

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária  
Ciências Veterinárias

Infecção por *Encephalitozoon cuniculi*  
em coelhos-domésticos (*Oryctolagus cuniculus*) observados na  
Clínica Veterinária Exotics (Barcelona)

Maria Margarida dos Santos Teixeira Costa

Orientador:

Prof. Doutor Luís Cardoso

Co-orientadora:

Dr.ª Neus Morera



Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

VILA REAL, 2012

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária  
Ciências Veterinárias

Infecção por *Encephalitozoon cuniculi*  
em coelhos-domésticos (*Oryctolagus cuniculus*) observados na  
Clínica Veterinária Exotics (Barcelona)

Maria Margarida dos Santos Teixeira Costa

Orientador:

Prof. Doutor Luís Cardoso

Co-orientadora:

Dr.<sup>a</sup> Neus Morera



Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

VILA REAL, 2012

## Resumo

*Encephalitozoon cuniculi* é um parasita microsporídeo que afecta principalmente o coelho doméstico, podendo também ser transmitido ao homem.

Este estudo consistiu na recolha da história clínica e dados relativos a 144 coelhos testados para anticorpos anti- *E. cuniculi* por imunofluorescência indirecta (IFI) ao longo de um período de 6 anos na Clínica Veterinária Exotics em Barcelona.

Dos 144 coelhos testados por IFI, 108 revelaram título positivo (75%). Verificou-se uma maior seropositividade entre as fêmeas (82,3%) e uma diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,017$ ) relativamente à seropositividade nos machos (68,1%). Verificou-se também maior seropositividade entre os coelhos adultos (7-60 meses) (81,8%) e uma diferença significativa ( $p = 0,048$ ) entre este grupo e o dos animais jovens (1- 6 meses) (64,5%).

Entre os coelhos seropositivos, o quadro clínico mais frequentemente observado (73%) foi o neurológico e os sinais clínicos mais frequentemente observados foram sinais típicos de síndrome vestibular (52,9%).

## Abstract

*Encephalitozoon cuniculi* is a microsporidian parasite which mostly infects domestic rabbit, but that can also be transmitted to humans.

This study consisted on the collection of clinical story and data from 144 rabbits that had been tested for antibodies to *E. cuniculi*, using an indirect immunofluorescence antibody test (IFAT), throughout a 6-year period, at Clínica Veterinária Exotics, in Barcelona.

One-hundred and eight out of the 144 rabbits tested with IFAT had a positive antibody titer (75%). There was a higher seropositivity among females (82,3%) and a significant statistically difference ( $p = 0,017$ ) in comparison with seropositivity among males (68,1%). Adult rabbits (7-60 months) had a higher seropositivity (81,8%) and a significant difference ( $p = 0,048$ ) to young rabbits (1-6 months) (64,5%).

Out of the seropositive rabbits, the most frequently observed clinical picture was of the neurological type (73%), and the most common clinical signs those of vestibular syndrome (52,9%).

## Índice geral

I.	NOTA INTRODUTÓRIA.....	1
1.	Estágio curricular.....	2
II.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
1.	Etiologia.....	4
2.	Epidemiologia.....	5
3.	Ciclo de vida e morfologia do esporo.....	7
4.	Patogenia .....	9
4.1.	Imunidade humoral .....	9
4.2.	Imunidade celular.....	10
5.	Sinais clínicos.....	11
5.1.	Quadro clínico ligeiro.....	11
5.2.	Quadro clínico neurológico.....	12
5.3.	Quadro clínico renal.....	12
5.4.	Quadro clínico oftalmológico.....	13
6.	Diagnósticos diferenciais.....	13
6.1.	Afecção neurológica.....	13
6.2.	Afecção renal.....	15
6.3.	Afecção oftalmológica .....	15
7.	Diagnóstico.....	15
7.1.	Métodos de diagnóstico serológico específico.....	16
7.2.	Métodos de diagnóstico parasitológico.....	18
7.3.	Métodos de diagnóstico histopatológico.....	20
7.4.	Métodos auxiliares de diagnóstico .....	21
8.	Tratamento.....	22
9.	Prognóstico.....	24
10.	Profilaxia .....	24
III.	MATERIAL E MÉTODOS.....	26
1.	Anamnese e exame físico .....	26
2.	Análises laboratoriais .....	27
3.	Tratamento.....	28
4.	Análise estatística .....	30

IV. RESULTADOS .....	31
V. DISCUSSÃO.....	42
V. CONCLUSÕES.....	50
VI. REFERÊNCIAS .....	51
VII. ANEXOS .....	55

## Índice de figuras

Figura 1- Clínica Veterinária Exotics.....	2
Figura 2 – Esporo de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> .....	8
Figura 3 - Rim repleto de lesões cicatriciais deprimidas.....	20
Figura 4 - Coelho com “head tilt” (cabeça inclinada).....	26
Figura 5 - Coelho com lesão compatível com uveíte facoclástica por <i>E. cuniculi</i> .....	27
Figura 6 - Recolha de sangue a partir da veia safena num coelho.....	27
Figura 7 – Fenbendazol (Panacur. MSD). ....	28
Figura 8 - Oxbow Critical Care. ....	30
Figura 9 – Distribuição e seropositividade dos coelhos analisados por IFI relativamente à existência de sinais clínicos compatíveis com encefalitozoonose.....	31
Figura 10 - Sexo e seropositividade dos coelhos analisados por IFI.....	32
Figura 11 – Distribuição e seropositividade dos coelhos analisados por IFI por idade. ....	33
Figura 12 - Títulos obtidos por IFI.....	34
Figura 13 - Quadros clínicos compatíveis com encefalitozoonose .....	35

## Índice de tabelas

Tabela 1 - Estudos de seroprevalência realizados a nível mundial e respectivas técnicas de diagnóstico.....	5
Tabela 2 - Sinais clínicos neurológicos detectados nos coelhos seropositivos por IFI. .	36
Tabela 3 - Sinais clínicos oftalmológicos detectados nos coelhos seropositivos por IFI.	37
Tabela 4 - Sinais clínicos urinários/inespecíficos detectados nos coelhos seropositivos por IFI. ....	37
Tabela 5 - Resumo dos sinais clínicos manifestados pelos coelhos seropositivos.....	38
Tabela 6 - Valores de hemograma obtidos nalguns dos coelhos seropositivos. ....	39
Tabela 7 - Valores de bioquímica obtidos nalguns dos coelhos seropositivos.....	40
Tabela 8 – Proteinograma de 45 coelhos seropositivos.....	41
Tabela 9 – Análise estatística das variáveis sexo, idade e estado clínico dos coelhos testados por IFI. ....	55

## **Lista de abreviaturas**

BID – de 12 em 12 horas

CIA – imuno-ensaio de carbono (“carbon immunoassay”)

CD4+/CD8+ - linfócitos T do tipo CD4 + ou CD8+

ELISA – ensaio imunoenzimático (“enzyme-linked immunosorbent assay”)

HIV - vírus da imunodeficiência humana

IFI – imunofluorescência indirecta

IFN-  $\gamma$  – interferão gama

Ig – imunoglobulina

IL – interleucina

ITS2 – “internal transcribed spacer 2”

IV – via intravenosa

LCR – líquido cefalorraquidiano

Mb – megabases

PCR – reacção de polimerase em cadeia (“polymerase chain reaction”)

PO – por via oral (*per os*)

rRNA – ácido ribonucleico ribossómico (“ribosomal ribonucleic acid”)

SC – por via subcutânea

SID – de 24 em 24 horas

SIDA – síndrome de imunodeficiência adquirida

Th1 – linfócitos T “helper”

VP – vacúolo parasitóforo

## **Agradecimentos**

Ao Professor Doutor Luís Cardoso, por ter aceitado ser orientador da minha dissertação, por ter estado sempre presente e por todo o apoio, prestabilidade e amabilidade que demonstrou ao longo da realização deste trabalho.

À Dr.<sup>a</sup> Neus Morera, por ter aceitado ser minha co-orientadora, me ter despertado o gosto por este tema e por toda a ajuda ao longo da realização deste trabalho.

Ao Dr. Javier Bermudez e ao Dr. Xavier Valls, por toda a simpatia demonstrada ao longo do período de estágio, bem como a toda a restante equipa da Clínica Veterinária Exotics (Barcelona), pelo bom acolhimento e por terem cimentado o meu gosto pelos animais exóticos.

Às minhas colegas e amigas, Filipa e Isabel, por todos os momentos que passamos juntas a estudar e a conviver, e por me terem apoiado sempre ao longo deste curso.

A todos os elementos da Turma 3, pelo companheirismo e amizade sempre presentes ao longo do curso.

Ao Filipe, por estar sempre presente e por todo o carinho e compreensão nos bons e maus momentos.

A todos os meus amigos por serem verdadeiros amigos.

Por último, mas não menos importante, à minha família, por me terem dado sempre os melhores conselhos e por toda a ajuda e apoio ao longo desta etapa da minha vida.

A todos, Muito Obrigada.

## I. NOTA INTRODUTÓRIA

Os microsporídeos foram identificados pela primeira vez como causa da “pébrine” (*Nosema bombycis*) nos bichos-da-seda, em 1857, por Nägeli, tendo originado graves prejuízos nesta indústria (Didier, 2005). Desde então mais de 1200 espécies foram identificadas como causa de infecção num amplo leque de hospedeiros, invertebrados e vertebrados, sendo que apenas 15 infectam mamíferos (Didier et al., 2000). *Encephalitozoon intestinalis*, *Enterocytozoon bieneusi* (Mathis et al., 2005) e *Encephalitozoon hellem* são as espécies mais frequentes no homem (Didier et al., 2000). *Encephalitozoon cuniculi*, que também infecta os seres humanos, é o microsporídeo mais descrito em mamíferos não humanos (Didier et al., 2000), sendo o coelho (*Oryctolagus cuniculus*) o principal hospedeiro (Lennox e Kelleher, 2009) e reservatório do agente com relevância epidemiológica e importância em termos de saúde pública (Fenoy et al., 2010). Este agente foi descrito pela primeira vez em 1922 por Wright and Craighead como causa de paralisia espontânea (Thomas et al., 1997; Jeklova et al., 2010), encefalite, nefrite (Harcourt-Brown, 2004) e síndrome vestibular em coelhos de laboratório (Ozkan et al., 2011) e foi subsequentemente observado no cérebro dos mesmos por Levaditi et al (Thomas et al., 1997).

Com o aparecimento da pandemia do vírus da SIDA no homem, a infecção por *E. cuniculi* passou a ser reconhecida como oportunista (Weese e Fulford, 2011) estando associada a diarreia persistente em indivíduos imunocomprometidos (Didier et al., 2000; Texier et al., 2010), particularmente HIV (vírus da imunodeficiência humana) positivos, com linfocitopenia T CD4+ idiopática ou indivíduos transplantados (Gruber et al., 2009). A confirmação do carácter zoonótico dos microsporídeos e o número cada vez maior de casos humanos causados por espécies representativas do género *Encephalitozoon* em pacientes imunocomprometidos dá ênfase à doença na prática de medicina humana (Valencakova et al., 2008).

Os pequenos mamíferos exóticos encontram-se cada vez mais inseridos no grupo dos vulgares animais de companhia (cão e gato). Dentro deles, o coelho tem visto a sua popularidade crescer nos agregados familiares comuns, principalmente como primeiro animal de estimação de crianças, quer pelo seu baixo custo de aquisição como pela facilidade de manejo (Mitchell e Tully, 2004). Dado o risco de transmissão de doenças zoonóticas, entre elas *E. cuniculi*, torna-se necessário alertar os proprietários de coelhos para os cuidados de manejo que reduzem a probabilidade de transmissão do agente (Harcourt-Brown, 2004), pois muitas vezes tanto os proprietários como os profissionais de saúde animal não se encontram

cientes dos riscos de transmissão de doenças zoonóticas e não adoptam as melhores medidas de prevenção (Mitchell e Tully, 2004).

Na maioria dos casos de *E. cuniculi*, a infecção é subclínica (Fenoy et al., 2010) mas a doença continua a ser altamente endémica na população mundial de coelhos de estimação (Mathis et al., 2005), com um número crescente de casos graves (Künzel e Joachim, 2010), sendo a forma neurológica a mais frequente (Weese e Fulford, 2011).

## 1. Estágio curricular

A Clínica Veterinária Exotics foi fundada em 1996 por dois médicos veterinários, o Dr. Xavier Valls e o Dr. Javier Vergés, tendo sido a primeira clinica veterinária especializada exclusivamente em espécies exóticas (aves, répteis e pequenos mamíferos) a surgir em Espanha e possivelmente uma das primeiras da Europa. A Clínica Veterinária Exotics funciona actualmente como centro veterinário de referência para atendimento de animais exóticos (Figura 1).



**Figura 1-** Clínica Veterinária Exotics.

O corpo clínico é constituído, actualmente, por cinco médicos veterinários: os dois fundadores da clínica, a Dr<sup>a</sup> Neus Morera, a Dr<sup>a</sup> Elisabet Giraldos e o Dr. Javier Bermúdez; aos quais se juntam três auxiliares veterinárias.

Dos animais mais comumente atendidos na clínica constam: furões, coelhos, hamsters e cobaias, no grupo dos mamíferos; tartarugas, iguanas, camaleões, e “geckos” no grupo dos répteis; e pequenos e grandes psitacídeos, canários e columbiformes, no grupo das aves. A área geográfica de influência da clínica é a da cidade e da província de Barcelona e da comunidade da Catalunha, sendo no entanto a Clínica um centro veterinário de referência para outras províncias e comunidades de Espanha.

Durante o ano de 2011, foram atendidos, na Clínica, 4516 animais, incluindo consultas de vacinação e urgências. Desse total, 349 foram coelhos, cujo principal motivo de consulta era a vacinação.

O estágio na Clínica Veterinária Exotics decorreu entre Setembro e Dezembro de 2011. Durante o meu período de estágio pude acompanhar os vários serviços de que a Clínica dispõe: consultas, internamento, técnicas de diagnóstico como ecografia e radiografia, cirurgia (sendo as mais frequentes: castração, ovário-histerectomia, adrenalectomia em furões com tumores da glândula adrenal, remoção de corpos estranhos, enucleações oculares, perfurações de papo, remoção de ovos em répteis com distocia e correcção cirúrgica de fracturas ósseas e de carapaça de tartarugas), odontologia nos pequenos mamíferos exóticos e sexagem mediante endoscopia em aves, entre outros.

O interesse pela encefalitozoonose surgiu durante o período estágio, no qual observei casos clínicos bastante interessantes e desafiantes. A escolha do tema da minha dissertação foi influenciada maioritariamente pela casuística existente na Clínica, a qual me conduziu à realização de um estudo retrospectivo e também prospectivo sobre esta patologia. Como a espécie animal em estudo era uma das mais frequentemente observadas na Clínica e dada a possibilidade de observar novos casos, optei por recolher os dados essenciais para a realização deste estudo, que no final se revelou um processo bastante enriquecedor e motivador.

Esta dissertação de mestrado tem o intuito de rever os conceitos mais importantes relacionados com a patologia encefalitozoonose em coelhos e determinar num conjunto de casos observados ao longo de 6 anos na clínica veterinária Exotics em Barcelona, qual a forma da doença mais frequente e respectivos sinais clínicos; a existência ou não de factores predisponentes (como a idade e o sexo), e avaliar a eficácia do tipo de tratamento instituído. Os dados foram recolhidos a partir do programa Winvet durante um período de 4 meses compreendido entre Setembro e Dezembro de 2011 e constam de registos clínicos de 144 coelhos de estimação que foram atendidos desde o ano de 2006 até final do ano de 2011. Durante o período de estágio foram directamente acompanhados oito casos.

## II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1. Etiologia

O agente *Encephalitozoon cuniculi* é um parasita unicelular, de localização intracelular obrigatória, eucariota (Mathis et al., 2005), formador de esporos (Ozkan et al., 2011), que mede entre 1.5 a 6 µm (Harcourt-Brown e Holloway, 2003) pertencente ao género *Encephalitozoon* (Nast et al., 1996) e ao filo *Microsporidia* (Valencakova et al., 2008).

Os microsporídeos apresentam uma estrutura simples e um elevado nível de diferenciação (Müller, 1997). Apesar de serem eucariotas apresentam um conjunto de características invulgares: não têm centríolos (Weiss, 2001) nem mitocôndrias mas possuem enzimas com funções mitocondriais; o complexo de Golgi é atípico; o RNA ribossômico (rRNA) tem mais semelhanças com o dos procariotas (Kunzel e Joachim, 2010), pois todas as sequências de genes de rRNA dos microsporídeos carecem da região ITS2 (“internal transcribed spacer 2”) (Weiss, 2001); o genoma é pequeno (<20 Megabases – ou 20 milhões de pares de bases), e *E. cuniculi* possui o genoma eucariótico mais pequeno alguma vez descrito (<2.9 Mb) (Texier et al., 2010).

