

Encefalitozoonosi nel coniglio: cosa è cambiato negli anni nel difficile processo di diagnosi

Di Giuseppe M., DVM, PhD, GPCert (ExAP), Centro Veterinario per Animali Esotici, Palermo
marcodigiuseppe@yahoo.com

SUMMARY

Encephalitozoon in rabbits: what's new in diagnosis process

Encephalitozoon cuniculi (E. cuniculi) is a parasite that can infect a variety of animals, including immune-compromised humans. Rabbits are prone to encephalitozoonosis but the subclinical course and high serum prevalence make it difficult to diagnose with certainty in live animals. Different approaches have been used to detect the presence of an active infection in symptomatic rabbits: antibody titers, positive immunoglobulin M (IgM) and immunoglobulin G (IgG) serum for E. cuniculi, electrophoresis and C-reactive protein, isolation of the parasite by PCR in urine, cerebrospinal fluid analysis.

KEY WORDS

Encephalitozoon cuniculi, rabbit, electrophoresis, IgM, IgG

INTRODUZIONE

Encephalitozoon cuniculi (E. cuniculi) è un parassita intracellulare obbligato, appartenente alla famiglia dei microsporidia, che può infettare diverse specie animali, compreso persone immuno-compromesse.(11)

Al giorno d'oggi sono stati isolati tre diversi sierotipi di Encephalitozoon cuniculi.(6) Il sierotipo 1 è stato associato al coniglio, il sierotipo 2 ai roditori ed il 3 ai cani. Le differenze tra i vari sierotipi risiedono nel DNA ma ancora non è chiaro se questi siano specie-specifici o se possano adattarsi a ospiti diversi. Nell'uomo sono stati isolati il sierotipo 3 in Europa e il sierotipo 1 in USA.(17)

I conigli rappresentano l'ospite definitivo del parassita e generalmente si infettano in seguito all'ingestione o all'inalazione di spore contenute nelle urine di conigli infetti. Le spore sono caratterizzate da un filamento polare che permette di trasferire il contenuto all'interno della cellula ospite. La moltiplicazione avviene per sporogonia all'interno dei vacuoli delle cellule fino a determinarne la lisi. In seguito, attraverso i macrofagi circolanti nel circolo sistemico, le spore colonizzano altre cellule in tutto l'organismo.

È stata segnalata anche la trasmissione verticale in seguito all'isolamento del DNA di E. cuniculi nelle placente e nei feti di fattrici sieropositive.(1)

Questa via di trasmissione è responsabile della localizzazione del parassita a livello della lente a seguito di un'infezione precoce; si ipotizza infatti che il parassita possa localizzarsi quando ancora è ben sviluppata la tunica vascolare lentis. Infatti in questi soggetti il parassita è stato riscontrato esclusivamente a livello della lente.(8)

In condizioni sperimentali è stato dimostrato anche il contagio per via endovenosa, intra-peritoneale, trans-congiuntivale, intra-tracheale e intra-cerebrale.(11)

Da un punto di vista clinico è bene tenere conto di un eventuale contagio qualora si proceda con una trasfusione

di sangue. Il contagio trans-congiuntivale è verosimile che possa avvenire anche in condizioni naturali poiché il coniglio maschio tende a urinare su oggetti e suoi simili per marcare il territorio.

L'infezione acuta pertanto coinvolge i polmoni, l'intestino e la placenta che sono i primi tessuti ad essere colpiti; in una seconda fase cronica, attraverso il sistema reticolo-endoteliale, avviene un'infezione sistemica che coinvolge principalmente il sistema nervoso centrale ed il rene.

Sebbene la malattia sia dovuta all'infiammazione legata alla



Fig. 1. Torcicollo (Head tilt) in un coniglio con sindrome vestibolare.



Fig. 2. Dermatite perineale in un coniglio affetto da incontinenza. L'urina imbratta il pelo ed irrita la cute sottostante con conseguente perdita parziale del pelo ed irritazione e macerazione cutanea.

presenza del parassita non è ancora chiaro se quest'ultimo sia presente quando i primi sintomi appaiono. La lisi cellulare causata dal parassita è associata ad un'infiammazione cronica ed in base alle capacità di risposta del sistema immunitario dell'ospite i soggetti infetti possono sviluppare un'infezione sub-clinica a seguito di un equilibrio precario tra ospite e parassita.(7)

Nonostante il decorso della malattia sia cronico la comparsa dei sintomi (in particolare quelli neurologici) può essere in alcuni soggetti acuta a seguito di un evento stressante.

