



ESCOLA UNIVERSITÁRIA VASCO DA GAMA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

***Encephalitozoon cuniculi* em coelhos (*Oryctolagus cuniculi*) de companhia:
um estudo retrospectivo (2020 a 2022) na região Hauts-de-France, França**

Fleur Marie Odile Savaton

Coimbra, julho de 2023



ESCOLA UNIVERSITÁRIA VASCO DA GAMA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

***Encephalitozoon cuniculi* em coelhos (*Oryctolagus cuniculi*) de companhia:
um estudo retrospectivo (2020 a 2022) na região Hauts-de-France, França**

Coimbra, julho de 2023

Fleur Marie Odile Savaton

Aluna do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Constituição do Júri

Presidente do Júri:

Professora Doutora Anabela Maduro de Almeida
Francisco

Arguente:

Professora Doutora Anna Carolina Massara
Brasileiro

Orientador:

Professora Doutora Sofia Ferreira Anastácio

Orientador Interno

Professora Doutora Sofia Anastácio

Coorientador Interno

Doutor Hélder Craveiro

Orientador Externo

Doutor Frédéric Vlaemynck

Dissertação do Estágio Curricular do Ciclo de Estudos
Conducente ao Grau de Mestre em Medicina Veterinária da EUVG

Os conteúdos presentes no documento são da exclusiva responsabilidade do autor.

Agradecimentos

Aos professores e ao pessoal da EUVG

Pelo seu acompanhamento e ensinamentos,
Pelos seus encorajamentos e benevolência,
Sinceros agradecimentos.

A Gilles Belissa et aux membres de GEDS

*Pour m'avoir donné accès à cette formation,
Sincères remerciements.*

A Professora Doutora Sofia Anastácio

Por ter orientado este trabalho,
Pelos seus valiosos conselhos e acompanhamento,
Sinceros agradecimentos.

Ao Doutor Hélder Craveiro

Por ter aceitado coorientar este trabalho,
Sinceros agradecimentos.

Aux Docteurs Vlaemynck et Chovet

*Pour avoir permis la réalisation de ce sujet,
Pour votre supervision et votre aide,
Sincères remerciements.*

A mes parents,

*Pour votre soutien et votre Amour indéfectible,
Vous m'avez appris la persévérance,
Vous avez toujours cru en moi,
Vous êtes mes racines et mes ailes.*

A mon frère, Alexis,

*Pour ton aide et ton soutien,
Pour ton humour et ta gentillesse,
Tu es et resteras mon petit frère adoré (et évidemment préféré).*

A toute ma famille,

*Pour vos encouragements et votre bienveillance,
Pour tous les bons moments passés et à venir,
Vous êtes la meilleure famille qui soit.*

A ceux qui ne sont plus là,

*Tout cela c'est aussi grâce à vous,
Je ne vous oublie pas.*

A Jordan,

*Pour ta patience et ton soutien,
Pour ta gentillesse et ta tendresse,
Pour tous les beaux moments que nous avons partagés.*

A Cynthia,

*Pour tous les moments de joie et de doute qui ont nourri notre complicité,
Pour ton aide et ton soutien sans faille,
Tu es une amie exceptionnelle.*

A mes amis,

Pour tous les bons moments que nous avons partagés.

Au Docteur Alexandra Kim,

*Pour votre confiance et votre bienveillance,
Pour m'avoir donné la chance de suivre vos pas.*

Aux Docteurs vétérinaires et aux assistantes vétérinaires qui m'ont accompagnée,

Pour le partage sans réserve de vos connaissances et vos encouragements.

A mes lapins,

Pour m'avoir donné l'envie d'exercer ce si beau métier et m'avoir inspiré ce sujet.

Índice geral

Resumo	2
Palavras-chave	2
Abstract.....	3
Keywords.....	3
1. Introdução.....	4
2. Material e métodos	5
2.1. Aprovação da Comissão de Ética	5
2.2. Seleção da amostra.....	5
2.3. Registo de dados.....	6
2.4. Análise estatística.....	7
3. Resultados.....	7
3.1. Determinação da taxa de seropositividade	7
3.2. Caracterização clínica dos animais seropositivos.....	7
3.3. Influência de fatores na ocorrência de infecção	9
3.3.1. Fatores relacionados às características do animal	10
3.3.2. Fatores relacionados à história clínica do animal	10
3.3.3. Fatores relacionados ao estilo de vida do animal	11
4. Discussão	12
5. Conclusão.....	15
Referências bibliográficas	16

Índice de tabelas

Tabela 1. Resultados do teste serológico para detecção de anticorpos IgG e IgM anti- <i>E. cuniculi</i>	7
Tabela 2. Frequência dos animais sintomáticos seropositivos segundo o quadro clínico (n=154).....	8
Tabela 3. Distribuição das diferentes manifestações clínicas por quadro clínico.....	9
Tabela 4. Distribuição dos animais estudados por classes de idade	10
Tabela 5. Taxa de seropositividade em coelhos de estimação em vários países	13

Índice de figuras

Figura 1. Distribuição dos animais incluídos no estudo por “departamento” (n=238)	6
Figura 2. Distribuição dos diferentes quadros clínicos de acordo com manifestação clínica neurológica, urinária e ocular.	8
Figura 3. Distribuição dos animais seropositivos segundo os departamentos	12

Lista de abreviaturas

CIA - Carbon Immune Assay

DP - Desvio-Padrão

ELISA - Enzyme Linked Immunosorbent Assay

IC - Intervalo de Confiança

IFI - Imunofluorescência Indireta

OR - Odds Ratio

RT-PCR - Real-Time Polymerase Chain Reaction

SQL - Structured Query Language

***Encephalitozoon cuniculi* em coelhos (*Oryctolagus cuniculi*) de companhia:
um estudo retrospectivo (2020 a 2022) na região Hauts-de-France, França**

Fleur Savaton^a, Frédéric Vlaemynck^b, Helder Craveiro^a, Sofia Anastácio^a

^a Escola Universitária Vasco da Gama e Centro de Investigação Vasco da Gama, Av. José R. Sousa Fernandes, Campus Lordemão, 3020-210 Coimbra, Portugal (fleur.savaton@gmail.com)

^b Clinique Vétérinaire du Caducée, 57 rue Salvador Allende, Parc Eurasanté - Épi de Soil, 59120 Loos, France