O agente *E. cuniculi*, previamente conhecido como *Nosema cuniculi* (Harcourt-Brown e Holloway, 2003), tal como as restantes espécies pertencentes ao filo *Microsporidia*, foi inicialmente classificado como protozoário primitivo mas estudos moleculares e filogenéticos revelaram que está, na verdade, relacionado com os fungos (Texier et al., 2010). A meiose parece ser semelhante, o RNA mensageiro intervém em reacções que também existem nos fungos e análises baseadas na sequência das tubulinas  $\alpha$  e  $\beta$  incluíram mais sequências do reino *Fungi* (Tanabe et al., 2002), não sendo claro, contudo, de que tipo de fungos eles derivam (Valencakova e Halanova, 2012), talvez devido à falta de características suficientes de interferência filogenética nestes genes (Tanabe et al., 2002). A redução extrema e compactação da maioria dos genomas dos microsporídeos resultou na perda de muitas vias metabólicas, o que fez com que estes microorganismos ficassem extremamente dependentes do hospedeiro (Texier et al., 2010). Estão, por isso, perfeitamente adaptados ao parasitismo interno, uma vez que todos os estádios do ciclo de vida, à excepção dos esporos infecciosos, são intracelulares (Valencakova e Halanova, 2012).

## 2. Epidemiologia

*Encephalitozoon cuniculi* pode afectar um amplo leque de hospedeiros (Valencakova et al., 2008), entre os quais se encontram: coelho, murganho, porco, cavalo, cobaia, hamster, ovelha, cabra, cão, gato, vários carnívoros exóticos (entre eles a raposa), primatas não humanos, seres humanos (Valencakova e Halanova, 2012), vaca (Halánová et al., 1999), rato (Müller-Doblies et al., 2002), lontra (*Lutra lutra*), marta (*Martes foina*) (Hůrková e Modrý, 2006), e falcão-gerifalte (Malcekova et al., 2011). Análises moleculares sugerem que os cães possam ser reservatórios do agente (Snowden et al., 1999).

No coelho, as vias e métodos de infecção incluem: ingestão de alimento contaminado com urina infectada, inalação de esporos ou a via transplacentária (Harcourt-Brown, 2004; Tee et al., 2011). Contudo não é obrigatório que uma mãe infectada transmita o agente à descendência (Baneux e Pognan, 2003; Rich, 2010). Em estudos experimentais, verificaram-se ainda as seguintes possíveis vias de infecção: intravenosa, intraperitoneal, intracerebral e intrarrectal (Künzel e Joachim, 2010). A infecção por *E. cuniculi* por via rectal está associada a lesões hepáticas graves, diferindo de outras vias de infecção em que a frequência das lesões é maior no rim, cérebro, e pulmão do que no fígado (Fuentealba et al., 1992).

Rastreios serológicos (Tabela 1) detectaram elevadas seroprevalências (37-68%) em coelhos por todo o mundo, o que sugere que a infecção por *E. cuniculi* seja cosmopolita (Tee et al., 2011).

**Tabela 1** - Estudos de seroprevalência realizados a nível mundial e respectivas técnicas de diagnóstico.

Países	Seroprevalência de <i>E. cuniculi</i>	Técnica	Referências
Quénia	27%	Histopatologia	Wesonga e Munda, 1992
Suíça	Não disponível	Não disponível	Mathis et al. 1997
Austrália	24,7% em coelhos selvagens; 75,9% em coelhos de laboratório	IFI	Thomas et al. 1997
Reino Unido	52%	ELISA	Keeble e Shaw 2006
Japão	29,7% a 81%; 14-40%	ELISA IgG; ELISA IgM	Igarashi et al. 2008
Itália	67,2%	ELISA e CIA	Dipineto et al. 2008
	31,6%	ELISA e CIA	Santaniello et al. 2009
Áustria	70,3%	Histopatologia	Gruber et al. 2009
Egipto	15%	ELISA	Ashmawy et al. 2011
NovaZelândia	7,7%	CIA	Ozkan et al. 2011
Tailândia	63,2%; 67,8%	CIA; ELISA	Tee et al, 2011

As diferenças entre os valores de prevalência devem-se ao facto de *E. cuniculi* se dispersar mais facilmente em populações grandes e com elevada taxa de substituição de animais (Csokai et al., 2009). Em populações de coelhos selvagens, a prevalência é menor, provavelmente devido a uma menor densidade populacional (Künzel e Joachim, 2010). Factores como o manejo, a dieta, a raça, o sexo, o peso corporal, a situação vacinal, o estado de saúde do animal ou a prática de medicina preventiva de rotina não têm efeito significativo nos níveis de seropositividade de *E. cuniculi* (Keeble e Shaw, 2006; Dipineto et al., 2008). Em contraste, a idade do animal tem efeito significativo na infecção. A percentagem de coelhos adultos infectados é maior do que a de coelhos jovens, pois os anticorpos maternos conferem alguma protecção aos indivíduos até às quatro semanas de idade (Dipineto et al., 2008). Num estudo realizado por Keeble e Shaw (2006) em coelhos, a raça mais frequentemente infectada foi o coelho-anão, mas não se detectou uma associação significativa entre a raça e a seropositividade para *E. cuniculi*.

No homem, a infecção por *E. cuniculi* está confirmada e relatada desde 1994 (Künzel e Joachim, 2010) e foi associada a hepatite, encefalite, nefrite, enterite, queratoconjuntivite, sinusite, bronquite (Gruber et al., 2009), pneumonia intersticial (Rich, 2010) e infecção disseminada grave (Jordan et al., 2006) tendo como principais manifestações clínicas febre, cefaleia, vômito, perda de consciência, convulsão espástica (Tee et al., 2011), e diarreia ou fraqueza muscular (Rich, 2010). As lesões cerebrais revelam-se geralmente fatais (Jordan et al., 2006). Na Europa, infecções por *E. cuniculi* em seres humanos imunodeprimidos foram relatadas na Alemanha, Reino Unido e Suíça (Rossi et al., 1998).

Ainda em seres humanos acredita-se que as vias de infecção feco-oral, inalatória ou por abrasões na pele sejam as mais importantes (Ashmawy et al., 2011). A transmissão sexual é possível pois os agentes foram isolados na uretra e na próstata de doentes com SIDA (Didier, 2005). O contacto próximo entre proprietários e coelhos infectados pode facilitar a exposição ao agente (Ashmawy et al., 2011). Num estudo realizado por Deplazes *et al* (1996) três de seis amostras de *Encephalitozoon* spp isoladas em pessoas e um total de nove amostras isoladas em coelhos foram caracterizadas como *E. cuniculi* o que, de certa forma, confirma a importância deste parasita em termos zoonóticos mas a transmissão directa do animal ao homem ainda não foi documentada (Weese e Fulford, 2011). As fontes ambientais (água, comida ou outras fontes de contaminação) de microsporídeos que afectam humanos estão pobremente caracterizadas (Weiss, 2001) mas como os esporos de *E. cuniculi* são resistentes ao meio ambiente devem ser tidas em conta (Deplazes et al., 1996).

Estudos de seroprevalência em humanos demonstraram elevadas prevalências de anticorpos para *E. cuniculi* ou *E. hellem* sugerindo que a infecção subclínica possa ocorrer (Weiss, 2001), mas a doença é rara nos humanos (Jordan et al., 2006).

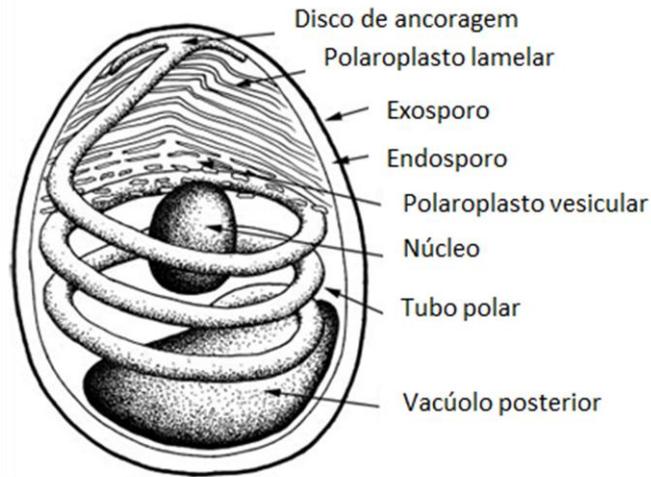
O agente *E. cuniculi* pode ser classificado, com base numa análise molecular do rRNA, em três estirpes (genótipos I, II e III) (Snowden et al., 1999; Sieg et al., 2012). A capacidade em distinguir a estirpe pode providenciar uma ferramenta importante para esclarecer sobre as fontes de infecção em estudos epidemiológicos. A estirpe I tem sido maioritariamente isolada em coelhos (Sieg et al., 2012) e também em murganhos (Malcekova et al., 2011); a estirpe II em roedores (Ozkan et al., 2011) e cães; e a estirpe III em cães e raposas (Snowden et al., 1999; Malcekova et al., 2011). Estas três estirpes podem afectar outros animais (Ozkan et al., 2011), não significando que os anteriormente mencionados sejam necessariamente os seus reservatórios naturais (Müller-Doblies et al., 2002). Até aos dias de hoje, só estão descritos casos em coelhos infectados pela estirpe típica dos coelhos, embora eles sejam susceptíveis experimentalmente às duas outras estirpes (Künzel e Joachim, 2010).

Múltiplas estirpes de *E. cuniculi* isoladas em humanos indicam que o genótipo III é o mais frequente nos Estados Unidos da América e genótipo I é o mais frequente na Europa (Didier et al., 2000). As infecções humanas com a estirpe II não foram observadas até à data (Künzel e Joachim, 2010).

### **3. Ciclo de vida e morfologia do esporo**

Os esporos são inalados ou ingeridos (Didier et al., 2000) e uma vez no trato alimentar, entram em contacto com a mucosa intestinal infectando a célula hospedeira (Harcourt-Brown e Holloway, 2003). O esporo (Figura 2) constitui o estágio maduro e infectante dos microsporídeos, é pequeno, tem forma oval (Didier et al., 2000) e tem uma cápsula polar (Harcourt-Brown e Holloway, 2003). Encontra-se revestido pelo exosporo que é composto por glicoproteínas e é electrodense e pelo endosporo electroluzente composto por quitina, o que lhe confere resistência no meio ambiente (Didier, 2005). O seu núcleo localizado centralmente pode ser monocariota (como acontece em *Encephalitozoon*) ou dicariota (Didier et al., 2000). Contém ainda o filamento polar, um aparelho altamente elaborado que é exteriorizado (Müller, 1997) perante estímulo apropriado, penetra na célula hospedeira e transfere o esporoplasma (Khan et al., 2001) (estrutura redonda que contém o núcleo e está

confinada numa simples membrana) (Nast et al., 1996) para um vacúolo parasitóforo (VP) na célula hospedeira (Harcourt-Brown e Holloway, 2003).



**Figura 2** – Esporo de *Encephalitozoon cuniculi* (adaptado de Keeling e Fast, 2002).

As células do sistema fagocítico mononuclear estão entre as que o agente coloniza e juntamente com os macrófagos disseminam-no pelo hospedeiro (Fisher, 2006). De seguida, os organismos passam pela fase de merogonia, durante a qual ocorre a divisão nuclear binária e proliferação dos mesmos (Didier et al., 2000), e depois segue-se a fase de esporogonia, na qual ocorre diferenciação e maturação (Didier, 2005), produzindo-se os esporoblastos, com subsequente maturação em esporos (Weese e Fulford, 2011). O VP distende-se e eventualmente acaba por se romper, libertando os esporos que invadem novas células. A ruptura das células está associada a resposta inflamatória crónica que leva ao desenvolvimento de lesões granulomatosas, primariamente no rim e no sistema nervoso central, embora outros órgãos, como o fígado e o coração, possam ser afectados (Harcourt-Brown e Holloway, 2003). Os esporos são tipicamente libertados na urina ou nas secreções respiratórias (Didier et al., 2000). A infecção intra-uterina parece ter somente importância no desenvolvimento intra-ocular do parasita, havendo migração dos esporos para cápsula anterior do cristalino (Künzel e Joachim, 2010).

## 4. Patogenia

Geralmente nos coelhos, ao contrário do que acontece noutros hospedeiros, a infecção é subclínica, podendo haver indivíduos portadores inaparentes por toda a sua vida (Meana e Peña, 2001).

Acredita-se que a disseminação do agente ocorra em duas fases. A primeira é a infecção dos macrófagos da parede intestinal, que conseguem reconhecer o agente patogénico e respondem através da secreção de mediadores químicos que recrutam novas células, incluindo monócitos, para controlar a infecção. Sete dias após infecção os linfócitos intra-epiteliais intestinais produzem citocinas que têm acção citotóxica para os macrófagos infectados. Esta resposta é considerada a primeira barreira de defesa. Se os macrófagos falharem na eliminação intracelular, então na segunda fase, os macrófagos infectados migram dos locais iniciais de infecção para o sistema linfático e depois para a corrente sanguínea (Valencakova e Halanova, 2012).

Os macrófagos respondem ao interferão gama (IFN- $\gamma$ ) secretado pelas células T activadas e fagocitam os agentes. Quando os microsporídeos destroem estes mecanismos protectores, os macrófagos podem tornar-se “cavalos de Tróia”, transportando o agente pelo organismo e permitindo a infecção de novas células (Valencakova e Halanova, 2012), ocorrendo replicação do mesmo no pulmão, fígado e rim. Assim que a infecção progride, a replicação continua no rim e também a nível do sistema nervoso central e do coração (Harcourt-Brown, 2004). O curso clínico da encefalitozoonose é crónico, o que é evidente pela persistência de elevados títulos de anticorpos (Khan et al., 2001) e do agente por vários anos no hospedeiro sem causar sinais clínicos (Gruber et al., 2009).

Os hospedeiros subclínicamente infectados são uma fonte primária de infecção para outros coelhos (Rich, 2010), pois um sistema imunitário competente previne a multiplicação dos microrganismos mas os esporos mantêm-se viáveis no cérebro e rim (Fisher, 2006).

### 4.1. Imunidade humoral

Os anticorpos opsonizam os microsporídeos, tornando-os alvos para os macrófagos, que neutralizam a sua actividade e inibem a infecção de novas células hospedeiras (Didier et al., 2000). No caso da infecção por *E. cuniculi* a produção de imunoglobulinas G (IgG) em animais imunocompetentes ocorre durante as duas primeiras semanas pós-infecção. O pico de

produção é atingido às 5-6 semanas e geralmente persiste por toda a vida do hospedeiro (Valencakova e Halanova, 2012).

Durante a infecção, o título de IgM diminui e o de IgG aumenta, porém animais com infecções concorrentes podem manifestar alterações na produção de anticorpos (Keeble e Shaw, 2006). A presença de IgM é indicativa de infecção activa (aguda, reactivada ou reinfeção) pelo que se deve optar por instituir terapia específica nessa situação. A presença de IgG indica infecção crónica. A titulação diferenciada de anticorpos IgM e IgG dá-nos, por isso, uma ideia do estado da infecção. Contudo, a maioria dos testes de rotina só consegue detectar anticorpos do isotipo IgG (Jeklova et al., 2010).

Os anticorpos maternos contra *E. cuniculi* passam para a descendência através do colostro conferindo protecção aos coelhos até às 4 semanas de idade (Khan et al., 2001), mas entre as 4 e as 8 semanas os animais tornam-se seronegativos (Santaniello et al., 2009). A seroconversão em resposta a uma infecção activa ocorre em animais jovens entre as 8 e as 10 semanas de idade, e acredita-se que nesta fase a infecção é transmitida por contacto com a progenitora (Keeble e Shaw, 2006).

A resposta imunitária humoral não parece conferir um efeito protector em contraste com os mecanismos de imunidade celular, que são essenciais para o controlo do parasita e para a sobrevivência do hospedeiro (Künzel e Joachim, 2010).

#### 4.2. Imunidade celular

A imunidade mediada pelas células T parece ser a mais importante na resistência do organismo hospedeiro ao agente patogénico. Tal foi demonstrado através dos efeitos letais dos microsporídeos em pacientes com imunodeficiência de células T. As células T produzem interleucinas (IL) que conferem um mecanismo defensivo que facilita a fagocitose imunomediada pelos macrófagos (Valencakova e Halanova, 2012). Contudo, o mecanismo mais eficaz destas células é a via de perforinas; na sua ausência os animais sucumbem mais facilmente ao agente (Khan et al., 2001).

Tanto os linfócitos T CD4+ como os CD8+ são importantes na resistência do hospedeiro ao organismo, mas a deficiência em linfócitos T CD4+ não afecta o decurso da infecção (Khan et al., 2001), enquanto os linfócitos T CD8+ são especialmente importantes na sobrevivência do hospedeiro (Texier et al., 2010). A imunidade mediada pelas células T CD8+ não é activada pelas células T CD4+ mas depende das citocinas do tipo Th1

(linfócitos T “helper”): IFN- $\gamma$  e IL-12 (Texier et al., 2010). Apesar disso, na ausência de IL-2 produzida por linfócitos CD4+, a produção de linfócitos CD8+ pode não ocorrer (Valencakova e Halanova, 2012).

