

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI  
FEDERICO II



TESI DI DOTTORATO DI RICERCA

IN

BIOLOGIA, PATOLOGIA E IGIENE AMBIENTALE IN  
MEDICINA VETERINARIA

xxiv CICLO – 2008-2011

INDAGINE SIEROLOGICA E MOLECOLARE DI  
*ENCEPHALITOOZON CUNICULI* IN CONIGLI PET

TUTOR  
CHIAR.MA PROF.SSA FRANCESCA  
MENNA

DOTTORANDO  
DOTT. DARIO D'OIDIO

COORDINATORE  
CHIAR.MO PROF. GIUSEPPE PAINO

## INDICE

INTRODUZIONE	3
ENCEPHALITOOZON CUNICULI	5
Eziologia	5
Epidemiologia e spettro d'ospite	9
Trasmissione e ciclo vitale	10
Patogenesi e patofisiologia	15
Sintomatologia	20
Principali sintomi nel coniglio	20
Immunità	24
Diagnosi differenziali	26
Encefalitozoonosi nell' uomo	32
Encefalitozoonosi in altre specie animali	36
Diagnosi	37
Terapia e controllo	43
SCOPO DELLA RICERCA	49
MATERIALI E METODI	51
Campionamento	51

Tecniche Sierologiche (Elisa, CIA test, QPE)	53
Tecniche molecolari (PCR convenzionale e nested)	56
RISULTATI	60
DISCUSSIONE E CONSIDERAZIONI FINALI	64
BIBLIOGRAFIA	69
RINGRAZIAMENTI	88

### INTRODUZIONE

I primi casi di Encephalitozoonosi riportati in conigli da laboratorio affetti da paralisi risalgono al 1922 (Wright e Craighead, 1922). Da allora sono state condotte numerose ricerche sulla diffusione di tale patologia tra i conigli da laboratorio, nei conigli impiegati per uso zootecnico e, per ovvi motivi di salute pubblica, anche nell'uomo. Negli ultimi anni, la notevole diffusione del coniglio come animale da compagnia ha sollevato la necessità di indagare l'Encephalitozoonosi anche tra i Pet Rabbit, imponendo l'esigenza di acquisire sempre maggiori conoscenze non solo riguardo alla diagnosi, ma anche in merito alla prognosi ed alla eventuale terapia del singolo soggetto. Negli animali da laboratorio tale malattia ha costituito un problema per le sue indesiderate interferenze con la ricerca scientifica (Sadduck e Pakes 1971), per cui tali animali vengono routinariamente testati per la ricerca di anticorpi contro *E. cuniculi* prima di essere impiegati nelle procedure di laboratorio. Per quanto l'Encephalitozoonosi rappresenti una zoonosi, nell'uomo, la gran parte dei casi riportati riguarda soggetti affetti da AIDS in cui *E.cuniculi* si comporta come un patogeno opportunisto. In ambito medico veterinario, *E.cuniculi* rappresenta una comune causa di malattie neurologiche,

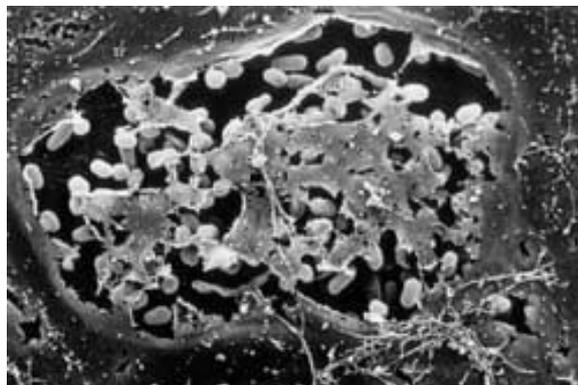
respiratorie, oculari e renali nel coniglio da compagnia. Tuttavia la difficoltà del raggiungimento di una diagnosi definitiva, *in vivo*, unitamente con l'attuale impossibilità ad intraprendere un trattamento universalmente riconosciuto efficace, continua a rendere l'Encephalitozoonosi oggetto di numerosi studi.

## ENCEPHALITOOZON CUNICULI

### EZIOLOGIA

*Encephalitozoon cuniculi* è un parassita sporigeno endocellulare obbligato degli animali omeoterme appartenente alla famiglia dei microsporidi (Wasson and Peper, 2000).

Tale microsporidio è capace di infettare un ampio range di animali, soprattutto uccelli e mammiferi tra cui roditori, lagomorfi, equini, ovini, caprini, suini, diversi carnivori domestici e selvatici, primati e l'uomo in cui è conosciuto quale patogeno opportunistico in individui immunocompromessi.



**Figura 1** – *Encephalitozoon cuniculi* al microscopio elettronico a scansione.

Fonte: P. Keeling, B. Koudela and *Nature*.

Il coniglio rappresenta tuttavia l'ospite principale e l'infezione da esso provocata si manifesta con un andamento generalmente subacuto.

*E. cuniculi* è stato da tempo identificato come un è uno delle nove specie di microsporidi isolate in pazienti umani affetti da sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS), (Wasson and Peper, 2000).

Successivamente alla prima segnalazione nel coniglio da laboratorio nel 1922, ed alla sua denominazione di *E. cuniculi* nel 1923 sono state descritte più di 1300 specie appartenenti a 143 generi, identificate come responsabili di infezioni, con sintomatologia varia, in ospiti vertebrati ed invertebrati.

Con il genere *Encephalitozoon* sono note altre due specie, che come l' *E. cuniculi*, infettano i mammiferi, *E. hellem* ed *E. intestinalis* (Wasson and Peper, 2000) (Mathis 2005).

Per quanto i microsporidi siano organismi eucarioti, essi mostrano alcune caratteristiche atipiche quali la mancanza di mitocondri (Kunzel F e Joachim A, 2010). Tuttavia sono stati identificati alcuni enzimi con funzioni mitocondriali (Katinka et al. 2001). Inoltre lo stesso apparato del Golgi è atipico (Mètenièr e Vivares 2001) e l' RNA ribosomiale assomiglia a quello dei procarioti piuttosto che a quello degli eucarioti. Sulla base di analisi

molecolari e biochimiche, i microsporidi presentano una maggiore correlazione con i miceti piuttosto che con i protozoi (Mètenièr and Vivares 2001). Essi sono organismi inusuali per diversi aspetti. Durante la fase ambientale, formano spore unicellulari che infettano le cellule attraverso un unico apparato di invasione, comprendente un filamento polare che rilascia gli sporoplasmi nella nuova cellula ospite in seguito ad attivazione (Franzen 2004). Dopo una moltiplicazione asessuata (merogonia) le spore si sviluppano nella cellula ospite (sporogonia) e nel caso dell'*Encephalitozoon* in un vacuolo parassitovoro che separa il parassita dal citoplasma della cellula ospite, formato principalmente da lipidi derivati dalla cellula ospite (Franzen 2004; Ronnebaumer et al. 2008). Il rilascio delle spore nell'ambiente avviene in seguito alla distruzione della cellula ospite. Tali spore, hanno dimensioni variabili 1-10  $\mu\text{m}$  in base alla specie e sono formate da un filamento polare avvolto a spirale attorno allo sporoblasto, avvolto nella membrana plasmatica e contenente il nucleo, il vacuolo posteriore ed i ribosomi. Tali strutture sono racchiuse in una endo ed eso spora, allo scopo di incrementarne la resistenza ambientale (Franzen 2004). Un'altra caratteristica peculiare dei microsporidi è il loro piccolissimo genoma, che nel caso dell' *E. cuniculi*, comprende 2.9 Mbp (Katinka et al. 2001). Le ridotte dimensioni del loro

genoma sono dovute allo stretto alloggiamento delle informazioni genetiche all'interno dei cromosomi (dovuta ad una virtuale assenza di introni, ad un basso numero di sequenze ripetitive ed a molti geni a singola copia), ad un accorciamento dei geni e delle sequenze non-codificanti ed ad una perdita di informazioni genetiche riguardanti alcuni processi metabolici che sembrano irrilevanti per lo stile di vita parassitario del microsporidio ((Katinka et al. 2001).

### EPIDEMIOLOGIA E SPETTRO D'OSPITE

Il coniglio rappresenta l'ospite principale con una sieroprevalenza più alta negli animali da compagnia (37-68%) (Kunzel F. e Joachim A. 2010; Harcourt-Brown e Holloway 2003; Ebrecht e Muller 2004) rispetto alle popolazioni selvatiche, probabilmente a causa della minore densità di popolazione (Wilson 1979; Cox e Ross 1980; Chalupsky et al. 1990). Grazie ad una buona igiene ed ad una valutazione attenta dello stato di salute dei soggetti impiegati, tale patologia viene attualmente controllata nei laboratori di ricerca (Mathis et al. 2005; Kunzel et al. 2008).

Sino ad ora sono stati isolati 3 differenti ceppi di *Encephalitozoon spp.*, di cui il ceppo I infetterebbe prevalentemente il coniglio, il ceppo II, il ratto ed il ceppo III, il cane. (Didier et al. 1995a/b). Il coniglio seppur potenzialmente suscettibile a tutti e tre i ceppi, sembra sia colpito, nel corso di infezioni naturali, solo dal ceppo I (Mathis 2000; Mathis et al. 2005).

Nell'uomo invece, dal 1994 ad oggi, sarebbero stati isolati sia il ceppo I che il ceppo III, esclusivamente in pazienti HIV-sieropositivi (Mathis et al. 2005). Per tale ragione il microsporidio *Encephalitozoon cuniculi* rappresenterebbe un patogeno opportunista raro.

### TRASMISSIONE E CICLO VITALE

Nel coniglio l'infezione si trasmetterebbe, per via orizzontale diretta od indiretta (Harcourt-Brown 2004; Mathis 2005), mediante l'eliminazione intermittente di spore, di dimensioni comprese tra 1.5-2.5 micron, espulse con le urine (Wasson e Pepper 2000). Le spore sono di forma ovale e vacuolate nella loro vita matura, con la presenza di un filamento polare, mentre solo in fase proliferativa manifestano più di un nucleo. Una volta ingerite da un soggetto sano, le spore del parassita, attraverso il proprio apparato di invasione, colonizzerebbero dapprima le cellule della mucosa intestinale ed in seguito attraverso il circolo ematico, andrebbero a localizzarsi in diversi siti, tra cui reni, fegato, polmoni e cuore, essendo reni ed encefalo le sedi di predilezione (Cox et al. 1979).

È possibile anche che l'infezione avvenga per inalazione o attraverso la placenta nel periodo di gestazione, sebbene ciò accada molto raramente. (Cox et al., 1979). Per quanto la trasmissione verticale sia stata dimostrata da Baneus e Pognan (2003), pare che tale via di infezione abbia un ruolo fondamentale esclusivamente nella localizzazione del parassita a livello

intraoculare e nella successiva determinazione di sintomi oculari (Kunzel F e Joachim A 2010; Wolfer et al. 1993). A tal proposito sarebbe stato ipotizzato che le spore raggiungerebbero la camera anteriore dell'occhio solo durante la vita intrauterina (Wolfer et al. 1993). Infatti mentre nell'individuo adulto il cristallino è costituito da un compartimento segregato dalle strutture contigue e le sue cellule epiteliali sono completamente avvolte da una capsula spessa, durante la gestazione invece è ancora presente una capsula sottile e ricca di supporto vascolare (*tunica vasculosa lentis*) (Ashton et al., 1976, Wilson 1979). Dunque solo tramite un'infezione precoce, sarebbe ipotizzabile il passaggio di spore in tale compartimento.

