

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**  
**CÂMPUS DE ARAÇATUBA**

**OCORRÊNCIA DE INFECÇÕES POR**  
***Encephalitozoon* spp. EM COELHOS DO ESTADO**  
**DE SÃO PAULO, BRASIL**

**Sheila Pereira Barbosa Freitas**  
Bióloga

ARAÇATUBA – SP  
2017

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**  
**CÂMPUS DE ARAÇATUBA**

**OCORRÊNCIA DE INFECÇÕES POR**  
***Encephalitozoon* spp. EM COELHOS DO ESTADO**  
**DE SÃO PAULO, BRASIL**

**Sheila Pereira Barbosa Freitas**  
**Orientadora: Profa. Dra. Gisele Fabrino Machado**

Dissertação apresentada à  
Faculdade de Medicina Veterinária  
– Unesp, Campus de Araçatuba,  
como parte das exigências para a  
obtenção do título de Mestre em  
Ciência Animal (Medicina  
Veterinária Preventiva e Produção  
Animal).

Araçatuba – SP  
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da FMVA / UNESP

F866o Freitas, Sheila Pereira Barbosa  
Ocorrência de infecções por Encephalitozoon spp. em coelhos do estado de São Paulo / Sheila Pereira Barbosa Freitas. – Araçatuba: [s.n.], 2017.  
34 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2017

Orientadora: Profa. Dra. Gisele Fabrino Machado

1. Encefalitozoonose 2. Microsporídios 3. Zoonose I. Título.

CDD 636.932



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Ocorrência de infecções por *Encephalitozoon spp.* em coelhos no Estado de São Paulo, Brasil

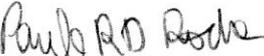
**AUTORA: SHEILA PEREIRA BARBOSA FREITAS**

**ORIENTADORA: GISELE FABRINO MACHADO**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIA ANIMAL, área: Fisiopatologia Médica e Cirúrgica pela Comissão Examinadora:

  
Profa. Dra. GISELE FABRINO MACHADO  
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

  
Profa. Dra. KATIA DENISE SARAIVA BRESCIANI  
Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

  
Prof. Dr. PAULO RICARDO DELL'ARMELENA ROCHA  
Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental / Universidade Paulista - Câmpus de Indianópolis/UNIP

Araçatuba, 15 de agosto de 2017.

## DADOS CURRICULARES DO AUTOR

**SHEILA PEREIRA BARBOSA FREITAS** - Nascida em 29 de Maio de 1991, no município de Mapacá - Amapá. Em 2013, concluiu o curso de graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas pela Faculdade Ciências na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Câmpus de Bauru - SP, podendo atuar como Bacharel sob o registro no Conselho Federal de Biologia Nº100455/01-D. Em 2014 realizou estágio voluntário no Laboratório de Patologia Aplicada, situado na UNESP "Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, onde aprendeu a técnica de Imuno-histoquímica, trabalhando com tecido de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* e acompanhando os projetos em andamento com este parasito no Lapap – Laboratório de Patologia Aplicada. Após a conclusão do estágio, iniciou o mestrado no curso de Pós Graduação em Ciência Animal em março de 2015 na mesma Instituição, com projeto intitulado: “Ocorrência de infecções por *Encephalitozoon* spp. em coelhos do estado de São Paulo, Brasil” sob a orientação da Profa. Dra. Gisele Fabrino Machado.

“Você é o que você repetidamente faz.  
Excelência não é um evento, é um hábito”.

Aristóteles

Dedico este trabalho à minha mãe, Andréa, que faleceu em 2014, mas que sonhava em ver a filha concluir a pós-graduação. Ao meu pai, Paulo e meu marido, Gilson, que sempre me deram apoio psicológico e financeiro para chegar onde estou. Ao meu filho Enzo, minha motivação e força para todas as horas. Aos meus três companheiros de pelos e patas, Johnny, Sandie e Ísis, que transformam até meus piores dias em alegria.

## AGRADECIMENTOS

Minha gratidão é totalmente dedicada às pessoas sem as quais eu não teria realizado esta pesquisa:

À Profa. Dra. Gisele Fabrino Machado, minha orientadora, que me aceitou em seu laboratório para a realização destes experimentos, me auxiliou na escrita da dissertação e sempre acreditou no meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcelo Vasconcelos Meireles, meu co-orientador, que forneceu seus equipamentos e muitos dos reagentes utilizados, além seu tempo para inúmeras discussões a respeito dos resultados e metodologia.

Ao Prof. Dr. Paulo Ricardo Dell'Armelina Rocha, por todo o conhecimento prático e teórico que me doou desde o início deste trabalho, além da grande ajuda com o projeto e os experimentos, mas principalmente por me introduzir à sua linha de pesquisa com o gênero *Encephalitozoon*.

À doutoranda Roberta Picciuto Duarte, pelo auxílio com as dificuldades e obstáculos encontrados durante a realização dos experimentos, e pela paciência durante meu aprendizado.

À CAPES, agência de fomento, que me concedeu a bolsa de mestrado.

À banca examinadora do EGQ e Defesa que contou com a Profa. Dra. Kátia D. S. Bresciani, o Prof. Dr. Marcelo V. Meireles e o Prof. Dr. Paulo Ricardo Dell'Armelina Rocha.

Agradeço também à Dra. Maria Anete Lallo, que forneceu os esporos isolados em cultivo celular, usados como controle positivo das reações.

Por fim, agradeço à Dra. Máisa Melo Heker por me fornecer parte de suas amostras colhidas em seu curso de doutorado.

## SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1 <i>Encephalitozoon</i> spp.....	13
2.2 Infecção em coelhos.....	16
2.3 Métodos de diagnóstico.....	17
3 MATERIAL E MÉTODO.....	21
3.1 Seleção de amostras.....	21
3.2 PCR. ....	21
3.2.1 Extração do DNA.....	21
3.2.2 Amplificação do DNA.....	22
4 RESULTADOS.....	24
5 DISCUSSÃO.....	25
6 CONCLUSÕES. ....	27
7 REFERÊNCIAS. ....	28

## OCORRÊNCIA DE INFECÇÕES POR *Encephalitozoon* spp. EM COELHOS DO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL

**RESUMO** - A encefalitozoonose é uma doença zoonótica causada por microsporídios do gênero *Encephalitozoon* e acomete uma ampla gama de aves, répteis e mamíferos, incluindo os coelhos, principal hospedeiro da espécie *Encephalitozoon cuniculi*. Esse estudo teve como objetivo investigar a ocorrência da presença do DNA de *Encephalitozoon* spp. em coelhos de granjas e residências do interior do e estado de São Paulo, Brasil. Foram colhidas 429 amostras por conveniência, que passaram por extração e posterior amplificação de DNA por meio da PCR convencional para o gênero *Encephalitozoon*. O método utilizado permitiu a detecção do parasito em 11 amostras (2,56%). Há presença do esporo do parasito em algumas destas granjas, mas nenhum coelho doméstico apresentou positividade. A baixa porcentagem de DNA detectado nas amostras analisadas pode indicar uma baixa ocorrência desta infecção nos animais presentes nas granjas analisadas. Esta é a primeira pesquisa sobre o gênero *Encephalitozoon* em granjas de coelhos e residências no estado de São Paulo.