A interacção das IL com o IFN- $\gamma$  parece ser particularmente importante na resposta imunitária. Os macrófagos peritoneais dos musaranhos podem ser activados para eliminar o agente *E. cuniculi* após incubação com IFN- $\gamma$  (Didier et al., 2000), mas ainda só foi confirmada a sua importância *in vitro* (Khan et al., 2001). As células dendríticas desencadeiam uma resposta por parte dos linfócitos T contra os microsporídeos. Contudo esta resposta pode estar ausente em animais mais velhos, o que explica a maior sensibilidade destes animais ao agente (Texier et al., 2010).

## 5. Sinais clínicos

As manifestações clínicas podem variar desde um estado de portador subclínico, em que o hospedeiro está infectado mas assintomático, até mortalidade súbita (Tee et al., 2011). A maioria das infecções agudas é completamente assintomática (Harcourt-Brown, 2004). Podem ocorrer sinais clínicos graves esporadicamente, e ao que parece não há relação do aparecimento destes com a idade ou o sexo dos animais afectados (Suter et al., 2001). A presença de animais seropositivos saudáveis reforça a necessidade de exames de detecção frequentes, considerando também o carácter zoonótico da doença (Ashmawy et al., 2011). Deve ser prestada especial atenção ao comportamento do animal seropositivo, à condição corporal e ao estado de hidratação (Künzel et al., 2008).

Os sinais clínicos não decorrem somente da acção patogénica directa do parasita mas estão também relacionados com a resposta inflamatória causada pela replicação do agente e consequente ruptura celular (Csokai et al., 2009) por parte do hospedeiro, que persiste mesmo após o agente ter sido eliminado (Valencakova et al., 2008).

### 5.1. Quadro clínico ligeiro

Os indivíduos dentro deste grupo podem manifestar algum atraso na resposta a estímulos externos, ter dificuldades de locomoção em corrida não manifestando os movimentos velozes característicos de coelhos saudáveis (Harcourt-Brown, 2004), mas geralmente estas alterações só são detectadas por proprietários atentos (Harcourt-Brown and Holloway, 2003).

## 5.2. Quadro clínico neurológico

Os sinais neurológicos estão associados à ruptura celular a nível cerebral, à libertação dos microrganismos para os tecidos circundantes (Rich, 2010) e consequente inflamação granulomatosa (Jeklova et al., 2010), e são os sinais mais frequentemente detectados nesta patologia (Rich, 2010).

As manifestações clínicas típicas de infecção por *E. cuniculi* incluem uma síndrome vestibular (Künzel e Joachim, 2010) e convulsões (Rich, 2010). As convulsões resultam de lesão cerebral ou insuficiência renal, levando a mineralização da aorta e consequentes distúrbios circulatórios (Harcourt-Brown, 2004). Os sinais típicos da síndrome vestibular podem variar desde “head tilt” (cabeça inclinada), que é o sinal clínico mais observado (Igarashi et al., 2008), sendo pouco evidente até um estado em que o animal não consegue manter-se na posição normal durante muito tempo, revela movimentos circulares e giratórios e está hemiparésico (Harcourt-Brown, 2004). Nessa fase o exame neurológico pode tornar-se bastante difícil (Künzel et al., 2008). Um período de imobilização após uma doença vestibular pode limitar a recuperação da disfunção vestibular (Künzel e Joachim, 2010).

Outros sinais neurológicos geralmente atribuídos à encefalitozoonose são ataxia, paresia e paralisia (Harcourt-Brown e Holloway, 2003) e alterações do comportamento (agressividade, andar cambaleante, tremores com a cabeça, corrida ou salto contra as paredes da jaula e automutilação) (Harcourt-Brown, 2004; Künzel e Joachim, 2010). A paresia posterior e a perda de massa muscular foram associadas a estádios avançados da doença (Rich, 2010).

## 5.3. Quadro clínico renal

A afecção renal causada por *E. cuniculi* é caracterizada por uma nefrite intersticial granulomatosa (Jeklova et al., 2010) e é normalmente subclínica (Künzel e Joachim, 2010). As manifestações renais são bastante variáveis (Rich, 2010), mas normalmente são típicas de uma insuficiência renal crónica, como a perda de peso, poliúria, polidipsia, incontinência urinária (Harcourt-Brown, 2004), letargia e anorexia (Künzel et al., 2008), com impacto no estado geral do animal, o que faz com que quase todos os animais que revelam afecção renal tenham de ser eutanasiados (Künzel et al., 2008). Quando os animais revelam incontinência urinária frequentemente chegam a desenvolver dermatite na região do períneo. Um certo grau de disúria pode ser atribuído a uma manifestação neurológica (Rich, 2010), por afecção do

neurónio motor superior da bexiga, hérnia discal lombar, trauma medular, neoplasia da coluna ou embolismo fibrocartilaginoso (Davies e Shell, 2002).

#### 5.4. Quadro clínico oftalmológico

As alterações intra-oculares incluem a formação de cataratas (Wagner e Fehr, 2007), hipópion e uveíte (a mais comum é a facoclástica) (Rich, 2010). Estas alterações devem-se na maioria dos casos a ruptura/luxação do cristalino (Jeklova et al., 2010). A cápsula da parte anterior do cristalino ruptura espontaneamente e causa uma inflamação granulomatosa que provoca uveíte. Acredita-se que a transmissão vertical de *E. cuniculi* esteja associada ao aparecimento do agente no cristalino *in utero*, quando a cápsula é ainda muito fina ou mesmo ausente. Quando o animal atinge a idade adulta, o parasita leva à ruptura do cristalino na parte mais fina da superfície anterior, libertando material do cristalino para a câmara anterior e levando ao aparecimento de uma uveíte facoclástica (Harcourt-Brown, 2004) que surge devido a intolerância das células T aos antígenos das proteínas do cristalino (Crispin, 2002). As lesões oculares são normalmente unilaterais na maioria dos doentes (Künzel et al., 2008; Künzel e Joachim, 2010) e os indivíduos com sinais clínicos oculares são claramente mais jovens do que os que manifestam sinais compatíveis com insuficiência renal (Künzel e Joachim, 2010). O exame clínico de coelhos com uveíte facoclástica normalmente não revela qualquer outra alteração para além da ocular e esse factor não altera a qualidade de vida dos animais afectados (Künzel et al., 2008), pois não demonstram uma considerável perda de visão (Künzel e Joachim, 2010).

## 6. Diagnósticos diferenciais

### 6.1. Afecção neurológica

As alterações do sistema vestibular periférico, como a otite média/interna causada por infecções primárias (*Pasteurella multocida*), o trauma (Gruber et al., 2009) ou a sarna psoróptica (*Psoroptes cuniculi*), são relativamente pouco frequentes em coelhos de estimação (Csokai et al., 2009). Contudo, a otite média/interna representa o principal diagnóstico diferencial para as alterações vestibulares em coelhos. Na maioria dos casos de otite pode-se isolar *P. multocida* do empiema das bolhas timpânicas e tipicamente os dois canais auditivos

estão afectados (Künzel e Joachim, 2010). Em contraste com a infecção por *E. cuniculi*, a otite média/interna está geralmente associada a sinais de tracto respiratório superior (espirros, descargas nasais e ruídos respiratórios), ocasionalmente pneumonia, e síndrome vestibular periférica ao contrário do que acontece com *E. cuniculi*, que causa tipicamente síndrome vestibular central (Künzel e Joachim, 2010). A bactéria *P. multocida* pode também ser responsável por meningoencefalite (Künzel et al., 2008). Os procedimentos convencionais de diagnóstico (inspecção do canal auditivo e exame radiográfico das bolhas timpânicas) parecem não ser muito importantes para descartar uma possível otite (Künzel et al., 2008). Por outro lado, o diagnóstico de otite média/interna não exclui a possibilidade de infecção activa por *E. cuniculi* (Jeklova et al., 2010). O ácaro *P. cuniculi* parasita o canal auditivo externo e causa otite externa com consequente “head tilt” transitório (Künzel e Joachim, 2010).

Embora seja uma causa pouco frequente de sinais neurológicos em coelhos de estimação, a toxoplasmose deve ser sempre considerada como diagnóstico diferencial de encefalitozoonose (Künzel et al., 2008). *Toxoplasma gondii* induz a formação de meningoencefalite granulomatosa semelhante à provocada por *E. cuniculi*, mas podem ser encontrados focos de necrose e os taquizoítos em muitos outros órgãos, incluindo o músculo-esquelético, baço, fígado, coração, pulmão e linfonodos. Os rins não estão geralmente afectados na toxoplasmose e esta doença pode ser diferenciada da encefalitozoonose por serologia, morfologia tecidular e análise imuno-histoquímica (Jeklova et al., 2010).

As lesões vasculares, que derivam de doença primária do sistema vascular ou coração, podem provocar hipoxia cerebral que pode ser responsável pelos sinais neurológicos (Gruber et al., 2009). A doença metabólica-tóxica devida a deficiência de nutrientes ou vitaminas (vitamina E e selénio) (Suter et al., 2001), ou devida a processos tóxicos (toxinas de fungos *Aspergillus* spp., por exemplo) também é responsável por alterações neurológicas semelhantes às causadas por *E. cuniculi* (Gruber et al., 2009).

Outros diagnósticos diferenciais possíveis são a endotoxemia, que provoca edema e malícia do cerebelo acompanhada de necrose dos neurónios; neoplasias, como o linfoma e o teratoma; e lesões neurodegenerativas, como a desmienilização moderada idiopática da medula espinal (Gruber et al., 2009). Em animais que revelam paresia, decúbito lateral e “head tilt” devemos pensar também em hipocalcemia (Gruber et al., 2009). *Encephalitozoon cuniculi* parece ser uma causa rara de paresia. Esta condição é mais frequentemente causada por incidentes traumáticos, como fracturas ou subluxações da coluna espinal (Künzel e Joachim, 2010), e pode também ser causada por espondilose (Csokai et al., 2009).

Traumatismo craniano também é pouco frequente, mas pode estar na origem dos sinais neurológicos (Künzel e Joachim, 2010). Menos frequentes são as infecções virais do sistema nervoso central incluindo herpesvírus, bornavírus e o vírus da raiva, que podem também induzir doença neurológica em coelhos (Künzel e Joachim, 2010).

## 6.2. Afecção renal

Em relação à insuficiência renal, a urolitíase (Csokai et al., 2009) ou nefrolitíase apresenta-se como o principal diagnóstico diferencial da encefalitozoonose em coelhos (Kunzel e Joachim, 2010), mas neoplasia, amiloidose (Reusch et al., 2009), nefrite intersticial crónica, glomerulonefrite ou pielonefrite (Melillo, 2007) devem também ser tidas em conta. Como diagnósticos diferenciais para incontinência urinária encontramos infecção do trato urinário, cálculos urinários, decúbito permanente devido a pododermatites, problemas de coluna, obesidade e artrite (Harcourt-Brown, 2004).

## 6.3. Afecção oftalmológica

O diagnóstico diferencial mais importante para a uveíte facoclástica provocada por *E. cuniculi* é a uveíte bacteriana, geralmente causada por *P. multocida* devido a disseminação sanguínea. A uveíte pode também ser secundária a queratite ou pode ser causada por trauma ou penetração de corpos estranhos (Künzel e Joachim, 2010).

## 7. Diagnóstico

Consideráveis progressos têm sido efectuados no sentido de melhorar as técnicas disponíveis de detecção dos microsporídeos. Anteriormente, o diagnóstico baseava-se na identificação laboriosa por microscopia electrónica, devido ao pequeno tamanho dos organismos analisados. A introdução de técnicas de fixação e coloração permitiu recorrer ao microscópio de rotina para identificar o género do microrganismo em causa e por último o diagnóstico das diferentes espécies foi adquirido através do uso de técnicas serológicas (anticorpos monoclonais e policlonais) e métodos moleculares pela reacção de polimerase em cadeia (Mathis et al., 2005).

O diagnóstico definitivo *antemortem* de encephalitozoonose é importante para uma terapia específica, um prognóstico preciso e uma avaliação do risco zoonótico (Jeklova et al., 2010). Contudo, o mesmo revela-se difícil no animal vivo, uma vez que os sinais clínicos não são patognomónicos (Weese e Fulford, 2011) e é necessário um exame histopatológico que demonstre a presença de *E. cuniculi* (Fisher, 2006; Rich, 2010). O diagnóstico de rotina por isso é normalmente presuntivo, tendo por base os sinais clínicos, exames neurológico e oftalmológico (Künzel e Joachim, 2010), a exclusão de outros possíveis diagnósticos diferenciais e um teste serológico positivo (Künzel et al., 2008).

### 7.1. Métodos de diagnóstico serológico específico

A análise serológica específica é o método mais utilizado para detectar a infecção por *E. cuniculi* (Künzel et al., 2008) e para confirmar casos clínicos suspeitos de encefalitozoonose. Os métodos serológicos mais frequentes são a técnica de imunofluorescência indirecta (IFI), imuno-ensaio de carbono (“carbon immunoassay” –CIA) e o ensaio imunoenzimático (“enzyme-linked immunoabsorbent assay –ELISA) (Ashmawy et al. 2011). A presença de anticorpos circulantes para *E. cuniculi* não é diagnóstica, confirmando apenas a exposição ao agente (Harcourt-Brown, 2004) não reflectindo o estado de infecção no momento (Rich, 2010). A grande percentagem de animais seropositivos assintomáticos pode dever-se a infecção por estirpes menos virulentas, menor concentração de agente patogénico ou a uma eficaz resposta imunitária do hospedeiro (Jeklova et al., 2010). O valor do título de anticorpos não é suficiente para confirmar se *E. cuniculi* é o agente etiológico em causa (Jeklova et al., 2010), mas foi demonstrado que numa fase inicial da infecção, quando esta é mais grave, os títulos detectados são maiores e durante ou após o tratamento é de esperar uma descida dos mesmos, como reflexo da melhoria do estado geral do animal, devida a uma diminuição do número de microrganismos e menor inflamação associada (Rich, 2010).

A detecção de anticorpos é o método de diagnóstico mais sensível durante a fase inicial de infecção (Künzel e Joachim, 2010). Vários estudos demonstraram que os títulos de anticorpos são detectáveis 3 a 4 semanas após a infecção, atingindo o pico às 6 a 9 semanas (Tee et al., 2011). Por isso, uma análise isolada negativa num animal saudável não descarta uma infecção recente. A análise deve ser repetida após 4 semanas, para que assim se possa descartar a possibilidade de seroconversão (Keeble e Shaw, 2006). Contudo, um resultado negativo (à

excepção dos falsos negativos) descarta a possibilidade de que seja *E. cuniculi* o agente etiológico no caso da existência de sinais clínicos (Künzel e Joachim, 2010).

#### 7.1.1. ELISA e IFI

Correntemente, a técnica de ELISA e o teste de IFI são as duas provas serológicas mais usadas para detecção de *E. cuniculi* (Jordan et al., 2006).

A técnica de ELISA permite a detecção de anticorpos específicos (Jordan et al., 2006). A quantidade de anticorpos no teste de ELISA é medida pela densidade óptica da amostra quando comparada com a dos controlos positivo e negativo. Um título negativo é indicativo de ausência de infecção ou de um estado inicial de infecção quando o nível de anticorpos ainda é reduzido (Fisher, 2006). Efectuam-se várias diluições sendo que o título corresponde ao inverso da última diluição em que se detecta um resultado positivo (Rich, 2010).

A IFI é uma técnica de rotina relativamente fácil e rápida de executar em amostras de soro (Thomas et al., 1997). Utilizando a técnica de IFI os títulos de anticorpos consideram-se negativos quando abaixo de <40, positivos baixos (40-320), moderados (640-2560) e elevados (>5120) (Csokai et al., 2009).

Embora estes métodos sejam sensíveis e fiáveis existem certos inconvenientes. As reacções cruzadas entre espécies do género *Encephalitozoon* são frequentes e cada método exige equipamento especializado para a sua execução. O teste de ELISA requer uma placa especial de leitura e o teste de IFI requer um microscópio com uma luz ultravioleta (Jordan et al., 2006). A IFI tem a vantagem de conseguir detectar anticorpos numa fase inicial de infecção, mas requer um técnico experiente para as leituras, enquanto as densidades ópticas obtidas pela técnica de ELISA podem ser medidas fotometricamente (Ashmawy et al., 2011).

#### 7.1.2. Outros métodos serológicos de diagnóstico

Outros métodos serológicos de diagnóstico incluem a técnica CIA, o teste de aglutinação directa e os anticorpos monoclonais. A técnica de CIA é de fácil execução, utiliza reagentes comuns e necessita de requisitos mínimos de laboratório. No entanto, este teste não é específico e o mecanismo pelo qual as partículas de carbono se agregam às IgG não se encontra bem definido (Ashmawy et al., 2011), mas é, tal como as técnicas referidas no ponto anterior, igualmente apta para o diagnóstico de infecção por *E. cuniculi* (Boot et al., 2000).