In studi sperimentali è stato possibile causare lo sviluppo di infezioni intravenose, intraperitoneali, intracerebrali ed intrarettali (Cox et al. 1979; Shaddock et al. 1979; Wicher et al. 1991; Horvát et al. 1998). Le spore vengono successivamente eliminate per via urinaria per diverse settimane (Cox e Gallichio 1978; Kunzel F e Joachim A 2010).

Una volta infettato un nuovo coniglio il parassita viene trasportato dal sangue agli organi bersaglio (reni e sistema nervoso centrale). Durante la fase infettiva del ciclo vitale, servendosi del filamento polare, le spore iniettano lo sporoplasma all'interno delle cellule dove si moltiplicheranno, secondo due

ulteriori fasi distinte, causando la crescita incontrollata dell'ospite e la sua rottura, e conseguente infiammazione dell'organo colpito, che rilascerà nuovamente altre spore in grado di infettare cellule vicine e di giungere ad altri organi.

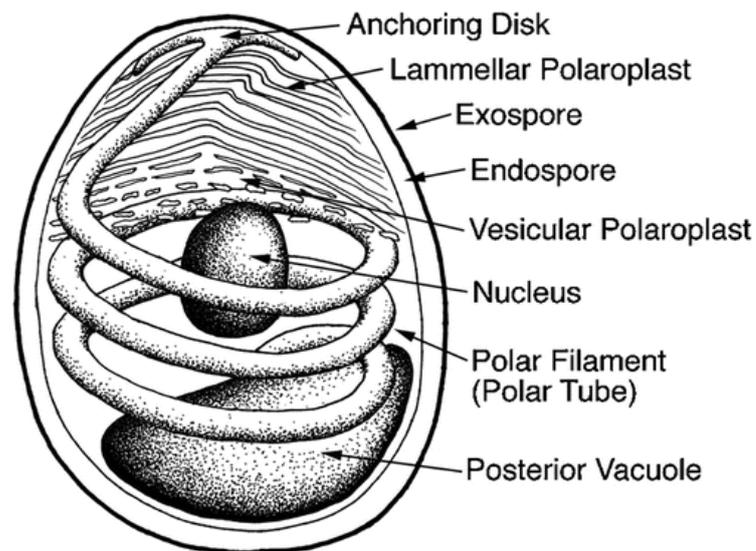
Il ciclo vitale dura dalle tre alle cinque settimane:

- fase infettiva: la spora è composta da una spessa parete che la rende particolarmente resistente (alcuni tipi possono resistere fino a 10 anni in acqua distillata), data da una membrana proteica, eso-spora, elettrone-densa, uno strato chitinoso elettrone-lucente, da un'endo-spora ed una membrana plasmatica. La parete della spora racchiude il contenuto uni- o bi- nucleato di questa, detto sporoplasma, un apparato di estrusione (filamento polare) ancorato alla membrana plasmatica, un complesso sistema di membrane chiamato polaroplasto lamellare, che circonda la sezione lineare del tubulo polare, uno scarso reticolo endoplasmatico e dei ribosomi liberi. Quando appropriatamente attivato da stimoli provenienti dall'ospite, quali

fluidi intestinali, il tubulo fuoriesce ed è capace di penetrare le cellule ospiti per inoculare il sarcoplasma nel citoplasma cellulare (Cali ed Owen, 1990; Ishihara and Hyashi, 1968; Pleshinger and Weidner, 1985). La sua posizione all'interno di questo, dipenderà dalla direzione di penetrazione e dalla lunghezza del tubulo polare;

- fase merogonica (o schizogonia): è la fase proliferativa iniziata dallo sporoplasma iniettato. I merozoiti sono cellule strutturalmente semplici con piccole differenziazioni del citoplasma, delimitate da membrana. Esse si moltiplicano ripetutamente per scissione multipla e binaria. La cariocinesi può avvenire ripetutamente prima della citochinesi, producendo così forme plasmodiali multinucleate (*E. bienersi*), o cellule multinucleate a forma di nastro (Cali and Owen, 1990; Cali et al., 1993);
- fase sporogonica: tale fase inizia quando i merozoiti si trasformano in sporozoiti morfologicamente caratterizzati dalla comparsa di una superficie amorfa densa che riveste la cellula. Gli sporozoiti crescono e si moltiplicano secondo scissione binaria o multipla per formare

sporoplasti che maturano in spore dopo aver sviluppato vari organelli citoplasmatici e aver ispessito la parete.



**Figura 2** – Struttura della spora di un microsporidio

Fonte: [annualreviews.org](http://annualreviews.org)

## PATOGENESI E PATOFISIOLOGIA

---

### PATOGENESI E PATOFISIOLOGIA

*E. cuniculi*, quale parassita intracellulare, si caratterizza per la sua capacità di infettare diversi tessuti dell'ospite, determinando lesioni tipicamente riscontrabili a carico di sistema nervoso centrale, reni ed occhio (Canning et al., 1996).

Il decorso della malattia da *E. cuniculi* è solitamente cronico ed occorrono settimane o mesi prima che tale parassitosi possa aggravarsi ed eventualmente manifestarsi con sintomi clinici evidenti. Tuttavia non esistono caratteristiche cliniche costanti. L'eventuale comparsa della sintomatologia può avvenire, in maniera improvvisa, in seguito al verificarsi di eventi stressogeni che, inducendo immunodepressione, favoriscono la comparsa della malattia in soggetti apparentemente in buona salute. Uno studio recente ha dimostrato una sieroprevalenza del 50%, in conigli, esposti al parassita, ma del tutto asintomatici (Keeble and Shaw, 2006). Si tratta, infatti, di una patologia subdola in cui un soggetto infetto si comporta da "carrier" clinicamente sano, ma potenzialmente in grado di trasmettere

l'infezione ad altri soggetti. Vari fattori influiscono sullo stabilirsi dell'infezione e lo sviluppo di segni clinici in caso di contagio. Tra essi vanno menzionati: specie e ceppo del parassita, via di infezione, età e stato immunitario (Weber et al., 1994). In particolare è stato riscontrato che in soggetti adulti ed immunocompetenti l'infezione non si scatena in maniera sintomatica e si instaura un equilibrio tra parassita e sistema immunitario dell'ospite. Al contrario il parassita tende a prevalere sulle difese immunitarie dell'ospite sia nei soggetti giovani non immunocompetenti in cui spesso determina forme acuto-iperacute e sovente fatali, sia nei soggetti adulti immuno-compromessi in cui invece si instaura una più classica forma subacuto-cronica. In questi ultimi, spesso sono fattori di stress successivi (Patologie concomitanti, stress ambientali, etc..) a determinare la rottura dell'equilibrio e la comparsa dei segni clinici. La malattia può avere dunque decorso sia acuto che cronico con segni clinici che possono variare da forme asintomatiche alla morte improvvisa (Harcourt–Brown and Holloway, 2003). I primi tessuti in cui compaiono alterazioni evidenti sono rappresentate da reni, fegato e polmoni. Dopo circa 3 mesi tali lesioni permangono nei reni, tendono a diminuire in fegato e polmoni e iniziano a diffondersi a livello

cerebrale. Anche il cuore può essere colpito, ma in misura minore (Cox et al. 1979). A livello istopatologico tali lesioni cerebrali variano da infiltrazioni perivascolari ad encefaliti/meningoencefaliti granulomatose non-suppurative focali o multifocali (Cox e Gallichio 1978; Wicher et al. 1991; Eroksuz et al. 1999; Csokai et al. 2009). Tali granulomi sono prevalentemente costituiti da linfociti, plasmacellule e cellule gliali ed hanno un centro necrotico (Eroksuz et al. 1999; Harcourt-Brown 2002). La maggioranza delle lesioni si localizza a livello cerebrale (corteccia e midollo), ma lesioni infiammatorie sono riscontrabili anche a livello del midollo spinale ed in misura minore nel cervelletto. Le leptomeningi sono quasi sempre colpite (Kunzel F e Joachim A 2010; Coskai et al. 2009). Occasionalmente possono essere osservate radicoliti spinali focali (Nast et al. 1996), che sarebbero responsabili dei sintomi neurologici atipici. Non esisterebbe necessariamente una correlazione tra la presenza delle lesioni ed il manifestarsi dei sintomi, in particolar modo per le forme neurologiche. Infatti in alcuni casi di soggetti affetti da forme nervose non è stato possibile evidenziare né le suddette lesioni, né tantomeno la presenza del parassita a livello di SNC. Viceversa

tali lesioni sono spesso state riscontrate in soggetti che non avevano precedentemente mostrato alcuna sintomatologia.

Le principali lesioni renali includono nefrite granulomatosa focale, primariamente con cellule mononucleate. Diversi sono i gradi documentati di nefrite cronica interstiziale con formazione di tessuto connettivo e fibrosi e granulomi multifocali (Flatt e Jackson 1970; Cox e Gallichio 1978; Eroksuz et al. 1999; Csokai et al. 2009). Le spore del parassita si moltiplicano nell'epitelio tubulare e vengono successivamente espulse per via urinaria. Man mano che l'infezione procede la presenza di tali spore diviene sempre meno frequente (Flatt e Jackson 1970; Csokai et al. 2009).

Quando si verifica un'infezione intrauterina (Trasmissione verticale) è frequente il riscontro di lesioni oculari quali uveite facoclastica, caratterizzata dall'infiltrazione di cellule infiammatorie (granulociti, macrofagi e cellule giganti) nel cristallino che ne comportano la successiva rottura. Anche l'iride ed i corpi ciliari sono infiltrati da linfociti e plasmacellule. A livello oculare i parassiti possono essere riscontrati solo a livello del cristallino (Giordano et al. 2005). Nel corso delle forme croniche, raramente vengono riscontrate lesioni in altri organi. Quando presenti, esse sono il frutto di reazioni

infiammatorie piuttosto che invasioni specifiche del parassita (Kunzel F e Joachim A 2010). L'osservazione del parassita nelle suddette lesioni in SNC, reni ed occhio, avviene in seguito a colorazione con Giemsa, Gram's , Goodpasture-carbol fucsina.