Resumo

Encephalitozoon cuniculi é um microsporídio com uma distribuição mundial. O seu hospedeiro principal é o coelho doméstico (*Oryctolagus cuniculi*), podendo, contudo, infectar outras espécies, incluindo o homem. No coelho, a infecção pode permanecer no estado subclínico ou causar encefalitozoonose. Num quadro de doença, o animal pode apresentar, de forma isolada ou de forma conjunta, sinais clínicos neurológicos, urinários ou oculares. Este trabalho teve como objetivo determinar a taxa de seropositividade de *E. cuniculi* em coelhos de companhia na região Hauts-de-France nos anos 2020 a 2022, em França. Para tal, foi realizado um estudo retrospectivo em coelhos de estimação (n=238) recebidos em consulta veterinária na “Clinique du Caducée”, e submetidos a um teste serológico de deteção de anticorpos anti-*Encephalitozoon cuniculi* por imunofluorescência indireta. Os dados obtidos permitiram observar uma taxa de seropositividade de 70% entre os animais testados. Por outro lado, a análise estatística revelou associações significativas ($p<0,05$) entre a deteção de anticorpos anti-*E. cuniculi* e a presença de *head tilt*, de nistagmo e, de uma forma geral, de síndrome vestibular. Por último, verificou-se que a seropositividade tinha uma associação estatística significativa com a raça anã, com os animais com idade igual ou superior a três anos, com os níveis elevados de ureia e de creatinina, e também com a origem dos animais adquiridos em lojas de animais.

Palavras-chave

Encefalitozoonose – França – Imunofluorescência indireta – *Oryctolagus cuniculi*

Abstract

Encephalitozoon cuniculi is a microsporidia with worldwide distribution. Its main host is the domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculi*) but it can infect other species, including humans. In rabbits, the infection may remain subclinical or cause encephalitozoonosis. In case of disease, the animal may present, separately or jointly, neurological, urinary or ocular clinical signs. The objective of this work was to determine the seropositive rate of *E. cuniculi* in pet rabbits in the Hauts-de-France region between 2020 and 2022, in France. For this, a retrospective study was conducted on pet rabbits (n=238) received in veterinary consultation at the "Clinique du Caducée" and subjected to a serological test for the detection of antibodies anti-*Encephalitozoon cuniculi* by indirect immunofluorescence. The data obtained showed a seropositive rate of 70% in the animals tested. On the other hand, statistical analysis revealed significant associations ($p < 0,05$) between the detection of antibodies anti-*E. cuniculi* and the presence of head tilt, nystagmus and, in general, vestibular syndrome. Finally, seropositivity was found to have a significant statistical association with the dwarf breed, animals aged three years or older, high levels of urea and creatinine and animals purchased from pet shops.

Keywords

Encephalitozoonosis – France – Indirect Immunofluorescence – *Oryctolagus cuniculi*

1. Introdução

Encephalitozoon cuniculi é um microrganismo intracelular obrigatório e formador de esporos pertencente ao filo Microsporidia. Os microsporídios não têm, até à data, uma classificação filogenética precisa, mas parecem estar ligados ao reino Fungi (Didier & Weiss, 2006; Künzel & Joachim, 2010; Doboși et al., 2022). A sequenciação completa do genoma de *E. cuniculi*, em 2001, suporta esta hipótese (Katinka et al., 2001). Atualmente, quatro genótipos de *E. cuniculi* são descritos (Doboși et al., 2022).

E. cuniculi apresenta uma distribuição mundial podendo infectar um amplo espectro de hospedeiros, nomeadamente mamíferos, como macacos, raposas, cães, gatos, entre outros. No entanto, o coelho doméstico (*Oryctolagus cuniculi*) é o seu hospedeiro principal. Além disso, *E. cuniculi* é um agente patogénico oportunista e o seu potencial zoonótico faz dele um microrganismo de interesse para a saúde humana, em especial pessoas imunocomprometidas (Didier & Weiss, 2006; Künzel & Joachim, 2010; Doboși et al., 2022).

A infeção do hospedeiro ocorre por transmissão direta da forma infetante do agente, os esporos. Estes últimos são excretados de forma intermitente, principalmente na urina de animais infetados e são resistentes no ambiente. A transmissão horizontal por ingestão, de água ou alimentos contaminados, é a mais frequente, mas a transmissão por inalação também está descrita. Pode ainda ocorrer uma transmissão vertical por via transplacentária (Künzel & Fisher, 2018; Doboși et al., 2022).

A infeção por *E. cuniculi* pode causar doença sendo designada encefalitozoonose mas animais infetados permanecem, muitas vezes, em estado subclínico (Csokai et al., 2009; Künzel & Joachim, 2010). Quando a infeção se manifesta clinicamente, pode assumir, simultaneamente ou independentemente, três formas: i) neurológica, ii) renal e/ou iii) ocular. Sinais neurológicos, em especial sinais vestibulares, como cabeça inclinada (*head tilt*), ataxia, andar em círculos (*circling*), rolamento no eixo longitudinal (*rolling*) e nistagmo, são os mais frequentes. Os sinais clínicos da forma renal não são específicos, tais como perda de peso e anorexia (Künzel & Joachim, 2010). Por último, a forma ocular parece estar relacionada a transmissão vertical. Os sinais clínicos são principalmente a uveíte, nomeadamente a uveíte facoclástica, a presença de uma massa branca no olho ou a catarata (Künzel & Joachim, 2010; Ozkan et al., 2019).

A manifestação clínica da encefalitozoonose não é, assim, patognomónica. Além disso, a ocorrência de infeções subclínicas dificulta o diagnóstico em vida. Neste contexto, a serologia é a ferramenta de diagnóstico mais fiável. Um resultado positivo indica apenas um contacto com o agente patogénico, enquanto um resultado negativo permite excluir a encefalitozoonose no caso de animais sintomáticos (Künzel & Fisher, 2018). Os testes serológicos mais comuns são a Imunofluorescência Indireta (IFI) e o *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) que estão bem correlacionados entre si, mas também com a histopatologia (Csokai et al., 2009; Künzel & Fisher, 2018). O *Carbon Immune Assay* (CIA) e o *Western Blot* também são testes serológicos eficazes (Desoubreaux et al., 2017; Künzel & Fisher, 2018).

Finalmente, a análise dos tecidos por histopatologia, por imuno-histoquímica ou ainda por *Real-Time Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) pode ser realizada *post-mortem* (Leipig et al., 2013).

De acordo com estudos serológicos realizados em França, a taxa de seroprevalência de *E. cuniculi* em coelhos selvagens foi estimada em 3,9% (Chalupsky et al., 1990), enquanto em coelhos domésticos na região de Paris foi estimada em 69% (Beaurin, 2006). A escassez de dados relativos a este tema em França motivou a realização deste estudo pela possibilidade de contribuir para o aumento do conhecimento sobre este assunto neste país.