O teste de aglutinação directa não necessita de reagentes específicos para cada espécie hospedeira, o que facilita a execução do teste em animais exóticos e selvagens. Contudo, é requerida uma grande quantidade de esporos para sua execução e, como tal, apenas as espécies que são facilmente cultivadas *in vitro* são aptas para este teste. Este teste é altamente sensível e específico para os anticorpos contra *E. cuniculi* e as reacções cruzadas são mais reduzidas quando comparadas com IFI. Não é necessário equipamento especializado, mas os resultados são observados somente ao fim de 24 horas (Jordan et al., 2006).

Os anticorpos monoclonais (MAbs) contra estirpes de *E. cuniculi* podem ser usados com sucesso para distinguir a espécie em causa, permitindo que a identificação e o diagnóstico sejam específicos, simples, rápidos e de baixo custo. O diagnóstico das microsporidioses ao nível da espécie é importante devido ao espectro de actuação de determinados fármacos (Mo e Drancourt, 2004).

## 7.2. Métodos de diagnóstico parasitológico

### 7.2.1. Técnica de PCR

Em seres humanos, a detecção do DNA de *E. cuniculi* por PCR nas secreções ou fluidos corporais parece ser um método de diagnóstico sensível e específico para confirmar a presença do agente. Contudo, a PCR para detecção de *E. cuniculi* em coelhos não está ainda suficientemente avaliada para utilização como teste fiável e de rotina (Künzel et al., 2008). A PCR convencional a partir de amostras oculares de coelhos com uveíte facoclástica constitui um excelente marcador de diagnóstico *in vivo*, talvez pelo facto de existir uma maior concentração de esporos no cristalino liquefeito (Csokai et al., 2009). De um ponto de vista prático a PCR constitui um bom método de diagnóstico alternativo à detecção de parasitas em tecidos de animais selvagens, quando a colheita de sangue é inviável (Hůrková e Modrý, 2006). A PCR “nested” é mais sensível que a PCR convencional e o exame *post mortem* de órgãos com PCR “nested” revelou que o cérebro é o tecido mais apropriado para detecção de DNA de *E. cuniculi* (Csokai et al., 2009).

### 7.2.2. Detecção de esporos

Os esporos de *E. cuniculi* podem ser encontrados nas lesões granulomatosas ou no tecido circundante (Harcourt-Brown, 2004), sendo que nos rins surgem a partir das 4 semanas após seroconversão e no cérebro a partir das 8 semanas (Künzel e Joachim, 2010), podendo também ser encontrados em órgãos sem qualquer reacção inflamatória associada. No cérebro, os esporos parecem prevalecer por um período de tempo mais longo do que no rim (Csokai et al., 2009).

Os esporos podem ser libertados em dejectos e fluidos corporais, particularmente nas fezes, urina e secreções respiratórias. Na urina, o principal veículo de disseminação (Weese e Fulford, 2011), os primeiros esporos podem ser detectados 3 a 5 semanas após seroconversão (Tee et al., 2011) por PCR (Cray et al., 2007), mas a excreção diminui durante os meses seguintes (Thomas et al., 1997). Uma vez que a excreção dos esporos na urina só ocorre esporadicamente, um resultado negativo não exclui a possibilidade de infecção (Künzel e Joachim, 2010).

A recolha e manipulação das amostras podem ser difíceis (Valencakova et al., 2008) e a presença de cristais pode dificultar a visualização dos esporos, facto que pode ser ultrapassado através da acidificação da urina (Harcourt-Brown, 2004). Devido ao pequeno tamanho dos esporos, a detecção dos mesmos através dos métodos de coloração e fixação de rotina, como o de hematoxilina-eosina, é difícil, sendo métodos como a coloração cromotrópica (ácido tricrómico ou Ziehl-Neelsen) ou imunofluorescência mais sensíveis (Künzel e Joachim, 2010). Contudo, os microsporídeos podem não ser detectados se a carga parasitária for reduzida ou se estiverem misturados com muco (Mo e Drancourt, 2004). A microscopia electrónica é considerada o método de eleição para detecção dos esporos, mas é muito laboriosa e não consegue diferenciar *E. cuniculi* de *E. hellem* (Künzel e Joachim, 2010). A detecção de esporos nos fluidos suporta o diagnóstico se estiverem presentes sinais clínicos compatíveis, mas animais sem sinais clínicos também podem eliminar esporos (Weese e Fulford, 2011).

### 7.3. Métodos de diagnóstico histopatológico

#### 7.3.1. Lesões histopatológicas

O exame histopatológico constitui o método *post mortem* de diagnóstico mais sensível (Csokai et al., 2009). As primeiras alterações tecidulares ocorrem nos rins, fígado e pulmão. O cérebro só é afectado cerca de 3 meses após infecção. O coração também pode estar envolvido, embora em menor extensão (Künzel e Joachim, 2010).

A nível macroscópico não existem lesões visíveis no cérebro, embora os rins afectados sejam facilmente identificáveis com a superfície repleta de lesões cicatriciais deprimidas (Valencakova et al., 2008) (Figura 3) no caso da infecção crónica (Paré e Paul-Murphy, 2004). A nível microscópico o parasita causa áreas de inflamação características (Harcourt-Brown, 2004), sendo as mais típicas encontradas ao nível do cérebro (91,7%) e do rim (54,1%) (Csokai et al., 2009).



**Figura 3** - Rim repleto de lesões cicatriciais deprimidas, (imagem gentilmente cedida por Xavier Valls).

No cérebro as alterações caracterizam-se pela presença de bainhas perivasculares (Csokai et al., 2009) que de acordo com alguns autores estão na origem da meningoencefalite focal granulomatosa não supurativa (Künzel et al., 2008). Os granulomas são menos frequentes e não são detectados pelos métodos de rotina se as alterações histológicas forem leves a moderadas (Csokai et al., 2009). A área mais afectada é o encéfalo (córtex e medula), mas as lesões inflamatórias podem também ser encontradas no tronco cerebral, medula espinal, e, em menor grau, no cerebelo. As leptomeninges estão quase sempre afectadas, onde se podem visualizar linfócitos em torno do parênquima dos vasos sanguíneos e em focos granulomatosos (Gruber et al., 2009).

A nível renal as lesões consistem numa nefrite intersticial focal ou segmentária granulomatosa com vários graus de fibrose (Künzel et al., 2008), e na infecção crónica não pode ser distinguida de uma nefrite comum (Marcato e Rosmini, 1986).

Encontram-se ainda entre as lesões características a pneumonia intersticial granulomatosa, a hepatite focal intersticial granulomatosa e a uveíte facoclástica (Keeble e Shaw, 2006). A confirmação do diagnóstico de uveíte facoclástica inclui exame histológico do cristalino e estruturas circundantes ou análise imuno-histoquímica após enucleação (Künzel et al., 2008).

Nas infecções agudas, não existe correlação entre o título de anticorpos e a gravidade das lesões encontradas na necropsia (Harcourt-Brown, 2004). Nas infecções crónicas, quando os títulos de anticorpos diminuem levemente as lesões histológicas tornam-se mais pronunciadas (Csokai et al., 2009).

### 7.3.2. Análise do líquido cefalorraquidiano (LCR)

A análise do líquido cefalorraquidiano (LCR) pode possibilitar um diagnóstico clínico de encefalitozoonose em coelhos. A pleocitose linfomonocítica e o aumento da concentração de proteínas totais no LCR são indicativos de infecção por *E. cuniculi*. Contudo, qualquer encefalite viral, protozoária ou imunomediada pode induzir resultado semelhante (Künzel e Joachim, 2010).

### 7.4. Métodos auxiliares de diagnóstico

A electroforese das proteínas plasmáticas parece também ter aplicação no diagnóstico de *E. cuniculi* (Cray et al., 2007) uma vez que são encontrados maiores aumentos de  $\gamma$ -globulinas em indivíduos suspeitos (Lennox e Kelleher, 2009). Nos coelhos, as proteínas plasmáticas de interesse incluem a albumina, a  $\alpha$ 1-globulina, a  $\alpha$ 2-globulina, a  $\beta$ -globulina e a  $\gamma$ -globulina (Rich, 2010). Os animais infectados por *E. cuniculi* têm um rácio albumina/globulinas significativamente inferior ao apresentado pelos animais seronegativos (Cray et al., 2007). Essa diminuição atribui-se ao aumento da concentração de globulinas, incluindo a fracção das  $\gamma$ -globulinas que contém as IgG. A electroforese das proteínas plasmáticas é usada como um acessório de diagnóstico e prognóstico em medicina veterinária (Cray et al., 2009).

A medição do rácio proteína: creatinina na urina, por rotina, em coelhos suspeitos de estarem a desenvolver patologia renal constitui um bom método de prognóstico e facilita a monitorização da progressão da doença (Reusch et al., 2009).

## 8. Tratamento

O tratamento da encefalitozoonose em coelhos assenta em princípios básicos da terapia de encefalite granulomatosa noutras espécies e em estudos *in vitro* de susceptibilidade de *E. cuniculi* a diversos fármacos (Harcourt-Brown e Holloway, 2003). Dos objectivos do tratamento constam a eliminação do agente etiológico, a supressão da resposta inflamatória, o tratamento sintomático dos sinais clínicos (Harcourt-Brown, 2004) e o controlo de uma possível doença concorrente (Künzel e Joachim, 2010). De acordo com um estudo realizado por Franssen et al. (1995) os fármacos itraconazol, toltrazuril, metronidazol, ronidazol e ganciclovir são ineficazes no tratamento de infecção por *E. cuniculi*.

Estudos *in vitro* com albendazol (25mg/kg/dia, durante 30 dias) revelaram que este é um anti-microsporídeo que elimina eficazmente os esporos de *E. cuniculi* a nível renal sem evidência de danos citopáticos. Embora este fármaco seja só parasitostático, tem a vantagem de ser bem absorvido quando administrado por via oral e é o princípio activo de eleição para o tratamento em humanos (Harcourt-Brown, 2004). No entanto, em coelhos o albendazol tem como efeitos secundários toxicidade embrionária, teratogénese (Künzel e Joachim, 2010), pancitopenia, febre e inclusive mortalidade (Fisher, 2006).

O fenbendazol passou a ser mais utilizado (20mg/kg, PO, SID, durante um período de 28 dias) em detrimento do albendazol. O tratamento pode ser repetido a intervalos de 6 meses ou se houver uma reinfeção. É também usado como desparasitante interno de rotina e não tem efeitos secundários. Tal como o albendazol o fenbendazol é rapidamente metabolizado em oxfendazol (Suter et al., 2001). Os protocolos que contêm fenbendazol parecem proporcionar maior percentagem de sobrevivência do que os outros, sugerindo por isso ser indispensável o uso desta substância no tratamento de encefalitozoonose (Sieg et al., 2012). A única desvantagem do fenbendazol é o facto de possuir menor absorção quando administrado por via oral (Harcourt-Brown, 2004). O albendazol quando usado durante um período de tempo longo é ineficaz na eliminação da infecção e é exigido um grande controlo e responsabilidade por parte dos proprietários não sendo por isso o princípio activo de eleição (Valencakova et

al., 2008). O fármaco de eleição para o tratamento etiológico em coelhos é o fenbendazol na dose já referida (Künzel e Joachim, 2010).

Em coelhos com sinais neurológicos é aplicável um tratamento antibiótico adicional (enrofloxacina, PO, 10mg/kg, SID ou oxitetraciclina, SC, 20mg/Kg, SID, durante 10 dias) (Künzel et al., 2008), dado que o principal diagnóstico diferencial é a infecção ascendente por *P. multocida* (Harcourt-Brown e Holloway, 2003; Valencakova et al., 2008). Também está descrito o uso de oxitetraciclina como tratamento base de encefalitozoonose; no entanto, a eficácia deste ainda não está bem determinada. Num estudo apenas 50% dos animais responderam positivamente (Harcourt-Brown, 2004).

A dexametasona (1 a 2 mg/kg) (Harcourt-Brown, 2004) pode aliviar os sinais neurológicos através da supressão da inflamação granulomatosa. Contudo, não é claro que o seu efeito seja duradouro, não tem qualquer efeito directo no parasita (Suter et al., 2001) e o seu uso em coelhos com encefalitozoonose poderá ser contra-indicado devido aos seus efeitos imunodepressores (Harcourt-Brown e Holloway, 2003), que podem inibir a resposta dos linfócitos T e a produção de citocinas, mecanismos essenciais para a defesa do hospedeiro (Künzel e Joachim, 2010).

Pode ainda ser necessário tratamento sintomático: o uso de diazepam (1-2mg/kg, SC ou IV) ou midazolam (0,5-2mg/kg SC ou IV) para o controlo das convulsões, o uso de analgésicos não esteróides, como o carprofeno (2 a 4 mg/kg SC ou IV) ou o meloxicam (0,1 a 0,2mg/kg PO), para alívio sintomático da dor nas dermatites da zona perineal por incontinência urinária. Recentemente, outras opções de tratamento, tais como a redução do stress (ruído) e a psicoterapia têm sido consideradas como adjuvantes na terapia de animais com síndrome vestibular (Künzel e Joachim, 2010).

O tratamento dos coelhos com insuficiência renal crónica por *E. cuniculi* é normalmente sintomático, constando de fluidoterapia adequada, reduzido teor de cálcio na dieta (Harcourt-Brown, 2004), controlo médico da hiperfosfatemia e acidose gastrointestinal (Fisher, 2006). No caso de uveíte está descrito o uso de oxitetraciclina e dexametasona (Harcourt-Brown, 2004). A terapia tópica tem normalmente pouco sucesso (Künzel e Joachim, 2010), mas no caso de queratoconjuntivite por *E. cuniculi*, a fumagilina tópica (antibiótico produzido pelo fungo *Aspergillus fumigatus*) é altamente eficaz (Didier, 2005). A remoção cirúrgica do cristalino por faco-emulsificação é um tratamento etiológico eficaz em coelhos com uveíte facoclástica, em conjunto com o maneio médico (Künzel e Joachim, 2010). Em caso de uveíte bastante avançada pode-se optar pela enucleação (Harcourt-Brown, 2004). Na maioria dos

animais, os sinais de uveíte reactiva desaparecem permanentemente com o tratamento, mas os granulomas e as cataratas persistem após terapia convencional (Künzel e Joachim, 2010).

A eliminação do agente com um tratamento parasiticida não reverte as alterações crónicas já instaladas (Harcourt-Brown, 2004) e por isso os coelhos com sinais neurológicos avançados ou com insuficiência renal grave podem não responder ao tratamento (Valencakova et al., 2008).

É difícil determinar a eficácia dos vários fármacos porque infecções latentes podem ocorrer e alguns casos clínicos melhoram espontaneamente sem qualquer tratamento médico, presumivelmente devido a uma adequada resposta imunitária do hospedeiro (Fisher, 2006). Os clínicos médico-veterinários dependem geralmente de alterações significativas na condição clínica do animal para avaliar se o tratamento é ou não eficaz, pois a confirmação laboratorial da eficácia do mesmo é controversa (Lennox e Kelleher, 2009). Alguns estudos demonstraram que substâncias inibidoras de enzimas responsáveis pela síntese de quitina são eficazes contra os microsporídeos (Mathis et al., 2005) e o metabolismo dos lípidos parece ser um alvo promissor da actuação destes fármacos (El Alaoui et al., 2001).

## **9. Prognóstico**

A evolução da gravidade dos sinais clínicos é o melhor indicador de prognóstico. Regra geral, os coelhos que continuam a comer voluntariamente têm boa possibilidade de sobrevivência (Harcourt-Brown e Holloway, 2003). O prognóstico na forma neurológica é razoável (Weese e Fulford, 2011), enquanto na forma renal varia segundo o grau de uremia verificado e a gravidade dos sinais clínicos (Fisher, 2006), mas de uma maneira geral é desfavorável (Weese e Fulford, 2011). Os coelhos com acesso a comida de boa qualidade têm uma probabilidade de sobrevivência maior desde vários meses ou até 2 anos sem intervenção terapêutica (Valencakova et al., 2008).

## **10. Profilaxia**

Os esporos de *E. cuniculi* permanecem viáveis durante 6 dias em água e 4 semanas em meio seco à temperatura ambiente (Harcourt-Brown, 2004), ou seja, a cerca de 22°C (Weiss, 2001). No entanto, podem ser inactivados nas superfícies pela exposição durante 30 minutos a desinfectantes comuns tais como etanol a 70%, formaldeído a 0.3%, peróxido de hidrogénio a

1% e hidróxido de sódio também a 1% (Künzel e Joachim, 2010), pela fervereira durante 5 minutos, pela esterilização (Keeble e Shaw, 2006) ou pela autoclavagem a 85°C durante 2-6 minutos (Weese e Fulford, 2011).