### SINTOMATOLOGIA

#### **Principali sintomi nel coniglio**

I sintomi clinici dell'Encephalitozoonosi sono riconducibili alle lesioni dirette od alle reazioni infiammatorie conseguenti alla localizzazione del parassita nei suoi organi bersaglio (SNC, reni ed occhio). Per tale ragione saranno riscontrati principalmente sintomi neurologici, nefrologici ed oftalmici, contemporanei o distanziati tra loro cronologicamente. L'insorgenza può essere improvvisa o conseguente ad un evento stressante (Kunzel F e Joachim A 2010). Il sintomo più frequentemente riscontrato è una sindrome vestibolare (Kunzel e Naumann 1985; Harcourt\_Brown e Holloway 2003; Jass et al. 2008). Oltre ad inclinazione della testa ed atassia possono riscontrarsi movimenti in circolo, nistagmo, movimenti rotazionali intorno all'asse lungo del corpo dell'animale. E' possibile, nei casi più gravi, l'instaurarsi di crisi convulsive, paresi/paralisi, tremori della testa ed oscillazioni anche in posizione di riposo, nonché occasionalmente, cambiamenti comportamentali quali aggressività, automutilazione, attacchi

contro la gabbia e corsa improvvisa. (Kunzel F e Joachim A 2010; Harcourt-Brown e Holloway 2003; Jordan et al. 2006). In genere, la presenza di tali sintomi non interferisce con l'assunzione degli alimenti. Tuttavia rotazioni estreme della testa rendono talora impossibile il mantenimento della stazione ed inducono, per tale ragione, un decubito forzato, determinando una prognosi riservata o spesso infausta. Tra i sintomi oculari, vengono annoverati l'uveite facoclastica, cataratta e presenza di masse bianche nell'occhio (Kunzel et al. 2008; Giordano et al. 2005) che solitamente non comportano perdita della vista (Fechel e Singler 2002). Tali sintomi possono essere unilaterali o più raramente bilaterali (Ashton et al 1976; Harcourt-Brown e Holloway 2003).

Un aspetto peculiare è rappresentato dal decorso dell'uveite, per il quale, a differenza di ciò che accade in altre specie di animali da compagnia (Wolfer et al. 1993), la rottura del cristallino si verifica senza un precedente evento traumatico. Dato che i sintomi oculari sono probabilmente effetto di una trasmissione verticale, essi sono più facilmente riscontrabili nei soggetti giovani (Grahm et al. 1991; Wolfer et al. 1993; Kunzel et al. 2008).

Per quanto concerne i sintomi renali, questi sono rappresentati da disidratazione, riduzione di peso, inappetenza e letargia (Harcourt-Brown e Holloway 2003). Spesso la patologia renale decorre in maniera subclinica, per cui l'alterazione dei parametri di laboratorio (Azotemia, etc.) è sovente solo un riscontro accidentale. L'insufficienza renale risulta un'evenienza meno comune ed è causata dall'estensione del danno renale. La sua cronicizzazione può portare ad anemia ed osteodistrofia, con conseguenti possibili fratture patologiche (Kunzel F e Joachim A 2010). Non è stata dimostrata alcuna correlazione certa tra la comparsa di Pu/Pd ed iperazotemia (Dipineto et al. 2008; Kunzel et al. 2008).

I principali sintomi sono raggruppati come segue:

- ✓ Segni oculari: uveite facoclastica, cataratta, masse bianche nell'occhio, ascessi iridali, fotofobia, ascessi intraoculari, ipopion.
- ✓ Segni neurologici: segni vestibolari dominanti (torcicollo, nistagmo, atassia), tremori, paresi, paralisi, convulsioni, cambiamenti comportamentali (Aggressività, attacchi alla gabbia, corsa improvvisa).

- ✓ Segni renali: letargia, depressione, anoressia, perdita di peso, disidratazione, incontinenza urinaria, ipomotilità gastrointestinale, IRC, anemia, osteodistrofia (fratture patologiche).
  
- ✓ Segni cardiaci ed epatici: miocarditi, vasculiti (non clinicamente apparenti) (Mathis et al., 2005).

## Immunità

In corso di Encephalitozoonosi la risposta immunitaria anticorpale persiste a lungo a causa della cronicizzazione della malattia (Kunzel F e Joachim A 2010). A distanza di 4-6 settimane dall'infezione compaiono in circolo gli anticorpi contro *E. cuniculi*, i quali raggiungono il loro picco a 6 settimane, periodo in cui si ha anche l'inizio dell'escrezione delle spore con le urine che si protrae per circa 3 mesi. Gli anticorpi compaiono nel siero 2 settimane prima che le spore siano evidenziabili nelle urine o nei tessuti (Sancak e Akyön, 2004). Tuttavia la risposta immunitaria umorale non risulta essere protettiva, a differenza di quella cellulo-mediata che appare determinante per il controllo del parassita e per la sopravvivenza dell'ospite (Kahn et al. 2001). In particolar modo i linfociti CD8+ sono fondamentali per la sopravvivenza dell'ospite, mentre i CD4+ non giocano un ruolo fondamentale (Khan e Moretto 1999; Khan et al. 2001). La prole di coniglie sieropositive presenta anticorpi fino a 4 settimane d'età: dopo tale periodo decrescono per poi aumentare nuovamente dalle 8 alle 10 settimane di età fino a raggiungere il picco a 14 settimane (Sancak e Akyön, 2004).

I conigli infettati naturalmente con *E. cuniculi* presentano una diminuita risposta di IgG ed una aumentata risposta di IgM ad infezioni sperimentali con altri organismi (Cox et al. 1978). Presentano inoltre un livello di catecolamine significativamente più bassi rispetto a conigli sani e questo sembra influire sulla risposta immunitaria.

### DIAGNOSI DIFFERENZIALI

Numerose sono le patologie da considerare nelle diagnosi differenziali dei principali sintomi causati dall'encephalitozoonosi. Per quanto concerne la sindrome vestibolare, la principale diagnosi differenziale da effettuare è sicuramente l'otite media/interna da *Pasteurella multocida*. In corso di pasteurellosi è frequente il riscontro di empiema delle bolle timpaniche, spesso bilaterale (Kunstyr e Naumann 1985), nonché la concomitanza con sintomi respiratori delle vie respiratorie alte (sinusiti, faringiti, etc.) e talora basse (polmoniti). Per quanto l'encephalitozoonosi causi una sindrome vestibolare centrale, rispetto a quella periferica indotta dalla Pasteurellosi, spesso tale differenziazione risulta impossibile, anche nei casi i cui la diagnosi radiografica di empiema delle bolle timpaniche venga effettuata. Infatti spesso tale reperto risulta accidentale in conigli affetti da forme subcliniche (Snyder et al. 1973).

Diverse malattie possono causare sintomi neurologici da differenziare rispetto a quelli riscontrabili in corso di encephalitozoonosi. Tra queste vanno menzionate le meningoencefaliti batteriche (Murray et al. 1985; Gruber et al. 2009), le rare forme virali che colpiscono il SNC, quali

herpesviroso simplex, Bornaviroso e Rabbia (Metzler et al. 1978; Weissenböck et al. 1997; Karp 1999; Grest et al. 2002; Kunzel F e Joachim A 2010) ed alcune malattie parassitarie, tra le quali le nematodiasi con *cerebral larva migrans* e la rara toxoplasmosi (Dubey et al. 1992; Furuoka et al. 2003). In particolare in corso di toxoplasmosi la presenza di sintomi quali febbre, letargia, inappetenza (Dubey et al. 1992) e l'assenza del riscontro sierologico, consentirebbero la differenziazione con encefalitozoonosi, oltre alla inconfutabile conferma istopatologica sulle lesioni granulomatose cerebrali, comunque presenti in entrambe le patologie (Dubey et al. 1992). Altre parassitosi quali la Baylisascariosi, frequente negli USA (Deeb e Carpenter 2004), nonché otiti esterne da *Psoroptes cuniculi* (Kunzstyr e Naumann 1985), possono infine essere considerate, ma facilmente differenziate da encefalitozoonosi. Occorre considerare tutte le patologie neoplastiche (linfomi che coinvolgono il SNC) (Gruber et al. 2009) traumatiche (cadute, urti, traumi ottusi a livello di testa e rachide), tossiche (intossicazioni da metalli pesanti, piante ornamentali, etc.), cardiovascolari e degenerative del SNC (Gruber et al. 2009) che possano determinare danni al SNC con conseguenti sintomatologie neurologiche centrali o periferiche.

La più importante diagnosi differenziale da considerare in corso di sintomatologia renale rispetto all'encefalitozoonosi è sicuramente la nefrolitiasi (Kunzel F e Joachim A 2010). Tale condizione risulta facilmente identificabile attraverso indagini radiografiche ed ecografiche, nonché attraverso analisi di laboratorio urinarie (Harcourt-Brown 2002).

In conclusione per quanto riguarda le lesioni oculari quali uveite, cataratta e presenza di masse anomale, in corso di encefalitozoonosi, occorre differenziarle da forme di Pasteurellosi caratterizzate da diffusione ematogena del batterio (Williams 1999) e cheratiti, traumatiche e/o da corpi estranei penetranti che abbiano causato uveiti secondarie (Harcourt-Brown 2002).

Schema delle diagnosi/test differenziali dell'Encefalitozoonosi cunicola:

- DD dei Sintomi neurologici CENTRALI ( Rotazione della testa, rotolamento, atassia, nistagmo, convulsioni, etc.. ):
  - ✓ Otite interna (Batterica)
  - ✓ Rottura del timpano
  - ✓ Pasteurellosi (Sindrome vestibolare periferica)
  - ✓ Toxoplasmosi

- ✓ Parassitosi da *Babyscaris procyonis* (*Larva migrans cerebri*)
- ✓ Rabbia
- ✓ Neoplasie SNC
- ✓ Patologie vascolari SNC
- ✓ Ascessi SNC
- ✓ Traumi SNC
- ✓ Herpes simplex
- ✓ Intossicazioni
- ✓ Encefalopatia epatica
- ✓ Epilessia idiopatica
- ✓ MEV

Test diagnostici differenziali (Ematologia, Sierologia, Tossicologia, Rx, Tac, RM, del cranio, otoscopia)

- DD dei Sintomi neurologici PERIFERICI ( Paresi/Paralisi di uno o più arti):
  - ✓ Traumi del rachide
  - ✓ Patologie degenerative discali

- ✓ Dermatiti/Ulcerazioni plantari

- ✓ Splay Leg

Test diagnostici differenziali (Citologia, Rx, Tac, RM, del rachide/arti, ect..)

- DD dei Sintomi di Debolezza generalizzata (Floppy Rabbit Syndrome):

- ✓ Intossicazioni

- ✓ Ipokaliemia

- ✓ Cardiopatie

- ✓ Splay Leg

- ✓ Miodistrofia

Test diagnostici differenziali (Ematologia, Sierologia, Elletrocardiografia, Rx, Tac, RM, del cranio, otoscopia)

- DD dei Sintomi OCULARI (Uveite, Cataratta, Masse corneali):

- ✓ Traumi ottusi dell'occhio

- ✓ Pasteurellosi (Uveite settica/ascenso irideo)

- ✓ Neoplasie oculari

Test diagnostici differenziali (Ematologia, Sierologia, Rx, Tac, RM del cranio, oftalmoscopia)

- DD dei Sintomi RENALI ( IRC, Pu/Pd, Incontinenza urinaria, etc.):

- ✓ Nefro-urolitiasi
- ✓ Infezioni urinarie
- ✓ Traumi del rachide posteriore

Test diagnostici differenziali (Esami urinari, Batteriologia, Ematologia, Sierologia, Rx, Tac, RM, Ecografia addominale, cistoscopia)

### ENCEFALITOOZONOSI NELL' UOMO

Il primo caso umano confermato di encephalitozoonosi è stato segnalato in Giappone (Matsubayashi et al., 1959) in ragazzo di nove anni che presentava febbre, vomito, emicrania, convulsioni e stati di incoscienza prima del suo recupero avvenuto dopo circa 24 giorni. Corpuscoli simili ad *Encephalitozoon spp.* sono stati rilevati nel liquido cerebrospinale e nell'urina del ragazzo.