Le lesioni tipiche associate a questa malattia sono: una meningoencefalite granulomatosa, una nefrite interstiziale cronica granulomatosa ed un'uveite fococlastica.(13)

In alcuni casi è possibile rilevare delle calcificazioni della corticale dei reni anche mediante esame radiografico o ecografico.

In uno studio svolto dall'Università di Vienna (Austria) su 191 conigli d'affezione con sospetto di encefalitozoonosi i soggetti sieropositivi mostravano principalmente sintomi neurologici ed in particolare sindromi vestibolari, Nefropatie ed uveiti fococlastiche invece erano presenti in percentuale notevolmente ridotta(14). La stessa incidenza si è ottenuta in altri studi svolti in paesi diversi.

In caso di sintomi ascrivibili ad una sindrome vestibolare in base al grado di severità del torcicollo (head tilt) (Fig. 1) si possono osservare anche rotolamento (rolling), perdita dell'equilibrio e movimenti di maneggio. Altri comuni sintomi neurologici rilevabili sono: atassia, nistagmo, tremori e crisi epilettiche.

In caso di sintomi riferibili a infezione renale è possibile rilevare perdita di peso, poliuria e polidipsia e dermatite perineale a seguito di imbrattamento (Fig. 2).(7)

In caso di infezione oculare invece sarà comune la presenza di un'uveite fococlastica (Fig. 3).

DIAGRAMMA DI FLUSSO PER UNA CORRETTA DIAGNOSI

La diagnosi di certezza di Encefalitozoonosi in vivo è difficile poiché i sintomi sono aspecifici e riferibili anche ad altre malattie.

Altre malattie infettive che andrebbero prese in considerazione nella lista delle possibili diagnosi differenziali sono la Toxoplasmosi e l'encefalite da Herpes simplex qualora ci sia stato uno stretto contatto tra il coniglio e persone con Herpes labialis.(7)

In corso di sindrome vestibolare, uno studio radiografico del cranio che metta in evidenza le bolle timpaniche permette di escludere un'otite media, spesso causata in questa specie da Pasteurella multocida.

La tomografia assiale computerizzata e la risonanza magnetica permettono di rilevare la presenza di possibili masse intra-craniche che possono essere all'origine di alcuni sintomi neurologici.

Inoltre bisogna tenere conto che intossicazioni sistemiche da Fipronil o altri tossici, traumi, colpi di calore, patologie degenerative e nutrizionali come la lipidosi epatica possono determinare sintomi neurologici sovrapponibili. Saranno necessari pertanto un esame ematobiochimico completo ed un'accurata visita clinica con altrettanto accurata anamnesi ove possibile.

L'uveite fococlastica, qualora sia causata da Encephalitozoon cuniculi, viene diagnosticata principalmente in conigli giovani, diversamente da quanto avviene in altri animali, qualora non ci sia una causa traumatica.

In corso di patologie renali sarà necessario escludere infezioni tanto ascendenti come discendenti di altra natura, la presenza di uroliti o più semplicemente di renella; reperto quest'ultimo piuttosto frequente in questa specie.

Il decorso sub-clinico e l'elevata sieropositività nei conigli d'affezione rende difficile se non impossibile una diagnosi di certezza in vita.

In soggetti con sospetto clinico di encefalitozoonosi si è dimostrato inoltre che titoli di IgG elevati rilevati mediante ELISA (IgG >1:1024) sono associati ad un aumento statisticamente significativo delle γ -globuline e ad una conseguente diminuzione del rapporto Albumina/Globulina.(2)

Bisogna ricordare però che i titoli anticorpali indicano esclusivamente un'esposizione al patogeno e la risposta all'esposizione e pertanto non sono in grado di rilevare un'infezione.

Un coniglio può essere esposto a Encephalitozoon cuniculi e prontamente mettere in atto una risposta immunitaria tale da prevenire l'infezione. Questo soggetto risulterebbe sieropositivo sebbene non abbia mai sviluppato un'infezione. D'altro canto un coniglio potrebbe essere stato infettato ma in seguito a una immunodepressione non mettere in atto una risposta immunitaria efficace tale da incrementare il titolo anticorpale.(16) Questo soggetto potrebbe persino risultare sieronegativo se il titolo anticorpale non è sufficientemente alto per essere rilevato dalla sensibilità del test.