Não existem factores predisponentes, mas é importante recomendar aos proprietários algumas medidas preventivas como analisar e isolar os animais positivos, realizar tratamento a animais que tenham tido contacto com outros seropositivos e ter boas práticas de manejo e higiene (Keeble e Shaw, 2006) em todas as superfícies e objectos que estejam em contacto directo com o animal para evitar ou minimizar a disseminação do agente (Harcourt-Brown, 2004), pois na maioria dos casos os proprietários não sabem que os seus animais se encontram infectados (Moore, 2005). Os proprietários devem limpar e desinfetar os objectos contaminados utilizando luvas de protecção e devem lavar as mãos após remoção das mesmas (Weese e Fulford, 2011). A presença de animais seropositivos mas aparentemente saudáveis indica a necessidade de análises de rotina para detecção de anticorpos contra *E. cuniculi*, especialmente considerando o seu potencial zoonótico. Por isso deve ser evitado o contacto com urina de animais suspeitos e mesmo aparentemente saudáveis (Ozkan et al., 2011).

### III. MATERIAL E MÉTODOS

Esta dissertação tem como objectivo descrever um estudo da história clínica de coelhos nos quais avaliada a infecção por *E. cuniculi* na Clínica Veterinária Exotics.

#### 1. Anamnese e exame físico

Os dados foram recolhidos a partir do programa Winvet e baseiam-se nos registos clínicos de 144 coelhos de estimação que foram observados desde o ano de 2006 até ao final do ano de 2011. Durante o período de estágio foram directamente acompanhados oito casos clínicos (incluídos nos 144).

A idade dos animais analisados encontrava-se compreendida entre 1 mês a 8 anos e 8 meses e a dos seropositivos entre 1 mês a 8 anos. Os animais foram testados por revelarem sinais clínicos neurológicos, renais ou oftalmológicos compatíveis com encefalitozoonose; por conviverem com animais infectados; ou como parte integrante de um exame de rotina por conviverem com pessoas imunodeprimidas.

Os sinais neurológicos incluíam “head tilt” (Figura 4), nistagmos, ataxia, paralisia, paresia, alterações comportamentais (automutilação, agressividade), tremores, convulsões, défices proprioceptivos, movimentos circulares e giratórios sobre si mesmo em marcha ou em repouso, impedindo que o animal se mantivesse numa posição normal.



**Figura 4** - Coelho com “head tilt” (cabeça inclinada), (imagem gentilmente cedida por Xavier Valls).

Os sinais urinários incluíam sinais compatíveis com insuficiência renal (disúria, entre outros), dermatite húmida por contacto com urina na região do períneo, e incontinência

urinária. Os sinais oftalmológicos incluíam uveíte compatível com uveíte facoclástica (Figura 5), catarata, dacriorreia, hipópion com sinequias, hifema, úlcera corneal e epífora. Alguns animais revelaram ainda sinais inespecíficos, ou seja, não sugestivos de encefalitozoonose, como anorexia, apatia e prostração.



**Figura 5** - Coelho com lesão compatível com uveíte facoclástica por *E. cuniculi*, (imagem gentilmente cedida por Xavier Valls).

## 2. Análises laboratoriais

Entre o início do ano de 2006 e final do ano de 2011, na Clínica Veterinária Exotics, foram analisadas 144 amostras de sangue de coelhos domésticos através da técnica de imunofluorescência indirecta (IFI) para despiste de *E. cuniculi*.

As amostras de sangue, de cerca de 2 ml, foram recolhidas a partir da veia safena (Figura 6) para seringas heparinizadas e enviadas para o laboratório Echevarne em Barcelona, onde foram testadas por IFI.



**Figura 6** - Recolha de sangue a partir da veia safena num coelho (adaptado de Melillo 2007).

Na técnica de IFI são efectuadas várias diluições do soro a ser testado que são colocadas em placas revestidas por antígenos de *E. cuniculi*. Caso o soro testado tenha anticorpos específicos para o agente, estes ligam-se ao antígeno e essa ligação é revelada pelo uso de conjugados imunofluorescentes num microscópio com lâmpada ultravioleta. São avaliadas várias diluições até que a intensidade da imunofluorescência na última diluição efectuada não seja suficiente para se obter um título positivo. A avaliação da intensidade da imunofluorescência é um critério que se presta a alguma subjectividade se for avaliada por diferentes pessoas. Os títulos obtidos no presente estudo foram de 80, 160, 320,  $\geq 320$ , 640,  $\geq 640$ .

Foram medidas, por electroforese, as proteínas plasmáticas em 45 coelhos seropositivos e este método foi utilizado como método complementar de diagnóstico, sendo que se os animais seropositivos revelassem um rácio albumina/globulina inferior aos valores normais, tal apoiava a hipótese de existência de infecção activa por *E. cuniculi*.

Para alguns dos coelhos foram realizados hemograma e análise bioquímica sérica.

### 3. Tratamento

O tratamento base de todos os coelhos infectados com *E. cuniculi* confirmados por IFI foi constituído por fenbendazol (Panacur®, Intervet/MSD - Figura 7) na dose de 20 mg/kg por via oral (PO), de 24 em 24 horas (SID), durante 28 dias.



**Figura 7**– Fenbendazol (Panacur.MSD).

Os coelhos com síndrome vestibular acentuada foram medicados com dexametasona (Fortecortin®, Merk) parenteral na dose de 1 a 2 mg/kg, toma única ou máximo de duas tomas. Os coelhos com suspeita de paragem intestinal ou de algum processo doloroso foram

medicados com buprenorfina (Buprex®, Schering Plough) na dose de 0,02- 0,1 mg/kg SC 12h, que é um analgésico opióide potente de acção prolongada. Os coelhos que revelaram um quadro convulsivo antes ou durante a hospitalização foram medicados com diazepam (Valium®, Roche) na dose de 1mg/kg por via intravenosa (IV) ou intrarrectal, toma única e nos casos refractários foi repetida a administração. Em casos não controlados por diazepam optou-se pelo uso de fenobarbital (medicamento genérico) na dose de 5-15mg/kg, PO, BID. Em quadros convulsivos não controlados por nenhum dos fármacos anteriores, os animais foram submetidos a infusão contínua de diazepam ou fenobarbital.

Os coelhos que revelaram uveíte facoclástica foram medicados com meloxicam (Metacam®, Boehringer Ingelheim) e colírio de cloranfenicol e succinato sódico de dexametasona (Colicursi de icol®, ALCON) na dose de 1 gota a cada 6 a 12 horas, dependendo da gravidade da uveíte. Em caso de suspeita de otite concomitante administrou-se enrofloxacin (Baytril®, Bayer AH) na dose de 5 mg/kg, por via subcutânea (SC), PO, de 12 em 12 horas (BID) durante 14 dias, para tratamento de possível infecção por *Pasteurella* spp.

Os coelhos que revelaram um quadro clínico compatível com insuficiência renal com sinais de desidratação receberam tratamento de suporte com fluídos (NaCl 0,9%) por via SC ou IV (taxa de manutenção 4ml/kg/h). Nos coelhos com dermatite por contacto com urina na região do períneo foi administrado antibiótico (Baytril comprimidos 50mg®) na mesma dose que acima mas PO, para prevenir qualquer infecção, anti-inflamatório-analgésico (Metacam®, na dose de 0,3mg/kg, PO, SID, durante 5 dias), para diminuir inflamação local e a dor associada. Foi também realizada limpeza da região afectada com clorhexidina (Desinclor®, AGB) e feita a aplicação de uma pomada de sulfadiazina de prata a 10mg/g (Silvederma®, ALDO) como antibacteriano tópico para prevenção de infecções bacterianas secundárias. Nalguns casos mais graves de dermatite foi utilizada buprenorfina (Buprex®) na dose de 0,02- 0,1 mg/kg SC BID, para controlo de dor. Nos casos de disúria de origem nervosa foi administrada gabapentina (medicamento genérico, na concentração de 100mg/ml) na dose de 10mg/kg PO BID, que actua na modelação do sistema nervoso e reduz a actividade nervosa responsável por dor neuropática.

A todos os coelhos internados que manifestaram hiporexia ou anorexia foi administrada o preparado alimentar completo para herbívoros Oxbow Critical Care (Figura 8) com seringa de 1ml (para melhor tolerância por parte do animal) em quantidades finais de 10 a 20 ml por toma (dependendo do peso do animal), sendo administradas 3 tomas diárias.



**Figura 8** - Oxbow Critical Care.

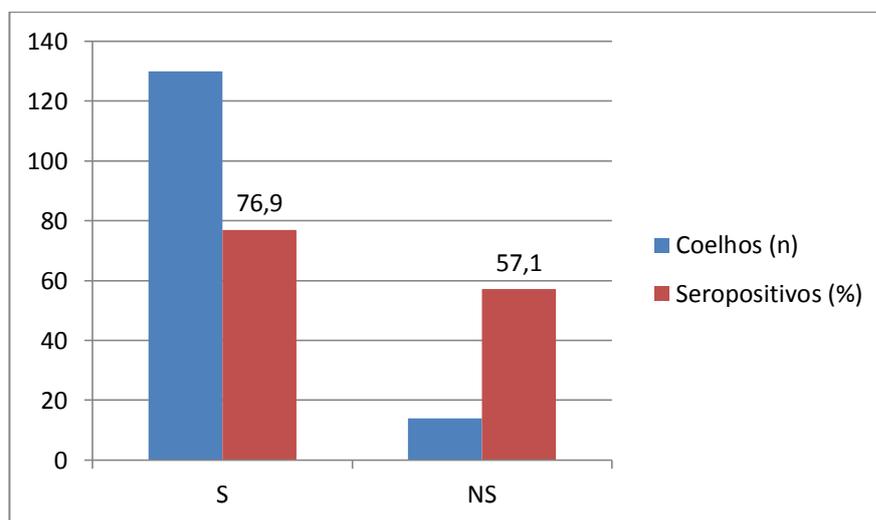
#### **4. Análise estatística**

Para a comparação de valores de seropositividade entre sexos, idades e estado de suspeita clínica foram utilizados os testes estatísticos do Qui-quadrado ou exacto de Fisher. Um valor de probabilidade ( $p$ )  $< 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. Os cálculos foram efectuados com recurso ao programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences).

#### IV. RESULTADOS

Dos 144 coelhos analisados por IFI entre Março de 2006 e Dezembro de 2011, 108 revelaram resultado serológico positivo (75%) e 36 revelaram resultado serológico negativo (25%). Desse total de 144 animais, 13 coelhos foram sujeitos a nova análise serológica para controlo de infecção e 10 desses coelhos mantiveram o mesmo título da primeira análise e em três coelhos o título diminuiu ou tornou-se mesmo seronegativo. Em dois coelhos com manifestações urinárias optou-se pela eutanásia.

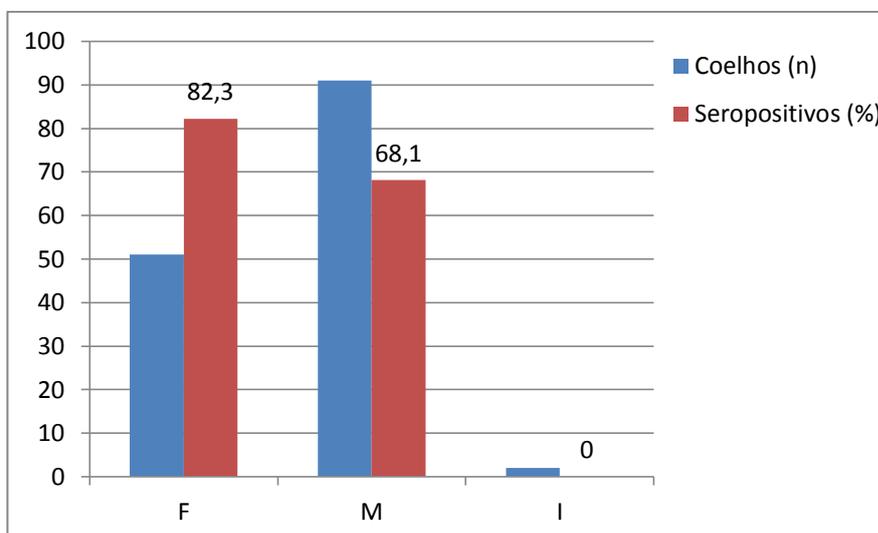
Dos 130 coelhos clinicamente suspeitos, ou seja com sinais clínicos compatíveis com encefalitozoonose, 100 estavam seropositivos (76,9%) e 30 seronegativos (23,1%). Dos 14 coelhos não suspeitos, ou seja sem sinais clínicos compatíveis com encefalitozoonose, oito estavam seropositivos (57,1%) e seis seronegativos (42,9%) (Figura 9). Não se verificou diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,140$ ) entre a seropositividade nos coelhos clinicamente suspeitos (76,9%) e nos não suspeitos clinicamente (57,1%) (Anexo 1).



**Figura 9**– Distribuição e seropositividade (%) dos coelhos analisados por IFI relativamente à existência de sinais clínicos compatíveis com encefalitozoonose. S - suspeitos; NS – não suspeitos.

Em relação ao sexo dos animais analisados por IFI (Figura 10), os dados encontram-se divididos por géneros: fêmea, macho e indisponível (por ausência de informações). Do total de 144 animais analisados 51 eram fêmeas (35,4%), 91 eram machos (63,2%) e para dois animais, a informação sobre o sexo não se encontrava disponível na ficha clínica (1,4%). Das 51 fêmeas 44 eram seropositivas (82,3%) e dos 91 machos 62 eram seropositivos (68,1%). O número absoluto de machos foi mais elevado, mas não foi possível confirmar se esta é a

situação real na população cunícola da área de influência da Clínica. Apesar disto, a seropositividade foi significativamente mais elevada entre as fêmeas observadas. Verificou-se uma diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,017$ ) entre a seropositividade nas fêmeas (82,3%) e nos machos (68,1%) (Figura 10) (Anexo 1).

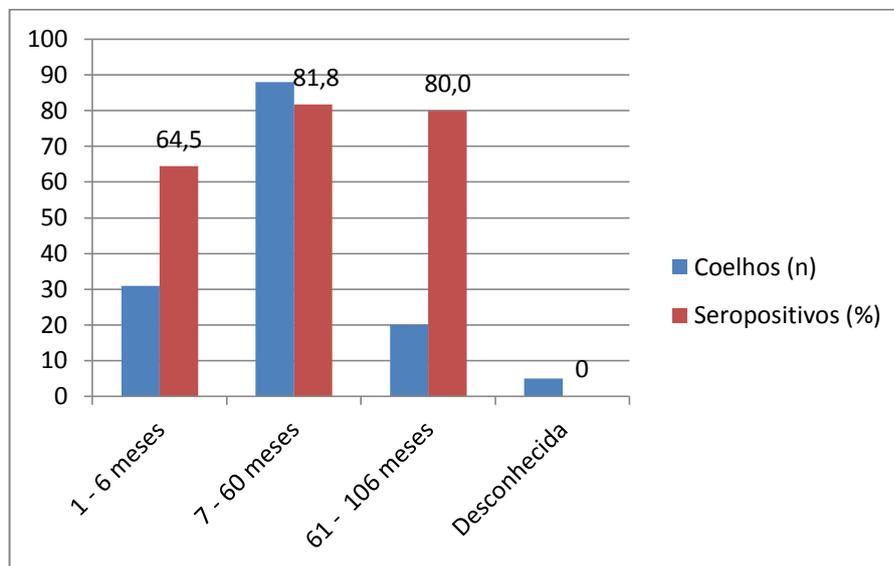


**Figura 10** - Sexo e seropositividade (%) dos coelhos analisados por IFI. F- fêmea; M – macho; I – indisponível.

Em relação à distribuição por idades (Figura 11) dos animais analisados por IFI, os dados disponíveis foram agrupados em 3 grupos etários: 1-6 meses, 7-60 meses e 61-100 meses, tendo em conta que os coelhos atingem normalmente a maturidade sexual entre os 4-8 meses (as fêmeas normalmente mais cedo do que os machos), e que a esperança média de vida dos coelhos domésticos varia entre os 5-10 anos. Os dados são apresentados em meses para facilitar a exposição e leitura dos mesmos. Os coelhos dentro do primeiro grupo (1-6 meses) consideram-se jovens, dentro do segundo grupo (7-60 meses) adultos e dentro do terceiro grupo (61-100 meses) idosos. A idade dos coelhos analisados encontrava-se entre 1 mês e 106 meses (8 anos e 8 meses). Dentro do grupo dos jovens encontravam-se 31 coelhos (21,5%), no grupo dos adultos encontravam-se 88 coelhos (61,1%) e no grupo dos idosos encontravam-se 20 coelhos (13,8%). Dos 31 coelhos jovens 20 encontravam-se seropositivos (64,5%); dos 88 coelhos adultos 72 encontravam-se positivos (81,8%) e dos 20 coelhos idosos 16 encontravam-se seropositivos (80,0%).