**Palavras-chave:** encefalitozoonose, microsporídios, zoonoses

## OCURRENCE OF INFECTION BY *Encephalitozoon* spp. IN RABBITS FROM THE STATE OF SÃO PAULO, BRAZIL

**SUMMARY** – Encephalitozoonosis is a zoonotic disease caused by microsporidia of the genus *Encephalitozoon* and affects a wide range of birds, reptiles and mammals, including rabbits, the main host of the species *Encephalitozoon cuniculi*. This study aimed to investigate the occurrence of the DNA of *Encephalitozoon* spp. in rabbits from farms and residences at cities in state of São Paulo, Brazil. A total of 429 samples of feces were collected for convenience, from rabbits living at farms and residences from the state of São Paulo, Brazil. The DNA was extracted and amplified by conventional PCR for the genus *Encephalitozoon*. The parasite was detected in 11 samples (2.56%). That showed there's the presence of the parasite spore in some of these farms, but no domestic rabbit showed positivity. The low percentage of DNA detected in the analyzed samples, may indicate a low occurrence of this infection in the animals present in the analyzed farms. This is the first research on the genus *Encephalitozoon* in farms of rabbits and residences in the state of São Paulo.

**Keywords:** encephalitozoonosis, microsporidia, zoonoses

## 1 INTRODUÇÃO

O gênero *Encephalitozoon* pertence ao filo Microspora, o qual abrange diversas espécies de fungos eucariontes e unicelulares. Devido ao fato de serem desprovidos de mitocôndrias, esses fungos, são parasitos intracelulares obrigatórios e infectam uma ampla gama de animais vertebrados e invertebrados (KANTIKA et al., 2001).

As fontes de infecção podem ser indivíduos previamente infectados. A transmissão pode ocorrer principalmente por meio de rotas fecal-oral ou oral-oral (MATHIS et al., 2005). Na criação intensiva de coelhos, a falta de higiene é o principal responsável pela infecção. Condições de vida, superlotação, movimentação rotineira e introdução de animais de outras regiões, são fatores que ajudam a propagação da encefalitozoonose (SAVIOTTI et al., 2000).

Pouco se sabe sobre a ocorrência desta infecção em coelhos no Brasil. Os coelhos, cada vez mais têm se tornado animais de estimação, principalmente devido ao fato de serem animais dóceis e sociáveis. Além disso, a cunicultura tem crescido muito no Brasil, para atender à demanda de animais para laboratório e comércio de carnes (SORDI et al., 2014).

O objetivo do presente estudo foi investigar a presença de DNA do *Encephalitozoon* spp. em amostras de fezes de coelhos provenientes de granjas e residências localizadas em cidades do interior do estado de São Paulo.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 *Encephalitozoon* spp.

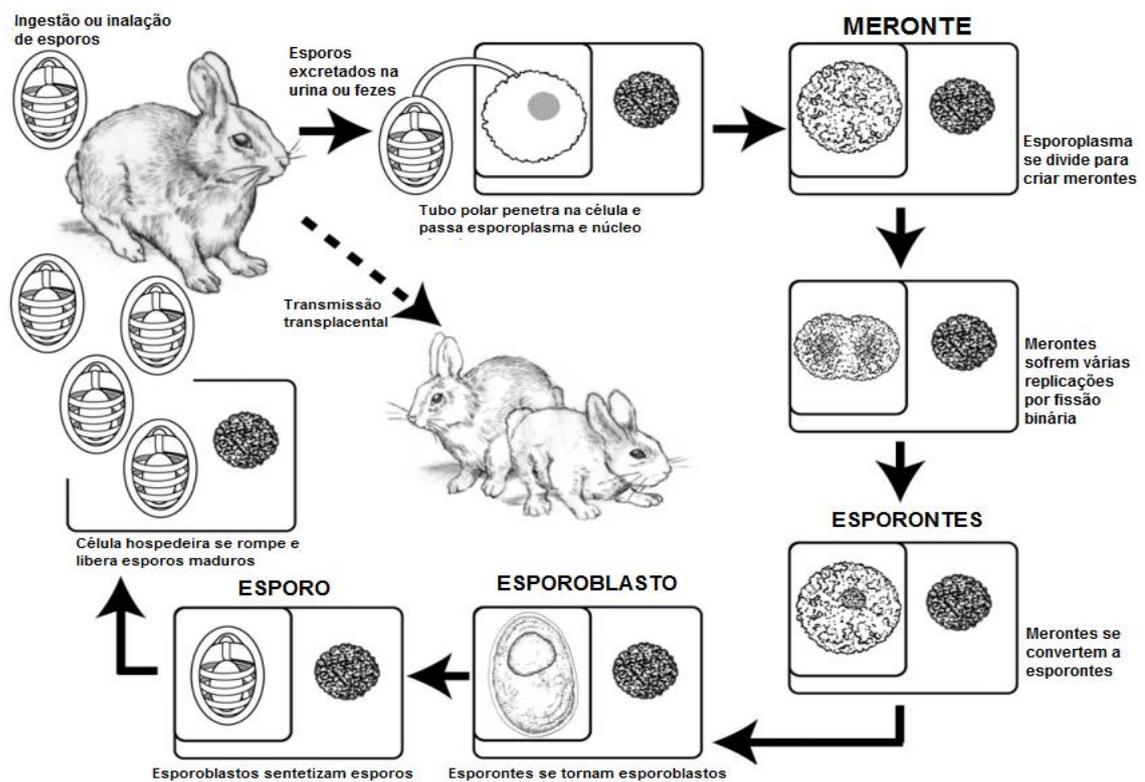
O gênero *Encephalitozoon* compreende espécies de parasitos oportunistas intracelulares obrigatórios, pertencentes ao filo Microspora, o qual é composto por microrganismos eucariontes, que se reproduzem por meio de esporos, portanto estão inseridos no Reino Fungi (VALENCÁKOVA; HALANOVA, 2010). A característica principal desses organismos é a presença de um longo tubo polar, que fica enrolado no interior de seus esporos e que quando sofre extrusão, penetra na membrana plasmática da célula do hospedeiro e realiza a deposição do seu esporoplasma (BOHNE et al., 2011). Seu ciclo de vida (Figura 1) se inicia, principalmente, pela ingestão da forma infectante do patógeno (esporo), que após invadir a célula do hospedeiro, inicia a fase de merogonia proliferativa, seguida pelo estágio de esporogonia, que dá origem a esporos característicos, muito pequenos (1 a 4  $\mu\text{m}$ ) e resistentes no meio ambiente (MATHIS et al., 2005).