In seguito, in India sono stati isolati organismi Encephalitozoon-like dalla cornea di un giovane individuo (Khanna and Iyer, 1971) che presentava affezioni oculari. Poiché il ragazzo aveva riportato lesioni oculari causati dal contatto con una capra sei anni prima, si pensò che si potesse trattare di *Nosema helminthorum*, un parassita della capra isolato anche delle tenie delle pecore. Siccome *E. cuniculi* è stato segnalato nelle capre, probabilmente il parassita implicato era *E. cuniculi*.

Durante lo stesso anno *Encephalitozoon spp.* è stato segnalato in un neonato immunodepresso, con grave diarrea, vomito incoercibile, irritabilità e letargia. In questo paziente sono stati trovati durante l'esame anatomico-patologico organismi nelle pareti muscolari delle arterie, nella vescica urinaria, nel rene,

nel fegato, nelle ghiandole surrenali, nel cuore, nel diaframma e nel tratto gastroenterico. La microscopia elettronica ha dimostrato undici spirali del filamento polare che, tuttavia contrastavano con le cinque spirali presenti in *E. cuniculi*.

Connor ed altri hanno menzionato il primo caso umano verificatosi di Encefalitozoonosi confermato dall'autopsia, come pure un secondo caso in Sudafrica che non era probabilmente dovuto ad un microsporide nonché un caso non documentato in Gran-Bretagna nel 1964 (Atías, 1995).

Tali studi hanno concluso che la sopravvivenza di un paziente in condizioni di immunodepressione favorisce una maggiore frequenza di infezione opportunistica di *Encephalitozoon spp.*

In uno studio, da sei pazienti umani affetti da AIDS ed in nove conigli sono state isolate e coltivate diverse spore da campioni di urina, di secrezioni respiratorie e di feci. Poiché le spore di *Encephalitozoon* di specie simili sono indistinguibili al microscopio, i campioni isolati sono stati sottoposti ad indagini molecolari. I risultati hanno consentito l'identificazione di *Septata intestinalis* in un paziente ed *Encephalitozoon hellem* in due pazienti sintomatici.

*Encephalitozoon cuniculi* è stato trovato in tutti i conigli ed in tre pazienti. Uno di questi pazienti ha manifestato una sintomatologia clinica dell'infezione (polmonite interstiziale grave). Il trattamento con albendazolo ha consentito la riduzione dei sintomi e la fine dell'escrezione del parassita. I risultati suggeriscono che *E. cuniculi* può essere patogeno in esseri umani e che quindi è un parassita zoonotico (Deplazes et al., 1996).

In un successivo studio, invece, isolati di *E. cuniculi* di origine animale sono stati confrontati con altri 6 isolati ottenuti da pazienti infetti da HIV. Sulla base dei risultati del Western blot, di RAPD e dell' ITS, gli isolati sono stati classificati in 3 gruppi tramite un sicuro marker genetico. Cinque isolati dai pazienti umani sono risultati omologhi agli isolati provenienti dai conigli (tipo I). Il sesto isolato da un paziente messicano differiva dagli altri e potrebbe essere attribuito al tipo III di *E. cuniculi*, isolato precedentemente in 2 cani negli USA. Tutti questi isolati differivano da quelli isolati dalle volpi blu della Norvegia (tipo II). I risultati forniscono un'ulteriore prova che la trasmissione orale del parassita fra i vari ospiti è possibile (Mathis et al., 1997).

In Italia, ha ricevuto particolare interesse uno studio, condotto da Rossi et al. (1998), sull'identificazione di *E. cuniculi* tipo I isolato da un paziente affetto da

AIDS. Infine, è stato condotto nella Slovacchia occidentale uno screening sierologico per la ricerca di anticorpi anti-*E. cuniculi* sia nell'uomo che negli animali che ha mostrato una sieropositività in 26 su 456 sieri umani esaminati (5.7%). Di questi, il 37.5% era rappresentato da pazienti immunodepressi. Negli animali analizzati, invece, la maggiore positività è stata osservata nei conigli (41.7%) e nei cani (37.8%). Tale studio ha evidenziato la potenzialità di conigli e cani di fungere da serbatoi dell'infezione da *E. cuniculi*, suggerendo l'importanza di monitorarla con screening sierologici, per controllare la diffusione di questa malattia (Halánová et al., 2003).

### ENCEFALITOOZONOSI IN ALTRE SPECIE ANIMALI

*E. cuniculi* è stato segnalato come causa di malattia in diverse specie di mammiferi: topi, cavie, criceti, cani, pecore, maiali, volpi blu, primati non umani, volatili. Nonostante l'infezione colpisca tali diverse specie, come precedentemente riportato, sono solo tre i ceppi geneticamente distinti di *E. cuniculi*: il tipo I che è causa di malattia nel coniglio, il tipo II nei roditori e il tipo III nel cane.

Nelle cavie lo sviluppo della malattia determina principalmente lesioni renali, ma, ad oggi non sono stati riportati casi di lesioni cerebrali. La sieroprevalenza è elevata (50%) con un maggior rischio di infezione nei casi di promiscuità tra cavie e conigli.

Infezioni sperimentali nel cane (Szabo e Shaddock 1987) riportano la comparsa di nefrite granulomatosa, meningoencefalite, epatite e polmonite; in generale nei carnivori la malattia appare essere sporadica, iperacuta e mortale nei neonati.

Un caso di encefalitozoonosi è stato segnalato in un pappagallo (Poonacha e Stamper 1985).

### DIAGNOSI

Allo stato attuale la diagnosi, *in vivo*, di Encephalitozoonosi è possibile solo attraverso la realizzazione combinata di diverse procedure, dal momento che nessun test, da solo, consente di confermare con certezza l'infezione. L'esame di gran lunga più utilizzato è rappresentato dal test anticorpale. Attraverso tecniche CIA, IFAT ed Elisa è possibile valutare il titolo anticorpale e valutarne la correlazione con la presenza dei sintomi clinici e la positività ad altri test diagnostici di riferimento (Boot et al. 2000; Jordan et al. 2006). Solitamente l'assenza di anticorpi anti *Encephalitozoon cuniculi*, permette di escludere l'infezione, anche in presenza di sintomi indicativi ed indica la possibilità di indagare altre malattie, quali la Pasteurellosi, in corso di sindrome vestibolare (Kunstyr e Naumann 1985). Tuttavia in corso di gravi forme di immunosoppressione o nei primissimi stadi della malattia è possibile riscontrare la presenza delle spore nei tessuti o nei liquidi organici (Lyngset 1980; Muller 1998; Csokai et al. 2009b). Viceversa la positività al test anticorpale può essere variamente interpretata. Diversi studi hanno evidenziato un aumento marcato del titolo anticorpale in animali clinicamente sani (Harcourt-Brown 2004; Kunzel et al. 2008; Csokai et al.

2009b), o addirittura la presenza di spore all'esame istopatologico, in soggetti che non avevano sviluppato alcun sintomo di encefalitozoonosi (Csokai et al. 2009b). L'infezione può infatti svilupparsi lentamente ed in assenza di segni clinici evidenti nella maggioranza dei casi (Kunzel F e Joachim A 2010; Csokai et al. 2009b). Inoltre, anche se i test anticorpali vengono ampiamente utilizzati, sembrerebbe che la sierconversione indichi solo un precedente contatto con il parassita o una infezione cronica, mentre non confermerebbe la responsabilità del parassita nel determinare i sintomi clinici, a causa dell'elevato numero di infezioni subcliniche. Da un punto di vista cronologico è stato accertato che la comparsa degli anticorpi avviene dopo circa 3 settimane dall'infezione, in soggetti con infezione indotta (Cox et al. 1979). La sierconversione può essere dimostrata 2 settimane prima che il parassita venga identificato a livello intracellulare e 4 settimane prima che si instaurino le lesioni renali visibili all'esame istopatologico o che le spore possano essere evidenziate nelle urine (Kunzel F e Joachim A 2010). Le lesioni cerebrali compaiono solitamente dopo circa 8 settimane dalla sierconversione (Cox e Gallichio 1978). Il titolo anticorpale si mantiene alto per mesi dopo l'infezione, successivamente decresce e può rimanere

fluttuante per anni (Waller et al. 1978; Kunzel F e Joachim A 2010). Non è stata tuttora dimostrata una correlazione con l'aumento del titolo e l'escrezione delle spore (Kunzel F e Joachim A 2010). L'immunità anticorpale è presente nei conigli neonati fino a 4 settimane di vita, grazie al trasferimento passivo degli anticorpi da madri sieropositive ai propri piccoli (Kunzel F e Joachim A 2010). Successivamente dopo un periodo sieronegativo, si può verificare una sieroconversione in risposta ad un'infezione attiva all'età di 8-10 settimane (Lyngset 1980).

La presenza di spore nei tessuti è indicativa di infezione, ma poiché non è sempre associata allo sviluppo di lesioni istologicamente evidenziabili non sempre si accompagna allo sviluppo dei sintomi clinici (Shaddock et al. 1979).

La presenza di lesioni istopatologiche quali nefriti e/o encefaliti granulomatose, spesso non suppurative, è molto indicativa di encephalitozoonosi e si accompagna sempre a sintomi clinici evidenti. Le spore sono sempre prima presenti a livello renale, a partire da circa 4 settimane dopo la sieroconversione e da lì diffondono a livello nervoso centrale dopo circa 8 settimane dalla sieroconversione (Cox e Gallichio 1978). A causa delle loro ridottissime dimensioni, le spore sono difficilmente

evidenziabili attraverso i metodi di colorazione più utilizzati (ematossilina-eosina, etc.). Altre tecniche più specifiche quali Ziehl-Neelsen ed Acid-fast trichrome, immunofluorescenza e chemofluorescenza risultano più sensibili (Weber et al. 1999). Attualmente la Microscopia elettronica è considerato il “gold standard” (Didier et al. 1995 a, b) per la identificazione del parassita. Tuttavia essa risulta laboriosa e non consente di differenziare tra *E.cuniculi* ed *E. hellem* (Didier et al. 1995). La presenza delle spore può essere utilizzata come metodo di screening analizzando urine e liquido cerebrospinale (LCS), attraverso visualizzazione diretta od attraverso estrazione del DNA, tramite PCR. Secondo la cronologia, precedentemente indicata, è possibile ritrovare le spore da 3 a 5 settimane dopo la sierconversione, nelle urine (Cox e Gallichio 1978; Scharmann et al. 1986) e dopo 8 settimane nel LCS. Poiché l’escrezione non è costante, ma intermittente, l’assenza di spore non consente di escludere l’infezione (Cox et al. 1979; Csokai et al. 2009a). Non è stata dimostrata un’escrezione regolare di spore attraverso le feci, anche se questa è stata valutata come possibile (Kunzel F e Joachim A 2010; Harcourt-Brown e Holloway 2003). Uno studio recente ha indicato l’analisi del liquido cerebrospinale (LCS) come possibile test diagnostico di Encephalitozoonosi

(Jass et al. 2008). In particolar modo è stato valutato un incremento delle della concentrazione proteica e la concomitante presenza di pleocitosi linfomonocitaria. Tuttavia tali riscontri sono possibili anche in corso di altre forme di encefaliti a diversa eziopatogenesi, per cui occorre sempre correlare tali test con gli altri precedentemente menzionati.