Este trabalho teve assim como objetivo determinar a taxa de seropositividade de *E. cuniculi* em coelhos de companhia recebidos em consulta veterinária na “Clinique du Caducée” na região Hauts-de-France, assim como caracterizar clinicamente os animais seropositivos e ainda avaliar a influência de determinados fatores na ocorrência de infeção.

2. Material e métodos

De forma a concretizar os objetivos propostos, foi realizado um estudo observacional descritivo com carácter retrospectivo, através da consulta de dados clínicos da “Clinique Vétérinaire du Caducée”, situada em Lille, na região Hauts-de-France, em França.

2.1. Aprovação da Comissão de Ética

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética da Escola Universitária Vasco da Gama (Parecer n°2/2023).

2.2. Seleção da amostra

Para o presente estudo foi realizada uma amostragem de conveniência. Assim, foram incluídos os coelhos de companhia consultados na “Clinique Vétérinaire du Caducée”, entre 1 de janeiro de 2020 e 31 de dezembro de 2022, e que foram submetidos a um teste serológico para deteção de anticorpos anti-*Encephalitozoon cuniculi*. Este estudo foi ainda limitado geograficamente à região Hauts-de-France, que compreende cinco “departamentos”: *Pas-De-Calais*, *Nord*, *Somme*, *Oise* e *Aisne*. Assim, os animais consultados na clínica no período definido, submetidos a teste serológico para deteção de anticorpos anti-*E. cuniculi*, mas residentes noutras regiões ou países foram excluídos (n=12). De acordo com os critérios acima referidos, um total de 238 animais foram incluídos no estudo (Figura 1).

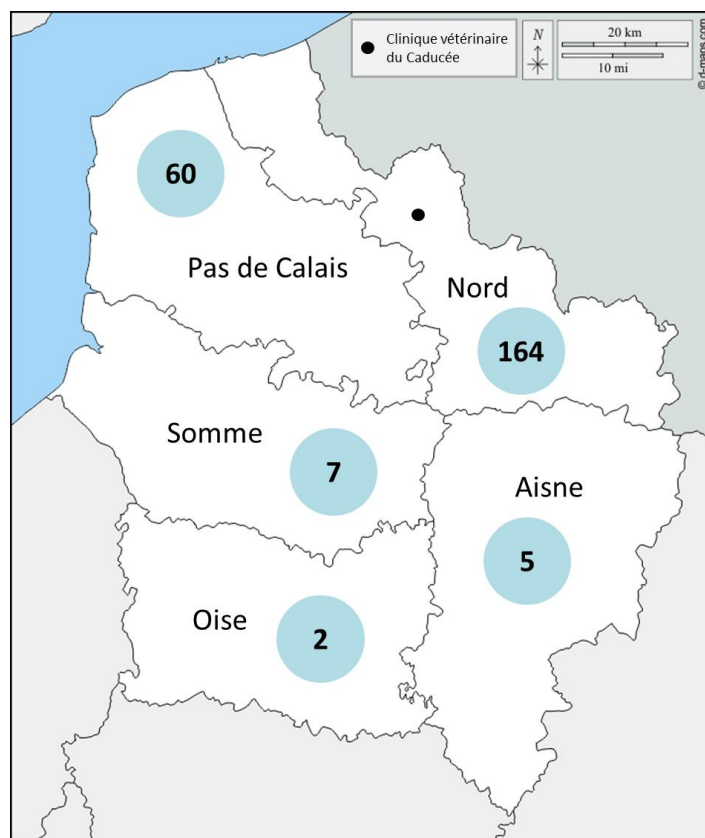


Figura 1. Distribuição dos animais incluídos no estudo por “departamento” (n=238)

2.3. Registo de dados

Os dados foram extraídos do software VetoPartner®, utilizado pela clínica, através de um pedido usando o *Structured Query Language* (SQL) a fim de respeitar os critérios de inclusão. Para refinar a obtenção de informação, foram utilizadas as seguintes palavras-chave num segundo pedido SQL: “encephalitozoon”, “cuniculi”, “tilt”, “cabeça inclinada”, “vestibular”, “rolling”, “nistagmo”, “convulsão”, “insuficiência renal”, “uveíte”, “panacur®”. Em seguida, os dados foram importados para uma tabela Excel na qual um código numérico foi atribuído a cada caso. Os dados recolhidos incluíram a raça, o género, a data de nascimento, a data da consulta, o motivo da consulta, os dados clínicos e a data do teste serológico *E. cuniculi*. Por fim, outras informações foram recolhidas manualmente (*i.e.*, resultados do teste serológico, sinais clínicos, antigos testes *E. cuniculi*, exames complementares, alimentação, existência de coelhos coabitantes, origem, habitat e o código postal). O resultado do teste serológico foi considerado positivo quando pelo menos, um dos anticorpos (IgM ou IgG) anti-*E. cuniculi* foi detetado na análise. Os exames complementares envolvidos foram análises bioquímicas e ultrassonografias abdominais realizadas até um mês antes ou depois do teste serológico.

2.4. Análise estatística

A análise estatística descritiva foi realizada utilizando o programa EpiInfo (CDC, versão 7.2.5.0). Além disso, o teste de Qui-quadrado do Programa RStudio (*Integrated Development Environment for R*, RStudio Team, versão 4.3.1) foi utilizado para verificar se os resultados obtidos apresentavam significado estatístico. No entanto, quando pelo menos um dos valores esperados era inferior a cinco, o teste de Fisher foi realizado. Considerou-se um resultado com significado estatístico sempre que o valor p foi inferior a 0,05. Na avaliação da influência de fatores sobre a ocorrência de infecção, além do significado estatístico foi calculado o Odds Ratio (OR), considerando a possibilidade de uma relação de causalidade se o valor obtido foi estritamente superior a um.

3. Resultados

3.1. Determinação da taxa de seropositividade

No total de animais estudados, verificou-se que a taxa de anticorpos anti-*Encephalitozoon cuniculi* foi de 70% (166/238; IC_{95%}: 63,5%-75,5%) (Tabela 1).

Tabela 1. Resultados do teste serológico para detecção de anticorpos IgG e IgM anti-*E. cuniculi*

Resultados de IFI	Proporção de resultados obtidos (%)	Categorização do resultado
IgG + / IgM +	141/238 (59%)	Positivo
IgG + / IgM -	25/238 (11%)	Positivo
IgG - / IgM +	0	Positivo
IgG - / IgM -	72/238 (30%)	Negativo

Entre os 238 coelhos estudados, 220 (92,5%; IC_{95%}: 88,3%-95,5%) apresentavam sinais clínicos compatíveis com a encefalitozoonose, dos quais 154 eram seropositivos (70%; IC_{95%}: 63,5%-76%). Por outro lado, entre os 18 coelhos assintomáticos, verificou-se que 12 eram seropositivos (67%; IC_{95%}: 41%-86,7%). Não foi observada uma associação estatística significativa entre o estatuto clínico e o estatuto serológico.

