....	30
3.3.	Resultados .....	30
3.3.1.	Caracterização do grupo investigado.....	30
3.3.1.1.	Idade.....	30
3.3.1.2.	Sexo.....	31
3.3.1.3.	Raça .....	32
3.3.2.	Seroprevalência.....	32
3.3.3.	Sinais Clínicos .....	33
3.3.4.	Distribuição dos sinais clínicos consoante os resultados das provas serológicas.....	33
3.3.5.	Estado da infeção.....	34
3.3.6.	Distribuição dos animais seropositivos consoante o sexo.....	35
3.3.7.	Distribuição dos sinais clínicos consoante o tipo de infeção .....	35
3.3.8.	Distribuição etária consoante o tipo de infeção.....	36
3.4.	Discussão.....	37
3.5.	Conclusão .....	39
4.	BIBLIOGRAFIA.....	41
5.	ANEXOS .....	46

5.1. ANEXO 1: Tabela 5 – Resumo dos principais diagnósticos diferenciais de encefalitozoonose.....	46
--	----

## ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

<b>Figura 1</b> – Vacúolo parasitóforo com merontes alinhados na periferia; organismos em diversos estados e esporos no centro do vacúolo.....	6
<b>Figura 2</b> – Esquema do esporo de um microsporídeo.....	6
<b>Figura 3</b> – Coelho com inclinação da cabeça de grau moderado.....	10
<b>Figura 4</b> – Coelho com inclinação da cabeça grave e “rolling”.....	10
<b>Figura 5</b> – Rim com superfície irregular e pontilhada devido a infecção por <i>Encephalitozoon cuniculi</i> .....	10
<b>Figura 6</b> – Uveíte facoclástica com massa inflamatória esbranquiçada característica.....	11
<b>Figura 7</b> – Uveíte facoclástica com massa inflamatória hiperêmica e catarata focal na cápsula anterior.....	11
<b>Tabela 1</b> – Valores de sensibilidade e especificidade dos testes serológicos mais utilizados no diagnóstico de encefalitozoonose.....	15
<b>Figura 8</b> – Esquema: imunofluorescência indireta.....	29
<b>Figura 9</b> – Distribuição etária dos coelhos investigados.....	31
<b>Figura 10</b> – Distribuição por sexo dos coelhos investigados.....	31
<b>Tabela 2</b> – Distribuição dos coelhos seropositivos e seronegativos consoante as raças.....	32
<b>Figura 11</b> – Distribuição dos coelhos investigados com base nos resultados das provas serológicas.....	32
<b>Figura 12</b> – Distribuição das apresentações clínicas.....	33
<b>Figura 13</b> – Distribuição dos sinais clínicos nos coelhos seropositivos.....	34
<b>Figura 14</b> – Estados de infecção identificados.....	34
<b>Figura 15</b> – Distribuição por sexo dos coelhos seropositivos.....	35
<b>Tabela 3</b> – Distribuição dos infetados agudos e crónicos consoante a sintomatologia.....	36
<b>Figura 16</b> – Distribuição etária dos coelhos com infecção aguda e infecção crónica.....	36
<b>Tabela 4</b> – Seroprevalência de infecção por <i>E. cuniculi</i> em coelhos assintomáticos e sintomáticos.....	37

<b>Tabela 5</b> – Resumo dos principais diagnósticos diferenciais de encefalitozoonose.....	46
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADN – Ácido Desoxirribonucleico

AFT – do inglês, “*Acid-Fast-Trichrome*”

AVMA – do inglês, “*American Veterinary Medical Association*”

°C – grau Celsius

CIA – do inglês, “*Carbon immunoassay*” (imunoensaio de carbono)

CRP – do inglês, “*C-Reactive Protein*” (proteína C reativa)

ELISA – do inglês, “*Enzyme-linked immunosorbent assay*” (ensaio imuno-enzimático)

etc. – do latim, “*et cetera*” (e outros)

EUA – Estados Unidos da América

Ex. – exemplo

HIV – do inglês, “*Human immunodeficiency vírus*” (vírus da imunodeficiência humana)

IFI – Imunofluorescência indireta

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

ITU – Infecção do trato urinário

IV - Intravenosa

kg – quilograma

LCR – Líquido Céfalo-Raquidiano

µm – micrómetro

µl – microlitro

mg – miligrama

PCR – do inglês, “*Polimerase Chain Reaction*” (Reação em cadeia da polimerase)

PO – do latim, “*per os*” (por via oral)

q8h – a cada 8 horas

q12h – a cada 12 horas

q24h – a cada 24 horas

SC – subcutânea

SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

SNC – Sistema Nervoso Central

TAC – Tomografia Axial Computorizada

UPC – do inglês, “*Urine Protein Creatinine*” (proteína/creatinina urinárias)

WB – do inglês, “*Western Blot*”

ZN – do inglês, “*Ziehl Neelsen*”

## 1. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O ESTÁGIO CURRICULAR

O estágio curricular foi realizado na Clínica Veterinària Exòtics, em Barcelona, Espanha. Teve início a 8 de janeiro de 2020 e terminou a 17 de março de 2020. Durante este período, foram cumpridas 479 horas de estágio. O horário realizado foi bipartido durante a semana, contemplando as horas de abertura e de fecho da clínica e fez uma média de 9 horas diárias. Aos sábados, a estagiária colaborou nas atividades da clínica, num período matinal de 4 horas. O horário foi estrategicamente definido para que houvesse um acompanhamento dos períodos de maior afluência de pacientes às consultas, e de monitorização e medicação dos animais internados.

Durante o estágio curricular, a estudante participou nas consultas (de primeira e segunda opinião, e de seguimento) e auxiliou os médicos veterinários na contenção e no manejo de pequenos mamíferos, aves, répteis, e outros, para realização de exames físicos e exames complementares de diagnóstico, recolha de amostras biológicas, corte de unhas e administrações farmacológicas. Diversificou e aprofundou conhecimentos, reforçou competências clínicas de medicina de animais exóticos, e adquiriu destreza na manipulação de uma grande variedade de animais exóticos.

No serviço de internamento, foi responsável pela limpeza dos alojamentos dos animais internados (gaiolas/jaulas, terrários e aquários), por auxiliar na sua monitorização (exame físico, avaliação de urina/fezes, pesagem e medição de temperatura corporal), pela preparação e administração de medicações (por via oral e/ou parentérica) e de alimentação por sonda (quando necessário).

Participou nas atividades cirúrgicas realizadas, desempenhando funções como ajudante na preparação do material cirúrgico/fármacos e limpeza do bloco operatório, anestesista e ajudante de cirurgião. Colaborou em procedimentos cirúrgicos básicos (castração, esterilização, corte/limagem de dentes) e complexos (amputação de membros e remoção de massas tumorais) realizados em gerbos, porcos vietnamitas, camaleões, chinchilas e tartarugas. No período pós-cirúrgico, foi responsável pelo acompanhamento e monitorização dos animais intervencionados.

Na vertente dos meios complementares de diagnóstico, a estudante realizou e interpretou exames radiológicos e ecográficos, auxiliou na preparação, posicionamento e contenção dos animais. Assistiu à realização de ecocardiografias e de exames oftalmológicos, por especialistas. Participou também nas rotinas de diagnóstico laboratorial, realizando e interpretando provas hematológicas e bioquímicas, esfregaços sanguíneos e contagem de células, pesquisa de endo e ectoparasitas, urianálises, exames coprológicos e citologias.

Além das tarefas referidas, colaborou na recepção, alojamento, alimentação e acompanhamento dos animais em regime de “hotel” e auxiliou os médicos veterinários nas emergências médicas e nas consultas de urgência.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Introdução**

Os animais exóticos, também designados como “novos animais de companhia”, têm ganho popularidade ao longo dos tempos e fazem, cada vez mais, parte das preferências dos cidadãos como animais de estimação. Segundo a AVMA (do inglês, *American Veterinary Medical Association*), em 2018 foram registados, nos Estados Unidos da América (EUA), mais 20,7% de agregados familiares detentores de animais exóticos e houve um crescimento de 19,4% nas populações de animais exóticos mantidos como animais de companhia, em relação ao ano de 2012.

Estas populações animais são bastante abrangentes, e subdividem-se geralmente em três grandes grupos: aves; répteis; pequenos mamíferos. É neste último grupo de animais que se insere o vulgarmente designado como “coelho doméstico” - *Oryctolagus cuniculus* -, espécie-alvo do presente trabalho.

A adoção do coelho como animal doméstico na civilização humana é muito antiga, tendo as primeiras raças de coelho europeu doméstico surgido em França no século XVI (Hutchins, 2004). Atualmente, esta espécie conta com mais de 100 variedades e continua a ser das mais populares, não só como animal de companhia, mas também como animal de produção (carne e pêlo) e enquanto espécie usada no diagnóstico biológico e em experimentação animal. Na clínica dos animais exóticos, o coelho doméstico já é a terceira escolha entre os titulares destes animais e é a espécie com maior número de consultas (Mitchell and Tully, 2009).

A crescente preferência acarreta uma maior proximidade e frequência de contactos dos titulares com esta espécie animal e, como tal, um maior risco de transmissão de microrganismos entre si, alguns com potencial zoonótico. De entre estas zoonoses, destaca-se a encefalitozoonose, doença abordada neste estudo.

Perante esta nova e dinâmica realidade, é importante que o médico veterinário conheça os agentes zoonóticos mais frequentes e os seus hospedeiros, e tenha competências para diagnosticar e tratar estes animais, avaliar e mitigar o risco zoonótico, sensibilizando e informando os titulares acerca das boas práticas que devem tomar para prevenir a doença.

### **2.2. *Encephalitozoon cuniculi***

#### **2.2.1. Classificação e estrutura celular**

O parasita *E. cuniculi* faz parte do género *Encephalitozoon*, incluído no filo Microsporidia.

Os microsporídeos são microrganismos unicelulares, intracelulares obrigatórios e produtores de esporos (Didier *et al.*, 2000; Keeble, 2011; Wasson and Peper, 2000). Inicialmente, e dada a ausência de mitocôndrias, estes organismos eram considerados eucariontes básicos, mas atualmente, sabemos que têm estruturas equivalentes a pequenas mitocôndrias no organelo celular, os mitossomas. Através de análises filogenéticas e pelo facto de os esporos possuírem alguns elementos característicos de fungos, tem-se vindo a acumular evidência científica de uma relação bastante próxima com os filos Microsporidia e Fungi (Künzel and Fisher, 2018).

Estes parasitas têm um leque de hospedeiros muito diversificado, podendo afetar desde invertebrados a todas as classes de vertebrados, incluindo a espécie humana (Keeble, 2011).

### **2.2.2. Ciclo de vida**

Os organismos do género *Encephalitozoon* são monomórficos e possuem um núcleo isolado em todos os estados do seu ciclo de vida.

O ciclo de vida é direto, desenvolve-se em 3 a 5 semanas e pode ser dividido em três fases: a fase proliferativa ou merogonia; a fase formadora de esporos ou esporogonia; a fase infecciosa ou ambiental. As fases merogónica e esporogónica ocorrem no interior da célula hospedeira (Jordan *et al.*, 2006; Weiss and Becnel, 2014).

Na fase proliferativa, a replicação do parasita ocorre por divisão binária dentro de um vacúolo parasitóforo, que o separa do plasma da célula hospedeira, e tem origem em componentes lipídicos desta (Künzel and Joachim, 2010; Didier *et al.*, 2000). Nesta fase, o parasita é composto por células estruturalmente simples, os merontes, que representam o estado menos maduro, sendo tipicamente visualizados ligados à membrana do vacúolo ou alinhados em cadeia junto a esta membrana (Künzel and Fisher, 2018; Didier *et al.*, 2000; Weiss and Becnel, 2014).

A fase formadora de esporos/esporogonia começa quando a membrana plasmática aumenta de espessura e componentes dos esporos, como o filamento polar e o retículo endoplasmático iniciam o seu desenvolvimento (Didier *et al.*, 2000).

Os esporos maduros apresentam um tamanho compreendido entre 1,5 e 2,5 µm. Na sua constituição contêm o filamento polar enrolado no esporoblasto. O filamento polar tem como finalidade facilitar a entrada do material genético parasitário nas células hospedeiras. Por sua vez, o esporoblasto é composto pelo núcleo, pelo vacúolo posterior e pelos ribossomas, sendo delimitado por uma membrana plasmática (Künzel and Fisher, 2018; Künzel and Joachim, 2010).

A libertação dos esporos no organismo é o resultado da resposta inflamatória em curso que promove a rutura da membrana do vacúolo parasitóforo e da célula hospedeira (Künzel and Fisher, 2018; Didier *et al*, 2000; Weiss and Becnel, 2014).

### **2.2.3. Transmissão e Fisiopatologia**

Quando os esporos são libertados no espaço extracelular, inicia-se a fase infecciosa/ambiental, que inclui a disseminação de esporos no meio ambiente e é potenciada por fatores ambientais que promovem a germinação (Weiss and Becnel, 2014).

Estes organismos são relativamente resistentes a alterações ambientais, sobretudo em condições de temperatura amena e de baixa humidade, podendo persistir até seis semanas no exterior, a uma temperatura de 22°C (Keeble, 2011; Künzel and Fisher, 2018).

Os esporos de *E. cuniculi* são excretados nas fezes, no muco e na urina dos animais infetados (Varga, 2014).

O parasita transmite-se de modo horizontal (vias digestiva e respiratória) e de modo vertical (via transplacentária) (Künzel and Fisher, 2018).

Os hospedeiros suscetíveis tendem a infetar-se pela ingestão de alimento ou água contaminados com urina de animais no período infeccioso, que veicula os esporos.

Uma vez no interior do organismo do hospedeiro, os esporos invadem as células da mucosa intestinal, onde se multiplicam. Esta invasão celular pode recorrer a dois mecanismos: (i) o desenrolar muito rápido do filamento polar com descarga de esporoplasma diretamente no interior da célula hospedeira com formação do vacúolo parasitóforo; (ii) através da fagocitose do esporo pela célula hospedeira e captação do esporoplasma pelos fagossomas.

Após a multiplicação, os esporos são libertados no espaço extracelular devido à rutura da membrana do vacúolo parasitóforo e da célula hospedeira e são despoletados os mecanismos de inflamação crónica e reações granulomatosas característicos da doença (Varga, 2014; Künzel and Fisher, 2018; Keeble, 2011).

No espaço extracelular, os esporos invadem o sistema reticuloendotelial e são transportados até aos principais órgãos-alvo, o fígado, os rins e o sistema nervoso central (SNC), mas também podem localizar-se no coração e nos pulmões.

Numa fase de infeção aguda, a replicação tem lugar no fígado, rins e pulmões. Nos rins, ocorre no epitélio tubular, de onde são posteriormente excretados na urina (Harcourt-Brown, 2004; Varga, 2014; Keeble, 2011).