Oltretutto in tutti gli studi si sono evidenziati una forte sieropositività ed un andamento fluttuante delle IgG per anni, persino in assenza di sintomi clinici.(12)

In generale una sieronegatività rappresenta ad oggi il risultato sierologico più attendibile da un punto di vista clinico, soprattutto se rimane tale a lungo termine, poiché ci permette di escludere Encephalitozoon cuniculi come agente causale dei sintomi osservati in un coniglio.(9)

Sulla base di questa criticità un test simultaneo sia per le IgM che per le IgG è stato proposto per indicare lo stato dell'infezione del paziente, permettendo un'interpretazione sierologica qualitativa piuttosto che quantitativa. La presenza



Fig. 3. Uveite fococlastica in un coniglio.

di IgM può indirizzarci verso una possibile infezione acuta mentre la presenza di IgG verso un' infezione cronica. La presenza simultanea di entrambe le immunoglobuline suggerisce invece sia un'infezione acuta che una possibile reinfezione o riattivazione di una infezione cronica.(12)

Tuttavia anche un'analisi qualitativa della sierologia non ci permette da sola di affermare con certezza lo stato di infezione ma solo l'avvenuto contatto con il patogeno e se questo sia stato recente o meno a seconda della presenza o meno delle IgM.

Un'ulteriore limite della sierologia è dovuto all'immunità passiva sino a 4 settimane osservata in conigli provenienti da fattrici sieropositive. A questa sieropositività dovuta all'immunità materna fa seguito una sieronegatività fino alle 8-10 settimane prima che si verifichi nuovamente una sieroconversione.(15) Pertanto risulta poco utile testare conigli di età inferiore a 10 settimane qualora la madre risulti sieropositiva.

Oltretutto, qualora sia presente una trasmissione verticale, è teoricamente possibile che il parassita sia riconosciuto come "self" dal feto se il contagio avviene prima della formazione del sistema immunitario fetale.

In uno studio successivo si è cercato di mettere in relazione

la valutazione sierologica qualitativa con l'elettroforesi ed in particolare con le gammaglobuline in conigli che presentavano sintomi sovrapponibili a encefalitozoonosi. Si è dimostrato infatti che i conigli sieropositivi tanto per le IgM che per le IgG presentavano valori percentuali di gammaglobuline significativamente maggiori rispetto ai conigli positivi solo per IgG e quest'ultimi presentavano a loro volta valori percentuali di gammaglobuline significativamente maggiori rispetto ai conigli sieronegativi(5).

In questo studio sono stati presi in analisi i valori percentuali delle gammaglobuline piuttosto che i valori assoluti come fatto in precedenza in altri studi, evitando di non sottostimare i soggetti con ipoproteinemia.

Parallelamente all'elettroforesi si sono studiate anche le proteine della fase acuta ed in particolare la Proteina C-reattiva. Il valore di quest'ultima infatti aumenta in maniera significativa nei soggetti con sintomi clinici ascrivibili a una encefalitozoonosi(3). Inoltre sembrerebbe aumentare la specificità dei test sierologici quando sono presenti titoli anticorpali elevati sia per le IgM e/o per le IgG.(4)

Escludendo la sierologia, un ulteriore supporto al sospetto clinico di encefalitozoonosi può essere dato dall'analisi del liquido cefalorachidiano; in uno studio eseguito in conigli con sindrome vestibolare la cui origine si sospettava essere dovuta a Encefalitozoonosi, il liquido cefalorachidiano ha mostrato una pleocitosi linfomonocitaria.(10) Bisogna tenere conto però che questa alterazione si può verificare anche in corso di altre patologie e la procedura non è priva di rischi. Un'ulteriore possibilità consiste nella ricerca delle spore eliminate con le urine. La positività alla PCR permette infatti di asserire la presenza di Encephalitozoon cuniculi nell'ospite. Malgrado l'alta sensibilità della PCR, l'eliminazione delle spore nelle urine è sporadica e anche un'eventuale positività indica solo che il coniglio rappresenta una fonte di infezione ma non necessariamente che sia malato.

CONCLUSIONE

In conclusione, qualora si sospetti una encefalitozoonosi in un coniglio in seguito alle informazioni estrapolate da un'accurata anamnesi e dai rilievi clinici che si possono ottenere dalla visita, andrebbero sempre richieste insieme alla sierologia anche l'elettroforesi e, se possibile, la proteina C-reattiva. Questi ultimi due esami, infatti, ci permettono di comprendere meglio il risultato della sierologia stessa, l'andamento clinico della malattia e la risposta dell'ospite al patogeno. Inoltre possono essere un utile sussidio quando ci troviamo di fronte a valori sierologici borderline che possono rappresentare tanto falsi positivi come falsi negativi. La sierologia da sola infatti non riesce a supportare un sospetto clinico ma richiede un'analisi oggettiva che evidenzi un'inflammatione e se possibile la tipizzi così da contestualizzare il risultato sierologico stesso con la sintomatologia clinica.