Come precedentemente indicato, la PCR rappresenta oggi uno strumento sempre più sensibile per la diagnosi di Encephalitozoonosi nel coniglio. Infatti è possibile evidenziare il DNA di *Encephalitozoon cuniculi* non solo nei tessuti principalmente colpiti dal parassita (Baneux e Pognan 2003; Csokai et al. 2009b), ma anche attraverso la nested-PCR, in urine e LCS di conigli infetti (Jass et al. 2006). Inoltre la PCR eseguita su materiale residuo dalla liquefazione del cristallino, dopo faco-emulsificazione, rappresenta un metodo attendibilissimo per la ricerca del parassita in conigli affetti da uveite facoclastica (Kunzel et al 2008; Csokai et al. 2009b). L'attuale limite di tale metodica è rappresentato dall'intermittenza di escrezione, dall'impossibilità di correlare la presenza del DNA con l'instaurarsi dei sintomi e dalla incongruenza tra la comparsa dei sintomi e l'evidenziazione del DNA del parassita tramite test PCR. (Jass et al. 2006; Csokai et al. 2009b). Tuttavia per

quanto, in sede necroscopica, la individuazione delle spore, previa colorazione specifica (Csokai et al. 2009b) sia un metodo più affidabile della PCR eseguita sui tessuti sedi del parassita (SNC, reni, occhio), al contrario, *in vivo*, la combinazione di tecniche sierologiche e tecniche molecolari rappresenta uno strumento più sicuro ed applicabile per formulare la diagnosi di encefalitozoonosi.

### TERAPIA E CONTROLLO

Dal momento che la sintomatologia clinica riscontrabile in corso di encephalitozoonosi è causata sia dal danno primariamente indotto dal parassita nelle sue sedi preferenziali (reni, occhi e snc), che dal processo infiammatorio susseguente all'eliminazione del parassita stesso, non è possibile stabilire un protocollo terapeutico uniforme. Il trattamento di tale patologia sarà rivolto sia a limitare, ove possibile, la diffusione incontrollata del parassita nell'organismo ospite, sia ad instaurare una terapia sintomatica, allo scopo di ridurre i segni clinici, particolarmente quelli neurologici (Crisi convulsive e rolling) (Deeb e Carpenter 2004) sia infine a prevenire l'insorgenza di infezioni secondarie.

Per quanto sino ad ora nessun farmaco sia stato ufficialmente approvato per la terapia dell'encefalitozoonosi, diverse sono le molecole impiegate per il trattamento di questa parassitosi. Gli antelmintici sono stati impiegati con successo per ridurre la replicazione del microsporidio, in particolare tra i diversi benzimidazolici sono stati impiegati oxibendazolo, albendazolo, tiabendazolo e febendazolo (Harcourt-Brown e Holloway 2003; Kunzel et al.

2008). Sia in ambito umano che veterinario è stata dimostrata ampiamente l'efficacia dell'albendazolo per impedire lo sviluppo e la diffusione di *E. cuniculi*, oltre che per il livello di tollerabilità del farmaco stesso (Neuscl et al. 1999). Tuttavia l'albendazolo si è rivelato marcatamente embriotossico e taratogeno nel coniglio e per tale ragione è stato escluso dai protocolli terapeutici applicabili per il controllo della parassitosi, soprattutto nelle femmine gravide o presunte tali. Il febendazolo è invece attualmente considerato il farmaco di scelta, in grado di prevenire e trattare le infezioni da *encephalitozoon cuniculi* nel coniglio (Suter et al. 2001). L'attuale protocollo terapeutico prevede l'utilizzo di febendazolo a 20 mg/kg per un periodo di 4 settimane. Tale regime sarebbe efficace ad impedire la sierconversione ed a negativizzare la presenza di spore nel SNC in conigli naturalmente infetti (Suter et al. 2001).

Per quel che concerne il trattamento dei sintomi causati dalla localizzazione del parassita, specialmente a livello nervoso centrale controversa è la questione sull'utilizzo dei corticosteroidi per la terapia della meningoencefalite. Dato che i sintomi sarebbero causati dalla reazione infiammatoria alla localizzazione nel SNC, come dimostrato da Feaga nel

1997, l'uso di cortisonici sarebbe indicato da più autori quale trattamento maggiormente indicato, ugualmente a come ampiamente praticato in altre specie. Harcourt-Brown (2004) riporta l'utilizzo di un dosaggio di 1-2 mg/kg di desametazone come singola dose d'attacco ridotta poi a 0,2 mg/kg. Particolare attenzione deve essere usata nel caso di associazione di tale farmaco con l'albendazolo, in quanto il desametazone avrebbe una dimostrata capacità di aumentare i livelli plasmatici dell'albendazolo del 50%. Tuttavia, l'uso di farmaci antinfiammatori steroidei avrebbe un duplice impatto negativo nei conigli affetti da encefalitozoonosi. Infatti da un lato favorirebbe l'insorgenza di infezioni secondarie, a causa dell'effetto notoriamente immunosoppressivo da essi causato, dall'altro andrebbe ad inibire l'azione dei linfociti T e delle citochine da essi prodotte, che rappresenterebbero la principale risposta immunitaria all'infezione del parassita. In virtù di tali valutazioni, sarebbe stato ipotizzato l'impiego di ciclofosfamide a dosaggi bassi ed a cicli ripetuti come possibile terapia in grado di modificare la risposta pato-morfologica all'*Encephalitozoon cuniculi* (Horvat et al. 1998). Ciononostante l'azione immunosoppressiva di tale farmaco avrebbe causato diversi decessi, per cui il suo utilizzo non avrebbe

trovato largo impiego nella pratica clinica. Per la terapia dei sintomi provocati dall'otite media ed interna hanno trovato ampio impiego diversi antibiotici quali sparfloxacin, fumagilin ed ossitetraciclina in associazione a dei comuni antinfiammatori non steroidei, quali flunixin meglumine ( mg/kg SC od EV), meloxicam (0,1-0,2 mg/kg SC o OS) e carprofen (2-4 mg/kg SC od EV) (Kunstyr e Naumann 1985). Questi ultimi avrebbero un'azione importante anche nella riduzione degli effetti del parassita sull'innervazione vescicale, quali l'incontinenza urinaria. Per il controllo delle crisi convulsive sono stati impiegati con efficacia diversi comuni benzodiazepinici (diazepam al dosaggio di 1-2 mg/kg Sc od EV, midazolam alla dose di 0,2-2 mg/kg SC, EV od intranasale.), associati ad una riduzione dello stress ambientale (ambiente silenzioso, etc.). Nessun trattamento farmacologico si è rivelato efficace nei casi di insufficienza renale cronica, indotta da lesioni granulomatose a carico dei reni. Un buon supporto di liquidi ed una corretta dieta con alimenti a basso contenuto di calcio, sarebbero fondamentali per ridurre l'incidenza delle calcolosi dell'apparato urinario. Per il trattamento dei sintomi oculari scarsi risultati hanno fornito i trattamenti conservativi per l'uveite facoclastica. L'uso di corticosteroidi sistemici e/o topici in

associazione a tetracicline può infatti ridurre gli effetti dell'uveite, ma non risolvere per niente i casi di cataratta e granulomi a livello oculare. L'unico trattamento di elezione è invece rappresentato dalla rimozione del cristallino attraverso faco-emulsificazione (Stiles et al. 1997; Fechle e Sigler 2002) nei casi di cataratta e/o l'enucleazione del globo oculare in caso di endo-oftalmi.

Le strategie di controllo dell'encephalitozoonosi prevedono, maggiormente, la riduzione dell'incidenza di trasmissione dell'infezione nelle colonie di conigli da laboratorio attraverso l'eliminazione dei soggetti sieropositivi. Si ritiene che questi ultimi abbiano un'elevata probabilità di diffondere le spore del parassita attraverso le urine. Il completo eradicamento del parassita deve tuttavia essere conseguito attraverso un programma di disinfezione delle attrezzature e dei ricoveri degli animali (Waller 1979). La bollitura per 5 minuti o l'autoclavaggio a 120°C per 10 minuti ucciderebbero le spore. Tra i disinfettanti maggiormente efficaci 9 su 11, comprendenti etanolo 70%, formaldeide 0.3%, perossido di idrogeno all'1% ed idrossido di sodio all'1%, sarebbero quelli la cui azione per circa 30 minuti inattiverebbe le spore di *Encephalitozoon cuniculi*.

# Parte Sperimentale

### SCOPO DELLA RICERCA

Nel contesto delle patologie presenti nei conigli pet, l'encefalitozoonosi, nonostante l'elevata sieroprevalenza, è attualmente una patologia probabilmente sottostimata, in considerazione del suo decorso spesso subclinico e della oggettiva difficoltà nel formulare una diagnosi di certezza in vita.

*Encephalitozoon cuniculi* è un microsporidio, diffuso negli animali omeotermi, compreso l'uomo, che si diffonde tramite la produzione di spore.

Questo aspetto, legato quindi al suo potenziale zoonotico, suggerisce l'importanza di eseguire sempre uno screening combinato di test sierologici, test molecolari ed altre indagini diagnostiche (diagnostica per immagini, etc.) allo scopo di intercettare la presenza del microsporidio e di valutarne le lesioni indotte tanto nei conigli sintomatici quanto in quelli asintomatici.

Il presente studio è stato condotto con lo scopo di valutare la prevalenza di *E. cuniculi* attraverso la combinazione di differenti test diagnostici con tecniche sierologiche (CIA, Elisa e QPE) e molecolari (PCR) al fine di

## SCOPO DELLA RICERCA

---

valutare la diffusione epidemiologica di tale patologia che appare avere un reale, seppur limitato, potenziale zoonotico.

## MATERIALI E METODI

### Campionamento

Nel periodo compreso tra settembre 2010 e settembre 2011, sono stati esaminati 125 conigli pet, appartenenti a privati ed a negozianti di animali provenienti da varie province della regione Campania. I conigli oggetto di indagine erano di età compresa tra i 2 mesi ed i 10 anni ed appartenevano a diversi ibridi di conigli da compagnia (i.e. dwarf rabbit).

I conigli venivano previamente assegnati a 3 gruppi (Tab. 1):

- 1) Soggetti clinicamente sani (n=50) (Età media 2.5 anni)
- 2) Soggetti sospetti infetti da *E. cuniculi* con sintomi oculari-neurologici-renali (n=65) (Età media 4,5 anni).
- 3) Soggetti non sospetti infetti da *E. cuniculi* con sintomi aspecifici (n=10) (Età media 5,2 anni).

Da ciascun coniglio veniva effettuato un prelievo di sangue di volume compreso tra 0.5 ed 1.5 ml, dalla vena safena ed un prelievo di urine sia attraverso minzione spontanea, sia attraverso delicata compressione manuale della vescica urinaria. I prelievi ed il contenimento venivano effettuati

seguendo le linee guida proposte da Haffar, 1997. Successivamente, i campioni ematici venivano centrifugati a 2500 rpm per 15 minuti, ed i sieri ottenuti venivano sottoposti a Carbon Immunoassay (CIA test) ed Enzyme-linked ImmunoSorbed Assay (ELISA test) per la ricerca di anticorpi anti-*E. cuniculi* seguendo le procedure consigliate dalla ditta produttrice (Medicago, Uppsala, Sweden), e ad elettroforesi sierica (QPE). Le urine raccolte in 24 ore venivano centrifugate e sottoposte a PCR (convenzionale e nested) per l'amplificazione del DNA di *Encephalitozoon cuniculi*.