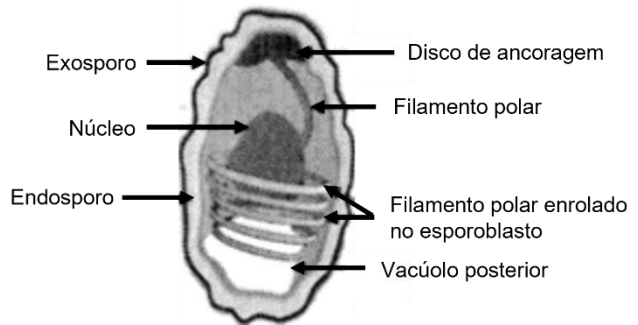
À medida que a infeção progride, a replicação do parasita tende a acantonar-se no rim, embora possa ocorrer também no SNC e no coração.

A excreção urinária ocorre sobretudo entre o 1º e 3º meses pós-infecção, tornando-se intermitente após esse período (Harcourt-Brown, 2004; Künzel and Fisher, 2018).

A infecção pós-natal dos láparos pode ocorrer nas primeiras seis semanas de vida, através da progenitora ou pelo contacto com outros animais infetados (Varga, 2014; Künzel and Fisher, 2018).



**Figura 1** – Vacúolo parasitóforo com merontes alinhados na periferia (indicados pela ponta de seta); organismos em diversos estados e esporos no centro do vacúolo (coloração Giemsa). (Weiss and Becnel, 2014)



**Figura 2** – Esquema do esporo de um microsporídeo. (Adaptado de Wasson and Peper, 2000)

#### 2.2.4. Hospedeiros suscetíveis

O vulgarmente designado como coelho europeu, *Oryctolagus cuniculus*, é o hospedeiro preferencial do parasita *Encephalitozoon cuniculi*.

As taxas de seroprevalência de *E. cuniculi* em coelhos domésticos são elevadas, apresentando valores compreendidos entre 37% e 68% (Khan and Didier, 2004; Künzel and Joachim, 2010). Além disso, são também as microsporidioses mais diagnosticadas em mamíferos não humanos (Künzel and Fisher, 2018). E, embora muito menos frequente, também já foram reportados casos de infecção em pacientes humanos com imunossupressão (Snowden, 2004). À exceção do coelho, na maior parte das espécies suscetíveis, as infeções são sobretudo assintomáticas (Hill and Brown, 2011).

Laboratorialmente, foram identificadas e caracterizadas três diferentes estirpes de *Encephalitozoon cuniculi*:

- Estirpe I (“*rabbit strain*”), tipicamente associada ao coelho, mas também isolada em roedores e em humanos na Europa (Künzel and Fisher, 2018);

- Estirpe II (“*rodent strain*”), mais frequente em roedores, mas também descrita em gatos e em raposas (Didier *et al.*, 2000);

- Estirpe III (“*dog strain*”), isolada no cão doméstico e em pacientes humanos nos Estados Unidos da América (Didier *et al.*, 2000).

Em coelhos, apenas existe evidência científica de infecção pela estirpe I, embora se admita que a espécie possa ser suscetível a todas as outras estirpes (Künzel and Fisher, 2018).

Outras estirpes, ainda por classificar, foram isoladas em ratazanas, porcos da Índia, hamsters, cavalos, vacas e em primatas não-humanos (Künzel and Joachim, 2010). Em humanos, foi identificado um novo genótipo, num paciente que desenvolveu infecção generalizada após receber transplante renal (Talabani *et al.*, 2010).

### **2.3. Encefalitozoonose**

A encefalitozoonose foi descrita pela primeira vez por Wright e Craighead (1922) em coelhos de laboratório com paralisia, mas só recentemente foi reconhecida como uma doença do coelho doméstico (Keeble, 2011).

A frequência de casos de encefalitozoonose em coelhos observados na prática clínica tem aumentado, seja por disseminação da doença, seja porque a comunidade médico-veterinária está mais alerta para a doença. Em 2015, mais de 50% dos animais de uma amostra de coelhos, investigada no Reino Unido, foram seropositivos para *E. cuniculi* (Buseth and Saunders, 2015). Morera and Molina (2012) identificaram uma seroprevalência de infecção por *E. cuniculi* de 45,5% em coelhos assintomáticos em Barcelona.

Conjetura-se que a maior parte dos animais positivos contactem com o parasita *in utero* ou numa fase inicial da vida (Buseth and Saunders, 2015).

De modo geral, a seroprevalência em coelhos domésticos ronda os 30-70%, no entanto, apenas cerca de 5% dos animais infetados desenvolvem sinais clínicos (Bradbury, 2018). Nos restantes animais, a encefalitozoonose manifesta-se de forma latente, podendo os coelhos apresentar títulos elevados de anticorpos durante meses ou anos, sem exibirem alterações clínicas. Os sinais clínicos e o estado de infecção ativa podem surgir semanas ou meses após a infecção, quando há acumulação de uma grande carga parasitária ou quando a capacidade de resposta do sistema imunológico se encontra comprometida por comorbilidades ou por envelhecimento (Künzel and Fisher, 2018; Hill and Brown, 2011; Künzel and Joachim, 2010).

Porém, todos os animais infetados devem ser considerados portadores porque excretam, de forma intermitente, esporos na urina, e podem ser uma fonte de infecção para terceiros (Csokai *et al.*, 2009a).

Quando há sinais clínicos, nem sempre é fácil atribuí-los a um episódio de encefalitozoonose, devido à inespecificidade e variabilidade dos sinais clínicos.

Entre os sinais clínicos possíveis reportados, destacam-se alterações a nível neurológico, renal e ocular, que estão geralmente associadas às lesões granulomatosas causadas pela presença de parasitas nesses órgãos-alvo (Keeble, 2011; Khan and Didier, 2004).

Em conclusão, o diagnóstico de encefalitozoonose em vida é complexo, mas pode ser obtido pelo recurso a vários métodos de diagnóstico em simultâneo, tais como o exame clínico neurológico e oftalmológico, e testes serológicos. Só deve excluir-se a hipótese de encefalitozoonose quando o resultado dos testes serológicos for negativo (Künzel *et al.*, 2008; Buseth and Saunders, 2015).

### **2.3.1. Sinais clínicos e lesões histopatológicas**

O decurso clínico da encefalitozoonose afeta, sobretudo, o SNC, os rins e os olhos, isoladamente ou em combinação, sendo reconhecidas três apresentações clínicas: neurológica; ocular; renal (Harcourt-Brown, 2004; Cray *et al.*, 2015).

A manifestação clínica mais frequente é a doença vestibular, associada a alterações do foro neurológico. A manifestação clínica ocular ocorre, principalmente, em coelhos jovens infetados *in utero*. A manifestação clínica renal tende a ser subclínica, com implicações como azotémia, desidratação ou anemia (Varga, 2014; Keeble, 2011).

De um modo geral, os animais infetados revelam perda de peso e podem apresentar íleo paralítico. A doença pode culminar na morte, devido a falhas a nível cardíaco e/ou renal ou a meningoencefalite (Keeble, 2011; Girling, 2013).

#### **2.3.1.1. Manifestações neurológicas**

As manifestações neurológicas são muito frequentes nos coelhos com encefalitozoonose e podem desenvolver-se em animais de qualquer idade (Harcourt-Brown, 2004).

A síndrome de disfunção vestibular é a mais reportada, variando bastante no grau de gravidade. Os sinais clínicos desta síndrome são: inclinação da cabeça (“*head tilt*”); ataxia; nistagmo; fraqueza dos membros posteriores; andamento em círculos (“*circling*”); e, rotação sobre si mesmo (“*rolling*”). Nos casos menos graves pode haver apenas uma ligeira inclinação da cabeça, enquanto nos casos graves o animal não consegue manter-se equilibrado quando em estação, rodopia sobre si mesmo ou apresenta-se num estado hemiparético, caracterizado

por perda parcial da movimentação e de sensibilidade de metade do corpo (direita ou esquerda) (Harcourt-Brown, 2004; Künzel and Fisher, 2018; Varga, 2014).

Muitas vezes, estes sinais neurológicos, principalmente o rodopiar sobre si mesmo, exacerbam-se após um momento de stress ou durante a manipulação do animal. Foi demonstrado que 72 horas antes de exibirem sinais do foro vestibular, 60% dos coelhos confrontaram-se com alterações stressantes do meio ambiente (Künzel and Fisher, 2018).

A maioria dos animais com disfunção vestibular, não exhibe outros sinais clínicos e, mesmo em casos de inclinação da cabeça grave, o apetite e a capacidade de preensão de alimento podem estar normais (Harcourt-Brown, 2004; Varga, 2014).

Outras manifestações clínicas descritas do foro neurológico são o colapso, a incontinência urinária e convulsões.

A incontinência urinária pode, ou não, ser acompanhada por poliúria e polidipsia. Ainda está por esclarecer se a poliúria e a polidipsia são consequência das lesões a nível do SNC, provocando alterações comportamentais, ou se estão relacionadas com lesões renais.

Também podem estar presentes perda de audição e tonturas em coelhos seropositivos, sendo que as tonturas podem resultar quer de lesões cerebrais quer de transtornos na circulação sanguínea causados por mineralização da parede da aorta, como consequência da insuficiência renal crónica (Buseth and Saunders, 2015; Varga, 2014; Harcourt-Brown, 2014).

De modo geral, os sinais neurológicos enunciados resultam das lesões granulomatosas localizadas no cérebro e na medula espinhal, e desenvolvem-se rapidamente, na consequência da lise neuronal que liberta o parasita para os tecidos adjacentes (Varga, 2014).

Um estudo realizado por Csokai *et al.* (2009a) concluiu que a maioria das alterações histopatológicas se localizam no cérebro (97,5%), seguido das leptomeninges (95,0%) e do tronco cerebral (77,5%). Predominaram as infiltrações inflamatórias perivasculares (92,5%) e as lesões granulomatosas (77,5%).



**Figura 3** – Coelho com inclinação da cabeça de grau moderado. (Varga, 2014)



**Figura 4** – Coelho com inclinação da cabeça grave e “rolling”. (Varga, 2014)

### 2.3.1.2. Manifestações renais

A doença renal em coelhos com encefalitozoonose, tende a induzir sinais clínicos inespecíficos, como inapetência, perda de peso, poliúria, polidipsia e anemia.

A insuficiência renal é geralmente de baixo grau com alterações ligeiras nos níveis de ureia e de creatinina séricos e possível hipofosfatemia, no entanto, é progressiva e irreversível. (Varga, 2014; Buseth and Saunders, 2015).

A reação do sistema imunológico à presença do parasita conduz à formação de lesões granulomatosas, acompanhadas de áreas fibróticas, que aparentam pequenas perfurações na superfície renal. Estas lesões granulomatosas são observadas no exame *post mortem* e, por vezes, na TAC.



**Figura 5** – Rim com superfície irregular e pontilhada devido a infecção por *Encephalitozoon cuniculi*. (Künzel and Fisher, 2018)

Histologicamente, observam-se vários graus de nefrite intersticial granulomatosa e, por vezes, é possível visualizar o parasita e/ou esporos no interior das células epiteliais, nos macrófagos, nos focos inflamatórios e, ainda, livremente e em circulação nos túbulos coletores

renais. Nos estados mais avançados de fibrose intersticial, não é possível observar o parasita (Varga, 2014).

Num estudo de Csokai *et al.* (2009a), as alterações histológicas observadas estavam associadas a processos crônicos (89,6%). Apenas 10,4% e 12,5% dos animais investigados apresentavam, respetivamente, nefrite intersticial aguda ou granulomas no parênquima renal.

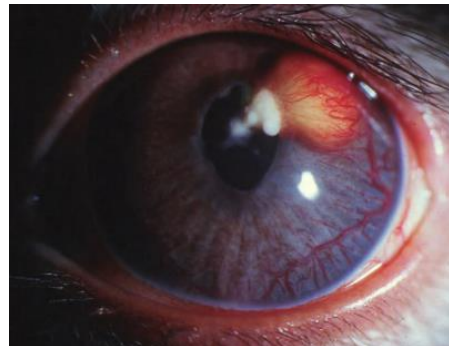
### 2.3.1.3. Manifestações oculares

A encefalitozoonose causa a catarata mais frequente na prática clínica em coelhos. Nalguns casos, a catarata acompanha-se de uveíte induzida pela lente, que é considerada por Williams (2012) um sinal patognomónico da doença.

A uveíte induzida pela lente consiste, tipicamente, numa massa circular ou ovoide de aspeto esbranquiçado, presente na superfície da íris (Figura 6). Porém, devido à neovascularização, pode assumir uma coloração avermelhada ou rosa (Figura 7).



**Figura 6** – Uveíte facoclástica com massa inflamatória esbranquiçada característica. (Williams, 2012)



**Figura 7** – Uveíte facoclástica com massa inflamatória hiperémica e catarata focal na cápsula anterior. (Williams, 2012)

Esta condição é mais frequente em coelhos jovens, infetados *in utero*. Durante a gestação, a lente apresenta uma fina cápsula e é altamente vascularizada, o que permite ao parasita instalar-se no seu interior, de onde mais tarde migra, causando opacificação seguida de rutura da cápsula anterior. Isto provoca a libertação de conteúdo na câmara anterior, com consequente reação inflamatória e desenvolvimento da uveíte induzida pela lente. Os olhos afetados apresentam-se hipotónicos e com pressão intraocular reduzida em relação ao olho contralateral (Giordano *et al.*, 2005; Williams, 2012).

As manifestações oculares são geralmente unilaterais no coelho e podem levar à perda de visão. Alterações bilaterais são mais frequentes no gato (Williams, 2012; Buseth and Saunders, 2015; Künzel and Fisher, 2018).

Recorrendo a técnicas histológicas, é possível visualizar neutrófilos no córtex da lente, rodeados por um anel de tecido fibroso composto por linfócitos e por células plasmáticas e, ainda, os parasitas na fração liquefeita do córtex (Varga, 2014).

Segundo Künzel and Fisher (2018), os animais que apresentam lesões oculares de encefalitozoonose, raramente manifestam alterações noutros órgãos ou sistemas.

### **2.3.2. Resposta imunológica**

A resposta imunitária à infeção por *E. cuniculi* é rápida, devido à presença do parasita na corrente sanguínea. Caracteriza-se por títulos de anticorpos elevados e persistentes, dada a natureza crónica da infeção (Varga, 2014; Künzel and Joachim, 2010).

Infeções experimentais realizadas em coelhos de laboratório, revelaram que a produção de anticorpos ocorre 14 a 28 dias após a infeção, atingido um pico ao 63º dia, com início da excreção do parasita às 6 semanas (Varga, 2014).

A resposta imunitária humoral é caracterizada pela produção inicial de IgM, seguida pela produção de IgG, que se tornam predominantes a partir do 17º dia pós-infeção. Nesta fase da infeção, os títulos de IgM começam a decrescer, atingindo níveis residuais ao 35º dia pós-infeção (Jeklova *et al.*, 2010).