Em relação aos 108 coelhos seropositivos, dentro do grupo dos jovens encontravam-se 20 coelhos (18,5%), no grupo dos adultos encontravam-se 72 coelhos (66,7%) e por fim no grupo dos idosos encontravam-se 16 coelhos (14,8%).

Da comparação entre grupos etários aos pares, verificou-se uma diferença significativa ( $p = 0,048$ ) entre a seropositividade dos animais jovens (1-6 meses; 64,5%) e o dos adultos (7-60 meses; 81,8%). As demais comparações aos pares não detectaram quaisquer outras diferenças significativas (Anexo 1).

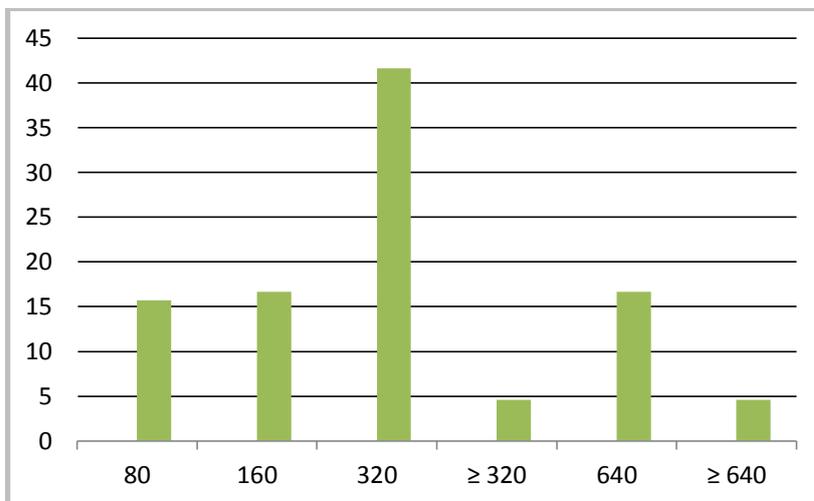


**Figura 11** – Distribuição e seropositividade (%) dos coelhos analisados por IFI por idade.

A média de idades dos animais seropositivos relativamente ao quadro clínico manifestado apresenta-se nos seguintes valores: os animais com sinais clínicos neurológicos apresentam uma média de 33,6 meses, os com sinais oftalmológicos apresentam uma média de 32,5 meses, os com sinais urinários apresentam uma média de 48,2 meses. Os animais que não tinham sinais compatíveis com encefalitozoonose apresentavam uma média de idades de 23,8 meses.

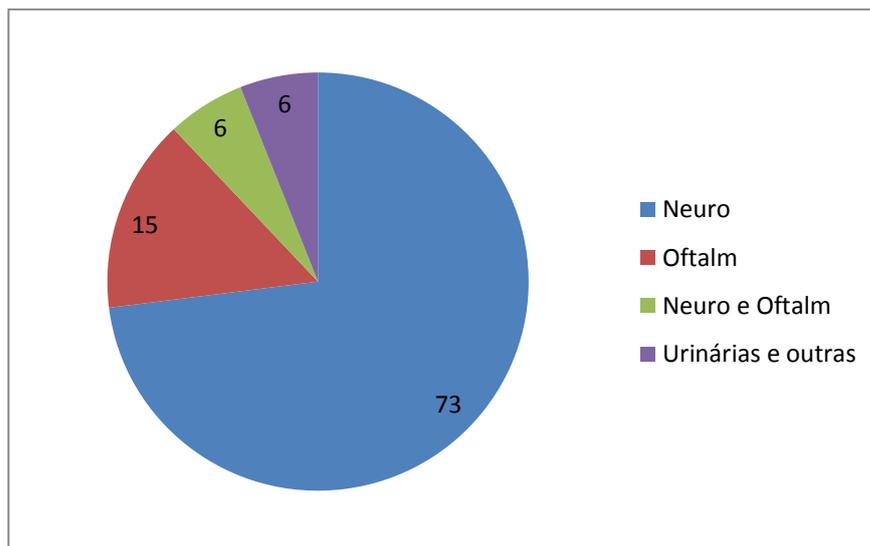
Relativamente aos títulos de anticorpos obtidos por IFI nos coelhos seropositivos (Figura 12), verificou-se uma predominância do resultado 320 (41,7%), em comparação com os restantes (80, 160,  $\geq 320$ , 640 e  $\geq 640$ ). O título  $\geq 320$  surge pelo facto de nalguns casos se ter optado testar apenas até à diluição de 1/320, mas o título poderia ser mais elevado. Os valores obtidos em número absoluto e em percentagem para cada titulação foram: título de 80 (n=17; 15,7%), 160 (n=18; 16,7%), 320 (n=45; 41,7%),  $\geq 320$  (n=5; 4,6%), 640 (n=18; 16,7%) e  $\geq 640$  (n=5; 4,6%). Os coelhos com sinais compatíveis com encefalitozoonose tinham títulos entre 80 a  $\geq 640$  e os sem sinais compatíveis revelaram títulos entre 80 a 320. Não se procedeu

a comparação estatística entre os dois grupos de coelhos, devido precisamente ao facto de os títulos  $\geq 320$ ,  $\geq 640$  poderem na realidade ser mais elevados.



**Figura 12** - Títulos obtidos por IFI (%).

Relativamente às manifestações clínicas reveladas pelos coelhos seropositivos suspeitos (100 coelhos) (Figura 13), os animais foram distribuídos por quatro grupos. No grupo das manifestações neurológicas compatíveis com encefalitozoonose (Neuro) encontravam-se 73 coelhos (73%), 69 desses indivíduos revelaram somente sinais neurológicos, dois tinham alterações comportamentais em conjunto com sinais neurológicos e outros dois revelaram apenas alterações comportamentais. No grupo das manifestações oftalmológicas compatíveis com encefalitozoonose (Oftalm) encontravam-se 15 coelhos (15%). No grupo das manifestações neurológicas e oftalmológicas (Neuro e Oftalm) encontravam-se seis animais (6%). No grupo das alterações urinárias e outras (Urinárias e outras) encontravam-se seis animais (6%), sendo que, dois desses demonstraram apenas alterações urinárias, dois revelaram alterações urinárias e neurológicas, um revelou alterações urinárias e oftalmológicas e um revelou alterações urinárias, neurológicas e oftalmológicas. Apesar de alguns desses animais terem revelado tanto sinais neurológicos como oftalmológicos compatíveis com encefalitozoonose, optou-se pela sua colocação no grupo Urinárias e outras, em vez de no grupo Neuro e Oftalm, pois todos os indivíduos dentro desse grupo revelaram sinais urinários compatíveis a par das restantes manifestações.



**Figura 13** - Quadros clínicos compatíveis com encefalitozoonose (%).

Relativamente aos sinais clínicos neurológicos manifestados pelos coelhos seropositivos a *E. cuniculi* (Tabela 2) detectaram-se 13 tipos de sinais clínicos, sendo que no grupo das alterações comportamentais incluem-se tremores, agressividade, automutilação e perda dos hábitos comuns de higiene. No grupo Outras incluem-se os sinais ou manifestações clínicas com menor expressão numérica na amostra: cegueira (n=1), midríase (n=1), ausência de sensibilidade à dor profunda (n=1) e ausência ou diminuição de reflexos (n=1). É de realçar que houve coelhos com mais do que um sinal clínico.

**Tabela 2** - Sinais clínicos neurológicos detectados nos coelhos seropositivos por IFI.

Sinais neurológicos	N.º de animais afectados	%
“Head tilt” (cabeça inclinada)	39	23,9
Nistagmos	20	12,3
Ataxia/perda de equilíbrio	18	11,0
Alterações comportamentais	17	10,4
Movimentos circulares	16	9,8
Queda com enrolamento	14	8,6
Tetra/paresia	11	6,7
Rotação da cabeça	7	4,3
Claudicação	6	3,7
Convulsões	5	3,1
Outras	4	2,5
Diminuição da propriocepção	3	1,8
Espasmos musculares	3	1,8
<b>Total</b>	<b>163</b>	<b>100</b>

Relativamente aos sinais clínicos oftalmológicos manifestados pelos coelhos seropositivos a *E. cuniculi* (Tabela 3) detectaram-se 10 tipos de sinais clínicos, sendo que no grupo dos abcessos oculares incluem-se abcessos da íris, da pálpebra e terceira pálpebra e infraorbitários. No grupo dos outros incluem-se os sinais clínicos com menor expressão numérica na amostra: buftalmia (n=2), lesão na câmara anterior (n=2), hiperpigmentação de córnea (n=1), úlcera de córnea (n=1) e hifema (n=1). É de realçar também que houve coelhos com mais do que um sinal clínico.

**Tabela 3** - Sinais clínicos oftalmológicos detectados nos coelhos seropositivos por IFI.

Sinais oftalmológicos	N.º de animais afectados	%
Uveíte facoclástica	8	19,5
Abcessos oculares	7	17,1
Outras	6	14,6
Edema/neovascularização corneal	4	9,8
Epífora	4	9,8
Dacriorreia	3	7,3
Sinequia/hipópion	3	7,3
Cataratas	2	4,9
Conjuntivite	2	4,9
Lesões no cristalino	2	4,9
<b>Total</b>	<b>41</b>	<b>100</b>

Por último, relativamente aos sinais clínicos urinários/inespecíficos manifestados pelos coelhos seropositivos a *E. cuniculi* (Tabela 4) detectaram-se 7 tipos de sinais clínicos, sendo que no grupo das outras dermatites incluem-se dermatite periocular e dermatite na zona do escroto provocada por lambedura excessiva na referida zona. Também aqui houve coelhos com mais do que um sinal clínico.

**Tabela 4** - Sinais clínicos urinários/inespecíficos detectados nos coelhos seropositivos por IFI.

Sinais urinários/inespecíficos	N.º de animais afectados	%
Anorexia/hiporexia	7	41,2
Disúria/postura antiálgica	3	17,6
Dermatite húmida do períneo	2	11,8
Outras dermatites	2	11,8
Incontinência urinária	1	5,9
Debilidade dos membros	1	5,9
Inflamação das extremidades	1	5,9
<b>Total</b>	<b>17</b>	<b>100</b>

A Tabela 5 tem o intuito de agrupar todos os sinais clínicos manifestados pelos 100 coelhos seropositivos clinicamente suspeitos.

**Tabela 5** -Resumo dos sinais clínicos manifestados pelos coelhos seropositivos.

<b>Sinais clínicos</b>	<b>Nº de animais afectados</b>	<b>%</b>
<b>Sinais de síndrome vestibular</b>	117	52,9
<b>Outros sinais neurológicos</b>	35	15,8
<b>Tetra/paresia</b>	11	5,0
<b>Uveíte facoclástica</b>	8	3,6
<b>Abcessos oculares</b>	7	3,2
<b>Outras alterações oculares</b>	26	11,8
<b>Sinais compatíveis com IR</b>	10	4,5
<b>Sinais inespecíficos</b>	7	3,2
<b>Total</b>	<b>221</b>	<b>100</b>

Relativamente aos animais sem sinais clínicos mas seropositivos (n=8), três coelhos foram testados por conviverem com pessoas imunodeprimidas, quatro por conviverem com coelhos seropositivos a *E. cuniculi* que morreram e um coelho foi testado no âmbito de um exame de rotina.

Relativamente aos métodos complementares de diagnóstico utilizados, são sumariados na Tabela 6 os resultados do hemograma de coelhos seropositivos. Os valores de referência foram disponibilizados pelo Laboratório Echevarne, que realizou as análises.

**Tabela 6** - Valores de hemograma obtidos nalguns dos coelhos seropositivos.

Hemograma	Intervalo de referência				
	n	Min - Máx	↓n	↑n	Min - Máx
<b>Eritrócitos (10<sup>6</sup>/μl)</b>	14	4,84 - 7,07	1	1	5,0 - 7,0
<b>Htc (%)</b>	20	29,0 - 69,7	5	1	35 - 50
<b>Hemoglobina (g/dl)</b>	15	9,7 - 15,2	N	1	9,0 - 15,0
<b>VCM (fl)</b>	15	56,1 - 70,0	4	1	60,0 - 68,0
<b>HCM (pg)</b>	15	19,64 - 22,46	N	2	19,0 - 22,0
<b>CHCM (g/dl)</b>	15	32,0 - 35,8	N	1	31,0 - 35,0
<b>Leucócitos (10<sup>3</sup>/μl)</b>	17	2,1 - 17,4	6	3	5,0 - 10,5
<b>Neutrófilos (%)</b>	17	11,0 - 71,0	3	N	30,0 - 80,0
<b>Linfócitos (%)</b>	17	20,0 - 88,0	N	3	20,0 - 62,0
<b>Monócitos (%)</b>	17	0 - 9,0	4	1	1,0 - 7,0
<b>Eosinófilos (%)</b>	17	0 - 11,0	N	1	0 - 4,0
<b>Basófilos (%)</b>	17	0 - 10,0	N	4	0,0 - 1,0
<b>Plaquetas (10<sup>3</sup>/μl)</b>	14	91,8 - 602	9	N	270 - 620
<b>Fibrinogénio (mg/dl)</b>	3	2,76 - 4,5	N	4	2,0 - 3,0
<b>Proteínas plasmáticas (g/l)</b>	4	60 - 68	N	3	50 - 60

n – n.º de coelhos analisados; Min – Máx – valor mínimo e valor máximos obtidos, respectivamente; ↓(n)/↑(n) – número de coelhos com valor abaixo/acima do valor mínimo/máximo do intervalo de referência, respectivamente. N – valor dentro do intervalo de referência. Htc – hematócrito; VCM – volume corpuscular médio; HCM – hemoglobina corpuscular média; CHCM – concentração de hemoglobina corpuscular média.

Relativamente aos parâmetros de bioquímica sérica medidos são também aqui apresentados os resultados dos coelhos seropositivos por IFI (Tabela 7). Não sendo possível o acesso ao intervalo de referência utilizado pelo Laboratório Echevarne, optou-se por utilizar o intervalo referido por Mellilo (2007), por sugestão de elementos da Clínica.

**Tabela 7** - Valores de bioquímica obtidos nalguns dos coelhos seropositivos.

Bioquímica	Intervalo de referência				
	n	Min - Máx	↓n	↑n	Min - Máx
Ureia (mg/dl)	13	15 - 133	2	4	20,0-45,0
Creatinina (mg/dl)	13	0,7 - 3,48	N	2	0,5-2,5
PT (g/dl)	6	5,9 - 83	N	3	5,4-7,5
Albumina (g/dl)	7	6,0 - 43,0	N	7	2,7-5,0
ALT (U/L)	11	22 - 97	6	1	45,0-80,0
FA (U/L)	3	19 - 155	N	1	12,0-96,0
Bilirrubina Total (mg/dl)	1	0,2	N	N	0-0,7
K (mmol/l)	2	3,8 - 4,8	N	N	3,5-6,9
Na (mmol/l)	2	139 - 155	N	1	138-150
P (mg/dl)	1	3,4	1	N	4,0-6,5
Ca (mg/dl)	1	12,8	N	N	11,0-14,0
Colesterol (mg/dl)	1	19	N	N	10,0-80,0
Ác. Biliares (µmol/l)	1	5,24	N	N	<40
Glicose (mg/dl)	2	149 - 189	N	1	75-155
Amilase (UL)	1	303	N	N	200-400

n – número de coelhos analisados; Min – Máx – valor mínimo e valor máximos obtidos, respectivamente; ↓ n/↑ n - número de coelhos com valor abaixo/acima do valor mínimo/máximo do intervalo de referência, respectivamente. N - valor dentro do intervalo de referência. PT – proteínas totais; ALT– Alanina aminotransferase; FA– Fosfatase alcalina; K– potássio, Na– sódio; P– fósforo; Ca– cálcio.

Apresenta-se, por último, uma tabela que resume os valores médios e respectivos desvios padrão relativamente a cada parâmetro medido no proteinograma (Tabela 8) em 45 dos coelhos seropositivos por IFI, sendo 42 desses 45 coelhos analisados suspeitos de infecção e 3 não suspeitos. As diferenças entre os dois grupos de coelhos seropositivos (suspeitos e não suspeitos) não se revelaram estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 8** – Proteinograma de 45 coelhos seropositivos.