Três principais espécies de microsporídios do gênero *Encephalitozoon* têm sido descritas infectando e causando a encefalitozoonose em humanos imunodeficientes, por exemplo, portadores do vírus “HIV (human immunodeficiency virus)”: *Encephalitozoon cuniculi*, *Encephalitozoon hellem* e *Encephalitozoon intestinalis* (WEBER et al., 1994). Também ocorre infecção em pessoas imunocompetentes, inclusive, Carhan et al. (2015) relatam um caso clínico, no qual um funcionário de um biotério de coelhos na Turquia estava infectado, provavelmente por ignorar as medidas de higiene e prevenção em seu ambiente de trabalho.

Shibasaki et al. (2017) sugerem a existência de outra espécie, a *Encephalitozoon pogonae* descrita em répteis. Entretanto, a sequência amplificada pelo “primer” espécie-específico para a *E. pogonae* é muito pequena para tal afirmação, contando apenas com 132 pares de base amplificados. Além da

*Encephalitozoon larcertae*, descrita inicialmente por Canning, em 1981 e posteriormente por Koudela et al. (1998), que utilizaram os mesmo primers que foram aplicados ao presente estudo (int530r e int580f), para realização da PCR com material colhido de mucosa intestinal e fezes de répteis. Na infecção experimental em camundongos SCID, a inoculação oral e intraperitoneal do patógeno não resultou em infecção e em cultura celular com células E6, os esporos não se propagaram e a quantidade inicial de esporos diminuiu a cada análise. Existem poucas informações na literatura a respeito destas diferentes espécies.

Dentre todas as microsporidioses, a encefalitozoonose tem sido relatada como uma doença com potencial para afetar setores da economia possui espécies de microsporídios com potencial para afetar setores da economia, como a piscicultura, já que causa morte em peixes (LALLO et al., 2016), a bovinocultura de leite (KVÁČ et al., 2016) e principalmente a cunicultura, na qual o parasito pode interferir diretamente na redução da produção de carne, além de frequentemente causar o óbito desses animais (SANTANIELLO et al., 2009; SAVIOTTI et al., 2000).



**FIGURA 1** - Ciclo de vida do parasito *Encephalitozoon* spp. visível por microscopia eletrônica de transmissão (Adaptado de: JORDAN et al., 2006).

## 2.2 Infecção em coelhos

O coelho é considerado o principal hospedeiro do *Encephalitozoon cuniculi*. Nos coelhos, a encefalitozoonose frequentemente representa uma infecção crônica e latente, somente uma parte dos animais infectados desenvolvem os sinais clínicos da doença. Os principais sinais clínicos são neurológicos, incluindo torcicolo e ataxia. Entretanto, é muito difícil diagnosticar a enfermidade somente baseando-se em sinais clínicos, pois diversos outros patógenos, por exemplo, *Pasteurella multocida*, *Toxoplasma gondii*, e *Listeria monocytogenes*, podem causar os mesmos sinais clínicos (KUNSTYR; NAUMANN, 1985).

Os microsporídios são gram positivos. O gênero *Encephalitozoon*, causa doença em coelhos (SANTANIELLO et al., 2009; SAVIOTTI et al., 2000), além também seres humanos (BRASIL et al., 2010), cães, e várias outras espécies de mamíferos (GALVÁN-DÍAZ et al., 2014), além de aves (LALLO et al., 2012; NAKAMURA et al., 2010), répteis (SHIBASAKI et al., 2017) e peixes (LALLO et al., 2016). Por isso é importante reconhecer as possíveis fontes de infecção e descrever suas rotas mais comuns.

De acordo com Harcourt-Brown et al. (2004) e Maestrini et al. (2016), as lesões típicas observadas em coelhos infectados por este agente incluem: Meningoencefalite granulomatosa multifocal, alterando morfológicamente o encéfalo, com a formação de granulomas. Estas lesões induzem a ataxia vestibular, inclinação da cabeça e déficits em vários nervos cranianos (MUÑANA; LUTTGEM, 1998). Além disso, o *Encephalitozoon* também causa nefrite intersticial principalmente nos túbulos (OLIVEIRA et al., 2000) e secundariamente, fibrose renal, induzindo a azotemia (EFSTRATIADIS et al., 2009).

As primeiras pesquisas com o *Encephalitozoon* foram descritas por Wright e Craighead a partir de coelhos com paralisia espontânea em 1922 (JEKLOVA et al., 2010).

No Brasil, a ocorrência destes patógenos tem sido descrita em humanos portadores do “HIV”, com diarreia crônica, principal sintoma da infecção por *E.*

*intestinalis* no Rio de Janeiro-RJ, por meio da PCR (BRASIL et al., 2000); Há relatos de pombos e aves exóticas infetados por *E. cuniculi* na cidade de São Paulo - SP (LALLO et al., 2012); E existem relatos de casos de coelhos naturalmente infectados, apresentando sinais neurológicos e oftálmicos avançados em várias cidades do estado do Paraná (BALDOTTO et al., 2015). Todavia, esta ocorrência não é conhecida em cidades do interior de São Paulo, o estado que atualmente abriga a maior população do Brasil.

Com relação à prevalência mundial do *E. cuniculi*, há estudos que mostram a ubiquidade do parasito. Uma pesquisa sorológica desenvolvida na Itália, com 1600 coelhos, confirmou a alta ocorrência da infecção por *E. cuniculi* em (31,5%) dos animais avaliados, por meio do “ELISA” (ensaio de imunoabsorção enzimática), sendo este um importante fator de relevância epidemiológica e de saúde pública, visto o reconhecimento da infectividade em seres humanos (SANTANIELLO et al., 2009). No Japão, um surto de encefalitozoonose também foi relatado em um zoológico localizado na cidade de Asahigawa. Dos 38 soros de coelhos examinados por ELISA, para a detecção de anticorpos contra *E. cuniculi*, 71,1% apresentaram positividade (FUKUI et al., 2012). Atualmente, infecções por *E. cuniculi* têm sido relatadas com maior frequência em coelhos de estimação (DIPINETO et al., 2008, *apud* EWRINGMANN; GÖBEL, 1999). Em Taiwan, confirmou-se em laboratório, por meio do “ELISA”, os primeiros casos de encefalitozoonose em coelhos, uma média de 65,5% de soropositividade em 171 amostras analisadas (TEE et al., 2011).

### 2.3 Método de diagnóstico

Exames sorológicos, como o “ELISA” (ensaio de imunoabsorção enzimática), “IFAT” (imunofluorescência indireta) e “CIA” (imunoensaio de carbono) são muito utilizados em rotina de laboratório para detecção do isotipo IgG de anticorpos específicos contra *Encephalitozoon* spp. (JEKLOVA et al. 2010; KÜNZEL; JOACHIM, 2010; TEE et al., 2011). Entretanto, eles indicam uma exposição ao patógeno, mas não confirmam que este é o agente causador da doença e nem se realmente ainda há presença dos esporos no indivíduo avaliado.