Também experimentalmente, determinou-se que as IgG são produzidas mais rapidamente quando a inoculação do parasita é intravenosa, intraperitoneal ou intracerebral, sendo possível detetá-las uma semana depois através de testes serológicos. Quando a inoculação é subcutânea, a deteção de IgG é possível cerca de 2 semanas depois e só após 3 semanas por via oral.

Os títulos de IgG aumentam até ser atingido o pico, 2 a 3 meses após a infeção experimental. Depois, os títulos de IgG mantêm-se em *plateau* e, caso o animal permaneça infetado cronicamente, continuam elevados, mas não aumentam, o que sugere um certo nível de imunorregulação (Khan and Didier, 2004). Harcourt-Brown (2004) reportou um caso de persistência de IgG com títulos a manterem-se no pico ao longo de 400 dias pós-infeção.

Uma vez produzidos anticorpos específicos face à infeção por *E. cuniculi*, a sua presença no organismo do animal é perpétua, mas tal não impede uma reinfeção ou a ativação da infeção existente. Devendo enfatizar-se que a presença de anticorpos não confirma encefalitozoonose, mas sim exposição prévia ao agente (Keeble, 2011; Varga, 2014; La'Toya *et al.*, 2014).

Em coelhos recém-nascidos, filhos de mães seropositivas, há transmissão de anticorpos maternos que persistem nas primeiras 2 a 4 semanas de vida. Posteriormente, os animais começam a desenvolver IgG específicas como resposta à infeção natural por *E.*

*cuniculi*, entre as 8 e as 14 semanas de vida (Khan and Didier, 2004; Varga, 2014; Santaniello *et al.*, 2009).

Em animais imunologicamente imaturos ou comprometidos, a resposta imunitária é muito variável, dependendo sobretudo da competência do sistema imunitário no momento da infecção (Khan and Didier, 2004).

Embora a resposta humoral seja a mais estudada, também a resposta imunitária celular tem vindo a ser investigada, e a revelar-se mais eficaz no combate à infecção por este parasita (Valencakova and Halanova, 2012).

Em estudos realizados em murganhos, foram reunidas evidências de que murganhos atímicos ou com défice de resposta mediada por linfócitos T (principalmente CD8<sup>+</sup>), sucumbem à infecção por *E. cuniculi* e a outras microsporidioses (Didier *et al.*, 2000).

Os linfócitos CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup> são cruciais na eliminação do parasita nos animais infetados, diminuindo a letalidade da doença. Estas células promovem a produção de interleucinas (IL-10, IL-12, etc.) e de outros fatores pró-inflamatórios, como a citocina interferão-gama (INF- $\gamma$ ), que também desempenha um papel importante na resposta imunitária face à infecção parasitária. O processo desencadeado promove a fagocitose dos esporos pelos macrófagos e o recrutamento de mais células inflamatórias, como os monócitos, de modo a auxiliar o organismo no combate à infecção (Künzel and Joachim, 2009; Didier *et al.*, 2000; Valencakova and Halanova, 2012).

### **2.3.3. Diagnósticos diferenciais**

No coelho, o principal diagnóstico diferencial de infecção por *E. cuniculi* é a otite média/interna que, tal como a encefalitozoonose, causa sinais clínicos vestibulares, apresentando os animais muito frequentemente inclinação da cabeça.

A etiologia mais frequente da otite é a infecção por *Pasteurella multocida*, que ascende da cavidade nasal através da trompa de Eustáquio. Nalguns casos, o diagnóstico clínico diferencial pode ser feito com base no tipo de apresentação da disfunção vestibular (Künzel and Joachim, 2010; Harcourt-Brown, 2004). Nos casos de pasteurelose, surgem sinais clínicos de doença do trato respiratório, como corrimento nasal, espirros, estridor e pneumonia. A pasteurelose, e outras doenças respiratórias, são mais frequentes em coelhos mantidos em colónias para fins produtivos.

A encefalitozoonose está associada a doença vestibular central, enquanto na otite média/interna se observa um quadro de doença vestibular periférica. Alterações vestibulares centrais podem incluir lesão a nível dos nervos cranianos (principalmente o nervo facial), alteração do estado mental e défices de reação postural (Künzel and Fisher, 2018; Varga,

2014). Nos coelhos domésticos, a encefalitozoonose é a principal causa de disfunção vestibular (Künzel and Joachim, 2010; Harcourt-Brown, 2004). Considerando a dificuldade que pode existir em distinguir um episódio de encefalitozoonose de uma otite média/interna quando os sinais clínicos são inespecíficos, mas os animais apresentam disfunção vestibular, alguns autores defendem que estes animais devem ser medicados para ambas as afeções (Buseth and Saunders, 2015).

Quando existam alterações neurológicas, outros diagnósticos diferenciais devem ser investigados além de encefalitozoonose, como meningoencefalite bacteriana, infecções parasitárias (larva migrante cerebral de alguns nemátodes e *Toxoplasma gondii*) e lesões da coluna vertebral (traumatismos, fraturas, subluxações, espondilose e doença degenerativa do disco) (Künzel and Joachim, 2009; Harcourt-Brown, 2004).

Como mencionado anteriormente, a manifestação ocular mais frequente na encefalitozoonose é a uveíte facoclástica. Todavia, também podem ocorrer casos de uveíte bacteriana, na sequência de infecções por *Pasteurella multocida* ou por *Staphylococcus* sp., ou de queratites graves devidas a trauma ou lesão por corpos estranhos penetrantes (Harcourt-Brown and Chitty, 2013; Künzel and Joachim, 2010).

Relativamente à manifestação renal de encefalitozoonose, o principal diagnóstico diferencial é com a nefrolitíase, apesar de também poder ocorrer urolitíase, atrofia ou hipoplasia renal (Künzel and Joachim, 2009; Csokai *et al.*, 2009a).

A tabela 5 (Anexo 1) resume os sinais clínicos de encefalitozoonose mais frequentes no coelho, respectivos diagnósticos diferenciais e os meios complementares de diagnóstico.

#### **2.3.4. Métodos de diagnóstico laboratorial**

Apesar de estar disponível uma grande variedade de exames laboratoriais, nenhum providencia um diagnóstico definitivo. Estas limitações resultam, principalmente, da variabilidade individual da resposta à infecção e da excreção intermitente de esporos. A maioria dos coelhos desenvolvem infecções crônicas, apresentando títulos elevados de IgG anti-*E. cuniculi* mesmo quando assintomáticas (Keeble, 2011; Cray *et al.*, 2015).

Um plano de diagnóstico deve incluir, idealmente, a realização de exame físico completo (incluindo exame neurológico e oftalmológico), hemograma, parâmetros bioquímicos e provas serológicas, exames imagiológicos (radiografia, TAC ou ressonância magnética) e urianálise (Künzel and Fisher, 2018; Varga, 2014; Harcourt-Brown, 2004).

Na maior parte das vezes, devido a restrições económicas dos titulares, não é possível realizar todos os exames complementares desejados. Consequentemente, o diagnóstico é quase sempre presuntivo, e obtido através da interpretação dos sinais clínicos, do resultado positivo nos exames serológicos e da exclusão dos principais diagnósticos diferenciais.

O diagnóstico definitivo de encefalitozoonose é feito pela demonstração do parasita em amostras biológicas (Keeble, 2011; Künzel and Joachim, 2010; Harcourt-Brown, 2004).

Para complicar o estabelecimento de um diagnóstico definitivo de encefalitozoonose, muitas vezes há comorbidades, como doença dentária adquirida e infecção do trato respiratório, que podem induzir imunossupressão e influenciam a resposta à terapêutica e o prognóstico. Estas afeções devem ser diagnosticadas e tratadas, sempre que possível (Keeble, 2011).

### 2.3.4.1. Exames serológicos

Os testes sorológicos são muito úteis no diagnóstico de infecções por *E. cuniculi*. Embora resultados seropositivos apenas confirmem uma exposição prévia ao agente e não a ocorrência de encefalitozoonose, os resultados seronegativos podem permitir a exclusão de infecção por *E. cuniculi* da lista de diagnósticos diferenciais de um caso suspeito. Resultados falsos-negativos são raros em animais com sinais clínicos (Künzel and Fisher, 2018; Cray et al., 2015; Varga, 2014).

São vários os testes disponíveis: imunoensaio de carbono (CIA, do inglês “*Carbon immunoassay*”); imunofluorescência indireta (IFI, do inglês “*Indirect fluorescence antibody test*”); e, ensaio imunoenzimático (ELISA, do inglês “*Enzyme-linked immunosorbent assay*”). Os dois últimos testes são os mais utilizados e apresentam uma boa correlação (Künzel and Joachim, 2010 Künzel and Fisher, 2018).

Desoubeaux *et al.* (2017) desenvolveram um *Western blot* para detecção de anticorpos anti- *E. cuniculi* no soro sanguíneo. Este método tem uma sensibilidade para detecção de IgG e IgM superior à da IFI e da ELISA e a especificidade também é elevada (88,4 *versus* 76,1% para a detecção de IgG e 84,3 *versus* 70,4% para a detecção de IgM). Porém, o *Western blot* (WB) é moroso e mais dispendioso, não sendo a escolha ideal para aplicar numa rotina diária como auxiliar ao diagnóstico de infecção por este parasita.

**Tabela 1** – Valores de sensibilidade e especificidade dos testes serológicos mais utilizados no diagnóstico de encefalitozoonose (Adaptado de Boot *et al.*, 2000; Desoubeaux *et al.*, 2017; Cray *et al.*, 2019).

	WB IgG	WB IgM	IFI IgM	IFI IgG	ELISA IgG	ELISA IgM
<b>Sensibilidade</b>	81,9-96,2%	76,7-93,1%	98,0-100%	69,0-94,0%	63,0-90,0%	11,0-40,0%
<b>Especificidade</b>	85,9-97,6%	75,6-91,4%	98,0-100%	91,0-100%	91,0-100%	91,0-100%

A interpretação dos resultados seropositivos nos testes serológicos permite, não só, confirmar a exposição ao parasita, como diferenciar o estado da infecção (ativa/aguda *versus* crónica/latente). Se for detetado um aumento apenas dos títulos das IgM, é indicativo de que

a infecção é aguda e recente. Quando há, simultaneamente, aumento dos títulos das IgM e das IgG, a infecção está ativa, mas não é possível distinguir se se trata de uma infecção recente, uma agudização de uma infecção crónica ou uma reinfeção. A presença de títulos elevados de IgG, é indicativa de uma infecção crónica ou latente. O título de IgG pode permanecer aumentado durante períodos longos e a flutuação do título varia de animal para animal (Jeklova *et al.*, 2010; Varga, 2014).

Pensa-se que a resposta imunitária seja diretamente proporcional à carga parasitária. Quanto maior o número de esporos no organismo, mais altos serão os títulos de anticorpos. No entanto, segundo Keeble (2011) e Harcourt-Brown (2004), a gravidade dos sinais clínicos e das lesões histopatológicas encontradas no *post mortem* não está correlacionada com o aumento do título de anticorpos circulantes.

#### **2.3.4.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês “*Polimerase Chain Reaction*”)**

A reação em cadeia da polimerase (PCR) pode ser realizada em amostras de urina, fezes, líquido cefalorraquidiano (LCR) ou material liquefeito da lente.

Este método baseia-se na deteção de ADN parasitário. No entanto, várias equipas de investigadores demonstraram que a presença de ADN nos fluídos corporais não se correlaciona com os sinais clínicos de doença e pode ser negativa em animais sintomáticos (Csokai *et al.*, 2009b; Künzel and Fisher, 2018).

Na urina, a excreção de esporos é intermitente, pelo que um resultado de PCR negativo não exclui a infecção por *E. cuniculi* da lista de diagnósticos diferenciais e será mais frequente em coelhos com infecção crónica e sintomatologia neurológica. Um resultado de PCR positivo confirma uma infecção recente e é mais provável em coelhos com doença renal concomitante. Keeble (2011), recomenda a recolha de urina durante um período de três dias consecutivos, de modo a maximizar a probabilidade de obter um resultado positivo.

O LCR tem pouca utilidade como amostra biológica para PCR devido à baixa sensibilidade e não deve ser utilizado, tal como a urina, em coelhos com sintomatologia neurológica ou níveis de creatinina aumentados (Künzel and Fisher, 2018; Csokai *et al.*, 2009b). Na prática, a PCR tem uma boa capacidade de deteção do ADN parasitário quando a amostra biológica é material liquefeito da lente ou de massa intraocular, recolhido durante a facoemulsificação em coelhos com uveíte facoclástica (Csokai *et al.*, 2009b; Varga, 2014).

### **2.3.4.3. Proteinograma**

A avaliação das proteínas séricas através da eletroforese de proteínas tem vindo a ser descrita por alguns autores como um método auxiliar no diagnóstico de infeção por *E. cuniculi* em coelhos (Cray *et al.*, 2013).

O rácio albumina/globulina (rácio A/G) é um parâmetro útil para determinar em coelhos suspeitos de encefalitozoonose. Tendencialmente, os animais infetados apresentam valores de rácio A/G menores do que animais saudáveis. A albumina é uma proteína de fase aguda negativa, o que não corrobora tal resultado. No entanto, esta discordância pode ser justificada pelo facto de a infeção por *E. cuniculi* apresentar características de doença inflamatória crónica, mesmo quando aparenta ser, clinicamente, um processo agudo. Por sua vez, o nível de gamaglobulinas nestes animais está aumentado, principalmente em casos de infeção ativa, e o nível de betaglobulina não tende a sofrer alterações em relação aos valores fisiológicos (Cray *et al.*, 2013; Rich, 2010).

A análise das proteínas de fase aguda também tem sido usada no diagnóstico desta doença. São quantificadas a haptoglobina, a amilóide sérica A e a proteína C-reativa (CRP, do inglês "*C-Reactive protein*") (Cray *et al.*, 2013). Embora não seja específica, a CRP pode revelar a presença de um processo inflamatório 24 horas após um estímulo agressor. Segundo um estudo realizado por Cray *et al.* (2015), o valor fisiológico da CRP no coelho doméstico situa-se no intervalo 0-20 mg/L, enquanto os animais suspeitos de encefalitozoonose apresentam níveis aumentados de CRP que variam entre 2 e 230 mg/L. Os níveis mais elevados foram diagnosticados em coelhos com sintomatologia clínica múltipla. Conclui-se que, em combinação com os resultados dos testes sorológicos, um aumento da CRP potencia a especificidade destes testes na deteção de infeção por *E. cuniculi* (Künzel and Fisher, 2018).

A realização deste tipo de análises durante e/ou no final do protocolo terapêutico permite avaliar a progressão da doença e a resposta ao tratamento, auxiliando o clínico na decisão da descontinuação da terapêutica e indicando se houve resolução do caso (Rich, 2010).