3.2. Caracterização clínica dos animais seropositivos

A análise das manifestações clínicas foi realizada nos animais sintomáticos nos quais foi confirmada a presença de anticorpos anti-*E. cuniculi* (n=154).

Neste grupo de animais, os quadros clínicos observados foram, Neurológico (N), Urinário (U) ou Ocular (O), e podem ocorrer de forma isolada ou combinada. Assim, conforme representado na Figura 2, os sinais neurológicos foram observados em 80,5% dos coelhos (124/154); os sinais urinários foram

observados em 67,5% dos animais (104/154); e os sinais oculares foram observados em 15% dos coelhos (23/154). Além disso, e conforme demonstrado na Tabela 2, em 57,8% dos coelhos (89/154) as manifestações clínicas apareceram de forma combinada. Além do mais, a combinação de um quadro clínico neurológico e urinário foi a mais comum (50%; 77/154).

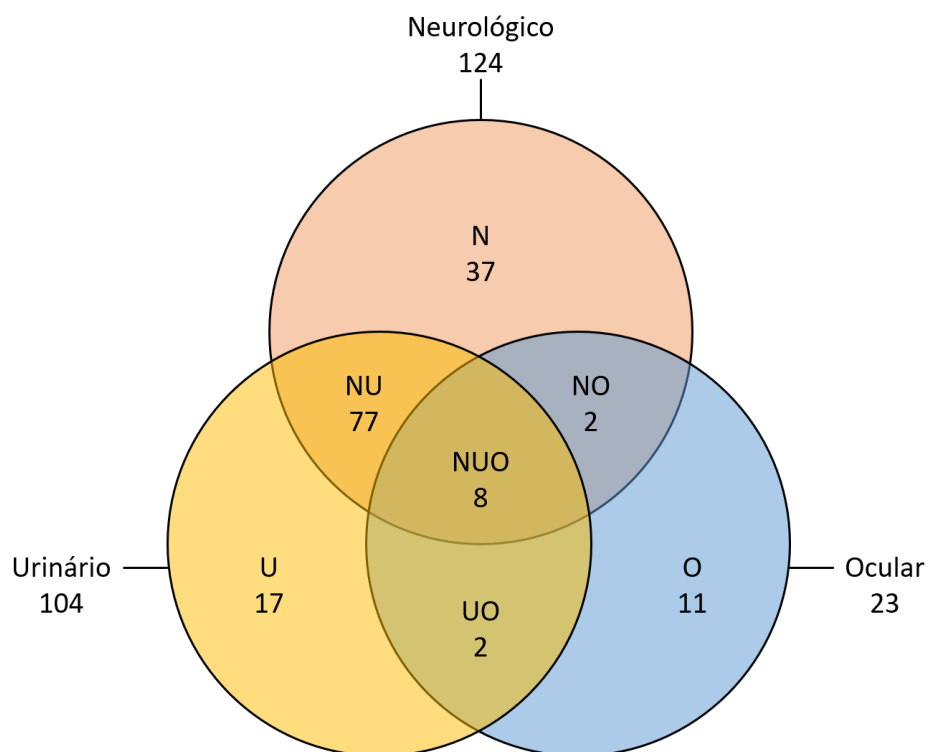


Figura 2. Distribuição dos diferentes quadros clínicos de acordo com manifestação clínica neurológica, urinária e ocular.

Tabela 2. Frequência dos animais sintomáticos seropositivos segundo o quadro clínico (n=154)

	Quadros clínicos isolados			Quadros clínicos combinados			
	N	U	O	NU	NO	UO	NUO
Frequência absoluta	37	17	11	77	2	2	8
Porcentagem	24%	11%	7,1%	50%	1,3%	1,3%	5,2%

N-Neurológico; U-Urinário; O-Ocular; NU-Neurológico e Urinário; NO-Neurológico e Ocular; UO-Urinário e Ocular; NUO-Neurológico, Urinário e Ocular

Entre os 154 coelhos sintomáticos seropositivos, o sinal clínico mais frequente foi o *head tilt* presente em 60% (92/154) dos casos. O segundo sinal clínico mais comum foi a perda de equilíbrio (39%; 60/154) seguindo-se a incontinência urinária (38%; 59/154). O *head tilt*, o nistagmo e a síndrome vestibular apresentaram uma relação estatisticamente significativa com a seropositividade (Tabela 3).

Tabela 3. Distribuição das diferentes manifestações clínicas por quadro clínico

	N	U	O	NU	NO	UO	NUO	Total	Valor p
<i>Head tilt</i>	30	0	0	54	1	0	7	92/154 (60%)	0,009
Perda de equilíbrio	18	0	0	37	2	0	3	60/154 (39%)	0,051
Nistagmo	18	0	0	21	1	0	4	44/154 (29%)	0,001
Síndrome vestibular	12	0	0	23	1	0	3	39/154 (25%)	0,005
<i>Rolling</i>	9	0	0	17	1	0	0	27/154 (18%)	0,813
Paresia	5	0	0	15	0	0	3	23/154 (15%)	0,223
<i>Circling</i>	7	0	0	11	0	0	1	19/154 (12%)	0,248
<i>Nodding</i>	2	0	0	11	0	0	0	13/154 (8%)	1
Ataxia	4	0	0	7	0	0	0	11/154 (7%)	0,353*
Convulsão	3	0	0	5	0	0	1	9/154 (6%)	0,764*
Incontinência urinária	0	9	0	42	0	2	6	59/154 (38%)	0,156
Anorexia	0	5	0	43	0	1	4	53/154 (34%)	0,073
Perda de peso	0	13	0	30	0	2	4	49/154 (32%)	0,252
Poliúria e/ou polidipsia	0	7	0	15	0	2	1	25/154 (16%)	0,051
Insuficiência renal	0	1	0	8	0	0	0	9/154 (6%)	0,060*
Mancha branca no olho	0	0	6	0	1	1	3	11/154 (7%)	0,353*
Uveíte	0	0	5	0	2	2	1	10/154 (6%)	1*
Catarata	0	0	0	0	0	0	4	4/154 (3%)	1*

* Teste de Fisher

Entre os sinais clínicos compatíveis com a infecção por *E. cuniculi*, aqueles que levaram especificamente o médico veterinário a realizar um teste serológico, foram identificados e designados sinais clínicos de alerta. Relativamente a estes últimos, verificou-se que os dois mais comuns foram o *head tilt* e a perda de equilíbrio. Com efeito, a frequência destes sinais de alerta em animais com anticorpos anti-*E. cuniculi* foi de 52% (80/154) e 33% (51/154) respetivamente.