Um diagnóstico *ante mortem* definitivo é difícil. A detecção direta de organismos na urina ou fezes torna-se um pouco dificultada pelo fato da excreção de esporos ser intermitente (COX et al., 1980). É recomendada a realização de mais de uma colheita de amostras em dias diferentes para diminuir este fator de intermitência ou o emprego de duas técnicas, por exemplo, a técnica de “ELISA”, como meio de triagem, e se houver presença de anticorpos anti-*Encephalitozoon*, uma “PCR” confirmatória para a infecção deve ser processada, pois somente os testes sorológicos não atendem satisfatoriamente a um diagnóstico desta doença.

Técnicas de maior precisão, financeiramente acessíveis e menos demoradas são necessárias para o diagnóstico da encefalitozoonose, como por exemplo, a PCR “Polymerase Chain Reaction” (MATHIS et al., 1997). Esta técnica é sensível, específica e demanda menos tempo, pois permite o processamento de várias amostras por reação e leva apenas algumas horas (DIDIER et al., 1995). A pesquisa de DNA do parasito por meio desta técnica também tem sido utilizada para o diagnóstico *post mortem* da encefalitozoonose, assim como para pesquisas epidemiológicas de potenciais reservatórios (portadores) de *E. cuniculi* (ABU-AKKADA et al., 2015).

Segundo Ghosh e Weiss (2009), os métodos de detecção molecular, por exemplo, a PCR para microsporídios, são potencialmente mais sensíveis, específicos e dependem menos da subjetividade do observador, que os métodos tradicionais baseados em microscopia. As primeiras aplicações deste método para a detecção deste parasito, descritas na literatura, foram realizadas por Vossbrinck et al. (1993), para o diagnóstico da infecção em humanos.

Os “Primers” (oligonucleotídeos iniciadores) mais frequentemente utilizados e aplicados para as PCRs do gênero *Encephalitozoon* são INT530 (F) e INT580 (R) que amplificam um produto de aproximadamente 1000 pares de base “bp”, que incluem grande parte dos genes da ssu rRNA “small subunit ribosomal RNA”, a região intergênica inteira e um pequeno fragmento de genes da lsu rRNA “Large subunit ribosomal RNA”. (VOSSBRINCK et al., 1993).

Didier et al. (1996) afirmou que esses “primers” pan-*Encephalitozoon*, que detectam a presença de todas as espécies do gênero *Encephalitozoon*, amplificam

um produto de aproximadamente 1000 pares de base. Fedorko e Nelson (1995) utilizaram esses mesmos “primers” para amplificar DNA extraído de cultura e também de amostras fecais de humanos portadores do vírus “HIV”. Franzen e Müller (1999) demonstraram que esses “primers” são muito úteis para detecção de microsporídios em diferentes tipos de amostras, como secreção nasal, urina, lavada broncoalveolar e muco proveniente dos pulmões, fezes e biópsia intestinal. Em uma análises de PCR realizadas com fezes de falcão-gerifalte (*Falco rusticolus*), utilizando este mesmo par de “primers”, Malcekova et al. (2010) obtiveram produtos com fragmentos de 1350 pares de base (pb). Para estas as amostras positivas, realizou-se uma nova PCR com “primers” espécie-específicos para *E. cuniculi* e novamente obteve-se a confirmação da positividade. A sequencia genética foi compatível com a disponível no GenBank. Vossbrinck et al. (1993), responsáveis pela criação deste par de “primers”, também obteve um produto amplificado de 1350 pares de base, entretanto, Didier et al. (1996), obtiveram um produto de 1000pb em PCR de cultura de parasitos isolados de mucosa nasal e lavado broquioalveolar de dois pacientes soropositivos para “HIV” e Rossi et al. (1998) afirmam ter obtido um amplificado de aproximadamente 1000 pares de base em suas pesquisas com *E. cuniculi* isolado de humanos com “HIV” e cultivados em células RK13 “rabbit kidney”.

As espécies de *Encephalitozoon* têm sido identificadas por meio de PCR em vários animais, como coelhos, em amostras de fezes, urina e material oftálmico (KÜNZEL; JOACHIM, 2010; NOTERMANS et al., 2005). Lallo et al. (2012) e Nakamura et al. (2010) identificaram o parasito em fezes de aves; Galván-Díaz et al. (2014), em fezes de suínos e vários outros mamíferos. Além de humanos, em material fecal (BRASIL et al., 2000; MOURA et al., 2003). Em vários estudos experimentais, observou-se que a encefalitozoonose é um doença potencialmente grave, que pode afetar tanto animais imunossuprimidos, como imunocompetentes, sendo que esses podem passar anos sem apresentar sintomas e eliminando esporos por meio da urina e fezes, fazendo parte da rota de transmissão do parasito (TOVAR et al., 2016).

Exames sorológicos (ABU-AKKADA et al., 2015; JEKLOVA et al., 2010) e a PCR de material fecal, por exemplo, (GALVÁN-DÍAZ et al., 2014) ainda são as ferramentas mais importantes para o diagnóstico *ante mortem* da doença.

Sabe-se que a PCR se trata de uma técnica sensível, específica e que permite experimentos posteriores, para distinção dos três diferentes genótipos de *E. cuniculi*. Essa distinção produz resultados para estudos epidemiológicos, pois a detecção da subespécie (genótipo) nos permite indagar sobre a afinidade desta com seu tipo de hospedeiro preferido, possível origem da infecção, rotas de transmissão e dinâmicas da propagação (GHOSH; WEISS, 2009; HINNEY et al., 2016; MATHIS et al., 2005).

Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar a ocorrência do DNA do *Encephalitozoon* spp. em amostras de fezes de coelhos de granjas e residências do estado de São Paulo, por meio da PCR.

### 3 MATERIAL E MÉTODO

#### 3.1 Seleção de Amostras

Por meio de parcerias entre granjas e proprietários de coelhos de estimação e profissionais do ramo, incluindo Médicos Veterinários, Zootecnistas e Biólogos de Araçatuba, Ribeirão Preto, Guariba, Araraquara, Jaboticabal, Campinas, Ribeirão Pires, Pradópolis e Botucatu, foram 429 amostras de fezes de coelhos foram colhidas diretamente no interior das gaiolas, no piso embaixo das gaiolas ou em bandejas coletoras localizadas embaixo das gaiolas e acondicionadas em tubos de polipropileno estéreis de 2mL e congeladas a -20°C com adição de dicromato de potássio 5%. Estas mesmas amostras foram utilizadas previamente para a pesquisa de *Eimeria* spp. e *Cryptosporidium* spp. (HEKER et al., 2016).