### **2.3.4.4. Hematologia e análises bioquímicas**

De um modo geral, não há alterações hematológicas diretamente relacionadas com a infeção por *E. cuniculi*. Os parâmetros que poderão estar alterados nas análises bioquímicas devem-se à insuficiência renal que pode, ou não, estar presente (Varga, 2014).

#### **2.3.4.5. Outros meios auxiliares de diagnóstico**

São vários os meios auxiliares ao diagnóstico de infecção por *E. cuniculi* descritos na literatura. A maioria tem sido aplicada em coelhos de laboratório e não são utilizados na prática clínica.

- Testes intradérmicos: apresentam baixa sensibilidade e, atualmente, já não são utilizados;

- Detecção de esporos em amostras de urina: requer o uso de corantes específicos que, quando aplicados ao sedimento urinário, coram os esporos, permitindo a sua visualização ao microscópio ótico. É um método alternativo à PCR, por ser mais rápido e económico. No entanto, a sua sensibilidade é bastante menor, não permitindo diferenciar as espécies de microsporídeos. Um resultado negativo neste teste não exclui a infecção por *E. cuniculi* dos diagnósticos diferenciais (Künzel and Joachim, 2010).

- Análise do LCR: demonstrou-se, experimentalmente, que modificações no LCR podem ser sugestivas de infecção por *E. cuniculi* (Künzel and Fisher, 2018). Coelhos infetados têm níveis aumentados de proteínas e pleocitose linfomonocítica. Porém, tais alterações estão igualmente presentes noutras infeções e doenças inflamatórias imunomediadas a nível cerebral. O risco associado à colheita do LCR e a incapacidade de obter um diagnóstico quando este método é utilizado isoladamente, faz com que não seja o mais apropriado para um diagnóstico *in vivo*.

- Biópsia renal através de laparoscopia, para análise histopatológica: é um método em desenvolvimento, que poderá proporcionar um diagnóstico definitivo de infecção por *E. cuniculi*, em coelhos com doença renal, a partir das 9 semanas pós-infeção (Künzel and Fisher, 2018; Keeble, 2011; Harcourt-Brown, 2004).

- Rácio proteína/creatinina urinárias (UPC): é uma ferramenta útil para decisão sobre o prognóstico e avaliação da progressão da doença, principalmente em coelhos infetados por *E. cuniculi* com manifestações do foro renal. As alterações encontradas são características de lesão renal (proteinúria persistente e presença de sedimento inativo) (Reusch *et al.*, 2009).

#### **2.3.4.6. Necropsia e diagnóstico *post mortem***

O diagnóstico *post mortem* baseia-se, principalmente, na avaliação das alterações histopatológicas dos órgãos-alvo, cérebro e rins. Este método é o que tem maior sensibilidade e o único que permite um diagnóstico definitivo de infecção por *E. cuniculi*, quando é possível a identificação do parasita.

Ao microscópio, os esporos podem ser encontrados como estruturas intracelulares, Gram-positivas, em forma de bastonete e refráteis. Para a sua deteção usam-se colorações como a *Ziehl Neelsen* (ZN) e a *Acid-Fast-Trichrome* (AFT). Segundo Csokai *et al.* (2009b), a coloração ZN tem maior sensibilidade em comparação com a AFT. Este investigador refere também que os melhores resultados são obtidos em amostras de cérebro. De facto, é mais frequente que os esporos persistam e sejam encontrados no cérebro, uma vez que a eliminação do parasita pelo rim é frequente (Keeble, 2011; Künzel and Joachim, 2010).

As lesões histopatológicas encontradas nestes órgãos são tipicamente não supurativas e granulomatosas, refletindo a nefrite intersticial crónica e a meningoencefalite granulomatosa (Csokai *et al.*, 2009a; Künzel and Joachim, 2010).

No exame *post mortem*, também é possível identificar lesões relacionadas com outros diagnósticos diferenciais. Podem ser afeções concomitantes ou predisponentes da infeção por *E. cuniculi*, devido à imunossupressão que induzem. (Keeble, 2011; Harcourt-Brown, 2004).

### **2.3.5. Controlo e Prevenção**

Embora ainda não sejam claros quais os fatores que predispõem à infeção por este parasita, sabe-se que coelhos sujeitos a episódios de stress são mais suscetíveis.

Neste âmbito, as características do alojamento e as práticas de manejo do animal devem ser avaliadas, principalmente se o coelho já manifestou ou exhibe sinais clínicos compatíveis com encefalitozoonose.

O bem-estar animal deve ser promovido através da instalação de um espaço apropriado à sua locomoção, de um ambiente adequado às características e à expressão dos comportamentos da espécie e da lavagem e desinfeção apropriada dos compartimentos e acessórios (Bradbury, 2018; Künzel and Joachim, 2010).

Os esporos de *E. cuniculi* podem sobreviver nas superfícies até 4 semanas à temperatura ambiente e até 6 semanas no exterior, a uma temperatura de 22°C (Künzel and Fisher, 2018). São destruídos pela maior parte dos desinfetantes de uso comum (como por exemplo, lixívia a 1% e etanol a 70%) e podem ser eliminados após uma exposição de 30 segundos a estes desinfetantes. De forma a mitigar o risco de contágio, as superfícies devem ser devidamente desinfetadas com estes produtos, com destaque para a desinfeção das marquesas dos centros de atendimento médico-veterinário, no intervalo entre consultas.

Os esporos também podem ser eliminados por ação da temperatura, fervura durante 5 minutos ou autoclavagem a 120°C durante 10 minutos (Künzel and Joachim, 2010; Keeble, 2011; Harcourt-Brown, 2004).

Quando há suspeita de infecção, todos os animais devem ser testados serologicamente. Os seropositivos devem ser separados e isolados para monitorização clínica e tratamento. Todo o grupo deve ser retestado ao fim de 30 dias e os coelhos seropositivos isolados, e assim sucessivamente, até controlo do surto. A entrada de novos coelhos adquiridos, implica um período de quarentena prévio de 4 semanas no mínimo, e a realização de testes serológicos.

A nível do alojamento, devem desinfetar-se, após lavagem, todas as jaulas e equipamentos, e colocar os comedouros acima do solo e recorrer a bebedouros em garrafa, para reduzir o risco de conspurcação com urina e fezes (Harcourt-Brown, 2004; Keeble, 2011).

O mais importante são as boas práticas de higiene, quer em coelhos que vivam em grupo, quer em animais que vivam isoladamente e/ou que contactem com terceiros. Por parte de médicos veterinários e de tutores, devem ser utilizadas luvas e a lavagem das mãos deve ser imediata após contacto com animais seropositivos e/ou com os seus pertences, evitando o contacto direto com a urina (Weese & Fulford, 2010).

Atualmente, é recomendada a administração profilática de fenbendazol que é eficaz na proteção dos coelhos contra a infecção por *E. cuniculi* (Abu-Akkada and Oda, 2016).

### **2.3.6. Tratamento**

Até à data, não existe nenhum protocolo terapêutico homologado para a encefalitozoonose. Como tal, os protocolos em uso baseiam-se na experiência clínica individual e em relatos sem evidência científica.

A estruturação de protocolo terapêutico na encefalitozoonose deve ter como base os seguintes cinco objetivos: (1) inibição da proliferação dos esporos; (2) redução da resposta inflamatória; (3) redução do potencial de contaminação; (4) resolução de afeções concomitantes; (5) instituição de terapêutica de suporte.

A resposta ao tratamento é bastante variável e o sucesso depende muito do estado da infecção. Os casos crónicos estão frequentemente associados a doença neurológica, a menor sucesso terapêutico e menor taxa de recuperação. Ainda assim, alguns animais conseguem recuperar espontaneamente do estado de doença sem que seja necessária a instituição de qualquer terapêutica (Varga, 2014; Künzel and Fisher, 2018; Keeble, 2011).

### 2.3.6.1. Tratamento sintomático

#### a) Abordagem geral

A instituição de terapêutica dirigida à encefalitozoonose é um processo complexo que recorre a vários grupos de fármacos:

- Benzimidazóis: atuam por inibição dos microtúbulos, prevenindo a extrusão do filamento polar e a invasão das células-alvo pelo parasita. Dentro deste grupo, substâncias como o albendazol, o oxbendazol e o fenbendazol têm demonstrado eficácia contra a infecção por *E. cuniculi* (Keeble, 2011).

O uso de albendazol nos coelhos foi extrapolado da Medicina Humana para a prática veterinária. O albendazol interfere na polimerização do parasita pela ligação às suas beta-tubulinas, afetando o uso de glucose e dificultando a gênese do seu citoesqueleto. No entanto, a administração do albendazol resulta numa redução da carga parasitária sem grande influência no grau de infecção. Além disso, o albendazol causa alterações embriotóxicas e teratogênicas nos coelhos, razão pela qual o seu uso tem sido desaconselhado (Sieg *et al.*, 2012).

O fenbendazol tem boa capacidade de penetração da barreira hematoencefálica nos animais infetados por *E. cuniculi* e é eficaz tanto na prevenção como no tratamento da doença. Estudos laboratoriais comprovaram que o fenbendazol destrói os parasitas no cérebro e reduz a manifestação de sinais clínicos. Atualmente, o fenbendazol está licenciado para uso em coelhos na dose de 20 mg/kg, por via oral, durante 28 dias, embora a posologia possa ser ajustada para valores compreendidos entre 5 e 20 mg/kg (Keeble, 2011; Sieg *et al.*, 2012; Künzel and Fisher, 2018; Carpenter, 2018). Efeitos secundários como necrose intestinal e hipoplasia/aplasia medular têm sido relatados com o uso de benzimidazóis em coelhos, pelo que a sua aplicação deve respeitar rigorosamente as doses e os intervalos de tempo recomendados e ser acompanhada de monitorização dos parâmetros hematológicos (Künzel and Fisher, 2018).

- Glucocorticóides: o seu uso está indicado numa abordagem anti-inflamatória, pois a inflamação associada à rutura celular e à libertação dos esporos nos tecidos vizinhos pode justificar grande parte das manifestações clínicas (Künzel and Fisher, 2018). Glucocorticóides como a prednisolona ou a dexametasona têm capacidade de suprimir a resposta inflamatória, mas o seu uso deve ser limitado, pois induzem imunossupressão a longo prazo. Em casos de sintomatologia neurológica aguda, pode ser administrada uma dose única de dexametasona (1-2 mg/kg). Se for necessário prolongar a sua utilização, a dose deve ser reduzida para 0,2 mg/kg. Para além da ação anti-inflamatória, a dexametasona tem também efeito anti-

edematoso (Sieg *et al.*, 2012; Harcourt-Brown, 2004; Varga, 2014). Adversamente, os coelhos podem ser sensíveis aos glucocorticoides, manifestando toxicidade hepática e a nível da glândula adrenal e dos órgãos linfoides (Sieg *et al.*, 2012).

- Antibióticos: as fluoroquinolonas e as tetraciclinas têm ação inibitória sobre o crescimento dos microsporídeos *in vitro* (Keeble, 2011; Künzel and Fisher, 2018). O seu uso deve ser limitado ao tratamento de infeções bacterianas primárias ou secundárias e não está recomendado em casos em que a otite tenha sido excluída dos diagnósticos diferenciais. As tetraciclinas têm também potencial anti-inflamatório e anti-apoptótico, pelo que o seu uso pode estar indicado na abordagem terapêutica à inflamação do SNC (Sieg *et al.*, 2012).

- Outros fármacos menos utilizados: os antifúngicos podem ser úteis, uma vez que o parasita apresenta características comuns aos fungos. Estudos recentes e focados no tratamento de pacientes humanos com infeção por *E. cuniculi* demonstraram que a polioxina D e a nicomicina Z podem ser eficazes no combate à encefalitozoonose (Varga, 2014). Também a citocina interferão-gama tem sido aplicada no tratamento de pacientes humanos com imunossupressão (Varga, 2014). Há expectativas de que seja possível fazer uma extrapolação bem-sucedida destes protocolos para a prática veterinária em coelhos infetados por *E. cuniculi*.

## **b) Abordagem à sintomatologia ocular**

No tratamento da uveíte facoclástica, está recomendado o uso tópico de esteroides.

Williams (2012) sugere o uso de acetato de prednisolona, 3 vezes ao dia, através da aplicação de uma gota no olho afetado, para controlo da inflamação. Outros fármacos que podem ser utilizados com esse objetivo são o metilsulfonilmetano, solução oftálmica a 15% (aplicação tópica, q12h) e doxiciclina monoidratada (2.5 mg/kg, PO, q12h). A administração de dexametasona e tetraciclina sistémicas também pode estar indicada.

A facoemulsificação é a única solução permanente com sucesso. Esta cirurgia consiste na remoção do material da lente e dos parasitas. Em casos específicos, a enucleação pode ser a derradeira alternativa (Carpenter, 2018; Felchle and Sigler, 2002; Keeble, 2011).

### **2.3.6.2. Terapêutica de suporte**

Durante a fase aguda da doença, e consoante o quadro clínico, podem ser necessárias terapêuticas de suporte, principalmente em coelhos com sintomatologia neurológica com dificuldades de locomoção e perda de equilíbrio.

É benéfico para estes animais que o bebedouro, o comedouro e o tabuleiro sanitário sejam de fácil acesso e de simples utilização. Em casos em que o animal não consiga alimentar-se ou beber água autonomamente, deve ser instituída fluidoterapia e suplementação nutricional (ex. *Oxbow® Critical Care*).

Também merece especial atenção o material utilizado nas camas, para animais com dificuldades em permanecer em estação, que rodopiem sobre si mesmos ou que estejam constantemente em decúbito lateral, de forma a providenciar conforto e a diminuir a probabilidade de feridas e lesões. A estes animais podem ser facultadas toalhas e almofadas para que se encostem e lhes permita adotar uma posição mais confortável ou a jaula poderá ter de ser almofadada, nos casos mais graves, de modo a prevenir traumatismos (Sieg *et al.*, 2012; Künzel and Fisher, 2018; Buseth and Saunders, 2015).

Farmacologicamente, é sugerido o uso de benzodiazepinas como o diazepam (1-2 mg/kg, por via SC ou IV) ou midazolam (0,5-2 mg/kg, por via SC ou IV) para controlo das tonturas e da desorientação em coelhos com manifestações vestibulares agudas. Esses animais podem também beneficiar de medicação comum ao tratamento de labirintite na Medicina Humana, como a proclorperazina (0,2-0,5 mg/kg, PO, q8h) (Keeble, 2011; Harcourt-Brown, 2004).

#### **2.3.6.3. Tratamento profilático**

Como referido anteriormente, o fenbendazol pode prevenir a infeção dos coelhos por *E. cuniculi*. Assim, durante a quarentena dos coelhos adquiridos, pode ser aplicado um tratamento profilático, que consiste na sua administração numa dose de 20 mg/kg (PO, q24h) durante 9 dias (Carpenter, 2018).