3.3. Influência de fatores na ocorrência de infeção

Este estudo tinha igualmente por objetivo determinar a existência de uma associação entre determinados fatores e a seropositividade. Os fatores estudados estavam relacionados com as características do animal, o seu historial clínico e o seu modo de vida.

3.3.1. Fatores relacionados às características do animal

Em relação às características dos animais, foram analisados o sexo, a esterilização, a raça e a idade no momento do teste serológico. Verificou-se que, a amostra incluiu 42% de fêmeas (100/238), e 58% de machos (138/238) e que as taxas de seropositividade foram respetivamente de 72% (72/100) e 68% (94/138). Entre os 238 coelhos, 149 (63%) eram esterilizados apresentando uma taxa de seropositividade de 69% (103/149). A presença de anticorpos anti-*E. cuniculi* não estava estatisticamente associada com o sexo nem com a esterilização.

Entre os coelhos incluídos no estudo foram identificados quatro tipos de raças: anã, pequena, média e grande. A raça anã foi a mais representada (80%; 190/238), sendo que a taxa de seropositividade neste grupo foi também a mais elevada (74%; 141/190). A análise estatística revelou uma associação significativa entre a raça e a presença de anticorpos anti-*E. cuniculi* ($p < 0,01$). Além disso, a raça anã em particular apresentava uma associação estatística positiva com a taxa de deteção ($p < 0,01$; OR=2,6; IC_{95%}: 1,4-5,1).

Relativamente à idade, verificou-se que a média da idade dos animais estudados foi calculada em 4 anos (DP=2,8 anos; mínimo 2 meses e máximo 12 anos). Assim, os 238 animais foram divididos em várias classes de idade (Tabela 4). A análise estatística revelou uma associação significativa positiva entre a taxa de deteção dos anticorpos anti-*E. cuniculi* e os animais de idade superior ou igual a 3 anos ($p = 0,01$; OR=2,1; IC_{95%}: 1,2-3,7).

Tabela 4. Distribuição dos animais estudados por classes de idade

	< 1 ano	1 – 2 anos	3 – 4 anos	5 – 6 anos	≥ 7 anos
Frequência de animais	12% (28/238)	26% (61/238)	18% (44/238)	26% (61/238)	18% (44/238)
Frequência de animais seropositivos	68% (19/28)	56% (34/61)	77% (34/44)	79% (48/61)	70% (31/44)

3.3.2. Fatores relacionados à história clínica do animal

Para a concretização deste objetivo foram considerados os antecedentes, os sinais clínicos detetados durante a ultrassonografia abdominal, bem como os níveis sanguíneos de ureia e creatinina. Apenas cinco coelhos (2%) apresentavam uma história prévia de teste positivo a anticorpos anti-*E. cuniculi*, não tendo sido identificada qualquer associação.

Entre os 238 animais, 48 foram submetidos a uma ultrassonografia abdominal. Durante este exame, foram identificadas em 29 animais (*i.e.*, 12% da amostra), alterações ecográficas a nível renal sugestivas de encefalitozoonose tais como a presença de inflamação, calcificação, alteração do

parênquima ou da morfologia do rim. Entre estes animais, 18 tinham um estatuto serológico positivo (62%), mas não foi evidenciada uma associação estatística significativa.

Os níveis de ureia e creatinina foram analisados em 102 animais (*i.e.*, 43% da amostra). Um nível de ureia superior a 29mg/dL (Carpenter & Harms, 2023) foi detetado em 76 coelhos (74,5%), dos quais 55 eram seropositivos (72%). Para a creatinina, uma taxa superior a 2,2mg/dL (Carpenter & Harms, 2023) foi observada em 16 coelhos (16%) dos quais 15 eram seropositivos (94%). A análise estatística revelou que o aumento destes parâmetros se encontra significativamente associado à seropositividade (ureia $p=0,011$; OR=3,6; IC_{95%}: 1,4-9 e creatinina $p=0,018$; OR=10,3; IC_{95%}: 1,3-81,5).

3.3.3. Fatores relacionados ao estilo de vida do animal

Foram ainda estudados os parâmetros relativos ao modo de vida do animal, nomeadamente a alimentação, o número de coabitantes e o seu estatuto serológico, a origem, o habitat, o acesso ao exterior e o departamento dos proprietários. Para alguns parâmetros, havia informações em falta para alguns animais.

Na amostra estudada, 89% dos coelhos (194/218) recebiam diariamente ou ocasionalmente vegetais. Destes animais, 68% eram portadores de anticorpos anti-*E. cuniculi* (132/194). Não foi demonstrada qualquer associação estatística entre este parâmetro e a seropositividade.

No que diz respeito aos coabitantes, 47% dos coelhos viviam com um outro coelho (85/180) e 13% viviam com dois coelhos ou mais (23/180). A seropositividade em indivíduos com um companheiro foi de 69% (59/85), enquanto em indivíduos com mais de um companheiro foi de 65% (15/23). O teste de Qui-quadrado não evidenciou qualquer associação entre o estatuto serológico positivo e a presença de coabitantes. Do mesmo modo, não foi possível identificar qualquer associação entre a seropositividade e a presença de companheiros que tenham anticorpos anti-*E. cuniculi*.

No que respeita ao habitat, entre os 214 animais em que foi possível obter informação, verificou-se que 209 coelhos viviam em casa (98%), dos quais 143 eram positivos para anticorpos anti-*E. cuniculi* (68%). Além disso, foi possível identificar o acesso ao exterior para 65 coelhos sendo que 51 tinham essa possibilidade (78,5%) dos quais 33 tinham um estatuto serológico positivo (65%). O teste de Fisher não determinou uma ligação entre estes parâmetros e a seropositividade.

Os coelhos incluídos na amostra estavam distribuídos de forma heterogénea entre os 5 departamentos da região Hauts-de-France (Figura 1). Os efetivos apresentados na Figura 1 foram divididos de acordo com o seu resultado serológico (Figura 3). A análise estatística não permitiu afirmar uma associação entre o departamento e a presença de anticorpos anti-*E. cuniculi* nos animais.