#### 3.2 PCR

##### 3.2.1 Extração do DNA

Cerca de 200mg de fezes foram colocadas em tubos com tampa rosqueáveis, contendo tampão de extração imediatamente após serem retiradas do congelador, para serem submetidas à extração de DNA conforme descrição no protocolo de McLauchlin et al. (1999), utilizado inicialmente para obtenção do DNA de *Cryptosporidium* spp. Esse método utiliza basicamente agitação da alíquota das amostras (200mg) em 900 µl de tampão de extração (L6 - preparado com 10 M tiocianato de guanidina, 0.2 M EDTA, 0.1 M Tris-HCL, 2% (wt/vol.) Triton x-100 e PVP) por 2 minutos, em velocidade máxima, no Mini-Beadbeater® (Biospec), com adição de 0.3 g pérolas de vidro, configurando extração química e mecânica do DNA. Após a ruptura dos esporos, o sobrenadante de cada amostra foi recolhido por pipetagem e transferido para outro tubo de polipropileno (1,5mL, estéril), no qual foram adicionados 100 µl de solução de sílica ativada para a captura do DNA. A

solução foi agitada em vórtex, centrifugada a 6000 rpm por 2 minutos e o sobrenadante descartado. O *pellet* foi lavado duas vezes com 200 µl de tampão de lavagem (L2 - preparado com 10 M tiocianato de guanidina, 0.2 M EDTA, 0.1 M Tris-HCL e PVP ), duas vezes com 200 µl de álcool gelado 80%, uma vez com 200 µl de acetona e seco no ThermoMixer® a 56°C durante 5 minutos. O DNA foi eluído em 150 µl de água ultra pura e agitado em vórtex para ser incubado a 56° por 5 minutos e centrifugado a 6000 rpm por 2 minutos. O sobrenadante (DNA) foi colhido com auxílio de uma pipeta, cautelosamente, a fim de evitar o contato com o *pellet* e transferido para outro tubo de polipropileno (0,2 mL, estéril) e armazenado a -20°C para posterior amplificação.

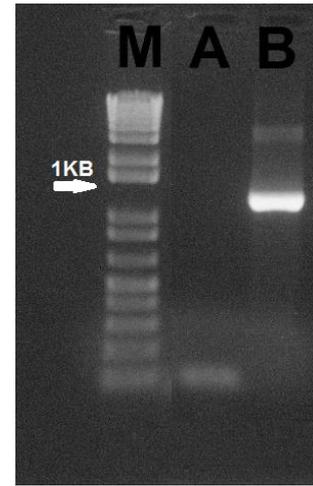
Para testar a eficiência do protocolo na extração de microsporídios, uma vez que o mesmo foi utilizado anteriormente apenas para extração em *Cryptosporidium* spp., realizou-se a extração do DNA de esporos provenientes de uma alíquota de cultivo celular de *E. cuniculi* (Figura 2A). O DNA extraído deste cultivo celular foi utilizado neste trabalho como controle positivo. Após a extração, o DNA foi quantificado com o aparelho espectrofotômetro NanoDrop® 1000 e congelado a -20°C.

### 3.2.2 Amplificação do DNA

A PCR para microsporídios foi realizada com o uso dos “primers” int530 (F) e int580 (R) para o gênero *Encephalitozoon*, que amplificam um produto de aproximadamente 1000 pares de base, que incluem grande parte dos genes da ssu rRNA “small subunit ribosomal RNA”, a região intergênia inteira e um pequeno fragmento de genes da lsu rRNA “large subunit ribosomal RNA” (VOSSBRINCK et al., 1993). Esse “primer” também tem sido utilizado por Didier et al. (1995), Malcekova et al. (2010), Rossi et al. (1998) e Weiss (2000).

Para o controle positivo, uma alíquota concentrada com esporos de cultivo celular de *E. cuniculi* foi doada pela pesquisadora Dra. Maria Anete Lallo (Universidade Paulista, São Paulo, SP). O DNA foi extraído de 4mL da suspensão de *E. cuniculi* mantido em meio EAGLE. O volume inicial foi transferido para tubo falcon

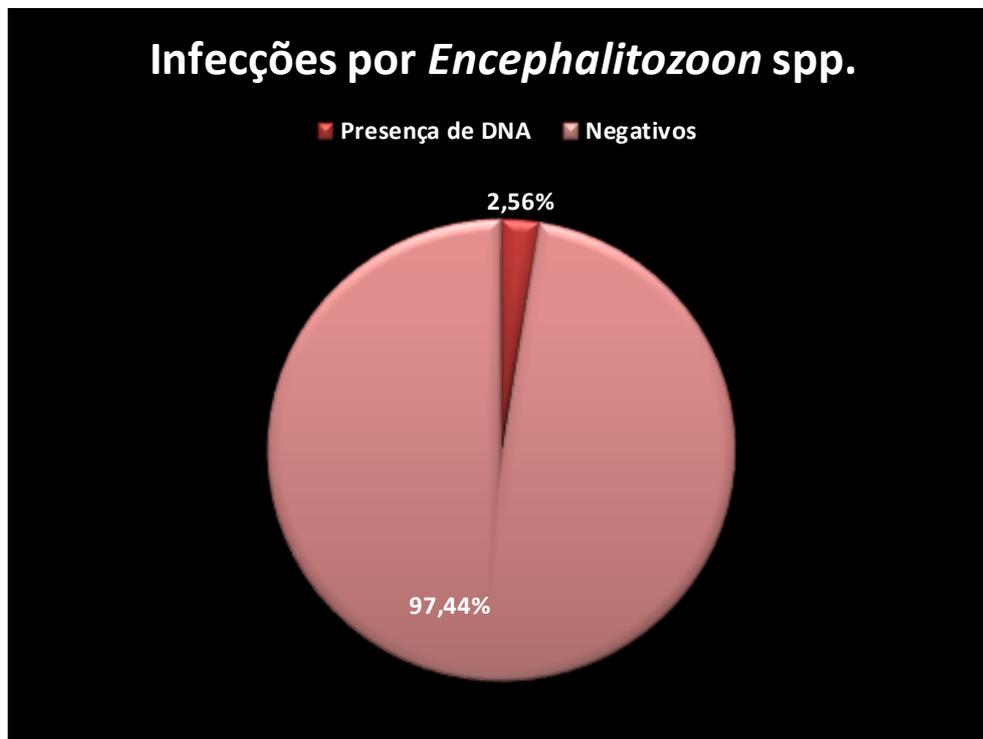
de 15mL e centrifugado a 4°C (Figura 2A). Subsequentemente, o DNA foi extraído com kit comercial “Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit®”. As concentrações dos reagentes e condições para o termociclador seguiram o protocolo de Rossi et al. (1998). Foi realizada corrida em gel de ágar a 1,5% com marcador de 100 “bp”. Verificou-se amplificação de 1000 “bp”, correspondentes ao controle positivo (Figura 2B).

**A****B**

**FIGURA 2 - A:** *Pellet* de células infectadas com *E. cuniculi* após centrifugação. Posteriormente, o sobrenadante foi removido e o DNA do *pellet* foi extraído com kit comercial. **B:** “M” (marcador de 100pb), “A” (controle negativo - água ultrapura), “B” (controle positivo (*E. cuniculi*), que amplificou 1000 “pb”).

#### 4 RESULTADOS

Um total de 11 amostras (2,56%) (Figura 3) apresentaram a presença do DNA do parasito. As amostras foram consideradas positivas quando se observou a amplificação de uma banda de aproximadamente 1000 pares de base (1kb).



**FIGURA 3** - Gráfico mostrando porcentagem de coelhos infectados por *Encephalitozoon* spp. em cidades do interior do estado de São Paulo.