### TECNICHE SIEROLOGICHE

#### CIA Test : Procedura

La procedura del CIA test consisteva nell'allestire piastre "microtitre" in cui si preparava un pozzetto con una diluizione 1:40 in PBS (Phosphate\_Buffered Saline Solution) del siero da testare. Successivamente si mettevano a contatto 10 $\mu$ l del siero così diluito con 10  $\mu$ l dell'antigene noto (Medicago, Sweden). Alla sospensione di antigene/siero (10  $\mu$ l) veniva addizionata una sospensione di carbone (10  $\mu$ l). Infine, 7  $\mu$ l di miscela antigene/siero/carbone venivano depositati su un vetrino portaoggetti ed analizzati al microscopio ottico ad un ingrandimento di 40x.

In caso di positività, sullo sfondo di carbone, le spore risultavano di colore nero. Tale fenomeno è dovuto alla proprietà delle particelle di carbone di legare le IgG del siero. Pertanto, in caso di positività se nel siero sono presenti anticorpi anti-*E.cuniculi* questi si legano alle particelle di carbone e contemporaneamente vanno a formare il complesso antigene-anticorpo determinando, quindi, la colorazione delle spore (antigene) in nero (particelle

di carbone). In caso di negatività, invece, il parassita appare incolore su sfondo nero.

### **ELISA Test : Procedura**

La procedura ELISA veniva realizzata in accordo alle indicazioni riportate nelle istruzioni del produttore (Medicago, Uppsala, Svezia). I campioni di siero venivano diluiti in phosphate buffer saline (PBS) in rapporto 1:40 prima di essere inoculati in micropiastra “antigen-coated”. Il coniugato, invece, veniva diluito in PBS in rapporto 1:1000 prima di essere inoculato in micropiastra “antigen-coated”. La densità ottica (DO) era letta 450 nm utilizzando un Sigma microplate reader (Sigma, St. Louis, MO, USA). I risultati dell’ELISA erano espressi utilizzando la formula (S:P) in accordo al protocollo suggerito dalla casa produttrice:  $(OD_{450} \text{ del campione} - OD_{450} \text{ control negative}) / (OD_{450} \text{ di controllo positivo} - OD_{450} \text{ di controllo negativo})$ . Il campione veniva considerato positivo per *E. cuniculi* quando il rapporto S:P era superiore a 3; il campione veniva considerato negativo, invece, quando il rapporto S:P era inferiore a 3.

### **QPE**

Ciascun campione di siero ottenuto in seguito a centrifugazione a 2500 rpm per 15 min veniva posto in provette eppendorf e stoccato a 4°C. I campioni ottenuti venivano inviati ad un laboratorio esterno per l'esecuzione dell'Elettroforesi serica.

### TECNICHE MOLECOLARI

#### PCR Test : Procedura

Le urine di tutti i soggetti venivano esaminate con PCR (convenzionale e nested) per la ricerca di *E. cuniculi*. Esse venivano trattate termicamente allo scopo di distruggere la parete delle spore, attraverso congelamento in protossido di azoto a -196°C per 5 min, seguito da riscaldamento a 90 °C per 5 min. L'isolamento del DNA veniva realizzato con un "High Pure PCR Template Preparation" Kit (Roche Diagnostics, Vienna, Austria). Ciascuna preparazione del campione conteneva un controllo negativo. L'estrazione del DNA veniva realizzata seguendo le istruzioni del produttore. L'eluizione finale del DNA dalle urine veniva realizzata con 50 µl di Elution Buffer, allo scopo di aumentare la concentrazione finale di DNA.

#### PCR convenzionale

La PCR è stata realizzata seguendo le procedure suggerite da Rossi et al. (1998) con alcune modifiche. I primer erano specifici per *E. cuniculi* ed

amplificavano un frammento di 549 bp di un gene di RNA disegnato sulla sub-unità 16S ribosomiale. I primer erano forniti da PRIMM s.r.l., Italia. La mix veniva allestita ad un volume totale di 25 µl e conteneva 5 µl di DNA, 5 pmol di ciascun primer, una Ence\_549\_forward (5'-ATGAGAAGTGATGTGTGTGCG-3') ed una Ence\_549\_reverse (5'-TGCCATGCACTCACAGGCATC-3'), 200 µM di ciascun dNTP, 0.5 U Go Taq® polymerase (Promega, Mannheim, Germany) e 5 µl Green Go Taq® reaction buffer 5× (contenente 1.5 mM di cloruro di magnesio) (Promega, Mannheim, Germany). Venivano realizzati 45 cicli PCR come segue: denaturation a 94 °C per 30 s, annealing a 61 °C per 1 min ed elongation a 72 °C per 2 min in un 2720 Thermal cycler (Applied Biosystems, CA, USA).

### **Nested PCR**

La prima parte della PCR (external PCR) veniva effettuata usando i primer (1460 bp) P2 (5'-TTGCGGGATGAGCAGTAGCTGCG-3') e M2 (5'-TGCTGCCACAAACACAACCCG-3') (Baneux and Pognan, 2003), mentre i

primer Ence\_549\_forward ed Ence\_549\_reverse venivano impiegati per la seconda parte (nested PCR). Il setup della mix era identico a quello della PCR convenzionale. 5 microlitri di DNA della prima PCR venivano usati per la nested PCR. Entrambe le PCR consistevano di 35 cicli ognuna. La prima PCR veniva realizzata come segue: denaturation a 94 °C per 45 s, annealing a 58 °C per 45 s ed elongation a 72 °C per 2 min. La seconda PCR veniva realizzata come segue: denaturation a 94 °C per 30 s, annealing a 60 °C per 45 s ed elongation a 72 °C per 1 min.

### **Elettroforesi in gel di agarosio**

I campioni amplificati venivano sottoposti ad elettroforesi in gel di agarosio (2%) e visualizzati previa colorazione con bromuro di etidio sotto transilluminatore UV.

### **Altre indagini diagnostiche**

Ove consentito dai proprietari e soprattutto nei conigli sintomatici che risultavano negativi ai test effettuati, venivano realizzate ulteriori indagini diagnostiche al fine di indagare la presenza di lesioni strumentalmente visibili e di determinare, se possibile, la causa della sintomatologia mostrata nei soggetti negativi. Venivano eseguiti esami ematologici (emocromocitometrico con formula leucocitaria, ematochimico, sierologia), esami urinari (sedimento e biochimica urinaria), radiogrammi del cranio, torace e addome ed ecografie addominali.

### RISULTATI

#### Sierologia (CIA, Elisa)

Su 125 conigli testati l'80% (100/125) risultava positivo per la ricerca sierologica di anticorpi anti-*E. cuniculi* (Tab 1). Di questi il 30% (30/100) apparteneva al gruppo I (Soggetti clinicamente sani), il 60% (60/100) apparteneva al gruppo 2 (Soggetti sospetti infetti da *E.cuniculi* con sintomi oculari-neurologici-renali), ed il restante 10% (10/100) al gruppo III (Soggetti sospetti infetti da *E.cuniculi* con sintomi aspecifici). Il 60% (36/60) dei conigli appartenenti al gruppo II era affetto da sintomatologia neurologica (i.e. rotolamento, rotazione della testa, paresi/paralisi), il 30% (18/60) mostrava sintomatologia oculare (i.e. uveite facoclastica) ed il 10% (6/10) sintomi renali (i.e. IRA accertata, poliuria, disidratazione).

Dei restanti conigli (25/125) risultati negativi a tutti i test effettuati (test sierologici e PCR), il 20% (5/25) mostrava rotazione della testa, mentre la restante parte (20/25) non era clinicamente affetta da alcun sintomo.

## RISULTATI E DISCUSSIONE

---

<b>CONIGLI</b>	<b>N°</b>	<b>Test CIA</b>	<b>Test ELISA</b>	<b>Test PCR</b>
<b><u>Gruppo I</u></b>	50	30	30	0
<b><u>Gruppo II</u></b>	65	60	60	25
Sintomi Neurologici		(36)	(36)	(5)
Sintomi oculari		(18)	(18)	(20)
Sintomi renali		(6)	(6)	(0)
<b><u>Gruppo III</u></b>	10	10	10	0
<b>Totale</b>	125	100	100	25

Tabella 1 – Risultati degli esami sierologici e molecolari

**QPE**

I risultati dei quadri protido-elettroforetici eseguiti hanno mostrato una riduzione del rapporto albumine-globulina (A/G ratio), una riduzione della frazione alfa 2 delle globuline, una riduzione delle albumine ed un aumento delle gammaglobuline sia nel gruppo II che nel gruppo III, mentre nessuna alterazione significativa è stata riscontrata nel gruppo I ( Tab. 2).

<b>VALORI QPE</b>	<b><u>GRUPPO I</u></b>	<b><u>GRUPPO II</u></b>	<b><u>GRUPPO III</u></b>
<b>Albumine</b>		Ridotto	Ridotto
<b>Alfa 1</b>			
<b>Alfa 2</b>		Ridotto	Ridotto
<b>Beta</b>			
<b>Gamma</b>		Aumentato	Aumentato
<b>Rapporto A/G</b>		Ridotto	Ridotto
<b>Prot. totali</b>			

**Tabella 2 – Risultati dell’ elettroforesi serica (QPE)**

### **PCR**

Il 20% (25/125) dei conigli testati con PCR sulle urine è risultato positivo per *E. cuniculi* (Tab. 4). Di essi il 100% (25/25) risultava ugualmente positivo anche ai test sierologici. L'età media era di 1,2 anni. L'80% (20/25) dei soggetti positivi al test PCR mostrava sintomi oculari, il restante 20% (5/20) manifestava sintomatologia neurologica.

### **Altre Indagini Diagnostiche**

Dei 25 conigli su 125 risultati sieronegativi a tutti i test effettuati, il 20% (5/25) era affetto da rotazione della testa (Tab. 1). Di essi solo 2 mostrava ispessimento delle bolle timpaniche all'esecuzione dei radiogrammi del cranio. Nella restante parte (3/5) non veniva evidenziata alcuna lesione radiografica. Dei 6 conigli affetti da patologia renale, il 50% (3/6) mostrava alterazioni dell'esame urinario, in particolare proteinuria marcata, il 17% (1/6) mostrava alterazione dei parametri ematochimici (iperazotemia ed aumento della creatininemia) ed il 33% (2/6) non mostrava alcuna alterazione apprezzabile né agli esami di laboratorio né all'ecografia renale.

Tutti gli altri test eseguiti risultavano costantemente negativi.