#### **2.3.6.4. Terapias alternativas**

A fisioterapia melhora a recuperação motora e sensorial de coelhos com síndrome de disfunção vestibular. A sua aplicação consiste em auxiliar o animal a deslocar-se e na realização de exercícios promotores de manutenção da posição de estação, que reduzam o grau de inclinação da cabeça e que melhorem a capacidade de caminhar e correr (Künzel and Fisher, 2018).

A hidroterapia pode ser tolerada por alguns coelhos e, à semelhança da fisioterapia, revela-se útil no processo de reabilitação, principalmente em animais com paresia dos membros posteriores (Keeble, 2011).

### 2.3.7. Prognóstico e taxa de recuperação

Da pesquisa bibliográfica realizada conclui-se que, após realização de protocolo terapêutico, a taxa de recuperação de coelhos com manifestação neurológica de encefalitozoonose é superior a 50% (Künzel *et al.*, 2008; Sieg *et al.*, 2012; Keeble, 2011; Künzel and Fisher, 2018; Varga, 2014).

No entanto, os protocolos utilizados são variáveis e os desenhos experimentais conferem alguma incerteza na extrapolação dos resultados. Segundo Künzel *et al.* (2008), o uso combinado de fenbendazol com oxitetraciclina ou enrofloxacin+dexametasona ou prednisolona, resultou numa taxa de recuperação de 54,0%. Sieg *et al.* (2012) recorreram a um protocolo que incluiu o uso de fenbendazol+oxitetraciclina+dexametasona, tendo 84,6% dos coelhos tratados sobrevivido até 6 meses após o episódio de doença.

Nalguns animais, embora a medicação promova a eliminação dos esporos do SNC, nem sempre há reversão dos sinais clínicos e as manifestações neurológicas como inclinação da cabeça, podem persistir até ao fim da sua vida (Künzel and Fisher, 2018).

O prognóstico em coelhos com sintomatologia ocular tende a ser bastante bom. Ao invés, a anemia em animais com síndrome de disfunção vestibular e a insuficiência renal crónica são indicadores de mau prognóstico (Keeble, 2011; Varga, 2014; Csokai *et al.*, 2010).

Numa investigação levada a cabo por Pio (2018), foram avaliados fatores intrínsecos e sinais clínicos com capacidade para influenciar o prognóstico dos animais seropositivos a *E. cuniculi*. As seguintes características foram identificadas como sendo desfavoráveis ao prognóstico: idade igual ou superior a 3 anos; apresentação de quadro clínico renal; anorexia; presença de inclinação da cabeça marcada; paresia dos membros posteriores.

### 2.4. Potencial zoonótico

Dezassete espécies incluídas no Filo Microsporidia, são potencialmente zoonóticas.

Está demonstrado que os genótipos I, II e III de *E. cuniculi* têm potencial zoonótico. Os mais isolados em pacientes humanos infetados são o III (“*dog strain*”) e o I (“*rabbit strain*”). O genótipo I é mais frequente em cidadãos europeus com coelhos de estimação (Snowden, 2004).

O aumento de casos de microsporidioses em pacientes humanos ocorreu nos anos 80 do século XX, durante a pandemia da SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida). Um estudo realizado por Bergquist *et al.* (1984), quantificou em 33,0% a seroprevalência de anticorpos anti- *E. cuniculi* numa amostra de suecos pertencentes a um grupo de risco de infeção por HIV. No entanto, o primeiro caso conhecido de infeção por *E. cuniculi* em pacientes

humanos, foi descrito por Matsubayashi *et al.* (1959), num jovem com sintomatologia convulsiva.

Dada a natureza oportunista destes organismos, são mais suscetíveis os indivíduos cujo sistema imunitário seja imaturo, como as crianças, ou que estejam em imunossupressão, como pacientes infetados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), sujeitos a transplantes de órgãos e doentes oncológicos. Em turistas que viajaram no período pré-infeção e em pessoas que usam lentes de contacto também já foram diagnosticadas microsporidioses (Lobo *et al.*, 2012; Weiss and Becnel, 2014; Didier *et al.*, 2005). Alguns estudos demonstraram que indivíduos imunocompetentes podem, igualmente, infetar-se mas manter-se assintomáticos (Wesolowska *et al.*, 2019).

A infeção pode ocorrer por contacto direto, através de lesões existentes na pele ou nas mucosas, e por via sexual. Nalgumas espécies de primatas e noutros mamíferos, foram relatados casos de transmissão transplacentar, mas essa via ainda não foi descrita no Homem (Kicia *et al.*, 2019). A maioria das infeções resultam da ingestão de água e alimentos conspurcados com esporos excretados na urina, fezes e secreções respiratórias de indivíduos infetados. A infeção por inalação de aerossóis é rara. Neste último cenário, o epitélio pulmonar é invadido e desenvolvem-se infeções respiratórias secundárias (Kicia *et al.*, 2019; Wesolowska *et al.*, 2019).

O parasita tem sido isolado maioritariamente em recetores de transplante renal e em pacientes com SIDA, principalmente quando a imunidade celular se encontra suprimida com contagem de CD4<sup>+</sup> ≤50-100 células/μl sangue (Wesolowska *et al.*, 2019).

Casos de doença ocular relacionada com a infeção por *E. cuniculi* estão documentados em pacientes com SIDA, assim como quadros de infeção dos seios nasais e de encefalite (Weiss and Becnel, 2014).

Tal como ocorre na prática veterinária, também na Medicina Humana o diagnóstico das microsporidioses é complexo. O diagnóstico definitivo depende da observação do filamento polar através da microscopia, mas a visualização dos esporos nem sempre se verifica.

O desenvolvimento de métodos imunohistoquímicos para deteção de microsporídeos em amostras biológicas, como urina, fezes, secreções respiratórias e biópsias de tecidos, tem sido um importante auxílio no diagnóstico laboratorial desta doença. A sua aplicação permite a deteção precoce da doença, uma vez que a excreção de esporos na urina pode ocorrer até seis meses antes do aparecimento dos sinais clínicos (Wesolowska *et al.*, 2019).

Os testes serológicos fazem parte do plano de diagnóstico, no entanto, além de a sua interpretação nem sempre ser clara, está dificultada pela emergência de novas espécies de microsporídeos e pela variação da resposta imunitária dos indivíduos suspeitos de infeção (Didier *et al.*, 2005; Wesolowska *et al.*, 2019).

A terapêutica nem sempre é necessária, principalmente quando os pacientes são imunocompetentes e desenvolvem sinais clínicos ligeiros. Nesses casos, a cura clínica é atingida nalgumas semanas. A dúvida que persiste é se a carga parasitária desses pacientes é eliminada ou se desenvolvem infecções crônicas assintomáticas como os coelhos.

Quando clinicamente necessário, o protocolo terapêutico que se tem demonstrado mais eficaz é a combinação de albendazol e fumagilina. O albendazol é considerado o fármaco de eleição para microsporidioses com manifestações sistêmicas, intestinais e oculares. A fumagilina é um antibiótico usado topicamente nas manifestações oculares de encefalitozoonose, sendo altamente eficaz. Estes dois fármacos podem não ser totalmente eficientes na eliminação parasitária e na resolução da sintomatologia, pelo que a abordagem terapêutica deve ser acompanhada pela recuperação do sistema imunitário do paciente (Kicia *et al.*, 2019; Didier *et al.*, 2005).

### **3. SEROPREVALÊNCIA DE *E. CUNICULI* NUM GRUPO DE 32 COELHOS DE ESTIMAÇÃO SINTOMÁTICOS**

#### **3.1. Objetivos do estudo**

Este estudo teve três objetivos:

1. Calcular a seroprevalência de *E. cuniculi* em coelhos presentes em consulta, na Clínica Veterinària Exòtics, com suspeita clínica de encefalitozoonose;
2. Investigar a relação entre as apresentações clínicas exibidas e a presença de infecção, tal como o estado da infecção;
3. Calcular a probabilidade de obtenção de um diagnóstico de encefalitozoonose em coelhos suspeitos, através de uma abordagem presuntiva, tendo como base o exame clínico e a experiência de um médico veterinário especialista.

#### **3.2. Materiais e métodos**

##### **3.2.1. Fontes de dados**

Os dados analisados neste estudo foram recolhidos, processados, validados e compilados pela estagiária, a partir do sistema informático e das fichas clínicas dos arquivos da Clínica Veterinària Exòtics, em Barcelona.

As variáveis recolhidas e analisadas foram: a anamnese; o exame físico; e, os resultados de provas analíticas e de outros meios complementares de diagnóstico.

Período investigado: 26 de março de 2019 a 14 de março de 2020.

##### **3.2.2. População em estudo e critérios de inclusão**

Para este estudo foram selecionados 32 coelhos, de diversas raças, que cumpriam o seguinte critério de inclusão: sintomatologia compatível com encefalitozoonose e submissão ao teste de imunofluorescência indireta (IFI).

Com base nos sinais clínicos observados, os coelhos foram reunidos em 4 grupos:

1. Sinais neurológicos – Grupo SN (N=18);
2. Sinais oculares – Grupo SO (N=6);
3. Sinais renais – Grupo SR (N=2);
4. Sinais inespecíficos – Grupo SI (N=3).

Os restantes três coelhos, foram incluídos em mais do que um grupo, porque exibiam múltiplos sinais clínicos.

### **3.2.3. Procedimentos de diagnóstico**

Todos os coelhos foram sujeitos a um exame de estado geral detalhado. Nos casos em que a sintomatologia assim o exigiu, a avaliação física foi complementada com observação do canal auditivo externo e com exame neurológico e/ou oftalmológico.

Quase todos os coelhos incluídos no grupo SN (com sinais neurológicos) apresentavam síndrome vestibular, caracterizada pelas seguintes alterações, enunciadas por ordem decrescente de frequência: inclinação da cabeça; rodopiar sobre si mesmo; ataxia; nistagmo bilateral; perda de equilíbrio.

Relativamente aos sinais neurológicos menos frequentes, documentámos a ocorrência de convulsões, alterações posturais e paralisia facial.

No exame oftalmológico, a presença de uveíte facoclástica e/ou cataratas foram os sinais clínicos mais frequentes que determinaram a inclusão destes animais no grupo SO (com sinais oculares). Alguns coelhos também exibiam conjuntivite e hifema.

Por sua vez, nos coelhos inseridos no grupo SR (com sinais renais), a sintomatologia revelou-se menos consistente. A maior parte dos animais apresentava poliúria e/ou incontinência urinária. Anúria, apenas nalguns. Também constatámos alterações como desidratação e a presença de sedimento na urina.

### **3.2.4. Recolha e processamento das amostras biológicas**

Para realização dos testes serológicos, foram recolhidas amostras de sangue.

Após contenção, realizou-se o garrote acima da zona do joelho e o local de punção da veia safena foi desinfetado com álcool etílico a 70%. Sempre que necessário foi feita tricotomia no local de punção.

Recolheu-se cerca de 1mL de sangue que foi imediatamente colocado num tubo esterilizado e centrifugado.

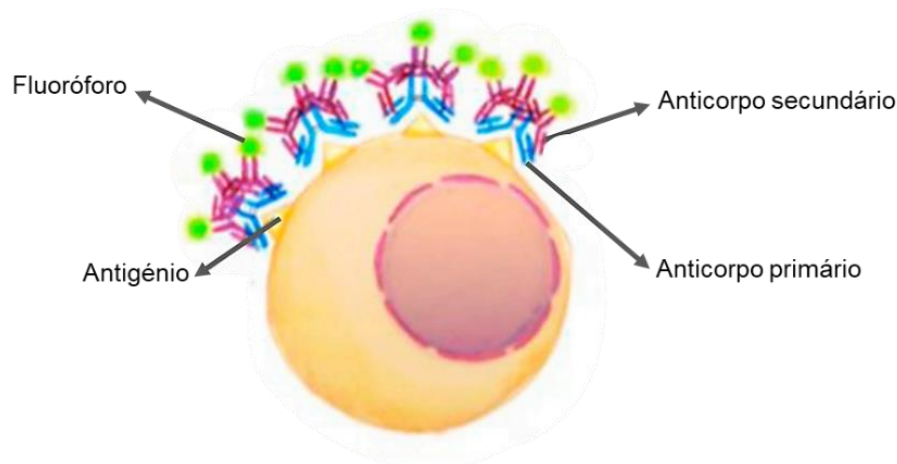
O plasma foi recolhido e armazenado a 4°C, durante um máximo de 24 horas, até ser transportado por estafetas do laboratório onde foram realizados os testes serológicos (Laboklin © – Laboratorio de Diagnóstico Clínico Veterinario).

### **3.2.5. Método de deteção de anticorpos utilizado**

A imunofluorescência é um método laboratorial no qual anticorpos são conjugados com um composto fluorescente (fluoróforo) para deteção de antígenos específicos ou de outros anticorpos com os quais ocorre a ligação (Haraldsen and Wright, 2020).

No presente estudo, o método de imunofluorescência foi a imunofluorescência indireta. Os protocolos de imunofluorescência indireta envolvem a aplicação de duas categorias de anticorpos, primários e secundários. O fluoróforo encontra-se conjugado com os anticorpos secundários.

Na testagem para encefalitozoonose, é utilizada uma preparação que contém antígenos de *E. cuniculi*, à qual se adiciona o plasma do paciente após diluição. Se o coelho tiver anticorpos específicos (IgG e IgM), há ligação aos antígenos e formam-se complexos anticorpo-antígeno. Numa segunda fase, são adicionados os anticorpos secundários – anticorpos anti-espécie – conjugados com o fluoróforo. Através da ligação destes aos complexos anticorpo-antígeno, é possível a sua visualização por microscopia de fluorescência, com base na cor fluorescente emitida (Joshi and Dihua, 2017; Haraldsen and Wright, 2020).



**Figura 8** – Esquema: imunofluorescência indireta (Adaptado de Joshi and Dihua, 2017).

Este protocolo é realizado recorrendo a várias diluições de plasma e o título de anticorpos presente é determinado pela maior diluição em que é visualizada fluorescência.

As diluições utilizadas foram 1:80, 1:320, 1:640 e 1:1280, e o valor de *cut-off* definido pelo Laboklin © foi 1:80. Amostras que não exibiram fluorescência na diluição de 1:80 foram consideradas negativas, enquanto que as amostras cuja fluorescência foi observada em diluições superiores a 1:80 foram consideradas positivas. Resultados “*borderline*”, com fluorescência presente na diluição inicial de 1:80, foram considerados negativos neste estudo.

### **3.2.6. Plano terapêutico**

Aos coelhos seropositivos foi administrado fenbendazol (Panacur®), na dose de 5 mg/kg, PO, q24h, durante 28 dias. Receberam ainda tratamento dirigido à restante sintomatologia, comorbilidades e necessidades individuais.

### **3.2.7. Análise estatística**

Os dados recolhidos foram inseridos, validados, processados e analisados nos programas informáticos *Excel*® 2010 (*Microsoft Office 365*) e *IBM SPSS Statistics*® v25.