## 5 DISCUSSÃO

O objetivo desta pesquisa foi investigar a ocorrência do esporo do *Encephalitozoon* spp. em coelhos de granjas de cunicultura e residências no interior do estado de São Paulo, pois existem poucos trabalhos na literatura que descrevem a ocorrência do parasito nesta região do Brasil e nenhum com coelhos, os principais hospedeiros do *Encephalitozoon cuniculi*.

Nenhuma amostra colhida dos coelhos domésticos foi positiva para *E. cuniculi*. Apesar das condições aparentemente ideais nas granjas de cunicultura, ocorreu positividade em 11 animais, que podem ser explicadas pela transmissão do patógeno por meio da ingestão de água contaminada com os esporos (MATHIS et al., 2005) ou até mesmo o contato indireto por meio dos tratadores, que podem ser reservatórios da doença, mesmo apresentando uma infecção latente ou até mesmo transmitindo os esporos mecanicamente, devido a falta de cuidados com a higiene durante o manejo dos animais (CARHAN et al., 2015).

O número de animais positivos (2,56%) neste estudo é menor do que o observado em um trabalho realizado na Polônia, no qual o DNA do microsporídio foi detectado pela PCR em 26.21% dos 103 coelhos examinados (ZIĘTEK et al., 2014). Entretanto, em outro trabalho realizado na Itália, Zanet et al. (2013) encontraram infecção por *E. cuniculi* em 9,72% de 144 coelhos selvagens, por meio da PCR. Essa variação de ocorrência pode estar ligada ao tipo de seleção de amostras. Em grupos de animais que vivem próximos uns dos outros, a porcentagem de infecções tende a subir. Além de que as amostras de são de materiais variados, incluindo fezes e urina, por exemplo. Poucos trabalhos extraem DNA diretamente das fezes, pois essas possuem muitas substâncias que inibem a PCR (FEDORKO; NELSON, 1995).

Este trabalho representa a primeira pesquisa sobre a presença de *Encephalitozoon* spp. em granjas de cunicultura e residências do Estado de São Paulo, Brasil. Os resultados obtidos mostram uma baixa ocorrência do patógeno nos

locais avaliados. Isto pode estar relacionado ao tipo de criação e ao tipo de manejo desses animais nas granjas onde foram obtidas as amostras estudadas. Nas granjas que participaram deste estudo, todos os coelhos eram mantidos em gaiolas individuais com boas condições de higiene e nas residências, todos os animais eram criados com acesso restrito ao ambiente externo da casa, mas sem acesso a rua e sem companhia de outro animal.

A investigação por sorologia costuma apresentar maior porcentagem de positividade que os da técnica de PCR, variando em média de 30% a 65%, na Itália (DIPINETO et al., 2008; SANTANIELLO et al., 2009), Japão (FUKUI et al., 2012), República Checa (JEKLOVA et al., 2010) e Egito (ABU-AKKADA et al., 2015). Entretanto, a sorologia não pode nos fornecer a informação exata sobre a quantidade de coelhos infectados de fato, pois esta mostra apenas que os coelhos tiveram algum tipo de contato com o parasito em um momento de sua vida e desenvolveram anticorpos contra esse microrganismo, podendo desenvolver uma infecção ativa ou latente (DIPINETO et al., 2008). Portanto, a PCR se mostrou um método eficaz para a verificação da presença de animais infectados em granjas de criação comercial.

É necessário considerar que nos coelhos com encefalitozoonose crônica, a excreção de esporos na urina e fezes é intermitente e isto pode levar a uma baixa estimativa da real ocorrência do patógeno (DIPINETO et al., 2008 *apud* EWRINGMANN; GÖBEL, 1999; MAESTRINI et al., 2016). Esta intermitência da eliminação dos esporos pode ter contribuído para uma menor detecção de animais positivos. Para melhor investigar a prevalência da infecção por meio da PCR, seria necessário realizar mais de uma colheita de fezes de cada animal avaliado no estudo.

Outra PCR para *E. intestinalis* e *E. hellem*, espécies menos comumente encontradas infectando coelhos, poderia ter sido feita com as amostras positivas para confirmar se as bandas correspondem a uma possível co-infecção ou uma infecção primária.

O sequenciamento genético para obter os dados sobre a espécie e genótipos encontrados não foi realizado, pois o DNA extraído apresentou uma quantificação inferior ao solicitado necessário para o procedimento de sequenciamento.

A porcentagem de DNA detectado nas amostras estudadas pode indicar uma baixa ocorrência da infecção nesses animais nas granjas parceiras. Provavelmente, resultado das boas práticas no manejo dos coelhos. Entretanto, devido ao fato de ocorrer a presença deste agente etiológico nos coelhos amostrados neste estudo, sugere-se que as pessoas que trabalham na criação de coelhos devem ser alertadas sobre os riscos da infecção, para que evitem contato direto com a urina e fezes, sempre cuidando da higiene pessoal após a manipulação dos mesmos. Os médicos veterinários devem estar preparados para reconhecer os sinais clínicos da doença em coelhos de estimação, possibilitando um diagnóstico preciso e também para alertarem os proprietários de coelhos sobre os riscos desta zoonose.

## **6 CONCLUSÕES**

Os objetivos deste trabalho foram atingidos com sucesso e o ineditismo deste, abre espaço para diversas outras pesquisas com o parasito. Esta é a primeira descrição de *Encephalitozoon* spp. em coelhos no estado de São Paulo.

O resultado encontrado é de suma importância para os criatórios de coelhos, tendo em vista que o diagnóstico é crucial para a vigilância da doença, evitando prejuízos econômicos e aumentando as práticas profiláticas.

## 7 REFERÊNCIAS

ABU-AKKADA, S.S.; ASHMAWY, K.I.; DWEIR, A.W. First detection of an ignored parasite, *Encephalitozoon cuniculi*, in different animal hosts in Egypt. **Parasitology**, v. 114, n. 3, p. 843-50, 2015.

BALDOTTO, S. B.; CRAY, C.; GIANNICO, A. T.; REIFUR, L.; FERREIRA, F. M. Seroprevalence of *Encephalitozoon cuniculi* infection in pet rabbits in Brazil. **J. Exot. Pet Med.**, v. 24, n. 4, p. 435–440, 2015.

BOHNE, W.; BÖTTCHER, K.; GROß, U. The parasitophorous vacuole of *Encephalitozoon cuniculi*: Biogenesis and characteristics of the host cell–pathogen interface. **Intern. J. Med. Microbiol.**, v. 301, n. 5, p. 395–399, 2011.

BRASIL, P.; DE LIMA, D. B.; DE PAIVA, D. D.; LOBO, M. S. C.; SODRÉ, F. C.; DA SILVA, S. P.; DA SILVA, S. D.; VILLELA, E. V.; DA SILVA, E. J.; PERALTA, J. M.; MORGADO, M.; MOURA, H. Clinical and diagnostic aspects of intestinal microsporidiosis in HIV-infected patients with chronic diarrhea in Rio de Janeiro, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 42, n. 6, p. 299-304, 2000.