Finalmente, a origem pôde ser determinada em 89 indivíduos. Assim, 32 coelhos foram adquiridos em lojas de animais (36%), dos quais 25 eram seropositivos (78%), 24 coelhos tiveram proveniência de particulares (27%), dos quais 14 eram seropositivos (58%), 14 coelhos foram adquiridos diretamente

de reprodutores (16%), dos quais 6 eram seropositivos (43%), 10 coelhos foram adotados em associações (11%), dos quais 5 eram seropositivos (50%) e, por fim, em 9 coelhos foram identificadas outras origens (10%), dos quais 6 eram seropositivos (67%). Após análise estatística, apenas a origem dos animais provenientes de lojas de animais era estatisticamente e positivamente significativa ($p=0,046$; $OR=3$; $IC_{95\%}$: 1,1-8).

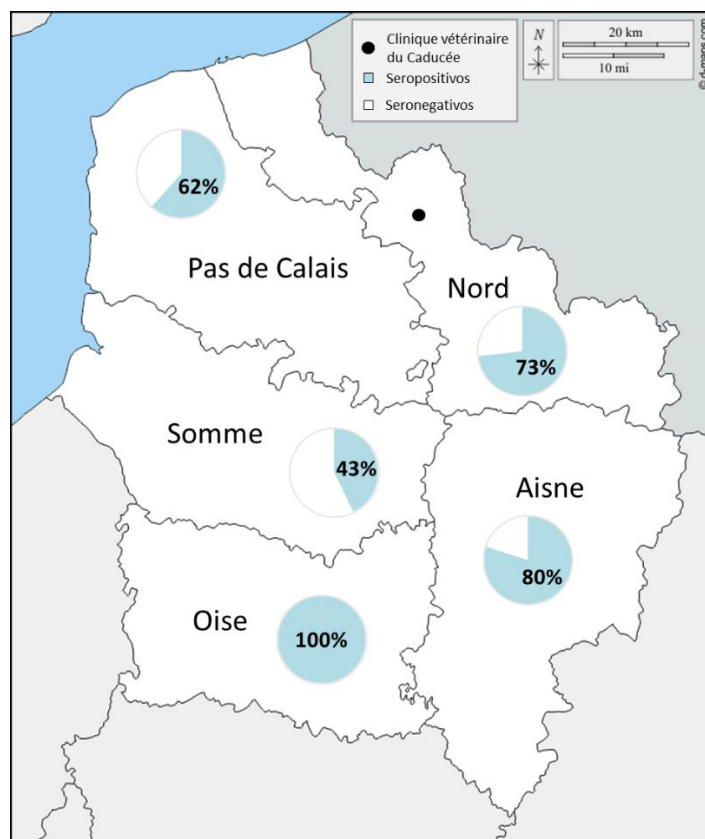


Figura 3. Distribuição dos animais seropositivos segundo os departamentos

4. Discussão

Durante este estudo, surgiram várias limitações. Uma dificuldade deste estudo foi a falta parcial de dados em alguns parâmetros estudados, devido à ausência de um protocolo de recolha de dados, relacionada com a própria natureza de um estudo observacional retrospectivo. Além disso, as consultas foram realizadas por vários médicos veterinários, o que gera variabilidade nos dados registados. Assim, ao analisar estatisticamente várias variáveis pelo teste do Qui-quadrado, alguns valores esperados eram inferiores a cinco e, portanto, o teste de Fisher teve de ser aplicado. De mais, a ausência de alguns dados para determinadas variáveis não permitiu o cálculo de OR. Finalmente, por razões práticas, este estudo baseia-se numa amostra de conveniência e implica portanto que comporta, por essência, um enviesamento.

A seropositividade em coelhos de estimação observados em contexto clínico na região Hauts-de-France calculada neste estudo é de 70%. É, portanto, comparável à determinada na região parisiense (Tabela 5). É possível fazer um paralelo com outros estudos sobre a seroprevalência de *E. cuniculi* noutros países, mesmo que a técnica de deteção de anticorpos utilizada seja diferente. Com efeito, os resultados da IFI e da ELISA estão correlacionados (Künzel & Fisher, 2018). Assim, pode-se ver que a seropositividade da amostra é comparável à obtida na República Checa (Jeklova et al., 2010). Também se aproxima da encontrada em Taiwan (Tee et al., 2011), no Japão (Igarashi et al., 2008) ou na Itália (Dipineto et al., 2008). No entanto, o resultado do presente estudo é muito diferente do obtido recentemente na Finlândia (Mäkitaipale et al., 2022). Verifica-se, portanto, uma variabilidade importante da seropositividade entre os estudos. Isso pode ser explicado pelo estatuto clínico dos animais estudados, por exemplo os do estudo finlandês eram todos clinicamente saudáveis. Além disso, vários outros fatores podem explicar essa flutuação, como a influência do clima, as condições de higiene em criação ou a falta de conhecimento dos proprietários que colocam em contato animais portadores com indivíduos saudáveis (Berger Baldotto et al., 2015).

Tabela 5. Taxa de seropositividade em coelhos de estimação em vários países

País	Teste serológico	Número de coelhos	Seropositividade	Estudo
Finlândia	ELISA	247 ^A	29,2%	(Mäkitaipale et al., 2022)
Itália	ELISA	9 ^{A+S}	44%	(Maestrini et al., 2017)
Itália	CIA	826 ^{A+S}	59,6%	(Lavazza et al., 2016)
Brasil	ELISA	186 ^{A+S}	81,7%	(Berger Baldotto et al., 2015)
Coreia	ELISA	186 ^{A+S}	22,6%	(Shin et al., 2014)
Alemanha	IFI, CIA	773 ^{A+S}	43%	(Hein et al., 2014)
Taiwan	ELISA CIA	171 ^{A+S}	63,2% 67,8%	(Tee et al., 2011)
República Checa	ELISA	500 ^{A+S}	70,4%	(Jeklova et al., 2010)
Japão	ELISA	337 ^{A+S}	63,5%	(Igarashi et al., 2008)
Áustria	IFI	184 ^S	78,3%	(Künzel et al., 2008)
Itália	ELISA, CIA	125 ^{A+S}	67,2%	(Dipineto et al., 2008)
Reino Unido	ELISA	97 ^A	52%	(Keeble & Shaw, 2006)
França	IFI	112 ^{A+S}	69%	(Beaurin, 2006)
Reino Unido	ELISA	125 ^{A+S}	59,2%	(Harcourt-Brown & Holloway, 2003)