Inicialmente, foi realizada uma análise exploratória e estatística descritiva, obtendo-se frequências absolutas, médias, medianas e desvio padrão.

Para identificar associações estatísticas, foram utilizadas tabelas de contingência e o teste de Qui-quadrado de *Pearson*. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

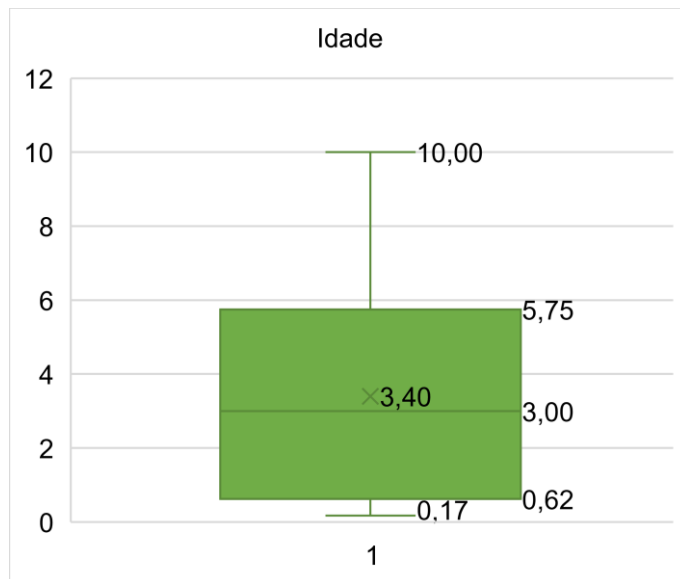
## **3.3. Resultados**

### **3.3.1. Caracterização do grupo investigado**

De modo a averiguar a sua influência na ocorrência de infeção por *E. cuniculi*, foram documentados e analisados fatores intrínsecos de doença dos animais em estudo. Os dados recolhidos e apresentados são relativos a: idade, sexo e raça.

#### **3.3.1.1. Idade**

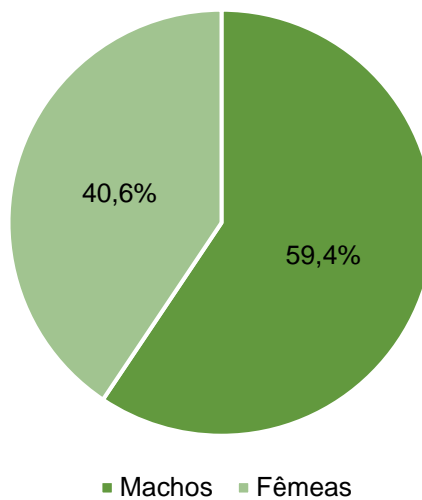
Os coelhos tinham idades compreendidas entre 2 meses e 10 anos, apresentando uma média etária de 3 anos e 5 meses (N=32). A mediana e desvio-padrão foram 3,0 e 2,7 anos, respetivamente.



**Figura 9** – Distribuição etária dos coelhos investigados (N=32).

### 3.3.1.2. Sexo

Os machos foram o sexo mais representado (n=19; 59,4%) (Figura 10).



**Figura 10** – Distribuição por sexo dos coelhos investigados (N=32).

### 3.3.1.3. Raça

Os animais pertenciam a 7 raças de coelho doméstico cuja distribuição está resumida na Tabela 2, de acordo com o resultado da imunofluorescência indireta.

**Tabela 2** – Distribuição dos coelhos seropositivos e seronegativos consoante as raças (N=32).

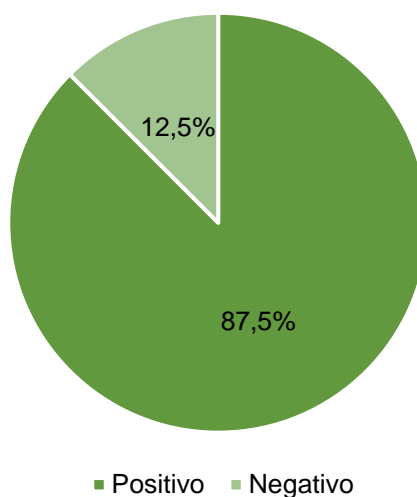
	Belier	Anão	Mini Lop	Cabeça de Leão	Angorá	Holandês	Indeterminada	TOTAL
<b>Seropositivo</b>	4	3	2	2	1	1	15	28
<b>Seronegativo</b>	1	0	0	1	0	0	2	4

Para avaliação da associação estatística agruparam-se as raças puras num grupo e a raça indeterminada noutra. Não foi encontrada evidência de associação estatística entre a raça do coelho e a infeção por *E. cuniculi* ( $p=0,893$ ).

### 3.3.2. Seroprevalência

Os resultados das provas serológicas permitiram averiguar que apenas quatro (12,5%) coelhos não apresentaram anticorpos anti-*E. cuniculi*.

Os restantes vinte e oito coelhos (87,5%) foram seropositivos à pesquisa de anticorpos anti-*E. cuniculi*.



**Figura 11** – Distribuição dos coelhos investigados com base nos resultados das provas serológicas (N=28).

### 3.3.3. Sinais Clínicos

A maioria dos animais examinados, apresentavam sinais clínicos neurológicos (n=18; 56,3%), seguida por sinais clínicos oculares (n=6; 18,8%). O grupo com sinais clínicos renais foi constituído por apenas dois animais (6,3%). Três coelhos (9,4%) exibiram sinais clínicos inespecíficos (Figura 12).

Houve ainda dois animais com sintomatologia renal e neurológica em simultâneo (6,3%) e um coelho com sinais clínicos oculares e neurológicos (3,1%) (Figura 12).

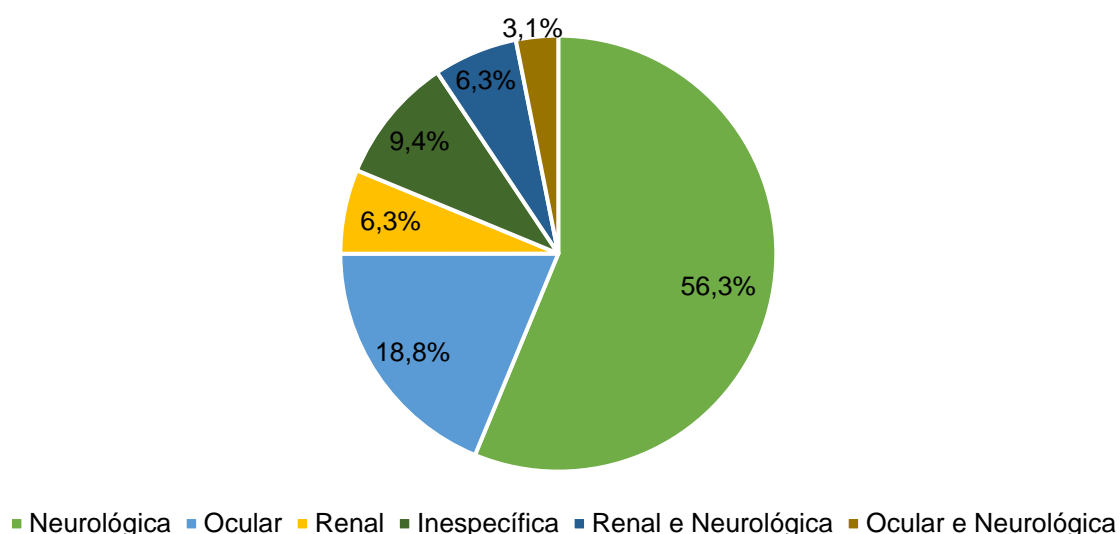
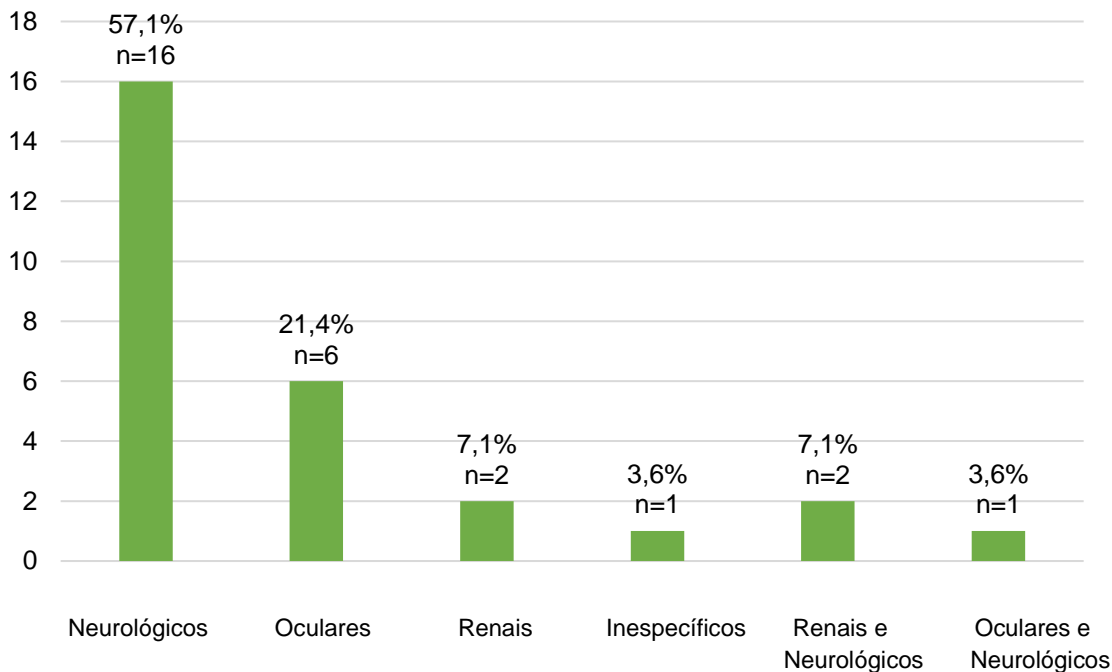


Figura 12 – Distribuição das apresentações clínicas (N=32).

### 3.3.4. Distribuição dos sinais clínicos consoante os resultados das provas serológicas.

A distribuição dos sinais clínicos apresentados pelos coelhos seropositivos assemelha-se à distribuição verificada no grupo geral e é sintetizada na Figura 13.

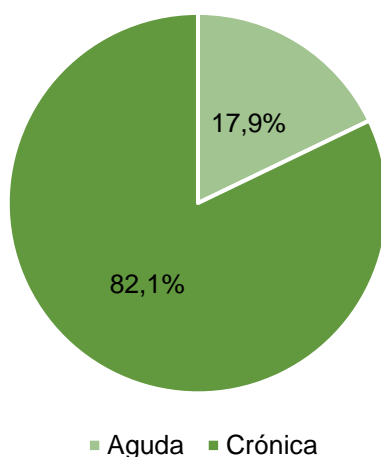
Por sua vez, os quatro animais (12,5%) que testaram seronegativos à pesquisa de anticorpos anti-*E. cuniculi*, revelaram apenas duas apresentações clínicas: neurológica (n=2; 50%); inespecífica (n=2; 50%).



**Figura 13** – Distribuição dos sinais clínicos nos coelhos seropositivos (N=28).

### 3.3.5. Estado da infeção

De acordo com a dinâmica entre as imunoglobulinas detetadas, nomeadamente da deteção de títulos elevados de IgG e ausência de aumento de IgM na imunofluorescência indireta, concluiu-se que 82,1% dos coelhos tinham infeção crónica por *E. cuniculi* (n=23). Identificámos apenas cinco (17,9%) casos de infeção aguda (Figura 14).



**Figura 14** – Estados de infeção identificados (N=28).

### 3.3.6. Distribuição dos animais seropositivos consoante o sexo

Dos 28 coelhos que apresentaram anticorpos anti-*E. cuniculi*, 17 (60,7%) eram machos e 11 (39,3%) eram fêmeas (Figura 15).

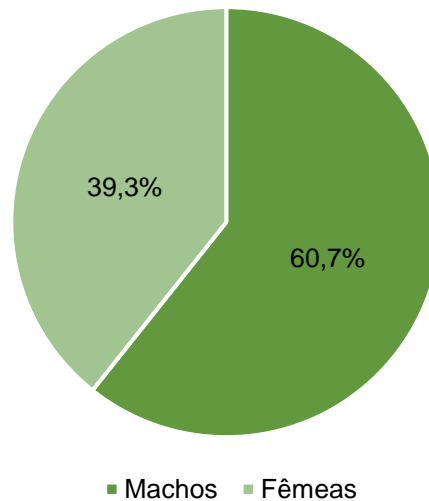


Figura 15 – Distribuição por sexo dos coelhos seropositivos (N=28).

Não foi encontrada evidência de associação estatística entre a variável sexo e a seropositividade para *E. cuniculi* ( $p=0,167$ ).

### 3.3.7. Distribuição dos sinais clínicos consoante o tipo de infeção

No grupo dos coelhos com encefalitozoonose crónica, a apresentação clínica neurológica foi a mais frequente ( $n=14$ ; 60,9%), seguida por sinais oculares ( $n=4$ ; 17,4%) e renais ( $n=2$ ; 8,7%). Dois (8,7%) animais tinham sintomatologia renal e neurológica em simultâneo e um (4,3%) coelho sinais clínicos inespecíficos (Tabela 3).

Os casos de infeção aguda enquadraram-se em apenas dois tipos de apresentações clínicas, neurológica e ocular, com dois animais em cada grupo e somente num coelho as alterações estavam presentes em simultâneo (Tabela 3).

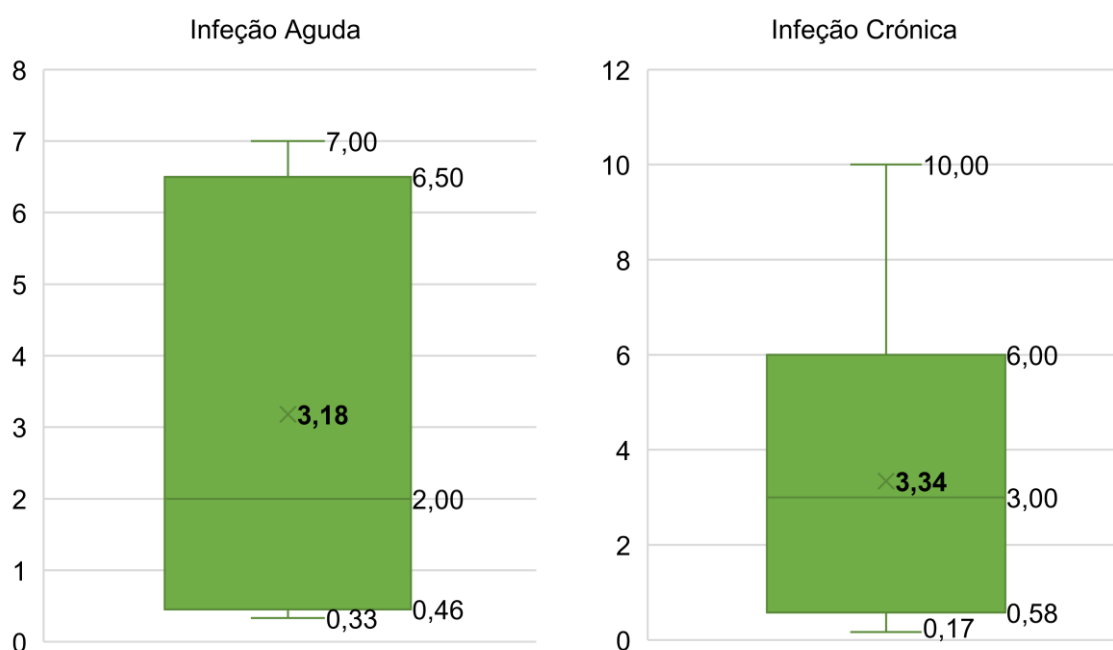
**Tabela 3** – Distribuição dos infetados agudos e crónicos consoante a sintomatologia (N=28).