CANNING, E. U. *Encephalitozoon lacertae* n. sp., a microsporidian parasite of the lizard *Podracis muralis*. **Parasitol. Top. Soc. Protozoologists Spec.**, v. 1, p. 57-64, 1981.

CARHAN, A.; OZKAN, O.; OZKAYA, E. The first identification of *Encephalitozoon cuniculi* infection in an animal care worker in Turkey. **Iran J. Parasitol.**, v. 10, n. 2, p. 280-285, 2015.

COX, J. C.; PYE, D.; EDMONDS, J. W.; SHEPHERD, R. An investigation of *Encephalitozoon cuniculi* in the wild rabbit *Oryctolagus cuniculus* in Victoria, Australia. **J. Hyg. (Lond.)**, v. 84, n. 2, p. 295–300, 1980.

DIDIER, E. S.; VOSSBRINCK, C. R.; BAKER, M. D.; ROGERS, L. B.; BERTUCCI, D. C.; SHADDUCK, J. A. Identification and characterization of three *Encephalitozoon cuniculi* strains. **Parasitology**, v. 111, p. 411–421, 1995.

DIDIER, E. S.; VISVESVARA, G. S.; BAKER, M. D.; ROGERS, L. B.; BERTUCCI, D. C.; DE GROOTE, M. A.; VOSSBRINCK, C. R. A microsporidian isolated from AIDS patients corresponds to *Encephalitozoon cuniculi* III, originally isolates from domestic dogs. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, n. 11, p. 2835-2837, 1996.

DIPINETO, L.; RINALDI, L.; SANTANIELLO, A.; SENSALÉ, M.; CUOMO, A.; CALABRIA, M.; MENNA, L. F.; FIORETTI, A. Serological survey for antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in pet rabbits in Italy. **Zoon. Public Health**, v. 55, n. 3, p.173-175, 2008.

EFSTRATIADIS, G.; DIVANI, M.; KATSIOULIS, E.; VERGOULAS, G. Renal fibrosis. **Hippokratia**, v 13, p. 224–229, 2009.

FEDORKO, D. P.; NELSON, N. A.; CARTWRIGHT, C. P. Identification of microsporidia in stool specimens by using PCR and restriction endonucleases. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, p. 1739–1741, 1995.

FRANZEN, C.; MÜLLER, A. Molecular techniques for detection species differentiation and phylogenetic analysis of microsporidia. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 12, p. 243–285, 1999.

FUKUI, D.; BANDO, G.; FURUYA, K.; YAMAGUCHI, M.; NAKAOKA, Y.; KOSUGE, M.; MURATA, K. Surveillance for an outbreak of *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbits housed at a zoo and biosecurity countermeasures. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 31, n. 75, p.55-61, 2012.

GALVÁN-DÍAZ, A. L.; MAGNET, A.; FENOY, S.; HENRIQUES-GIL, N.; HARO, M.; GORDO, F.P.; MILLÁN J.; MIRÓ, G.; DEL ÁGUILA, C.; IZQUIERDO, F. Microsporidia detection and genotyping study of human pathogenic *E. bieneusi* in animals from Spain. **Plos One**, v.9, n.3, e92289, 2014.

GHOSH, K.; WEISS, L. M. Molecular diagnostic tests for microsporidia. **Interdisc. Perspec. Infect. Dis.**, v. 2009, p.1-13, 2009. article ID 926521.

HARCOURT-BROWN, F. M. *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbits. **Semin. Avian Exotic Pet Med.**, v. 13, n.2, p. 86-93, 2004.

HINNEY, B.; SAK, B.; JOACHIM, A.; KVÁČ, M. More than a rabbit's tale - *Encephalitozoon* spp. in wild mammals and birds. **Intern. J. Parasitol.: Parasites Wildl.**, v. 5, p. 76–87, 2016.

HEKER, M. M.; NAKAMURA, A. A.; SANTANA, B. N.; MEIRELES, M. V. Etiological aspects of *Eimeria* spp. infection in brazilian rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) farms. **Vet. Parasitol.: Reg. Studies Rep.**, v. 8, p. 78–81, 2017.

JEKLOVA, E.; JEKL, V.; KOVARCIK, K.; HAUPTMAN, K.; KOUDELA, B.; NEUMAYEROVA, H.; KNOTEK, Z.; FALDYNA, M. Usefulness of detection of specific IgM and IgG antibodies for diagnosis of clinical encephalitozoonosis in pet rabbits. **Vet. Parasitol.**, v. 170, n. 1-2, p. 143-148, 2010.

JORDAN, C. N.; ZAJAC, A. M.; LINDSAY, D. S. *Encephalitozoon cuniculi* Infection in Rabbits. **Compendium**, p.108-116, 2006.

KATINKA, M. D.; DUPRAT, S.; CORNILLOT, E.; MÉTÉNIER, G.; THOMARAT, F.; PRENSIER, G.; BARBE, V.; PEYRETAILLADE, E.; BROTTIER, P.; WINCKER, P.; DELBAC, F.; EL ALAOUI, H.; PEYRET, P.; SAURIN, W.; GOUY, M.; WEISSENBACH, J.; VIVARÈS, C. P. Sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. **Nature**, v.414, n.6862, p.450-453, 2001.

KOUDELA, B.; DIDIER, E. S.; ROGERS, L. B.; DAVID MODRÝ, D.; KUČEROVÁ, S. Intestinal microsporidiosis in African skink *Mabuya perrotetii*. **Folia Parasitol.**, v. 45, p. 149-155, 1998.

KÜNZEL, F.; JOACHIM, A. Clinical symptoms and diagnosis of encephalitozoonosis in pet rabbits. **Vet. Parasitol.**, v. 106, n. 2, p. 299-309, 2010.

KUNSTYR, I.; NAUMANN, S. Head tilt in rabbits caused by pasteurellosis and encephalitozoonosis. **Lab. Anim.**, v. 19, n. 3, p. 208-213, 1985.

KVÁČ, M.; TOMANOVÁ, V.; SAMKOVÁ, E.; KOUBOVÁ, J.; KOTKOVÁ, M.; HLÁSKOVÁ, L.; MCEVOY, J.; SAK, B. *Encephalitozoon cuniculi* in raw cow's milk remains infectious after pasteurization. **Foodborne Pathog. Dis.**, v. 13, n. 2, p. 77-79, 2016.

LALLO, M. A.; CALÁBRIA, P.; MILANELO, L. *Encephalitozoon* and *Enterocytozoon* (microsporidia) spores in stool from pigeons and exotic birds: microsporidia spores in birds. **Vet. Parasitol.**, v. 190, n. 3-4, p. 418-422, 2012.

LALLO, M. A.; DA COSTA, L. F. V.; SARAIVA, A. M.; ROCHA, P. R. D.; MORENA, D. D. S.; KONNO, F. T. C.; SUFFREDINI, I. B. Culture and propagation of microsporidia of veterinary interest. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 78, n. 2, p. 171–176, 2016.