A = coelhos assintomáticos; S = coelhos sintomáticos

No presente estudo, observou-se que a proporção de animais sintomáticos é muito elevada em comparação com os animais assintomáticos. Com efeito, o teste serológico de detecção de anticorpos anti-*E. cuniculi* por IFI é raramente utilizado para prevenção, mas sim para apoiar ou rejeitar a hipótese da encefalitozoonose. Verificou-se que as taxas de detecção em animais sintomáticos (70%) e assintomáticos (67%) são semelhantes. A seropositividade num animal saudável pode resultar de um início de infeção ou de uma infeção subclínica. De facto, vários estudos mostraram que os coelhos podem ser portadores assintomáticos e que este fenómeno pode afetar um número não negligenciável de animais (Keeble & Shaw, 2006; Dipineto et al., 2008; Igarashi et al., 2008; Berger Baldotto et al., 2015). Quanto aos animais assintomáticos seronegativos, não é possível descartar a hipótese de um início de infeção. Idealmente, eles deveriam ser testados novamente quatro semanas depois (Keeble, 2011). A presença de anticorpos anti-*E. cuniculi* significa que o animal foi infetado com *E. cuniculi*, mas não confirma que é o patógeno responsável dos sintomas (Jeklova et al., 2010). Além disso, os sinais clínicos compatíveis com a encefalitozoonose são pouco específicos. Em animais sintomáticos seropositivos, eles podem resultar de infeção ativa por *E. cuniculi* ou outras patologias. No entanto, a encefalitozoonose pode ser excluída em animais sintomáticos seronegativos (Keeble, 2011).

Tal como noutros estudos, os animais seropositivos apresentavam mais frequentemente sinais clínicos neurológicos (80,5%) (Künzel et al., 2008; Jeklova et al., 2010; Lavazza et al., 2016). Nestes mesmos estudos, verifica-se que a proporção do quadro clínico combinado neurológico e urinário representa, no máximo, 5% dos animais seropositivos. Esta diferença acentuada em relação ao presente estudo (50%) pode ser explicada por uma divergência dos sinais clínicos considerados. Além disso, a presença de *head tilt*, de nistagmo ou de síndrome vestibular apresentou uma associação estatística com a taxa de detecção. Assim, a ocorrência de qualquer um desses sinais clínicos deveria levar a inclusão sistemática da encefalitozoonose nos diagnósticos diferenciais. Foi, aliás, demonstrado que, na prática, a presença de *head tilt* ou de perda de equilíbrio levou, na maior parte dos casos, os veterinários a praticar um exame serológico.

No que diz respeito aos potenciais fatores de predisposição ligados às características do animal, à semelhança de vários outros estudos, a seropositividade não tinha ligação estatística nem com o sexo nem com a esterilização (Keeble & Shaw, 2006; Dipineto et al., 2008; Tee et al., 2011; Shin et al., 2014; Berger Baldotto et al., 2015; Mäkitäipale et al., 2022). Em contraste, uma associação estatística foi encontrada entre a taxa de detecção e a raça, e mais precisamente a raça anã. Esta última parece representar um risco para a ocorrência de infeção, mas são necessários estudos posteriores para o confirmar. De facto, nenhum dos estudos mencionados na Tabela 5 estabeleceu uma relação estatística entre a raça e a seropositividade. No presente estudo, o resultado pode ter sido influenciado pelo número predominante de animais de raça anã em comparação com outras raças (80%). No que diz respeito à idade, os estudos dividem-se quanto à sua associação com a presença de anticorpos anti-*E. cuniculi*. Alguns estudos puderam determinar uma associação significativa em animais com mais de quatro meses de idade, enquanto no presente estudo esta associação foi verificada apenas em animais

com idade superior ou igual a três anos (Dipineto et al., 2008; Tee et al., 2011). Não foi encontrada qualquer explicação para esta diferença.

Entre os fatores relacionados à história médica do animal, os altos níveis de ureia e creatinina apareceram como significativamente associados com a seropositividade. No entanto, o aumento desses parâmetros bioquímicos também pode ser uma consequência de doenças concomitantes desconhecidas.

A análise estatística dos fatores ligados ao estilo de vida do animal não revelou qualquer associação entre a seropositividade e a alimentação, os coabitantes, o habitat, o acesso ao exterior ou ainda a zona geográfica. Os estudos de Keeble (2006) e Baldotto (2015) corroboram estes resultados. Por outro lado, um estudo encontrou uma associação estatística com a área geográfica (Tee et al., 2011) e um outro com a presença de coabitantes (Mäkitaipale et al., 2022). Finalmente, ao contrário deste último estudo, foi encontrada uma associação estatística positiva significativa entre a origem dos animais provenientes de lojas de animais e o estatuto serológico positivo. A introdução regular de novos animais de diferentes proveniências poderia ser uma explicação. Mas esta é contrariada pelo resultado estatístico dos animais adotados em associação, que então deveria ter sido igualmente significativo.

5. Conclusão

O objetivo principal do presente estudo consistia em determinar a taxa de seropositividade nos coelhos de companhia entre os animais que tinham sido submetidos a uma consulta veterinária na “Clinique du Caducée” na região Hauts-de-France. Assim, foi demonstrado que a seropositividade nesta região é semelhante à da região parisiense. Por outro lado, os valores calculados para os animais sãos e doentes são comparáveis e sublinham a importância da detecção serológica em todos os coelhos de companhia. Esta necessidade é tanto maior quanto *E. cuniculi* é um agente patogénico zoonótico e que os coelhos vivem maioritariamente no interior das casas. O rastreio e a informação dos proprietários são dois eixos da luta contra a propagação de *E. cuniculi*. Com efeito, permitiriam prevenir a transmissão aos animais sãos, mas também e sobretudo uma eventual transmissão ao Homem.

