

## Encefalitozoonose em coelho (*Oryctolagus cuniculus*)

Encephalitozoonosis in Rabbit (*Oryctolagus cuniculus*)

Maira dos Santos Carneiro Lacerda , Jair Alves Ferreira Júnior , Nathália Dela-Sávia da Fonseca ,  
André Leonardo Rodrigues-Matos Santos , Karla Alvarenga Nascimento ,  
Pedro Miguel Ocampos Pedroso  & Juliana Targino Silva Almeida e Macêdo 

### ABSTRACT

**Background:** Encephalitozoonosis is caused by the protozoan *Encephalitozoon cuniculi*, in rabbits, and can affect humans. The disease can be fatal and difficult to diagnose. It can be asymptomatic or cause vestibular neurological disease, paralysis, uveitis in addition to chronic kidney disease in rabbits. The transmission of the microorganism's spores occurs by ingestion, inhalation, or by the transplacental route. The aim of this work is to report a case of encephalitozoonosis in a pet rabbit (*Oryctolagus cuniculus*).

**Case:** An *Oryctolagus cuniculus* with a history of paraparesis of the thoracic and pelvic limbs was referred for necropsy, the evolution of the clinical picture happened in one day. After death, a necropsy was performed. Organ fragments were collected, fixed, and processed routinely for histology. Macroscopically, there was evidence of hepatic lobes, without injury to the other organs. Microscopically it was observed in the white and gray substance of the telencephalon multiple circumscribed granulomas composed of a necrotic center surrounded by macrophages, giant multinucleated cells in addition to lymphocytes and plasmocytes in the periphery, delimited by fibrous connective tissue. Around the vessels, perivascular cuffs with 2 to 4 layers of lymphocytic infiltrate were observed. Besides, special staining of Schiff's Periodic Acid (PAS) and Ziehl-Neelsen was performed, in which numerous cylindrical, eosinophilic structures of approximately 2.5 x 1.0 µm were observed, compatible with *E. cuniculi* spores. Besides, histiocytic lymphoblasts pericoronitis was noted in the liver. There were no relevant changes in the kidney.

**Discussion:** The diagnosis of encephalitozoonosis in rabbits was based on clinical and anatomopathological findings. Tetraparesis was the predominant sign in the present case and was justified by telencephalic lesions. This clinical sign is included in the literature but is less common than the syndrome such as head tilt and paralysis. The diagnosis of the disease is usually made by *post mortem* examination when it is possible to identify the spores in the lesions. Multifocal granulomatous encephalitis was the most significant finding in this case, which is also consistent with other studies. The pathogenesis of granulomatous lesions is still controversial. It is known that spores allow phagocytosis by macrophages, which induce the production of interleukins and other cytokines by TCD4 + lymphocytes, thereby activating the action of TCD8 + (cytotoxic) lymphocytes. Natural killer cells, granulocytes, other macrophages, and B lymphocytes are also recruited. Although there is such an inflammatory response, the antibodies produced are not efficient to eliminate the agent from the host organism, however, they contribute to the process of opsonization and consequent phagocytosis, facilitating the destruction of the microsporidium by macrophages. The neurological form was predominant in this case, with no chronic or ocular renal forms, possibly due to the rapid clinical evolution. Special stains were useful for visualizing intralésion spores. Although PAS staining is considered to be of little use, it was relevant in this case. The visualization of the agent made it possible to distinguish differential diagnoses, among them vestibular syndrome secondary to otitis due to pasteurellosis, toxoplasmosis, neoplasms, traumas, or diseases of the spine. Thus, a diagnosis of encephalitozoonosis was made in a rabbit through clinical and anatomopathological correlation using Ziehl-Neelsen and PAS stains.

**Keywords:** granuloma, *Encephalitozoon cuniculi*, central nervous system.

**Descritores:** granuloma, *Encephalitozoon cuniculi*, sistema nervoso central.

DOI: 10.22456/1679-9216.113465

Received: 30 April 2021

Accepted: 12 August 2021

Published: 5 October 2021

Laboratório de Patologia Veterinária, Universidade de Brasília (UnB), Brasília, DF, Brazil. CORRESPONDENCE: J.T.S. Almeida e Macêdo [jtsam\_targino@yahoo.com.br]. Via L4 Norte s/n. Campus Darcy Ribeiro. CEP 70910-970 Brasília, DF, Brazil.