BIBLIOGRAPHY

1. Banaeux P.J., Pognan F.: In utero transmission of Encephalitozoon cuniculi stain tipe 1 in rabbits. *Laboratory Animals*, 2003, 37, 132-138.
2. Cray C., Arcia G, Schneider R., Kelleher S. A., Arheart K. L.: Evaluation of the usefulness of an ELISA and protein electrophoresis in the diagnosis of Encephalitozoon cuniculi infection in rabbits. *American Journal Veterinary Research*, 2009, 70, 478-482.
3. Cray C., Rodriguez M., Fernandez Y.: Acute phase protein levels in rabbits with suspected Encephalitozoon cuniculi infection. *Journal of Exotic pet Medicine*, 2013, 22, 280-286.
4. Cray C., McKenny S., Perritt E., Arheart K. L.: Utility of IgM titers with IgG and C-reactive protein quantitation in the diagnosis of suspected Encephalitozoon cuniculi infection in rabbits. *Journal of Exotic pet Medicine*, 2015, 24, 356-360.
5. Di Giuseppe M., Romano P, Gelli D., Scopitteri T., Congiu F.: Correlation between γ -globulins and Encephalitozoon cuniculi immunoglobulins in suspected infected rabbits.

- Comparative Clinical Pathology. 2016, 25, 1237-1239.
6. Didier E.S., Vossobrink C.R., Baker M.D., Rogers L.D., Bertucci D.C., Shaddock J.A.: Identification and characterization of three *Encephalitozoon cuniculi* stains. *Parasitology*, 1995, 111, 411-421.
 7. Fisher P.G., Carpenter J.W.: Neurological and Musculoskeletal diseases. In: *Ferrets, Rabbits and Rodents Clinical Medicine and Surgery* 3th ed., Elsevier Saunders, St. Louise Missouri (USA), 2012, 245-256.
 8. Giordano C., Weigt A., Vercelli A., Rondena M., Grilli G., Giudice C.: Immunohistochemical identification of *Encephalitozoon cuniculi* in phacoclastic uveitis in four rabbits. *Veterinary Ophthalmology*, 2005, 8, 271-275.
 9. Harcourt-Brown F.: *Encephalitozoon cuniculi* in Rabbits: The Mystery Disease. Proceedings of the Association of Avian Veterinarians, Australasian Committee and Unusual and Exotic Pet Conference. 2010, 253-261.
 10. Jass A., Matiassek k., Henke J., Küchenhoff H., Hartmann K., Fisher A.: Analysis of cerebrospinal fluid in healthy rabbits and rabbits with clinically suspected encephalitozoonosis. *Veterinary Records*, 2008, 162(10), 618-622.
 11. Jeklova E., Leval L., Kovarcik K., Matiasovic J., Kummer J., Maskova J., Skoric M. and Faldynia M.: Experimental oral and ocular *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbits. *Parasitology*, 2010a, 137, 1749-1757.
 12. Jeklova E., Jekl V., Kovarcik K., Hauptman K., Koudela B., Neumayearova H., Knotek Z., Faldynia M.: Usefulness of detection of specific IgM and IgG antibodies for diagnosis of clinical encephalitozoonosis in pet rabbits. *Veterinary parasitology*, 2010b, 170, 143-148.
 13. Künzel F., Gruber A., Tichy A., Edelhofer R., Nell, B., Hassan, J., Leschnik M., Thalhammer J.G. Joachim A.: Clinical symptoms and diagnosis of encephalitozoonosis in pet rabbits. *Veterinary Parasitology*, 2008, 151(2 - 4), 115-124.
 14. Künzel F., Joachim A.: Encephalitozoonosis in rabbits. *Parasitology Research*, 2010, 106, 299-309.
 15. Lyngset A.: A survey of serum antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in breeding rabbits and their youngs. *Laboratory Animal Science*, 1980, 30(3), 558-561.
 16. Rosenthal K. J.: Emerging / Controversial Diseases in Rabbits. Proceedings of the North American Veterinary Conference. 2007, 1670-1671.
 17. Valencakova A, Balent P, Petrovova E., Novotny F, Luptakova L.: Encephalitozoonosis in household pet Netherland Dwarf rabbits. *Veterinary Parasitology*, 2008, 153, 265-269.