### **DISCUSSIONE E CONSIDERAZIONI FINALI**

Una diagnosi di certezza di Encefalitozoonosi, *in vivo*, nel coniglio risulta estremamente difficile. Infatti le localizzazioni preferenziali del parassita non consentono di ottenere una conferma istopatologica in modo agevole e sicuro per il paziente, tramite prelievo bioptico. L'evidenziazione del microsporidio può tuttavia avvenire, *in vivo*, attraverso le recenti tecniche molecolari (PCR). Attualmente una diagnosi presuntiva può comunque essere formulata attraverso la correlazione tra i sintomi clinici, i risultati delle indagini sierologiche (CIA, ELISA, QPE) e l'esclusione di patologie incluse nelle diagnosi differenziali. Per quanto i risultati delle indagini molecolari sul liquido di aspirazione dopo faco-emulsificazione di conigli affetti da cataratta, abbiano indicato un'elevata attendibilità di questo test, l'impiego della PCR (convenzionale o nested) su altri liquidi organici (LCS ed urine) può fornire risultati falsi negativi. Ciò è legato alla intermittenza dell'escrezione delle

spore e/o probabilmente alla difficoltà di raccolta di campioni significativi nell'arco delle 24 ore. Attualmente anche se la microscopia elettronica è indicata come il “gold standard” per l'evidenziazione del parassita in tessuti e liquidi organici (Didier et al. 1995), tuttavia tale metodica non consente, come la PCR, di distinguere le varie specie di microsporidio (*E. cuniculi* da *E. hellem*, etc.). Analogamente a quanto riportato da tali dati, la nostra ricerca ha evidenziato una positività di solo il 20% dei soggetti testati rispetto ad una positività dell'80% risultata alle indagini sierologiche. Tale aspetto conferma l'ipotesi che, seppur applicando metodiche altamente sensibili (nested-PCR), il limite di tale tecnica è rappresentato dalla raccolta delle spore.

L'elevata sieroprevalenza nei conigli affetti da sintomi neurologici conferma, quanto riportato in letteratura (Kunstyr e Naumann 1985; Harcourt-Brown ed Holloway 2003; Jass et al. 2008), che tale sintomatologia è quella che più frequentemente viene manifestata da animali colpiti da encefalitozoonosi. Viceversa solo una percentuale minima mostra segni di patologia renale. Le patologie che maggiormente sono state diagnosticate in animali con sintomi neurologici ma senza conferma di encefalitozoonosi, sono rappresentate dalla otiti medie o interne di probabile eziologia batterica. Una differenziazione

clinica di tali malattie dall'encefalitozoonosi risulta estremamente difficile per cui la conferma di laboratorio (sierologica e/o molecolare) è fondamentale sia per un corretto approccio terapeutico, sia per la formulazione della prognosi. Una delle difficoltà maggiori nella formulazione della diagnosi presuntiva di Encefalitozoonosi, deriva dal fatto che talora è possibile riscontrare soggetti con titoli medi-elevati, negativi alla PCR e che non abbiano ancora sviluppato sintomi della malattia. In taluni casi risulta di grande aiuto la valutazione comparata delle indagini messe in atto per evidenziare il microsporidio (sierologia/PCR) e la realizzazione del QPE.

I risultati ottenuti nella presente indagine indicano, in conformità con quanto già precedentemente riportato in letteratura (Cray C et al. 2009), che all'analisi dei test QPE in soggetti colpiti da Encefalitozoonosi, si riscontra una riduzione del rapporto albumine/globuline (A/G ratio), una riduzione della albumine e della frazione alfa2 globulinica e soprattutto un aumento significativo della frazione gamma delle globuline seriche (Cray 2009). Come è noto le frazioni globuliniche alfa1-2 delle proteine elettroforetiche misurano le proteine della fase acuta (alfa-lipoproteina, aptoglobina, fibronectina e transferrina), mentre la frazione globulinica gamma misura la

risposta anticorpale a vari tipi di patogeni (Virus, batteri, miceti, etc.). Pertanto, l'esecuzione di un quadro protido-elettroforetico rappresenta un valido ausilio per comprendere sia l'entità della risposta infiammatoria indotta direttamente dal parassita nelle sue sedi elettive (SNC, Reni, Occhio) od indirettamente dalla risposta tissutale susseguente alla lisi cellulare, sia l'entità della risposta immunitaria (Kaneko 1989).

Una recente indagine condotta su conigli pet in Italia da Dipineto et al. (2008) ha mostrato una sieroprevalenza del 59,2% (74 positivi su 125 analizzati).

Nella presente indagine, invece, è stata riscontrata una sieroprevalenza dell'80%, dato che confermerebbe una crescente diffusione della parassitosi in virtù di una proporzionale maggiore diffusione del coniglio come animale pet. I risultati del presente studio, in linea con la letteratura consultata, suggeriscono che l'elevata percentuale di sieropositività a *E. cuniculi* riscontrata in animali di privati e in diversi negozianti richiede una maggiore prudenza nel manipolare questi animali in particolare da parte soggetti immunodepressi, ma anche di anziani e bambini ed operatori del settore, nei confronti di questa affezione. Ciò si traduce nel seguire delle adeguate misure

igienico-sanitarie soprattutto nei luoghi di vendita dei conigli pet, in un attento e puntuale controllo da parte del medico veterinario attraverso l'esecuzione e l'interpretazione delle diverse indagini diagnostiche e nella messa a punto di nuove tecniche diagnostiche affidabili che possano facilitare la diagnosi di certezza, *in vivo*, di tale malattia. Pertanto, alla luce di quanto è esposto, sarebbe auspicabile la messa a punto di una metodica più precisa per l'evidenziazione del DNA del parassita nei liquidi organici al fine di consentire un controllo più concreto della diffusione di tale patologia.

**BIBLIOGRAFIA**

**Anonymous.** 2008. Annuario Assalzo - Associazione Nazionale tra i Produttori di Alimenti Zootecnici. Roma.

**Ashton N, Cook C, Clegg F.** 1976. Encephalitozoonosis (Nosematosis) causing bilateral cataract in a rabbit. Br J Ophthal. 60, 618-631.

**Atías, A.** 1995. Update on microsporidiosis in humans. Rev Med Chil. 123(6):762-772.

**Baneux PJR, Pognan F.** 2003. In utero transmission of *Encephalitozoon cuniculi* strain type I in rabbits. Lab Anim 37:132-138

**Boot R, Hansen C, Nozari N, Thuis H.** 2000. Comparison of assay of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits. Lab Anim 34(3):281-289

- Burglin TR.** 2003. The homeobox genes of *Encephalitozoon cuniculi* (Microsporidia) reveal a putative mating-type locus. *Dev. Genes. Evol.* 213, 50-52
- Cali A, Owen RL.** 1990. Intracellular development of Enterocytozoon, a unique microsporidian found in the intestine of AIDS patients. *J. Protozool.* 37:145-155.
- Cali A, Kotler DP, Orenstein JM.** 1993. *Septata intestinalis* n.g., n.sp., an intestinal microsporidian associated with chronic diarrhea and dissemination in AIDS patients. *J. Protozool.* 40:101-112.
- Canning EU, Lom J, Dykova I.** 1986. *The microsporidia of vertebrates.* Academic Press, Inc., New York.
- Chalupsky J, Vavra J, Gaudin J.** 1990. Mise en evidence serologique de la presence d'encephalitozoonose et de toxoplasmose chez le lapin de

Gareene (*Oryctolagus cuniculus*) en France. Bull Soc Franc Parasitol 8:91-95

**Cox JC, Ross J.** 1980. A serological survey of *Encephalitozoon cuniculi* infection in the wild rabbit in England and Scotland. Res Vet Sci 28:396

**Cox JC, Gallichio HA.** 1978. Serological and histological studies on adult rabbits with recent, naturally acquired encephalitozoonosis. Res Vet Sci 24:260-261.

**Cox JC, Hamilton RC, Attwood HD.** 1979. An investigation of the route and progression of *Encephalitozoon cuniculi* infection in adult rabbits. J Protozool. 26(2):260-265.

**Cray C, Arcia G, Schneider R** 2009. Evaluation of the usefulness of an ELISA and protein electrophoresis in the diagnosis of *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbits. Am J Vet Res 70(4):478-482

- Csokai J, Joachim A, Gruber A, Tichy A, Pakozdy A, Künzel F.** 2009. Diagnostic markers for encephalitozoonosis in pet rabbits. *Vet Parasitol.* 163(1-2):18-26
- Debb BJ, Carpenter JW.** 2004. Neurologic and musculoskeletal disease In: Quesenberry KE, Carpenter JW (Eds) *Ferrets, Rabbits and Rodents: Clinical Medicine and Surgery*, 2nd edn. Saunders, St. Louis, pp 203-210
- Deeb BJ, Di Giacomo RF, Bernard BL, Silbernagel SM.** 1990. *Pasteurella multocida* and *Bordetella bronchiseptica* in rabbits. *J Clin Microbiol.* 28:70-75.
- Deplazes P, Mathis A, Baumgartner R, Tanner I, Weber R.** 1996. Immunologic and molecular characteristics of Encephalitozoon-like microsporidia isolated from humans and rabbits indicate that Encephalitozoon cuniculi is a zoonotic parasite. *Clin Infect Dis.* 22(3):557-559.

**Didier E, Orenstein JM, Aldras A, Bertucci D, Rogers LB, Janney A.**

1995a. Comparison of three staining methods for detecting microsporidia in fluids. *J Clin Microbiol* 33:3138-3145

**Didier ES, Vossbrinck CR, Baker MD, Rogers LB, Bertucci DC,**

**Shadduck JA.** 1995b. Identification and characterization of three *Encephalitozoon cuniculi* strains. *Parasitology* 111(Pt 4):411-421

**Dipineto L, Rinaldi L, Santaniello A, Sensale M, Cuomo A, Calabria**

**M, Menna LF, Fioretti A.** 2008. Serological survey for antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in pet rabbits in Italy. *Zoonoses Public Health*. 55(3):173-175.

**Dubey JP, Brown CA, Carpenter JL, Moore JJ.** 1992. Fatal toxoplasmosis

in domestic rabbits in the USA. *Vet Parasitol* 44:305-309

- Eroksuz Y, Eroksuz H, Ozer H, Cevik A, Unver O.** 1999. A survey of *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbit colonies in Elazig, Turkey: pathomorphologic and serologic (carbonimmunoassay-test ) studies. Isr J Vet Med 54:7377
- Fechle LM, Sigler RL.** 2002. Phacoemulsification for the management of *Encephalitozoon cuniculi*-induced phacoclastic uveitis in a rabbit. Vet Ophthalmol 5,211-215
- Flatt RE, Jackson SJ.** 1970. Renal nosematosis in a young rabbits. Path Vet 7:492-497
- Franzen C.** 2004. Microsporidia: How can they invade other cells? Trends Parasitol Jun 20(6):275-279.
- Furuoka H, Sato H, Kubo M, Owaki S, Kobayashi Y, Matsui T, Kamiya H.** 2003. Neuropathological observation of rabbits

(*Oryctolagus cuniculus*) affected with raccoon roundworm (*Baylisascaris procyonis*) larva migrans in Japan. J Vet Med Sci 65(6):695-699

**Gentz E, Carpenter JW.** 1997. Neurological and musculoskeletal disease. In: Hyller EV, Quesenberry KE (Eds.), Ferrets, Rabbits and Rodents. Clinical Medicine and Surgery. WB Saunders, Philadelphia, pp 220-226.

**Giordano C, Weigt A, Vercelli A, Rondena M, Grilli G, Giudice C.** 2005. Immunoistochemical identification of *Encephalitozoon cuniculi* in phacoclastic uveitis in four rabbits. Vet Ophthalmol 8,271-275.