## INTRODUÇÃO

A encefalitozoonose é uma enfermidade causada pelo *Encephalitozoon cuniculi*, um protozoário primitivo, da classe Microsporea, intracelular obrigatório, oportunista e muito próximo de indivíduos procariotos. Acredita-se que tenham evoluído dos fungos [1,11]. O desenvolvimento deles ocorre por merogonia, com posterior formação de esporos no interior das células do hospedeiro, sendo esta a forma infectante do microrganismo [3].

A encefalitozoonose causada pelo *E. cuniculi* pode ser assintomática ou desenvolver uma doença neurológica vestibular, paralisia, uveíte além de doença renal crônica em coelhos [5]. O agente também pode infectar os humanos, principalmente imunodeprimidos, levando a quadros de diarreia, convulsão, febre e perda de peso [10]. A sua transmissão ocorre por ingestão, inalação ou pela via transplacentária. Quando o esporo é ingerido ele pode seguir dois caminhos, ser fagocitado e destruído por macrófagos ou invadir as células endoteliais para reproduzir-se assexuadamente resultando na formação de esporoblastos que contém inúmeros esporos em seu interior [2].

Dessa forma, o objetivo deste trabalho é relatar um caso de encefalitozoonose na forma neurológica em um coelho de estimação (*Oryctolagus cuniculus*).

## CASO

Foi encaminhado ao Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade de Brasília (LPV-UnB), um coelho de estimação, *Oryctolagus cuniculus*, com histórico de tetraparesia com evolução clínica de 1 dia e posterior óbito. Na necropsia, as mucosas apresentavam-se hipocoradas e havia acentuação do padrão lobular hepático. Fragmentos de órgãos da cavidade abdominal, torácica e sistema nervoso central foram colhidos, fixados em formol tamponado a 10%, clivados, processados rotineiramente para histologia e corados pela hematoxilina e eosina (H&E)<sup>1</sup>.

Microscopicamente observou-se na substância branca e cinzenta do telencéfalo, múltiplos granulomas circunscritos com centro necrótico envolto por macrófagos, células gigantes multinucleadas além de linfócitos e plasmócitos na periferia, delimitados por tecido conjuntivo fibroso (Figura 1). Ao redor dos vasos, observaram-se manguitos perivasculares com 2 a 4 camadas de linfócitos. Adicionalmente foi realizada a coloração especial de Ácido Periódico de

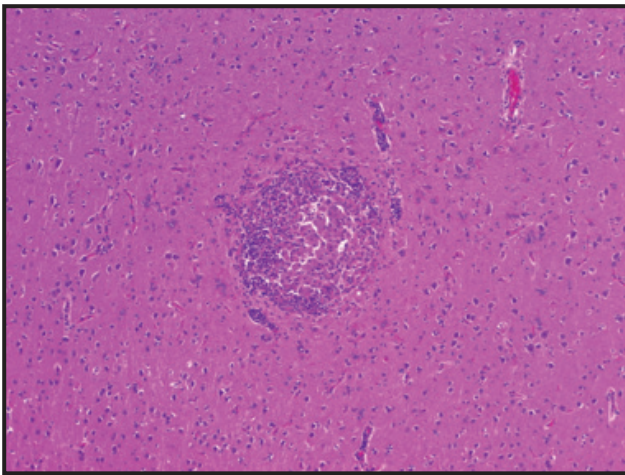
Schiff (PAS)<sup>1</sup> e Ziehl-Neelsen<sup>1</sup>, na qual foram observadas no interior de macrófagos, inúmeras estruturas cilíndricas, margentas de aproximadamente 2,5 x 1,0 µm, compatíveis com esporos de *E. cuniculi* (Figura 2). No fígado foi observado infiltrado inflamatório linfoplasmohistiocítico periportal multifocal moderado, associado a discreta proliferação de tecido conjuntivo (pericolangite linfoplasmohistiocítica), sem presença do agente nas lesões.