	Neurológica	Ocular	Renal	Inespecífica	Renal e Neurológica	Ocular e Neurológica	TOTAL
<b>Aguda</b>	2 40%	2 40%	0 0%	0 0%	0 0%	1 20%	5 100%
<b>Crónica</b>	14 60,9%	4 17,4%	2 8,7%	1 4,3%	2 8,7%	0 0%	23 100%
<b>TOTAL</b>	16 57,1%	6 21,4%	2 7,1%	1 3,6%	2 7,1%	1 3,62%	28 100%

### 3.3.8. Distribuição etária consoante o tipo de infeção

Na Figura 16 constata-se que o grupo dos animais com infeção aguda tinham uma idade média ligeiramente inferior à do grupo com infeção crónica, sendo de 3 anos e 2 meses e 3 anos e 4 meses, respetivamente.

Porém, não foi encontrada evidência de associação estatística entre a idade do coelho e o tipo de infeção por *E. cuniculi* ( $p=0,756$ ).



**Figura 16** – Distribuição etária dos coelhos com infeção aguda e infeção crónica (N=28).

### 3.4. Discussão

Tem-se acumulado evidência científica de que a infecção por *E. cuniculi* ocorre numa prevalência considerável nas populações de coelhos domésticos, quer apresentem sinais clínicos ou assintomáticas.

No presente estudo, 87,5% dos coelhos com sinais clínicos compatíveis com encefalitozoonose testaram positivo na imunofluorescência indireta para pesquisa de anticorpos anti- *E. cuniculi*.

Num outro estudo, também realizado na Clínica Veterinària Exòtics, em Barcelona (Espanha) e com recurso à IFI, mas tendo como objeto de estudo coelhos assintomáticos, foi revelado que 45,5% apresentavam infecção por este parasita (Morera and Molina, 2012). Em países como a Suíça, Áustria, Itália e Reino Unido, a seroprevalência de *E. cuniculi* em coelhos suspeitos, obtida através de diferentes métodos (IFI, CIA e ELISA), variou entre 66,7% e 84,7%. (Müller, 1998; Harcourt-Brown and Holloway, 2003; Künzel *et al.*, 2008; Dipineto *et al.*, 2008, Csokai *et al.*, 2009b). De modo similar, um estudo realizado na Noruega por Haraldsen and Wright (2020), mas em coelhos saudáveis sujeitos a provas de IFI, revelou uma seroprevalência de 59,0%, o que deve ser motivo de preocupação, e reforça a necessidade de se conjugarem esforços e recursos na investigação desta doença.

A Tabela 4 compila dados sobre a seroprevalência da infecção por *E. cuniculi* em coelhos assintomáticos e sintomáticos em seis países europeus.

**Tabela 4** – Seroprevalência de infecção por *E. cuniculi* em coelhos assintomáticos e sintomáticos. (Traduzido e adaptado de Künzel and Joachim, 2010)

País	Autor(es)	Estado clínico	Técnicas utilizadas	Total de coelhos estudados	Seroprevalência (%)
<b>Noruega</b>	Haraldsen and Wright (2020)	Assintomáticos	IFI	105	59,0
<b>Portugal</b>	Patrício (2014)	Assintomáticos	CIA	55	47,3
<b>Áustria</b>	Csokai <i>et al.</i> (2009b)	Sintomáticos	IFI	33	69,7
<b>Espanha</b>	Morera and Molina (2012)	Assintomáticos	IFI	55	45,5
<b>Itália</b>	Dipineto <i>et al.</i> (2008)	Assintomáticos Sintomáticos	CIA, ELISA	47 78	68,1 66,7
<b>Áustria</b>	Künzel <i>et al.</i> (2008)	Assintomáticos Sintomáticos	IFI	54 184	37,0 78,3
<b>Reino Unido</b>	Harcourt-Brown and Holloway (2003)	Assintomáticos Sintomáticos	ELISA	38 87	36,8 69,0

No presente estudo, a maioria dos animais seropositivos exibiu apresentações clínicas neurológicas (67,8%), das quais a mais representada foi a síndrome vestibular, manifestando-se frequentemente pela presença de inclinação da cabeça. Este resultado é concordante com o reportado por Harcourt-Brown and Holloway (2003), Künzel *et al.* (2008) e Dipineto *et al.* (2008), que quantificaram a presença de sinais clínicos neurológicos nos coelhos investigados num intervalo compreendido entre 71,7% e 77,1%.

A segunda apresentação clínica mais frequente foi a ocular. Em 18,9% dos animais observou-se uveíte facoclástica.

Apenas 7,1% dos coelhos seropositivos apresentavam alterações do foro renal isoladas e com sintomatologia inconsistente. Observou-se incontinência urinária em alguns animais, mas como já referimos, não foi possível apurar se a incontinência urinária era consequência de lesões a nível do sistema urinário ou de lesões neurológicas.

Uma proporção considerável (14,3%) dos coelhos seropositivos apresentava sintomatologia múltipla ou inespecífica. A ocorrência de vários quadros clínicos em simultâneo também foi descrita por Harcourt-Brown and Holloway (2003) e por Künzel *et al.* (2008). Esta multiplicidade de apresentações clínicas torna o diagnóstico de encefalitozoonose ainda mais desafiante e exige cuidados de saúde redobrados, uma vez que a recuperação de um animal com infeção multisistémica é mais morosa e complicada.

Não foram encontradas associações estatísticas entre os fatores determinantes de doença intrínsecos dos coelhos investigados, nomeadamente a raça, o sexo e a idade, com a frequência ou o tipo de infeção por *E. cuniculi*.

A frequência de machos seropositivos (60,7%) foi superior à de fêmeas (39,3%). A maioria dos estudos reporta que não existe associação estatística entre o sexo do animal e a prevalência de *E. cuniculi* (Keeble and Shaw, 2006; Jeklova *et al.*, 2010; Patrício, 2014; Haraldsen and Wright, 2020), mas Harcourt-Brown (2004) e Pio (2018) encontraram associação estatística entre o sexo masculino e a ocorrência de infeção.

Relativamente à idade, destacamos que 5 animais tinham idade igual ou inferior a 6 meses, sendo, portanto, considerados coelhos jovens. Apenas um deles testou positivo à pesquisa de IgG e IgM, os restantes coelhos testaram apenas positivos à pesquisa de IgG. Considerando que as IgG são produzidas entre as primeiras 8 a 14 semanas de vida e que até cerca das 4 semanas de vida o animal está protegido por anticorpos maternos, é possível extrapolar que a infeção destes coelhos ocorreu provavelmente *in utero*. No entanto, e contrariamente ao descrito antes, apenas o coelho com encefalitozoonose aguda revelou sintomatologia ocular, os restantes exibiam alterações neurológicas, o que corrobora a possibilidade de transmissão vertical. A faixa etária dos coelhos com lesões oculares, é de 4 meses a 1 ano, indiciando infeções *in utero*.

A pequena dimensão da amostra investigada influenciou os resultados obtidos, mas outras equipas chegaram a conclusões análogas (Keeble and Shaw, 2006; Dipineto *et al.*, 2008; Jeklova *et al.*, 2010; Keeble, E. 2011; Haraldsen and Wright, 2020). De fato, a relação coelho-parasita ainda não é bem compreendida e necessita de mais investigação.

Deve enfatizar-se que, no presente estudo, não foi obtido nenhum diagnóstico definitivo de encefalitozoonose. Tal só seria possível por meio da observação do parasita através da microscopia. O diagnóstico de encefalitozoonose resultou da combinação do diagnóstico clínico com o teste de imunofluorescência indireta. O diagnóstico clínico mais provável foi obtido após exclusão de diagnósticos diferenciais, nomeadamente de otite média/interna, e face à resposta positiva aos protocolos terapêuticos instituídos.

Também não foi possível definir as infeções como ativas *versus* agudas ou crónicas *versus* latentes. Tal objetivo exigiria a realização periódica de titulação de IgM e de IgG para avaliar a sua dinâmica, além da resposta à terapêutica implementada e da evolução clínica de cada animal.

Os coelhos com infeção crónica/latente devem ser considerados animais de risco, pois qualquer fator que induza uma imunossupressão temporária pode despoletar a reativação do *E. cuniculi* e conduzir a um episódio clínico de encefalitozoonose. Os titulares destes animais devem ser informados deste risco e, sempre que for possível, a infeção deve ser monitorizada através de titulações periódicas de anticorpos, essencialmente IgM. Esta recomendação é particularmente pertinente no caso de titulares que pertençam a grupos de risco, como idosos e pacientes com doenças imunossupressoras ou que estejam a fazer medicações prolongadas com fármacos imunossupressores.

Sugere-se que futuramente sejam realizados estudos sobre outros fatores determinantes de doença, intrínsecos e extrínsecos, como: condição corporal e doenças pré-existentes; proveniência, número de coabitantes, condições de manejo e tipo de alojamento; recorrendo a amostras de maiores dimensões e salvaguardando a obtenção de um diagnóstico definitivo de infeção por *E. cuniculi*.

### **3.5. Conclusão**

O parasita *Encephalitozoon cuniculi*, como agente com potencial zoonótico, de natureza oportunista e frequente nas populações de coelhos domésticos, tem sido alvo de crescente atenção da comunidade científica e continua a ser um desafio complexo na clínica dos novos animais de companhia.

Os testes serológicos são os mais utilizados pelos clínicos para fazer o diagnóstico *in vivo* de encefalitozoonose em coelhos. A avaliação combinada dos títulos de IgM e IgG

permite determinar o estado da infecção e, desse modo, orientar o diagnóstico e decidir sobre a necessidade de terapêutica antimicrosporidiana.

Os resultados obtidos neste estudo, realizado nos coelhos de estimação dos clientes da Clínica Veterinária Exòtics em Barcelona, Espanha, reforçam a importância da inclusão da encefalitozoonose na lista de diagnósticos diferenciais sempre que se observem apresentações neurológicas em coelhos, e de propor aos titulares destes animais, uma abordagem preventiva pró-ativa baseada na titulação periódica de IgG e IgM em coelhos assintomáticos, sobretudo se os titulares sofrerem de imunossupressão temporária ou permanente.

Neste âmbito, a deteção de anticorpos anti- *E. cuniculi* deve fazer parte da rotina de avaliação do estado de saúde de coelhos domésticos na primeira consulta, permitindo averiguar precocemente se o animal é ou não portador do parasita e, desse modo, restabelecer o seu estado de saúde e mitigar o risco de transmissão.

Quando os titulares dos animais não viabilizarem a realização de testes serológicos, a utilização profilática de fenbendazol deve ser considerada. O mesmo deve suceder quando forem introduzidos animais de estatuto sanitário desconhecido num grupo de coelhos.

O combate à encefalitozoonose é um compromisso e uma missão conjunta. É importante a sensibilização dos criadores para que não sejam reproduzidos e comercializados coelhos portadores de *E. cuniculi*, promovendo a testagem dos animais durante os períodos de quarentena e mantendo rigorosos níveis de higiene e desinfeção das instalações. Este último ponto é relevante para os titulares de coelhos, principalmente se sofrerem de imunossupressão temporária ou permanente, para mitigar o risco de transmissão de microsporidioses.

Como agentes de saúde pública, e perante o crescente número de coelhos domésticos nos agregados familiares, cabe aos médicos veterinários proporem e implementarem medidas preventivas ajustadas aos perfis dos seus clientes.

#### 4. BIBLIOGRAFIA

Abu-Akkada, S. S., Oda, S. S. 2016. Prevention and treatment of Encephalitozoon cuniculi infection in immunosuppressed rabbits with fenbendazole. Iranian Journal of Veterinary Research. Volume 17, N°2, Series 55: 98-105

American Veterinary Medical Association (AVMA). 2012. *U.S. pet ownership & demographics sourcebook* - 2012 Edition

American Veterinary Medical Association (AVMA). 2018. *U.S. pet ownership & demographics sourcebook* - 2017-2018 Edition

Bergquist, R., Morfeldt-Månsson, L., Pehrson, P. O., Petrini, B., Wasserman, J. 1984. Antibody against Encephalitozoon cuniculi in Swedish Homosexual Men. Scandinavian journal of infectious diseases. 16(4): 389-391. <https://doi.org/10.3109/00365548409073966>

Bradbury, G. 2018. Behavioural Problems in Rabbits: A Clinical Approach. Sheffield: 5M Publishing

Boot R, Hansen AK, Hansen CK, Nozari N, Thuis HC. Comparison of assays for antibodies to Encephalitozoon cuniculi in rabbits. Lab Anim. 2000 Jul;34(3):281-9. doi: 10.1258/002367700780384726. PMID: 11037122.