Referências bibliográficas

- Beaurin, M. (2006). *Séroprévalence d'encephalitozoon cuniculi chez le lapin de compagnie en Région Parisienne*. Ecole Nationale Vétérinaire D'Alfort.
- Berger Baldotto, S., Cray, C., Giannico, A. T., Reifur, L., & Montiani-Ferreira, F. (2015). Seroprevalence of *Encephalitozoon cuniculi* Infection in Pet Rabbits in Brazil. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 24(4), 435–440. <https://doi.org/10.1053/j.jepm.2015.08.010>
- Carpenter, J. W., & Harms, C. (2023). *Carpenter's Exotic Animal Formulary*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2019-0-00378-0>
- Chalupsky, J., Vavra, J., Gaudin, J. C., Vandewalle, P., Arthur, C. P., Guenezan, M., & Launay, H. (1990). Mise en évidence sérologique de la présence d'encéphalitozoonose et de toxoplasmose chez le lapin de garenne (*Oryctolagus cuniculus*) en France. *Bulletin de La Société Française de Parasitologie*, 8(1), 91–95.
- Csokai, J., Joachim, A., Gruber, A., Tichy, A., Pakozdy, A., & Künzel, F. (2009). Diagnostic markers for encephalitozoonosis in pet rabbits. *Veterinary Parasitology*, 163(1–2), 18–26. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.03.057>
- Desoubeaux, G., Pantin, A., Peschke, R., Joachim, A., & Cray, C. (2017). Application of Western blot analysis for the diagnosis of *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbits: example of a quantitative approach. *Parasitology Research*, 116(2), 743–750. <https://doi.org/10.1007/S00436-016-5343-4>
- Didier, E. S., & Weiss, L. M. (2006). Microsporidiosis: current status. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 19(5), 485–492. <https://doi.org/10.1097/01.qco.0000244055.46382.23>
- Dipineto, L., Rinaldi, L., Santaniello, A., Sensale, M., Cuomo, A., Calabria, M., Menna, L. F., & Fioretti, A. (2008). Serological survey for antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in pet rabbits in Italy. *Zoonoses and Public Health*, 55(3), 173–175. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2007.01097.x>
- Doboși, A.-A., Bel, L.-V., Paștiu, A. I., & Pusta, D. L. (2022). A Review of *Encephalitozoon cuniculi* in Domestic Rabbits (*Oryctolagus cuniculus*)—Biology, Clinical Signs, Diagnostic Techniques, Treatment, and Prevention. *Pathogens*, 11(12), 1486. <https://doi.org/10.3390/pathogens11121486>
- Harcourt-Brown, F. M., & Holloway, H. K. R. (2003). *Encephalitozoon cuniculi* in pet rabbits. *Veterinary Record*, 152(14), 427–431. <https://doi.org/10.1136/vr.152.14.427>
- Hein, J., Flock, U., Sauter-Louis, C., & Hartmann, K. (2014). *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits in Germany: Prevalence and sensitivity of antibody testing. *Veterinary Record*, 174(14), 350. <https://doi.org/10.1136/vr.102126>
- Igarashi, M., Oohashi, E., Dautu, G., Ueno, A., Kariya, T., & Furuya, K. (2008). High seroprevalence of *Encephalitozoon cuniculi* in pet rabbits in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 70(12), 1301–1304. <https://doi.org/10.1292/jvms.70.1301>

- Jeklova, E., Jekl, V., Kovarcik, K., Hauptman, K., Koudela, B., Neumayerova, H., Knotek, Z., & Faldyna, M. (2010). Usefulness of detection of specific IgM and IgG antibodies for diagnosis of clinical encephalitozoonosis in pet rabbits. *Veterinary Parasitology*, 170(1–2), 143–148. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2010.01.029>
- Katinka, M. D., Duprat, S., Cornillot, E., Méténier, G., Thomarat, F., Prensier, G., Barbe, V., Peyretilade, E., Brottier, P., Wincker, P., Delbac, F., El Alaoui, H., Peyret, P., Saurin, W., Gouy, M., Weissenbach, J., & Vivarès, C. P. (2001). Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature*, 414(6862), 450–453. <https://doi.org/10.1038/35106579>
- Keeble, E. (2011). Encephalitozoonosis in rabbits – what we do and don't know. *In Practice*, 33(9), 426–435. <https://doi.org/10.1136/inp.d6077>
- Keeble, E., & Shaw, D. J. (2006). Seroprevalence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in domestic rabbits in the United Kingdom. *Veterinary Record*, 158(16), 539–544. <https://doi.org/10.1136/vr.158.16.539>
- Künzel, F., & Fisher, P. G. (2018). Clinical Signs, Diagnosis, and Treatment of *Encephalitozoon cuniculi* Infection in Rabbits. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 21(1), 69–82. <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2017.08.002>
- Künzel, F., Gruber, A., Tichy, A., Edelhofer, R., Nell, B., Hassan, J., Leschnik, M., Thalhammer, J. G., & Joachim, A. (2008). Clinical symptoms and diagnosis of encephalitozoonosis in pet rabbits. *Veterinary Parasitology*, 151(2–4), 115–124. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.11.005>
- Künzel, F., & Joachim, A. (2010). Encephalitozoonosis in rabbits. *Parasitology Research*, 106(2), 299–309. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1679-3>
- Lavazza, A., Chiari, M., Nassuato, C., Giardiello, D., Tittarelli, C., & Grilli, G. (2016). Serological Investigation on *Encephalitozoon cuniculi* in pet Rabbits in North-Central Italy. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 25(1), 52–59. <https://doi.org/10.1053/J.JEPM.2015.12.004>
- Leipig, M., Matiassek, K., Rinder, H., Janik, D., Emrich, D., Baiker, K., & Hermanns, W. (2013). Value of histopathology, immunohistochemistry, and real-time polymerase chain reaction in the confirmatory diagnosis of *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbits. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 25(1), 16–26. <https://doi.org/10.1177/1040638712466394>
- Maestrini, G., Ricci, E., Cantile, C., Mannella, R., Mancianti, F., Paci, G., D'Ascenzi, C., & Perrucci, S. (2017). *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits: Serological screening and histopathological findings. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 50, 54–57. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2016.11.012>
- Mäkitaipale, J., Järvenpää, E., Bruce, A., Sankari, S., Virtala, A. M., & Näreaho, A. (2022). Seroprevalence of *Encephalitozoon cuniculi* and *Toxoplasma gondii* antibodies and risk-factor

- assessment for *Encephalitozoon cuniculi* seroprevalence in Finnish pet rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Acta Veterinaria Scandinavica*, 64(1). <https://doi.org/10.1186/S13028-022-00622-5>
- Ozkan, O., Karagoz, A., & Kocak, N. (2019). First molecular evidence of ocular transmission of Encephalitozoonosis during the intrauterine period in rabbits. *Parasitology International*, 71, 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2019.03.006>
- Shin, J. C., Kim, D. G., Kim, S. H., Kim, S., & Song, K. H. (2014). Seroprevalence of *Encephalitozoon cuniculi* in pet rabbits in Korea. *Korean Journal of Parasitology*, 52(3), 321–323. <https://doi.org/10.3347/kjp.2014.52.3.321>
- Tee, K.-Y., Kao, J.-P., Chiu, H.-Y., Chang, M.-H., Wang, J.-H., Tung, K.-C., Cheng, F.-P., & Wu, J.-T. (2011). Serological survey for antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits in Taiwan. *Veterinary Parasitology*, 183(1–2), 68–71. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.06.011>