<b>Proteinograma</b>	<b>Suspeitos</b>	<b>N</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio - Padrão</b>
<b>PT (g/l)</b>	Sim	42	66,10	8,433
	Não	3	61,00	4,359
<b>Album (g/l)</b>	Sim	42	44,388	8,3769
	Não	3	42,800	8,4445
<b>Glob T (g/l)</b>	Sim	42	21,717	7,4226
	Não	3	18,200	5,1098
<b>a1 glob (g/l)</b>	Sim	42	3,976	1,3496
	Não	3	3,867	,4163
<b>a2 glob (g/l)</b>	Sim	42	3,824	1,8769
	Não	3	4,733	2,0551
<b>β glob (g/L)</b>	Sim	42	6,288	3,6533
	Não	3	4,133	1,6623
<b>Υ glob (g/L)</b>	Sim	42	7,629	4,1986
	Não	3	5,467	2,4007
<b>Cociente SA/GT</b>	Sim	42	2,2976	,90667
	Não	3	2,6167	1,38911

PT – proteínas totais; Album – albumina; Glob T – globulinas totais; (a1, a2, β, Υ) glob – globulinas; SA/GT – Albumina/globulinas totais

## V. DISCUSSÃO

Na actualidade, é cada vez maior a importância atribuída ao estudo da encefalitozoonose nos animais por clínicos e investigadores de Medicina Veterinária e Medicina Humana (Valencakova et al.,2008), pois a confirmação do carácter zoonótico do agente e a aquisição cada vez mais frequente de coelhos domésticos como animais de companhia dão ênfase a esta patologia (Mitchell e Tully, 2004). Muitas infecções são inicialmente assintomáticas, mas por razões ainda não totalmente explicáveis, muitos coelhos desenvolvem sinais clínicos no decurso da infecção (Harcourt-Brown, 2004).

No presente trabalho os resultados relativos à percentagem de amostras serologicamente positivas por IFI levam-nos a concluir que a maior parte (cerca de 2/3 da amostra) dos coelhos testados na Clínica Veterinária Exotics ao longo de um período de 6 anos se encontrava infectada por *E. cuniculi* (75%). Contudo, como nem toda a população de coelhos domésticos é atendida nesta clínica e como a Clínica analisou por IFI mais animais suspeitos do que não suspeitos, não podemos tirar conclusões relativas à prevalência de infecção por *E. cuniculi* na população de coelhos de Barcelona. Valores de 52% e de 67,2% foram obtidos em coelhos domésticos do Reino Unido, através de ELISA (Keeble e Shaw, 2006) e de Itália, por ELISA e CIA (Dipineto et al. 2008), respectivamente. No estudo realizado por Keeble e Shaw (2006) os coelhos analisados foram escolhidos aleatoriamente e o teste fez parte de um exame de rotina, pelo que não deve ser comparado com o nosso estudo, em que os coelhos foram testados por revelarem sinais compatíveis, por conviverem com pessoas imunodeprimidas ou com animais seropositivos. Já no estudo realizado por Dipineto et al. (2008) os valores são comparáveis, pois os motivos pelos quais se testaram os animais foram semelhantes, e o nosso estudo apresenta uma seropositividade superior (75%).

Apesar de no nosso estudo não se ter verificado associação entre o estado clínico e a seropositividade, é de admitir que os coelhos suspeitos de encefalitozoonose sejam mais provavelmente seropositivos do que os coelhos clinicamente normais (Cray et al., 2009). Uma das razões que podem explicar a inexistência de diferença significativa no nosso trabalho é o facto de alguns dos animais mesmo clinicamente não suspeitos terem contacto com coelhos que sofriam de encefalitozoonose, tendo por isso uma probabilidade relativamente maior de poderem estar infectados pelo agente. Não obstante, também pode haver coelhos com sinais clínicos mas seronegativos, tal como se verificou no nosso estudo em que 23,1% dos 130 animais clinicamente suspeitos revelaram título negativo.

Relativamente ao sexo dos coelhos analisados serologicamente por IFI, o número absoluto de machos foi mais elevado (63,2%), porém a constituição da população de coelhos atendida na Clínica não se encontra devidamente estudada. Foi-nos dito que em média atendem igual número de fêmeas e machos, mas não existem dados concretos do período referente a este estudo. Apesar disto, a seropositividade foi significativamente mais elevada entre as fêmeas observadas. Verificou-se uma diferença estatisticamente significativa entre a seropositividade nas fêmeas (82,3%) e nos machos (68,1%). Estes resultados estão em desacordo com o estudo de Harcourt-Brown (2004), em que foi demonstrada uma aparente predominância de infecção em machos: 54,8% de seropositividade em fêmeas e 73,8% de seropositividade em machos. Porém, a maioria dos estudos disponíveis não refere associação entre o sexo do coelho e a infecção por *E. cuniculi* (Keeble e Shaw, 2006; Dipineto et al., 2007; Cray et al., 2009; Tee et al., 2011).

Quanto à idade dos indivíduos infectados verificam-se diferenças entre alguns grupos etários, pelo que a idade parece ser um factor relevante na seropositividade. O grupo etário dos 7-60 meses (coelhos adultos) destaca-se com uma percentagem de 81,8% e uma diferença significativa em relação aos 64,5% dos coelhos jovens (1-6 meses). Este resultado encontra-se de acordo com alguns estudos que referem existir maior prevalência de infecção nos coelhos adultos (Dipineto et al., 2007; Kai-Yee Tee, 2011) em detrimento de coelhos jovens. Contudo, noutros estudos não foram encontradas quaisquer diferenças relativamente à idade dos coelhos domésticos analisados (Keeble and Shaw, 2006; Cray et al., 2009; Jeklova et al., 2010).

Em relação à média de idades, para os 100 coelhos clinicamente suspeitos e seropositivos, verificou-se que os animais com sinais neurológicos e oftalmológicos apresentavam uma idade inferior à manifestada pelos animais com sinais urinários, o que se encontra de acordo com estudo de Künzel et al. (2008). Tal poderá ser justificado pelo facto de que muitos dos sinais clínicos manifestados na insuficiência renal são inespecíficos e como tal na maioria dos casos não são detectados pelos proprietários e por isso não há uma suspeita que conduza ao diagnóstico correcto.

Quanto às titulações obtidas, pode-se concluir que a titulação 320 é a mais frequente, com maior percentagem de resultados (41,7%). Contudo, não se sabe se alguns dos resultados obtidos no grupo  $\geq 320$  coincidiriam ou não com o título 320. Na bibliografia é referido que durante a fase inicial de infecção espera-se que os títulos obtidos sejam mais elevados e que depois com o decorrer do tratamento se tornem mais reduzidos (Rich, 2010). No nosso

estudo, foi efectuada nova análise serológica, após tratamento, numa pequena porção da amostra (13/144=9%), e na maioria dos casos os títulos mantiveram-se iguais aos iniciais. Como a amostra em causa é reduzida e como as novas análises não foram efectuadas num igual período de tempo após a primeira análise, não podemos tirar conclusões válidas acerca desta variável. O facto de não existir uma categoria de títulos superiores a 640 advém de o laboratório Echevarne não realizar por rotina a diluição superior a 1/640. O valor do título não confirma em absoluto que *E. cuniculi* seja o agente etiológico (Jeklova et al., 2010) e um título positivo pode indicar apenas exposição ao agente (Rich, 2010), pelo que o valor do mesmo é apenas orientador de diagnóstico. Foi demonstrado que uma elevada percentagem de coelhos têm títulos elevados mesmo na ausência de sinais clínicos (Rich, 2010), o que se verifica neste estudo pois os coelhos sem sinais compatíveis seropositivos revelaram títulos entre 80 e 320. Contudo, a presença de títulos elevados em coelhos clinicamente não suspeitos acresce a importância da avaliação periódica dos coelhos de companhia através de exame físico regular e da análise serológica para *E. cuniculi* em animais clinicamente suspeitos, visto que poder-se-á minimizar um curso clínico grave pela actuação com adequado tratamento precoce. A serologia revela-se um meio de diagnóstico importante na tentativa de distinguir uma infecção activa de uma infecção não activa (Cray et al., 2007).

Da análise do gráfico ilustrativo do tipo de quadros clínicos manifestado (Figura 13) podemos concluir que o quadro neurológico isolado é o mais frequente, estando presente em 73% dos animais seropositivos. O segundo quadro clínico mais frequente constitui o quadro oftalmológico isolado com 15%. Os restantes quadros clínicos apresentam-se em menor proporção. Estes resultados estão de acordo com estudos que referem que a percentagem de coelhos seropositivos com sinais neurológicos ou oftalmológicos é superior à daqueles com sinais urinários (Dipineto et al., 2008; Künzel et al., 2008; Tee et al., 2011). Outros estudos referem somente que o quadro clínico mais frequentemente observado é o neurológico (Harcourt-Brown, 2004; Künzel et al., 2008. Ashmawy et al., 2011), o que também se encontra de acordo com o presente estudo.

O sinal clínico mais frequentemente detectado nos animais seropositivos é o “head tilt” (Tabela 2), tendo sido observado no maior número de coelhos seropositivos (n=39). Este resultado encontra-se de acordo com os resultados obtidos em estudos anteriores (Harcourt-Brown e Holloway, 2003; Igarashi et al., 2008). Para além disso, verifica-se uma predominância do conjunto de sinais típicos de síndrome vestibular em relação a outros sinais

neurológicos (Tabela 2), o que também está de acordo com estudos anteriores (Künzel et al., 2008; Gruber et al., 2009).

Dentro dos sinais oculares observados (Tabela 3), a alteração compatível com “uveíte facoclástica” é o sinal clínico mais frequentemente observado, com 19,5% do total de sinais oculares, seguida pelos abscessos oculares, com 17,1%. Alguns estudos referem que o sinal clínico oftalmológico “uveíte facoclástica” é o mais frequentemente detectado em animais seropositivos a *E. cuniculi*, contudo não fazem referência a abscessos oculares (Künzel et al., 2008; Rich, 2010). O estudo de Künzel et al. (2008) refere que para designarmos a uveíte de facoclástica é necessário um exame histológico do cristalino e um exame imunohistoquímico das estruturas circundantes após enucleação. Tal, não foi efectuado, pelo que as designadas “uveítes facoclásticas” constituem alterações possíveis mas não confirmadas.

No grupo dos sinais urinários/inespecíficos (Tabela 4) encontramos como o mais frequente a “anorexia/hiporexia”, com 41,2% de seropositivos animais afectados. A “disúria/postura antiálgica” constituem o segundo grupo mais frequente, com 17,6% de animais afectados. Os restantes grupos têm percentagens com menor proporção na amostra analisada. A “anorexia/hiporexia” é um sinal muito inespecífico que se enquadraria em muitos quadros clínicos, sendo compatível com insuficiência renal por *E. cuniculi*. A “disúria” é um sinal de carácter urinário que se pensa ser secundário a manifestações neurológicas da doença ou proveniente do desgaste muscular associado à debilidade geral do coelho doente (Rich, 2010). Harcourt-Brown (2004); Künzel et al. (2008) e Reusch et al. (2009) referem serem mais frequentes os sinais compatíveis com insuficiência renal, o que se encontra de acordo com o presente estudo, em que na sua totalidade os sinais compatíveis com insuficiência renal são mais frequentes do que os sinais inespecíficos (Tabela 5). Outros estudos referem que as alterações urinárias são bastante variáveis e que na sua maioria não são muito sugestivas de infecção por *E. cuniculi* (Rich, 2010).

Na Tabela 5, que resume todos os sinais clínicos observados, verifica-se uma predominância dos “sinais clínicos típicos de síndrome vestibular” (“head tilt”, nistagmos, alterações da locomoção, ataxia e perda de equilíbrio, movimentos circulares, rotação da cabeça e diminuição da propriocepção), com 52,9% do total de sinais detectados, seguindo-se os “outros sinais neurológicos” (alterações comportamentais, convulsões, espasmos musculares, claudicação e outras alterações já referidas) com 15,8%, e as “outras alterações oculares” (que incluem alterações oculares como: cataratas, hipópion, sinequias, epífora, edema/neovascularização corneal, dacriorreia entre outras) correspondem ao terceiro grupo de

sinais clínicos mais frequentemente detectado com 11,8% do total de sinais clínicos. Os restantes grupos têm menor expressão na amostra, com percentagens entre os 5,0% e 1,8%. A predominância dos “sinais clínicos típicos de síndrome vestibular” em relação a todo o tipo de sinais típicos de encefalitozoonose está de acordo com a bibliografia estudada (Harcourt-Brown e Holloway, 2003), talvez pela maior facilidade de detecção por parte dos proprietários, como relata Harcourt-Brown (2004).

Como não existem sinais clínicos patognomónicos de encefalitozoonose (Weese e Fulford, 2011), mesmo com serologia positiva apenas obtemos um diagnóstico presuntivo. No entanto, com o recurso a outros métodos de diagnóstico, como a PCR, já utilizada no diagnóstico de rotina em medicina humana, poderemos eventualmente ter um diagnóstico que confirme a infecção (Künzel et al., 2008).

Os coelhos são animais que tendem a manifestar poucos sinais clínicos ou mesmo a mascará-los. Muita informação pode ser obtida a partir de uma simples análise sanguínea (Melillo, 2007), daí que se torne importante nalguns casos a sua execução para um diagnóstico mais preciso e concreto. A técnica de recolha efectuada encontra-se de acordo com a bibliografia, na qual é referido o uso de seringas heparinizadas como a melhor opção de recolha, dado que o sangue tende a coagular rapidamente e a heparina não altera os parâmetros bioquímicos (Melillo, 2007).

Em relação ao hemograma (Tabela 6), nem todos os parâmetros foram avaliados em cada caso, diferindo por isso o número de coelhos analisados entre cada parâmetro. O hemograma foi efectuada nos casos em que se procurou determinar outras causas potencialmente responsáveis por um quadro clínico semelhante ao observado. Por exemplo, no caso de existirem défices a nível do maneio e nutrição do coelho doente (Melillo, 2007) ou infecções por outros agentes poderiam ser encontradas alterações a este nível com necessidade de tratamento. Melillo (2007) refere que nas doenças parasitárias é de esperar que se manifeste algum grau de eosinofilia, mas que no caso de *E. cuniculi* tal não é observado por norma.

Nos estudos já referidos sobre encefalitozoonose não são referidas quaisquer alterações a nível de hemograma causadas directamente pelo agente *E. cuniculi*, razão pela qual não se discute esta temática.

Em relação à análise de bioquímica (Tabela 7) efectuada nos coelhos seropositivos, optou-se por colocar todos os parâmetros que foram analisados. Não obstante, no presente trabalho, os parâmetros com maior interesse para a patologia em causa são a ureia e a creatinina. Ligeiras alterações de ureia constituem um dado frequente e normalmente são difíceis de

interpretar (Melillo, 2007). Mas sabe-se que o aumento destes dois parâmetros séricos, que representa perda da função glomerular, é compatível com insuficiência renal e que tal alteração é frequentemente encontrada em coelhos seropositivos a *E. cuniculi* com sinais compatíveis com insuficiência renal (Harcourt-Brown e Holloway, 2003). Sabe-se também que a causa mais frequente de insuficiência renal em coelhos é a infecção por *E. cuniculi* (Melillo, 2007). No presente estudo, a ureia encontrava-se aumentada em quatro coelhos e a creatinina em dois desses quatro coelhos. Todos os coelhos com alterações de ureia e creatinina revelaram sinais compatíveis com insuficiência renal. Sabe-se, contudo, que a azotemia é detectada muitas vezes apenas acidentalmente, pois muitas das alterações renais causadas por *E. cuniculi* são subclínicas ou têm sinais inespecíficos como letargia, anorexia, perda de peso entre outros (Künzel e Joachim, 2010).

Em relação ao proteinograma (Tabela 8), não se encontraram diferenças estatisticamente significativas entre as médias de cada parâmetro avaliado nos dois grupos de coelhos seropositivos. Contudo existia uma grande diferença no tamanho de cada amostra (suspeitos n = 42; não suspeitos n = 3), pelo que não podemos valorizar demasiado estes resultados. No estudo de Cray et al. (2009), foram detectadas diferenças estatisticamente significativas entre os valores obtidos entre animais suspeitos e clinicamente normais, mas a amostra analisada era mais equilibrada a nível de número de coelhos (Cray et al., 2009).

Quanto ao tratamento efectuado, o tratamento etiológico da encefalitozoonose (fenbendazol, 20 mg/kg, PO, SID, durante um período de 28 dias) encontra-se de acordo com o designado tratamento de eleição para a referida patologia (Suter et al., 2001; Künzel e Joachim, 2010). Na maioria das fichas clínicas dos 136 casos não acompanhados directamente (apenas oito casos foram directamente acompanhados durante o estágio, como já referido), não se encontraram referências relativas à percentagem de sobrevivência dos animais tratados. Por outro lado, nos oito casos acompanhados directamente durante o período de estágio, o tempo decorrido não foi suficiente para demonstrar a eficácia do tratamento. Contudo, os clínicos referiram existir normalmente uma melhoria significativa da sintomatologia inicial, após tratamento etiológico em conjunto com tratamento sintomático específico para cada caso, pelo que ambos parecem ser indispensáveis para a melhoria dos sinais clínicos como é referido na bibliografia (Sieg et al., 2012).