MAESTRINI, G.; RICCI, E.; CANTILE, C.; MANELLA, R.; MANCIANTI, F.; PACI, G.; D'ASCENZI, C.; PERRUCCI, S. *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits: serological screening and histopathological findings. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 50, n. 2017, p.54-57, 2016.

MCLAUCHLIN, J.; PEDRAZA-DÍAZ, S.; AMAR-HOETZENEDER, C.; NICHOLS, G. L. Genetic characterization of cryptosporidium strains from 218 patients with diarrhea diagnosed as having sporadic cryptosporidiosis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, n. 10, p.3153-3158, 1999.

MALCEKOVA, B.; VALENCAKOVA, A.; LUPTAKOVA, L.; MOLNAR, L.; RAVASZOVA, P.; NOVOTNY, F. First detection and genotyping of *Encephalitozoon cuniculi* in a new host species, gyrfalcon (*Falco rusticolus*). **Parasitol. Res.**, v. 108, n. 2011, p.1479–1482, 2010.

MATHIS, A.; WEBER, R.; DEPLAZES, P. Zoonotic potential of the microsporidia. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 18, n. 3, p. 423-445, 2005.

MATHIS, A.; MICHEL, M.; KUSTER, H.; MÜLLER, C.; WEBER, R.; DEPLAZES, P. Two *Encephalitozoon cuniculi* strains of human origin are infectious to rabbits. **Parasitology**, v. 14, n. pt.1, p. 29-35, 1997.

MOURA, H.; OSPINA, M.; WOOLFITT, A. R.; BARR, J. R.; VISVESVARA, G. S. Analysis of four human microsporidian isolates by MALDI-TOF mass spectrometry. **J. Eukaryo. Microbiol.**, v. 50, n. 3, p.156-163, 2003.

MUÑANA, K. R.; LUTTGEN, P. J. Prognostic factors for dogs with granulomatous meningoencephalomyelitis: 42 cases (1982-1996). **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 212, n.12, p. 1902-1906, 1998.

NAKAMURA, A. A.; HOMEI, C. G.; GARCIA, S. D.; MEIRELES, M. V. Ceratoconjuntivite por *Encephalitozoon hellem* em periquitos agapornis (*Agapornis* spp.) no Brasil: relato de caso. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 62, n. 4, p. 816-820, 2010.

NOTERMANS, D. W.; PEEK, R.; DE JONG, M. D.; WENTINK-BONNEMA, E. M.; BOOM, R.; VAN GOOL, T. *Encephalitozoon* species in stool and urine specimens by PCR and differential hybridization. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, n. 2, p. 610–614, 2005.

OLIVEIRA, M. D. C.; NETO, M. C.; SANTOS, O. F. P. Insuficiência renal aguda: nefrite túbulo-intersticial aguda. **J. Bras. Nefrol.**, v. 22, n. 4, p. 260-276, 2000.

ROSSI, P.; LA ROSA, G.; LUDOVISI, A.; TAMBURRINI, A.; MORALES M. A. G.; POZIO, E. Identification of a human isolate of *Encephalitozoon cuniculi* type I from Italy. **Inter J Parasitol.**, v. 28, n. 9, p.1361-1366, 1998.

SANTANIELLO, A.; DIPINETO, L.; RINALDI, L.; MENNA, L. F.; CRINGOLI, G.; FIORETTI, A. Serological survey of *Encephalitozoon cuniculi* in farm rabbits in Italy. **Res. Vet. Sci.**, v.87, n.1, p.67-69, 2009.

SAVIOTTI, M.; TAMBA, M.; GALLAZZI, D.; LAVAZZA, A. Further data on the diffusion of *Encephalitozoon cuniculi* in Italian rabbitries. **J World Rabbit Sci Assoc.**, v. 8, n.1, p 355-362, 2000.

SHIBASAKI, K.; TOKIWA, T.; SUKEGAWA, A.; KONDO, H.; TAMUKAI, K.; HAGA, Y.; IKE, K. First report of fatal disseminated microsporidiosis in two inland bearded dragons *Pogona vitticeps* in Japan. **JMM. Case Rep.**, v. 4, p. 1–5, 2017.

SORDI, V. F.; ROSA, C. O.; MARTINS, V. N. A cunicultura na estratégia de diversificação em propriedades rurais. **Rev. Eletro. Fac. de Ciên. Exatas Terra**, v. 3, n. 5, p.11-20, 2014.

TEE, K. Y.; KAO, J. P.; CHIU, H. Y.; CHANG, M. H.; WANG, J. H.; TUNG, K. C.; CHENG, F. P.; WU, J. T. Serological survey for antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits in Taiwan. **Vet. Parasitol.**, v. 183, n. 1-2, p. 68-71, 2011.

TOVAR, R. L. E.; VELAZQUEZ, U. C.; MENDOZA, A. Y. A.; GARZA, A. M. N.; RAMOS, J. J. C.; VIDAL, G. H.; RAMÍREZ, H G. R.; CHAVEZ, A. T. Interferon g and interleukin 10 responses in immunocompetent and immunosuppressed New Zealand white rabbits naturally infected with *Encephalitozoon cuniculi*. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 62, p. 82-88, 2016.

VALENCAKOVA, A.; HALANOVA, M. Immune response to *Encephalitozoon* infection review. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 35, n. 1, p. 1-7, 2012.

VOSSBRINCK, C. R.; BAKER, M. D.; DIDIER, E. S.; DEBRUNNER-VOSSBRINCK, B. A.; SHADDUCK, J. A. Ribosomal DNA sequences of *Encephalitozoon hellem* and *Encephalitozoon cuniculi*: species identification and phylogenetic construction. **J. Eukaryo. Microbiol.**, v.40, n.3, 354–362, 1993.

ZANET, S.; PALESE, V.; TRISCIUOGLIO, A.; CANTÓN, A. C.; FERROGLIO, E. *Encephalitozoon cuniculi*, *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infection in

invasive Eastern Cottontail Rabbits *Sylvilagus floridanus* in Northwestern Italy. **Vet. Parasitol.**, v.8, n. 197, p. 682-684, 2013.

ZIĘTEK, J.; ADASZEK, Ł.; DZIĘGIEL, B.; KALINOWSKI, M.; BARTNICKI, M. KALINOWSKA, A.; JAROSZ, Ł.; WINIARCZYK, S. Diagnosis of the *Encephalitozoon cuniculi* infections in pet rabbits with neurological symptoms. **Polish. J. Vet. Sci.**, v. 17, n. 2, p. 361–363, 2014.

WEBER R.; BRYAN, R. T.; SCHWARTZ, D. A.; OWEN, R. L. Human microsporidial infections. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 7, n.4, p. 426-461, 1994.

WEISS, L. M. Molecular phylogeny and diagnostic approaches to microsporidia. **Contrib. Microbiol.**, v.6, p. 209-35, 2000.

WRIGHT, J. H.; CRAIGHEAD, E. M. Infectious motor paralysis in young rabbits. **J. Exp. Med.**, v. 36, n. 1, p. 135–140, 1922.