**Grahn B, Wolfer J, Keller CH.** 1991. Diagnostic Ophthalmology. Can Vet J 32:372-373

**Grest P, Albicker P, Hoetzle L, Wild P, Pospischil A.** 2002. Herpes simplex encephalitis in a domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). J Comp Pathol 126(4):308-311

**Gruber A, Pakodzdy A, Weissenbock H, Csokay J, Kunzel F.** 2009. A retrospective study of neurological disease in 118 rabbits. *J Comp Pathol* 140(1):31-37

**Halánová M, Cisláková L, Valencáková A, Bálent P, Adam J, Trávnicek M.** 2003. Serological screening of occurrence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in humans and animals in Eastern Slovakia. *Ann Agric Environ Med.* 10(1):117-120.

**Harcourt-Brown, FM,** 2002. Neurological and locomotor disorders. In: Harcourt-Brown FM (Ed.) *Textbook of Rabbit Medicine.* Butterworth. Edinburgh pp 307-323.

**Harcourt-Brown, FM, Holloway HK.** 2003. *Encephalitozoon cuniculi* in pet rabbits. *Vet Rec.* 152(14):427-431.

- Horvat M, Svicky E, Sevcikova Z.** 1998. Pathomorphological response to *Encephalitozoon cuniculi* infection in cyclophosphamide-treated rabbits. *Acta Vet (Brno)* 67:37-42
- Ishihara R, Hyashi Y.** 1968. Some observations on the fine structure of sporoplasm discharged from spores of a microsporidium, *Nosema bombycis*. *J. Invert. Pathol.* 11:377-385.
- Jordan Cn, Zajac AM, Lindsay DS.** 2006. *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbits. *Compend Contin Educ Vet* 28:108-116
- Kaneko JJ.** 1989. Serum proteins and dysproteinemias. In Kaneko JJ (Ed.) *Clinical Biochemistry of Domestic Animals* 4<sup>th</sup> ed., London: Academic Press; 143-165.

**Karp BE.** 1999. Rabies in two privately owned domestic rabbits. *J Vet Med Assoc* 215:1824-1827

**Katinka MD, Duprat S, Cornillot E, Metenier G, Thomarat F, Prensier G, Barbe V, Peyretailade E, Brottier P, Winker P.** 2001. Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature* 414:450-453.

**Katzwinkel-Wladarsch S, Deplazes P, Weber R, Loscher T, Rinder H.** 1997. Comparison of polymerase chain reaction with light microscopy for detection of microsporidia in clinical specimens. *Eur J Clin Microbiol Inf Dis* 16,7-10.

**Keeble EJ, Shaw DJ.** 2006. Seroprevalence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in domestic rabbits in the United Kingdom. *Vet Rec.* 158(16):539-544.

- Khan IA, Moretto M.** 1999. Role of gamma interferon in immune response against murine *Encephalitozoon cuniculi* infection. *Infect Immun* 67(4):1887-1893
- Khan IA, Schwartzman JD, Kasper LH, Moretto M.** 1999. CD8+ CTLs are essential for protective immunity against *Encephalitozoon cuniculi* infection. *J Immun* 162(10):6086-6091
- Khanna RS, Iyer PK.** 1971. A case of *Nosema cuniculi* infection in a goat. *Indian J Med Res.* 59(7):993-995.
- Kunstyr I, Naumann S.** 1985. Head tilt in rabbits caused by pasteurellosis and encephalitozoonosis. *Lab Anim Sci* 19, 208-213
- Kunzel F, Gruber G, Tichy A, Edelhofer R, Nell B, Hassan J, Leshnik M, Thalhammer JG, Joachim A.** 2008. Clinical symptoms and

diagnosis of encephalitozoonosis in pet rabbits. *Vet Parasitol* 151:115-124.

**Kunzel F, Joachim A.** 2010. Encephalitozoonosis in rabbits. *Parasitol Res.* 106:299-309

**Leland MM, Hubbard GV, Dubey JP.** 1992. Clinical toxoplasmosis in domestic rabbit. *Lab Anim Sci* 42, 318-319.

**Lyngset A.** 1980. A survey of serum antibodies of *Encephalitozoon cuniculi* in breeding rabbits and their young. *Lab Anim Sci* 30:558-561

**Mader DR.** 2004. Basic approach to veterinary care. In: Quesenberry KE, Carpenter JW (Eds.) *Ferrets, Rabbits and Rodents. Clinical Medicine and Surgery.* WB Saunders, Philadelphia, pp 147-160.

**Mathis A.** 2000. Microsporidia: emerging advances in understanding the basic biology of these unique organisms. *Int J Parasitol* 30:795-804.

**Mathis A, Weber R, Deplazes P.** 2005. Zoonotic potential of the microsporidia. *Clin Microbiol Rev.* 18(3):423-445.

**Mathis A, Michel M, Kuster H, Müller C, Weber R, Deplazes P.** 1997. Two *Encephalitozoon cuniculi* strains of human origin are infectious to rabbits. *Parasitology.* 114 ( Pt 1):29-35.

**Matsubayashi H, Koike T, Mikata I, Takei H, Hagiwara S.** 1959. A case of *Encephalitozoon*-like body infection in man. *AMA Arch Pathol.* 67(2):181-7.

**Metenier G, Vivares CP.** 2001. Molecular characteristics and physiology of microsporidia. *Microbes Infect* 3:407-415.

**Metzler A, Ehrensperger F, Wyler R.** 1978. Natural borna virus infection in rabbits. *Zentralbl Veterinarmed B* 25(2):161-164

**Murray KA, Hobbs BA, Griffin JW.** 1985. Acute meningoencephalomyelitis in a rabbit infected with *Pasteurella mltocida*. Lab Anim Sci 35(2):169-171

**Nast R, Middleton DM, Wheler CL.** 1996. Generalised encephalitozoonosis in a Jersey wooly rabbit. Can Vet J 37:303-305

**Neushl J, Conkova E, Krokavec P, Celarova E, Halanova M, Hipikova V, Balent P, Sutiak V.** 1999. The development of encephalitozoonosis in rabbit after infection by *Encephalitozoon cuniculi* and treatment with albendazole. Acta Vet (Beograd) 49(4):327-334

**Pleshinger J, Weidner E.** 1985. The microsporidian spore invasion tube. IV. Discharge activation begins with pH-triggered Ca<sup>2+</sup> influx. J. Cell Biol. 100:1834-1838.

**Poonacha KD, Stamper RD.** 1985. Encephalitozoonosis in a parrot. J Am Vet Med Assoc. 186:700-702

**Pye D, Cox J.** 1977. Isolation of *Encephalitozoon cuniculi* from urine samples. Lab Anim 11, 233-234.

**Ronnebaumer K, Groos U, Bohne W.** 2008. The nascent parasitophorous vacuole membrane of *Encephalitozoon cuniculi* is formed by host cell lipids and contains pores which allow nutrient uptake. Eukariot Cell Jun 7(6):1001-1008.

**Rossi P, La Rosa G, Ludovisi A, Tamburrini, A, Gomez Morales MA, Pozio E.** 1998. Identification of a human isolate of *Encephalitozoon cuniculi* type I from Italy. Int. J. Parasitol. 28, 1361-1366.

**Sancak B, Akyön Y.** 2005. Microsporidia: general characteristics, infections and laboratory diagnosis. Mikrobiyol Bul. 39(4):513-22.

**Shadduk JA, Pakes SP.** 1971. Encephalitozoonosis (Nosematosis) and toxoplasmosis. Am J Pathol 64(3):657-671.

**Snyder SB, Fox JG, Soave OA.** 1973. Sub-clinical otitis media associated with *Pasteurella multocida* infections in New Zealand White rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). Lab Anim Sci 23(2):270-272

**Stiles J, Didier E, Ritchie B, Greenacre C, Willis M, Martin C.** 1977. *Encephalitozoon cuniculi* in the lens of a rabbit with phacoclastic uveitis: confirmation and treatment. Vet Comp Ophthalmol 7, 233-238.

**Szabo JR, Shaddock JA.** 1987. Experimental encephalitozoonosis in neonatal dogs. Vet Pathol 24:99-108

**Suter C, Muller-Doblies UU, Hatt JM, Deplazes P.** 2001. Prevention and treatment of *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbit with febendazole. Vet Rec 148,478-480.

**Thomas WB.** 2000. Vestibular dysfunction. Vet Clin N Am Sm An Pract 30, 227-249.

- Uhlikova M, Hubner J.** 1973. Congenital transmission of toxoplasmosis in domestic rabbits. *Fol Parasitol* 20, 285-291.
- Valencakova A, Balent P, Petrovova E, Novotny F, Luptakova L.** 2008. Encephalitozoonosis in household pet Nederland Dwarf rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Vet Parasitol.* 153(3-4):265-269.
- Waller T, Morein B, Fabiansonn E.** 1978. Humoral immune response to infection with *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits. *Lab Anim* 12:45-48
- Wasson K, Peper RL.** 2000. Mammalian microsporidiosis. *Vet Pathol.* 37(2):113-128.
- Weber R, Bryan RT, Schwartz DA, Owen RL.** 1994. Human microsporidial infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 7:426-461.

- Weissenbock H, Hainfellner JA, Berger J, Kasper I, Budka H.** 1997. Natural occurring herpes simplex encephalitis in a domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Vet Pathol* 34(1):44-47
- Wicher V, Baughn RE, Fuentealba C, Shaddock JA, Abbruscato F, Wicker K.** 1991. Enteric infection with an obligate intracellular parasite, *Encephalitozoon cuniculi*, in an experimental model. *Infect Immun* 59:2225-2231
- Williams DL.** 1999. Laboratory Animal Ophthalmology. In: Gelatt KN (ed) *Veterinary Ophthalmology*, 3<sup>rd</sup> edn. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, pp 1209-1236
- Wilson JM.** 1979. *Encephalitozoon cuniculi* in wild European rabbits and fox. *Res Vet Sci* 26, 114.
- Wolfer J, Grahn B, Wilcock B, Percy D.** 1993. Phacoclastic uveitis in the rabbit. *Prog Vet Comp Ophthalmol* 3, 92-97.

**Wright JH, Craighead EM.** 1922. J Exp Med 36, 135

**Zender HO, Arrigoni E, Eckert J, Kapanci Y.** 1989. A case of  
*Encephalitozoon cuniculi* peritonitis in a patient with AIDS. Am J Clin  
Pathol 92, 352-356.

## **RINGRAZIAMENTI**

A mia moglie, per l'amore, la pazienza ed il grande sostegno, grazie;

Al Dottor Ludovico Dipineto, per la sua disponibilità e guida in questo percorso;

Al Professor Alessandro Fioretti e alla Professoressa Lucia Francesca Menna per avermi concesso l'opportunità di lavorare a questa tesi ed ampliare la mia conoscenza;

Al Dottor Massimo D'Acerno per il prezioso scambio di informazioni e dati scientifici;

Ai colleghi ed amici Dr. Paolo Selleri e Dr. Tommaso Collarile per il loro costante supporto in tutto;

Al centro sperimentale avicunicolo di Varcaturò per la loro preziosa disponibilità alla realizzazione di questo lavoro.