O uso de dexametasona nos coelhos com síndrome vestibular acentuada, com suspeita de encefalitozoonose, é controverso pelos efeitos secundários de imunossupressão que poderão exacerbar a reacção inflamatória provocada pelo agente a nível do sistema nervoso (Künzel e

Joachim, 2010). Contudo, no presente trabalho, foi-nos dito que este fármaco só foi utilizado nos casos em que os sinais clínicos neurológicos eram bastante acentuados, tendo sido realizadas um máximo de duas administrações (doses anti-inflamatórias), pelo que se supõe não ter ocorrido o risco de imunossupressão dos coelhos doentes. De facto, todos os indivíduos tratados revelaram melhorias significativas após a administração de dexametasona.

Para o controlo de dor poderia ter-se optado pelo uso de meloxicam em vez da buprenorfina, mas nestes casos muitas vezes a sua acção não é suficiente daí que se tenha optado pelo uso de opióides. O tratamento sintomático de coelhos com quadros convulsivos encontra-se de acordo com o referido por Künzel e Joachim (2010). Nos coelhos que revelaram uveíte facoclástica foi aplicada terapia tópica com resultados benéficos, apesar de outros terem referido reduzida eficácia deste tipo de tratamentos (Künzel e Joachim, 2010).

Nos casos de insuficiência renal apesar do tratamento etiológico e sintomático instituído, nalguns casos (dois coelhos) teve de se optar pela eutanásia pois as alterações provocadas pelo agente eram irreversíveis.

Apesar de nalguns casos o tratamento etiológico não se revelar eficaz por as alterações instituídas serem consideradas irreversíveis, logo no momento do diagnóstico (Fisher, 2006), o tratamento é sempre a melhor opção, enquanto se conseguir melhorar a qualidade de vida do coelho doente e enquanto isso for compatível com a sua sobrevivência.

Quando a um coelho doméstico é diagnosticada infecção por *E. cuniculi* os proprietários devem ser sempre alertados dos riscos inerentes que os seus animais de estimação acarretam para as pessoas e devem ser informados das alterações que terão de fazer a nível de manejo e higiene de modo a minimizar o risco de infecção para si próprios. Caso o coelho tenha tido contacto com outros coelhos seropositivos o médico veterinário deve realizar tratamento profiláctico (Keeble e Shaw, 2006).

Se todas as medidas profilácticas forem adoptadas, a encefalitozoonose é uma zoonose que acarreta poucos riscos para o homem (Jordan et al., 2006). Contudo, os indivíduos ditos de risco (imunodeprimidos, positivos para o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e transplantados) devem estar cientes da maior susceptibilidade relativa que têm de contrair infecção. O médico veterinário de animais exóticos deve, por isso, ter um papel activo na divulgação desta patologia, através da exposição de pósteres no seu centro de atendimento, que alertem para a existência desta patologia, muitas vezes desconhecida pela maioria dos proprietários. O médico veterinário deve inclusivamente aconselhar os proprietários para a realização de análises periódicas, na tentativa de ficarem a saber se o seu coelho estará

infectado ou não (Keeble e Shaw, 2006), pois na maioria dos casos os animais seropositivos são aparentemente saudáveis (Ozkan et al., 2011). Deve ainda ser explicado que o principal veículo de transmissão do agente é a urina do coelho e que as boas práticas de higiene são cruciais para prevenir a transmissão (Keeble e Shaw, 2006).

## V. CONCLUSÕES

Finalizado o presente trabalho, pode-se concluir que o agente *E. cuniculi* infecta parte da população cunícola de Barcelona e que é responsável por manifestações clínicas graves em coelhos, sendo neste ponto fundamental a acção dos proprietários, na medida em que devem alertar o médico veterinário para essas alterações.

No nosso estudo demonstrou-se que na maioria dos coelhos com sinais compatíveis com encefalitozoonose foi obtido título serológico positivo. Apesar de em todos os casos se ter realizado apenas um diagnóstico presuntivo, foi observada uma boa resposta ao tratamento etiológico implementado pelo que o agente *E. cuniculi* era muito provavelmente o responsável pelas referidas manifestações clínicas.

Foi observada uma maior seropositividade nas fêmeas, e o grupo etário de idade mais afectado foi o dos adultos. Contudo, e em geral, o nosso trabalho, apresentou algumas limitações pois não tínhamos conhecimento da real população cunícola de Barcelona.

O quadro mais frequentemente observado foi o neurológico, com predomínio de manifestações típicas de síndrome vestibular.

O tratamento foi vital na maioria dos casos, pelo que na dúvida deverá ser sempre implementado, visto que não acarreta riscos secundários para o animal. Os proprietários de coelhos devem estar bem informados sobre a patologia em causa e a profilaxia terá um papel fundamental na prevenção da transmissão da doença, visto ser a ingestão de esporos presentes na urina do coelho a principal via de infecção.

Apesar de o risco de infecção poder ser reduzido, os seres humanos, com algum grau de imunodepressão, deverão ter um cuidado redobrado no maneo e nas medidas de higiene relativas ao seu coelho. Mesmo na ausência de sinais clínicos por parte do mesmo, os proprietários deverão abordar o médico veterinário no sentido de analisarem o seu animal e realizarem tratamento adequado no caso de título serológico positivo.

## VI. REFERÊNCIAS

- Ashmawy, K. I., S. S. Abuakkada, e Awad, A. M. (2011). Seroprevalence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* and *Toxoplasma gondii* in farmed domestic rabbits in Egypt. *Zoonoses and Public Health* 58: 357-364.
- Baneux, P. J. e F. Pognan (2003). In utero transmission of *Encephalitozoon cuniculi* strain type I in rabbits. *Laboratory Animals* 37: 132-138.2
- Boot, R., A. K. Hansen, C. K. Hansen et al. (2000). Comparison of assays for antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits. *Laboratory Animals* 34: 281-289.
- Cray, C., G. Arcia, et al. (2009). Evaluation of the usefulness of an ELISA and protein electrophoresis in the diagnosis of *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbits. *American Journal of Veterinary Research* 70: 478-482.
- Crispin, S. (2002). The uveal tract. In: Petersen-Jones S. e Crispin S. (Eds). *BSAVA Manual of Small Animal Ophthalmology*. Second Edition BSAVA 171pp.
- Csokai, J., A. Gruber, et al. (2009). Encephalitozoonosis in pet rabbits (*Oryctolagus cuniculus*): pathohistological findings in animals with latent infection versus clinical manifestation. *Parasitology Research* 104: 629-635.
- Csokai, J., A. Joachim, et al. (2009). Diagnostic markers for encephalitozoonosis in pet rabbits. *Veterinary Parasitology* 163: 18-26.
- Davies C. eL. Shell (2002) *Common small animal diagnoses - an algorithmic approach* W.B. Saunders, 205-207 pp.
- Deplazes, P., A. Mathis, et al. (1996). Immunologic and molecular characteristics of Encephalitozoon-like microsporidia isolated from humans and rabbits indicate that *Encephalitozoon cuniculi* is a zoonotic parasite. *Clinical Infectious Diseases* 22: 557-559.
- Didier, E. S. (2005). Microsporidiosis: An emerging and opportunistic infection in humans and animals. *Acta Tropica* 94: 61-76.
- Didier, E. S., P. J. Didier, et al. (2000). Microsporidiosis in mammals. *Microbes and Infection* 2: 709-720.
- Dipineto, L., L. Rinaldi, et al. (2008). Serological survey for antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in pet rabbits in Italy. *Zoonoses and Public Health* 55: 173-175.
- El Alaoui, H., J. Bata, et al. (2001). *Encephalitozoon cuniculi* (Microspora): Characterization of a phospholipid metabolic pathway potentially linked to therapeutics. *Experimental Parasitology* 98: 171-179.
- Fisher, P. G. (2006). Exotic mammal renal disease: causes and clinical presentation. *Veterinary Clinics of North America Exotic Animal Practice* 9: 33-67.

- Fisher, P. G. (2006). Exotic mammal renal disease: diagnosis and treatment. *Veterinary Clinics of North America Exotic Animal Practice* 9: 69-96.
- Franssen, F. F., J. T. Lumeij, et al. (1995). Susceptibility of *Encephalitozoon cuniculi* to several drugs in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39: 1265-1268.
- Fuentealba, I. C., N. T. Mahoney, et al. (1992). Hepatic lesions in rabbits infected with *Encephalitozoon cuniculi* administered per rectum. *Veterinary Pathology* 29: 536-540.
- Gruber, A., A. Pakozdy, et al. (2009). A retrospective study of neurological disease in 118 rabbits. *Journal of Comparative Pathology* 140: 31-37.
- Halánová, M., V. Letková, et al. (1999). The first finding of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in cows in Slovakia. *Veterinary Parasitology* 82: 167-171.
- Harcourt-Brown, F. M. (2004). *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbits. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* 13: 86-93.
- Harcourt-Brown, F. M. and H. K. Holloway (2003). *Encephalitozoon cuniculi* in pet rabbits. *Veterinary Record* 152: 427-431.
- Hůková, L. and D. Modrý (2006). PCR detection of *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii* and *Encephalitozoon cuniculi* in brains of wild carnivores. *Veterinary Parasitology* 137: 150-154.
- Igarashi, M., E. Oohashi, et al. (2008). High seroprevalence of *Encephalitozoon cuniculi* in pet rabbits in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science* 70: 1301-1304.
- Jeklova, E., V. Jekl, et al. (2010). Usefulness of detection of specific IgM and IgG antibodies for diagnosis of clinical encephalitozoonosis in pet rabbits. *Veterinary Parasitology* 170: 143-148.
- Jordan, C. N., A. M. Zajac, et al. (2006). Direct agglutination test for *Encephalitozoon cuniculi*. *Veterinary Parasitology* 135: 235-240.
- Keeble, E. J. e D. J. Shaw (2006). Seroprevalence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in domestic rabbits in the United Kingdom. *Veterinary Record* 158: 539-544.
- Keeling, P. J. e Fast, N. M. (2002). Microsporidia: Biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. *Annual Review of Microbiology* 56: 93-116.
- Khan, I. A., M. Moretto, et al. (2001). Immune response to *Encephalitozoon cuniculi* infection. *Microbes and Infection* 3: 401-405.
- Künzel, F., A. Gruber, et al. (2008). Clinical symptoms and diagnosis of encephalitozoonosis in pet rabbits. *Veterinary Parasitology* 151: 115-124.
- Künzel, F. e A. Joachim (2010). Encephalitozoonosis in rabbits. *Parasitol Res* 106: 299-309.
- Lennox, A. M. and S. Kelleher (2009). Bacterial and parasitic diseases of rabbits. *Veterinary Clinics of North America Exotic Animal Practice* 12: 519-530.
- Malcekova, B., A. Valencakova, et al. (2011). First detection and genotyping of *Encephalitozoon cuniculi* in a new host species, gyrfalcon (*Falco rusticolus*). *Parasitology Research* 108: 1479-1482.

- Marcato, P. S. e Rosmini R. (1986). Patology of the rabbit and hare. Società Editrice Esculapio: 144 e 153 pp.
- Mathis, A., M. Michel, et al. (1997). Two *Encephalitozoon cuniculi* strains of human origin are infectious to rabbits. *Parasitology* 114: 29-35.
- Mathis, A., R. Weber, et al. (2005). Zoonotic potential of the microsporidia. *Clinical Microbiology Reviews* 18: 423-445.
- Meana, A. e M. Peña (1999). Parasitosis sistémicas. In: Cordero del Campillo M. e Rojo Vásquez FA, (Coords). *Parasitología veterinaria*. Madrid: McGraw – Hill. Interamericana: 743 pp.
- Melillo, A. (2007). Rabbit clinical pathology. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 16: 135-145.
- Mitchell, M. A. e Tully (2004), T. N. Zoonotic diseases. In: Quesenberry K. E. e Carpenter J. W (Eds). *Ferrets, Rabbits and Rodents – Clinical Medicine and Surgery*. W. B. Saunders: 429 pp..
- Mo, L. e M. Drancourt (2004). Monoclonal antibodies for specific detection of *Encephalitozoon cuniculi*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 11: 1060-1063.
- Moore, L. C. (2005). A house rabbit primer – understanding and caring for your companion rabbit. Santa Monica Press: 209-210 pp.
- Müller-Doblies, U. U., K. Herzog, et al. (2002). First isolation and characterisation of *Encephalitozoon cuniculi* from a free-ranging rat (*Rattus norvegicus*). *Veterinary Parasitology* 107: 279-285.
- Müller, M. (1997). What are microsporidia? *Parasitology Today* 13: 455-456.
- Nast, R., D. M. Middleton, et al. (1996). Generalized encephalitozoonosis in a Jersey wooly rabbit. *Canadian Veterinary Journal* 37: 303-305.
- Ozkan, O., A. T. Ozkan, et al. (2011). Encephalitozoonosis in New Zealand rabbits and potential transmission risk. *Veterinary Parasitology* 179: 234-237.
- Paré, J. A. e J. Paul-Murphy (2004). Disorders of the reproductive and urinary systems. In: Quesenberry K. E. e Carpenter J. W. (Eds). *Ferrets, Rabbits and Rodents – Clinical Medicine and Surgery*. W. B. Saunders: 191 pp.
- Ramsdale, M. (2003). Fungi and the bare necessities of life. *Mycologist* 17: 14-14.
- Reusch, B., J. K. Murray, et al. (2009). Urinary protein:creatinine ratio in rabbits in relation to their serological status to *Encephalitozoon cuniculi*. *Veterinary Record* 164: 293-295.
- Rich, G. (2010). Clinical update on testing modalities for *Encephalitozoon cuniculi* in clinically sick rabbits. *Journal of Exotic Pet Medicine* 19: 226-230.
- Rossi, P., G. La Rosa, et al. (1998). Identification of a human isolate of *Encephalitozoon cuniculi* type I from Italy. *International Journal for Parasitology* 28: 1361-1366.
- Santaniello, A., L. Dipineto, et al. (2009). Serological survey of *Encephalitozoon cuniculi* in farm rabbits in Italy. *Research in Veterinary Science* 87: 67-69.

- Sieg, J., J. Hein, et al. (2012). Clinical evaluation of therapeutic success in rabbits with suspected encephalitozoonosis. *Veterinary Parasitology* 187: 328-332.
- Snowden, K., K. Logan, et al. (1999). *Encephalitozoon cuniculi* strain III is a cause of encephalitozoonosis in both humans and dogs. *The Journal of Infectious Diseases* 180: 2086-2088.
- Suter, C., U. U. Muller-Doblies, et al. (2001). Prevention and treatment of *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbits with fenbendazole. *Veterinary Record* 148: 478-480.
- Tanabe, Y., M. M. Watanabe, et al. (2002). Are Microsporidia really related to Fungi?: a reappraisal based on additional gene sequences from basal fungi. *Mycological Research* 106: 1380-1391.
- Tee, K.-Y., J.-P. Kao, et al. (2011). Serological survey for antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits in Taiwan. *Veterinary Parasitology* 183: 68-71.
- Texier, C., C. Vidau, et al. (2010). Microsporidia: a model for minimal parasite-host interactions. *Current Opinion in Microbiology* 13: 443-449.
- Thomas, C., M. Finn, et al. (1997). Microsporidia (*Encephalitozoon cuniculi*) in wild rabbits in Australia. *Australian Veterinary Journal* 75: 808-810.
- Valencakova, A., P. Balent, et al. (2008). Encephalitozoonosis in household pet Nederland Dwarf rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Veterinary Parasitology* 153: 265-269.
- Valencakova, A. and M. Halanova (2012). Immune response to *Encephalitozoon* infection review. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 35: 1-7.
- Wagner, F. e M. Fehr (2007). Common ophthalmic problems in pet rabbits. *Journal of Exotic Pet Medicine* 16: 158-167.
- Weese J. S. e Fulford M. B. (2011). *Companion animal zoonoses*. Wiley – Blackwell: 282- 286.
- Weiss, L. M. (2001). Microsporidia: emerging pathogenic protists. *Acta Tropica* 78: 89-102.
- Wesonga, H. O. e M. Munda (1992). Rabbit encephalitozoonosis in Kenya. *Laboratory Animals* 26: 219-221.

## VII. ANEXOS

### Anexo 1

**Tabela 9** – Análise estatística das variáveis sexo, idade e estado clínico dos coelhos testados por IFI.

Variável	Coelhos analisados (n)	Distribuição relativa (%)	Seropositivos (n)	Seropositividade (%)
<b>Sexo</b>				
Fêmea	51	35,4	44	86,3
Macho	91	63,2	62	68,1
Indeterminado	2	1,4	2	100
<b>Idade</b>				
Jovem <sup>a,b</sup>	31	21,5	20	64,5
Adulto <sup>a,c</sup>	88	61,1	72	81,8
Sênior <sup>b,c</sup>	20	13,9	16	80
Desconhecida	5	3,5	0	0
<b>Estado clínico</b>				
Suspeito	130	90,3	100	76,9
Não suspeito	14	9,7	8	57,1
<b>Total</b>	<b>144</b>	<b>100</b>	<b>108</b>	<b>75</b>