## DISCUSSÃO

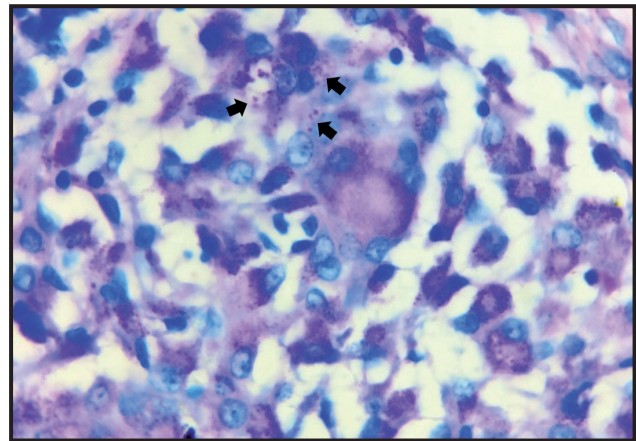
O diagnóstico de encefalitozoonose em coelho foi baseado pelos achados clínicos e anátomo-patológicos. A tetraparesia foi o sinal predominante no presente caso e foi justificada por lesões telencefálicas, região responsável por estímulos sensoriais e motores, sem sinais de síndrome vestibular. Geralmente, os animais infectados podem apresentar sinais neurológicos como inclinação de cabeça (“head tilt”) e paralisia [7]. Contudo, paresia posterior e ataxia também podem aparecer [5] como no presente caso.

O diagnóstico da doença é geralmente *post mortem*, quando é possível identificar os esporos de *E. cuniculi* nas lesões. Encefalite granulomatosa multifocal foi o principal achado histopatológico nesse caso, o que também é consistente com outros trabalhos [8]. A patogênese das lesões granulomatosas ainda é controversa. Sabe-se que os esporos permitem a fagocitose pelos macrófagos, que induzem a produção de interleucinas e outras citocinas pelos linfócitos TCD4+, ativando, por conseguinte, a ação dos linfócitos TCD8+ (citotóxicos). As células natural killer, granulócitos, outros macrófagos e linfócitos B também são recrutados. Embora haja tal resposta inflamatória, os anticorpos produzidos não são eficazes para eliminar o agente do organismo do hospedeiro, contudo, eles contribuem com o processo de opsonização e consequente fagocitose, facilitando a destruição do microsporídeo pelos macrófagos [4].

No presente relato, não foram encontradas lesões características nos rins e no fígado. Acredita-se que a forma de progressão da doença tenha sido predominantemente encefálica não havendo tempo de instalação de lesões crônicas no fígado e rim. Além disso, sabe-se que apresentações oculares, neurológica ou doença renal progressiva crônica podem ocorrer em conjunto ou isoladamente [5]. *E. cuniculi* pode afetar esses órgãos verificando-se infiltrado intersticial composto por



**Figura 1.** Encefalitozoonose em coelho. Encéfalo. Área circunscrita com macrófagos, células gigantes multinucleadas além de linfócitos e plasmócitos na periferia, delimitados por tecido conjuntivo fibroso (granuloma) [H&E; Obj.10x].



**Figura 2.** Encefalitozoonose em coelho. Encéfalo. Granuloma com estruturas cilíndricas, margentas de aproximadamente 2,5 x 1,0 µm, no interior de macrófagos (setas) compatíveis com esporos de *Encephalitozoon cuniculi* [Ziehl-Neelsen; Obj.100x].

células mononucleares, podendo haver ainda fibrose, necrose e atrofia, bem como a presença dos esporos no interior de macrófagos em ambos os órgãos [9].

Colorações especiais de PAS e Ziehl-Neelsen foram úteis para a visualização do agente intralésional e confirmação diagnóstica. Em experimento realizado em camundongos obtiveram melhores resultados com as colorações de Ziehl-Neelsen, azul de toluidina e azul de toluidina-fucsina, e não sendo o Ácido Periódico de Schiff (PAS) o mais indicado por não evidenciar as estruturas do agente. A justificativa utilizada é relacionada a afinidade do protozoário a corantes com base em fuccina e azul de toluidina [6]. Entretanto, Rodríguez-Tovar *et al.* [10] experimentaram outras histotécnicas em coelhos infectados naturalmente e indicaram o Tricrômico modificado, coloração de Gram e a Calcofluor White, não sendo o Ziehl-Neelsen, PAS, Giemsa, Azul de Alcian e o Grocott as mais indicadas, embora possam ser utilizadas. Ainda que esses resultados tenham sido encontrados, o PAS realizado nos cortes histológicos do presente caso, permitiu a ade-

quada visualização dos esporos, podendo-se presumir que ela também pode ser utilizada no seu diagnóstico.