Buseth, M. E., Saunders, R. A. 2015. Rabbit Behaviour, Health and Care. [place unknown]: CAB International. <https://doi.org/10.1079/9781780641904.0000>

Carpenter, J. W., Marion, C. J. 2018. Exotic Animal Formulary. 5th Edition. Missouri: Elsevier

Cray, C., McKenny, S., Perritt, E., Arheart, K. L. 2015. Utility of IgM titers with IgG and C-Reactive Protein quantitation in the diagnosis of suspected Encephalitozoon cuniculi infection in rabbits. Journal of Exotic Pet Medicine. 24: 356-360. <https://doi.org/10.1053/j.jepm.2015.06.017>

Cray, C., Madisen P., L., Kristopher, A., Roman, P., Künzel, F., Joachim, A. 2019. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and immunofluorescence test for determination of anti-Encephalitozoon cuniculi antibodies in sera from rabbits with different clinical and histopathological presentations. Journal of Exotic Pet Medicine. 32: 39-42. <https://doi.org/10.1053/j.jepm.2019.11.003>

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 <https://doi.org/10.1053/j.jepm.2013.08.008>

Csokai, J., Gruber, A., Künzel, F., Tichy, A., Joachim, A. 2009a. Encephalitozoonosis in pet rabbits (*Oryctolagus cuniculus*): pathohistological findings in animals with latent infection versus clinical manifestation. Parasitology research. 104: 629-635. <https://doi.org/10.1007/s00436-008-1239-2>

Csokai, J., Joachim, A., Gruber, A., Tichy, A., Pakozdy, A., Künzel, F. 2009b. Diagnostic markers for encephalitozoonosis in pet rabbits. Veterinary Parasitology. 163: 18-26. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.03.057>

Desoubeaux, G., Pantin, A., Peschke, R., Joachim, Cray, C. A. 2017. Application of Western blot analysis for the diagnosis of *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbits: exemple of a quantitative approach. *Parasitology research*. 116: 743–750. <https://doi.org/10.1007/s00436-016-5343-4>

Didier, E. S., Didier, P. J., Snowden, K. F., Shadduck J. A. 2000. Microsporidiosis in mammals. *Microbes and Infection*. 2, Issue 6: 709-720. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)00354-3](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(00)00354-3)

Didier, E. S., Maddry, J. A., Brindley, P. J., Stovall, M. E., Didier, P. J. 2005. Therapeutic strategies for human Microsporidia infections. *Expert review of anti-infective therapy*. 3(3): 419-434. <https://doi.org/10.1586/14787210.3.3.419>

Dipineto, L. Rinaldi, L., Santaniello, A., Sensale, M., Cuomo, A., Calabria, M., Menna, L. F., Fioretti, A. 2008. Serological survey for antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in pet rabbits in Italy. *Zoonoses and public health*. 55(3): 173-175. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2007.01097.x>

Felchle, L. M., Sigler, R. L. 2002. Phacoemulsification for the management of *Encephalitozoon cuniculi*-induced phacoclastic uveitis in a rabbit. *Veterinary Ophtalmology*. 5 (3): 211-215. <https://doi.org/10.1046/j.1463-5224.2002.00240.x>

Giordano, C., Weigt, A., Vercelli, A., Rondena, M., Grilli, G., Giudice, C. 2005. Immunohistochemical identification of *Encephalitozoon cuniculi* in phacoclastic uveitis in four rabbits. *Veterinary Ophtalmology*. 8 (4): 271-275. <https://doi.org/10.1111/j.1463-5224.2005.00394.x>

Girling, S. 2013. *Veterinary nursing of exotic pets*. 2nd Edition. [place unknown]: John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470690796>

Haraldsen, M., Wright, E. E. 2020. The seroprevalence of *Encephalitozoon cuniculi* among healthy pet rabbits in Norway. Norwegian University of Life Sciences, Ås. <https://hdl.handle.net/11250/2658028>

Harcourt-Brown, F. M. 2004. *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbits. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*. Volume 13, Issue 2: 86-93. <https://doi.org/10.1053/j.saep.2004.01.004>

Harcourt-Brown, F. M., Holloway, H. K. R. 2003. *Encephalitozoon cuniculi* in pet rabbits. *The Veterinary Record*. 152: 427-431. <https://doi.org/10.1136/vr.152.14.427>

Harcourt-Brown, F., Chitty, J. 2013. *BSAVA Manual of Rabbit Surgery, Dentistry and Imaging*. Gloucester: BSAVA

Hill, W. A., Brown, J. P. 2011. Zoonoses of Rabbits and Rodents. *The veterinary clinics of North America: Exotic animal practice*. 14: 519-531. <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2011.05.009>

Hutchins M. 2004. Family: Hares and rabbits. In: Devra G. Kleiman, Valerius Geist & Melissa C. McDade (Eds.), *Grzimek's Animal Life Encyclopedia*. 2<sup>nd</sup> Edition. Volume 16: Mammals V. Farmington Hills: Gale Group; p. 505-509

Jeklova, E., Jekl, V., Kovarcik, K., Hauptman, K., Koudela, B., Neumayerova, H., Knotek, Z., Faldyna, M. 2010. Usefulness of detection of specific IgM and IgG antibodies for

diagnosis of clinical encephalitozoonosis in pet rabbits. *Veterinary Parasitology*. 170: 143-148. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.01.029>

Jordan, C. N., Zajac, A. M., Snowden, K. S., Lindsay D. S. 2006. *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*. 28(2): 108-116

Joshi, S., Dihua, Y. 2017. Immunofluorescence. In: Morteza, J., Saldanha, F. & Jalali, M. (Eds.), *Basic Science for Clinical Researchers*. 1<sup>st</sup> Edition. [place unknown]: Academic Press; p. 135-150. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802077-6.00008-4>

Keeble, E. 2011. Encephalitozoonosis in rabbits – what we do and don't know. In *practice*. 33: 426-435. <https://doi.org/10.1136/inp.d6077>

Keeble, E. J., Shaw, D. J. 2006. Seroprevalence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in domestic rabbits in the United Kingdom. *Veterinary Record*. 158(16): 539-544. <https://doi.org/10.1136/vr.158.16.539>

Khan, I. A., Didier, E. S. 2004. Insights into the immune responses to microsporidia. In: Lindsay D. S. & Weiss L. M. (Eds.), *Opportunistic Infections: Toxoplasma, Sarcocystis, and Microsporidia, Volume 9: World Class Parasites*. Boston: Kluwer Academic Publishers; p. 135-157

Kicia, M., Szydłowicz, M., Cebulski, K., Jakuszko, K., Piesiak, P. Kowal, A., Sak, B., Krajewska, M., Hendrich, A. B., Kváč, M., Kopacz, Ž. 2019. Symptomatic respiratory *Encephalitozoon cuniculi* infection in renal transplant recipients. *International Journal of Infectious Diseases*. 79: 21-25. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2018.10.016>

Künzel F., Joachim, A. 2010. Encephalitozoonosis in rabbits. *Parasitology research*. 106(2): 299-309. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1679-3>

Künzel, F., Fisher, P. G. 2018. Clinical Signs, Diagnosis, and Treatment of *Encephalitozoon cuniculi* Infection in Rabbits. *The veterinary clinics of North America: Exotic animal practice*. 21: 69-82. <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2017.08.002>

Künzel, F., Gruber, A., Tichy, A., Edelhofer, R., Nell, B., Hassan, J., Leschnik, M., Thalhammer, J. G., Joachim, A. 2008. Clinical symptoms and diagnosis of encephalitozoonosis in pet rabbits. *Veterinary Parasitology*. 151: 115-124. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.11.005>

La'Toya, V. L., Bradley, C. W., Wyre, N. R. 2014. *Encephalitozoon cuniculi* in pet rabbits: diagnosis and optimal management. *Veterinary Medicine: Research and Reports*. 5: 169-180. <https://doi.org/10.2147/VMRR.S49842>

Lobo, M. L., Xiao, L., Antunes, F., Matos, O. 2012. Microsporidia as emerging pathogens and the implication for public health: a 10-year study on HIV-positive and -negative patients. *International journal for parasitology*. 42(2): 197-205. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2011.12.002>

Matsubayashi, H., Koike, T., Mikata, I., Takei, H., Hagiwara, S. 1959. A case of *Encephalitozoon*-like body infection in man. *A.M.A. archives of pathology*. 67(2): 181-187

Mitchell, M. 2008. Chapter 1: History of exotic pets. In: Mark A. Mitchell & Thomas N. Tully Jr. (Eds.), *Manual of Exotic Pet Practice*. 1<sup>st</sup> Edition. Elsevier Inc.; p. 1-3. <https://doi.org/10.1016/B978-141600119-5.50004-4>

Morera, N., Molina, L. 2012. Seroprevalencia de *Encephalitozoon cuniculi* en conejos asintomáticos del área metropolitana de Barcelona. Barcelona: Clínica Veterinària Exòtics

Müller, C. 1998. Untersuchugen zur Diagnostik, Biologie and Verbreitung von Microsporidien bei Kanichen und anderen Tierarten. [dissertação]. Universidade de Zurique

Patrício, R. F. G. 2014. Seroprevalência de *Encephalitozoon cuniculi* em coelhos assintomáticos da região de Lisboa. [dissertação de mestrado]. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Pio, L. B. P. R. 2018. Identificação dos Fatores Influenciadores no Prognóstico de Infecção por *Encephalitozoon cuniculi* no Coelho Doméstico (*Oryctolagus cuniculus*). [dissertação de mestrado]. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade de Lisboa

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. 164(10): 293-295. <https://doi.org/10.1136/vr.164.10.293>

Rich, G. 2010. Clinical Update on Testing Modalities for *Encephalitozoon cuniculi* in Clinically Sick Rabbits. Journal of Exotic Pet Medicine. 19(3): 226-230 <https://doi.org/10.1053/j.jepm.2010.07.007>

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. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2008.12.008>

Sieg, J., Hein, J., Jass, A., Sauter-Louis, C., Hartmann, K., Fischer, A. 2012. Clinical evaluation of therapeutic success in rabbits with suspected encephalitozoonosis. Veterinary Parasitology. 187: 328-332

Snowden, K. F. 2004. Zoonotic microsporidia from animals and arthropods with a discussion of human infections. In: Lindsay D. S. & Weiss L. M. (Eds.), Opportunistic Infections: Toxoplasma, Sarcocystis, and Microsporidia, Volume 9: World Class Parasites. Boston: Kluwer Academic Publishers; p. 123-134

Talabani, H., Sarfati, C., Pillebout, E., van Gool, T., Derouin, F., Menotti, J. 2010. Disseminated infection with a new genovar of *Encephalitozoon cuniculi* in a renal transplant recipient. Journal of Clinical Microbiology. 48(7): 2651-2653. <https://doi.org/10.1128/JMC.02539-09>

Valencakova, A., Halanova, M. 2012. Immune response to *Encephalitozoon* infection review. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases. 35(1): 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2011.11.004>

Van Gool, T., Vetter, J. C., Weinmayr, B., Van Dam, A., Derouin, F., Dankert, J. 1997. High seroprevalence of *Encephalitozoon* species in imunocompetente subjects. The Journal of infectious diseases. 175(4): 1020-1024. <https://doi.org/10.1086/513963>

Varga, M. 2014. Textbook of rabbit medicine. Edinburgh: Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-4979-8.00001-7>

Wasson, K., Peper, R. L. 2000. Mammalian Microsporidiosis. Veterinary Pathology. 37(2): 113-128. <https://doi.org/10.1354/vp.37-2-113>

Weese, J. S., Fulford, M. 2010. Companion Animal Zoonoses. New Jersey: Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9780470958957.ch2>

Weiss, L. M., Becnel, J. J. 2014. Microsporidia: Pathogens of Opportunity. [place unknown]: John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9781118395264>

Wesolowska, M., Szetela, B., Kicia, M., Kopacz, Ź., Sak, B., Rymer, W., Kváč, M., Salamatın, R. 2019. Dual infection of urinary tract with Enterocytozoon bienewsi and Encephalitozoon cuniculi in HIV/AIDS patients. Annals of Parasitology. 65(1): 77-81. <https://doi.org/10.17420/ap6501.185>

Williams, D. 2012. Ophthalmology of Exotic Pets. [place unknown]: John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118709627>

Wright, J. H., Craighead, E. M. 1922. Infectious motor paralysis in young rabbits. The journal of experimental medicine. 36(1): 135-140. <https://doi.org/10.1084/jem.36.1.135>

## 5. ANEXOS

**5.1. ANEXO 1:** Tabela 5 – Resumo dos principais diagnósticos diferenciais de encefalitozoonose (Varga, 2014; Harcourt-Brown, 2004).

Sinais clínicos	Diagnósticos diferenciais	Exames complementares
<b>Ataxia/Parésia</b>	Alterações cardiovasculares. Compressão do canal medular. Cetoacidose. Infeção por <i>E. cuniculi</i> . Doença hepática e/ou renal. Lesão degenerativa do SNC. Linfoma. Traumatismo.	<u>Exame físico</u> (é importante a avaliação da condição corporal, pois pode existir fraqueza muscular ou obesidade). <u>Exame neurológico</u> : avaliação de funções sensitivas e motoras. <u>Hemograma e parâmetros bioquímicos</u> . <u>Imagiologia</u> : radiografia, TAC (afeções da coluna vertebral são comuns em coelhos domésticos).
<b>Perda de audição</b>	Infeção por <i>E. cuniculi</i> . Otite média/interna.	<u>Exame físico</u> : observação das vias respiratórias superiores/auscultação pulmonar (otite por <i>P. multocida</i> frequentemente associada a doença respiratória superior e, ocasionalmente, a pneumonia.) <u>Imagiologia</u> : radiografia, TAC (observação do conduto auditivo e da bula timpânica) <u>Bacteriologia</u> (aplicável a material recolhido do conduto auditivo ou da cavidade nasal).
<b>Uveíte facoclástica</b>	Infeção por <i>E. cuniculi</i> . Uveíte por <i>P. multocida</i> . Secundária a queratite/traumatismo/lesão por corpo estranho perfurante.	<u>Exame oftalmológico</u> : medição da pressão intraocular (frequentemente diminuída no olho afetado, em casos de rutura capsular na encefalitozoonose).
<b>Disfunção vestibular, Inclinação da cabeça</b>	Infeção por <i>E. cuniculi</i> . Doença do SNC. Infeção ascendente do aparelho vestibular por <i>P. multocida</i> . Infeção por <i>Baylisacaris procyonis</i> (causa Síndrome da larva migrante visceral, existente nos EUA, onde guaxinins são o hospedeiro reservatório do parasita). Otite média/interna. Neoplasia. Toxoplasmose.	<u>Anamnese</u> : incluir histórico de viagens. <u>Exame neurológico</u> : avaliação da capacidade de resposta dos nervos cranianos e avaliação postural (disfunção vestibular periférica versus central). <u>Serologia</u> ( <i>E. cuniculi</i> e <i>T. gondii</i> ). <u>Imunohistoquímica</u> (permite diferenciar infeção por <i>T. gondii</i> de infeção por <i>E. cuniculi</i> ). <u>Radiografia</u> : observação da bula timpânica e área envolvente (alterações e/ou abscessos poderão estar presentes em casos de otite/infeção por <i>P. multocida</i> ).
<b>Insuficiência renal (IR)</b>	Infeção por <i>E. cuniculi</i> . Nefrolitíase. Neoplasia (linfoma, carcinoma, etc.). IR intrínseca. Urolitíase.	<u>Hemograma e parâmetros bioquímicos</u> . (anemia, desidratação e azotémia podem estar presentes em casos de encefalitozoonose; também pode ocorrer hipofosfatémia). <u>Rácio UPC</u> <u>Imagiologia</u> : radiografia e ultrassonografia.
<b>Incontinência urinária</b>	Alterações neurológicas e/ou comportamentais. Artrite nos membros posteriores (dor e desconforto dificultam a adoção de uma correta postura de micção). Infeção por <i>E. cuniculi</i> . Infeção do trato urinário (ITU). Obesidade. Urolitíase.	<u>Exame físico</u> . <u>Exame neurológico</u> . <u>Urianálise</u> (suspeita de ITU). <u>Imagiologia</u> : radiografia e ultrassonografia.