A visualização dos esporos na histoquímica e os achados de necropsia permitiram excluir alguns diagnósticos diferenciais de doenças neurológicas em coelhos. Nesses casos se deve considerar síndrome vestibular secundária a otite por pasteurelose seguida de toxoplasmose, neoplasias, traumas ou doenças da coluna vertebral [5]. Pasteurelose é importante em coelhos de colônias com problemas respiratórios [5] e as demais doenças possuem etiopatogenia e lesões distintas das aqui relatadas.

Assim, um diagnóstico de encefalitozoonose foi firmado em um coelho por meio da correlação clínica e anatomopatológica. O uso de colorações de Ziehl-Neelsen e PAS foram úteis para a visualização dos esporos de *Encephalitozoon cuniculi* intralésionais.

MANUFACTURER

<sup>1</sup>WCOR Corantes. São Paulo, SP, Brazil.

**Declaration of interest.** The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

## REFERENCES

- 1 Franzen C. & Müller A. 1999. Cryptosporidia and Microsporidia - waterborne diseases in the immunocompromised host. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 34: 245-262. DOI: 10.1016/s0732-8893(99)00003-6
- 2 Gardiner C.H., Fayer R. & Dubey J.P. 1998. Microspora. In: *An Atlas of Protozoan Parasites in Animal Tissue*. Washington: American Registry of Pathology, pp.11-13.
- 3 Gotti L.S.M. & Gagliani L.H. 2011. Microsporidiose humana: aspectos epidemiológicos e diagnósticos nos pacientes com aids. *Revista UNILUS Ensino e Pesquisa*. 8(14): 5-16.

- 4 Goulart A.E., Lopes A.J., Jansen J.M., Paiva D.D., Bóia M.N & Peralta J.M. 1999. Microsporidiose disseminada na AIDS: relato de caso. *Journal de Pneumologia*. 25: 53-56.
- 5 Harcourt-Brown F.M. 2004. *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbits. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*. 13(2): 86-93. DOI: 10.1053/j.saep.2004.01.004.
- 6 Lallo M.A., Bondan E.F., Xavier J.G & Hirschfeld M.P.M. 2010. Técnicas de coloração para detecção de *Encephalitozoon cuniculi* em cortes histológicos. *Ciência Rural*. 40: 2406-2410. DOI: 10.1590/S0103-84782010001100027
- 7 Patrício R.F.G. 2014. Soroprevalência de *Encephalitozoon cuniculi* em coelhos assintomáticos da região de Lisboa. 58f. Lisboa, Portugal. Dissertação (Mestrado em medicina veterinária) - Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.
- 8 Pereira A., Araújo R.S., Favorito S.E., Bertolla P.B. & Lallo M.A. 2009. Ocorrência de microsporídios em pequenos mamíferos silvestres no estado de São Paulo. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 61: 1474-1477. DOI: 10.1590/S0102-09352009000600035
- 9 Rodriguez-Tovar L.E., Nevárez-Garza A.M., Trejo-Chávez A., Hernández-Martínez C.A., Hernández-Vidal G., Zarate-Ramos J.J. & Castillo-Velázquez U. 2016. *Encephalitozoon cuniculi*: grading the histological lesions in brain, kidney, and liver during primoinfection outbreak in rabbits. *Journal of Pathogens*. 2016: 5768428. DOI: 10.1155/2016/5768428.
- 10 Rodríguez-Tovar L.E., Villarreal-Marroquín A., Nevárez-Garza A.M., Castillo-Velázquez U., Rodríguez-Ramírez H.G., Navarro-Soto M.C., Zárate-Ramos J.J., Hernández-Vidal G. & Trejo-Chávez A. 2017. Histochemical study of *Encephalitozoon cuniculi* spores in the kidneys of naturally infected New Zealand rabbits. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 29: 269-277. DOI: 10.1177/1040638716668559
- 11 Sprague V., Becnel J.J. & Hazard E.I. 1992. Taxonomy of phylum microspora. *Critical Reviews in Microbiology*. 18: 285-395. DOI: 10.3109/10408419209113519