

Descripción histopatológica de las lesiones oculares y nerviosas en conejos domésticos infectados con *Encephalitozoon cuniculi*: una revisión.

Histopathological description of ocular and nervous lesions in domestic rabbits infected with *Encephalitozoon cuniculi*: an overview.

Daniel Barrantes-Murillo¹ y Alejandro Alfaro-Alarcón¹ 

¹ Departamento de Patología, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional, Costa Rica.
danielfelipebarrantesmurillo@gmail.com

Recibido: 15 de Mayo de 2014. **Corregido:** 12 de Abril de 2015. **Aceptado:** 8 de Mayo de 2015.

Resumen: Este artículo describe las lesiones, a nivel del sistema nervioso central y ojo, en conejos infectados con *Encephalitozoon cuniculi*. El análisis histopatológico, en conjunto con el uso de tinciones especiales de Ziehl-Neelsen y Gomori metamina-plata, es el método más sensible en el diagnóstico post mórtem. La presentación neurológica afecta a una gran mayoría de estos pacientes y se asocia a una encefalitis granulomatosa multifocal severa. En muchos de estos casos se puede observar esporas microsporidiales con tinciones especiales. La presentación ocular es menos frecuente que la nerviosa, se caracteriza por una uveítis facoclástica bilateral o unilateral.

Palabras clave: *Encephalitozoon cuniculi*, sistema nervioso central, encefalitis granulomatosa, uveítis facoclástica.

Abstract: This paper describes ocular and central nervous system lesions of rabbits infected with *Encephalitozoon cuniculi*. The histopathological analysis, together with the use of special Ziehl-Neelsen and Gomori methenamine silver stains, is the most sensitive post-mortem diagnostic test. The neurologic lesion affects most of these patients and is related to severe multifocal granulomatous encephalitis. In many cases, microsporidial spores can be observed with the help of special stains. Ocular lesions are less frequent than nervous ones; they are characterized by a bilateral or unilateral phacoclastic uveitis.

Keywords: *Encephalitozoon cuniculi*, central nervous system, granulomatous encephalitis, phacoclastic uveitis.

 **Autor para correspondencia:**

Alejandro Alfaro-Alarcón, Departamento de Patología, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional, Costa Rica.
alejandro.alfaro.alarcon@una.cr



INTRODUCCIÓN

Encephalitozoon cuniculi es un parásito microsporidial, intracelular obligatorio. *E. cuniculi* fue identificado, por primera vez, en una colonia de conejos de laboratorio, en 1922, causando una parálisis parcial (Jeklova et al. 2009) y enfermedad vestibular (Ozkan et al. 2010). A pesar de que, anteriormente, fue clasificado como un protozoo, se ha sugerido que su taxonomía correcta, de microsporidia, podría estar dentro de los hongos, como un grupo altamente especializado, adaptado a un ciclo de vida intracelular parasitario (Müller 1997; Lonardi et al. 2012). Este organismo es capaz de infectar una gran cantidad de mamíferos como: perros, zorros, monos y roedores. *E. cuniculi* es un patógeno oportunista, que afecta a seres humanos infectados con HIV, o pacientes sometidos a trasplante de órganos (Wasson et al. 2000; Csokai et al. 2009; Sieg et al. 2011). Sin embargo, estudios más recientes, han demostrado que *Encephalitozoon cuniculi* es capaz de causar una infección crónica, tanto en humanos inmunocompetentes e inmunodeficientes, al igual que en animales salvajes y domésticos, con un curso potencialmente fatal (Wagnerová et al. 2013). En lagomorfos, la encefalitozoonosis es esencialmente una enfermedad subclínica, con una incidencia reportada de infección de 5 a 75% en animales de laboratorio (Szabo et al. 1978). Actualmente, se ha identificado tres genotipos diferentes: el genotipo I, aislado de conejos, el genotipo II, aislado de roedores; y el genotipo III, aislado de perros. Sin embargo, estos pueden infectar a otros huéspedes (Ozkan et al. 2010).

Este parásito tiene un ciclo de vida directo, y la transmisión microsporidial ocurre típicamente cuando las esporas ambientales infectantes son excretadas en la orina, vía oral, y son subsecuentemente ingeridas por el hospedador susceptible. Las esporas pueden sobrevivir en el ambiente durante 4 semanas (Rich 2010). Después de la ingestión o inhalación de esporas, los monocitos infectados con *E. cuniculi*, transportan el microorganismo a los sitios primarios de colonización (riñones, cerebro, pulmón e hígado) (Rich 2010). La transmisión transplacentaria de *E. cuniculi* está bien documentada en conejos domésticos y se ha demostrado, experimentalmente, en perros (Rich 2010).

El diagnóstico de la encefalitozoonosis, *in vivo*, es muy difícil, dado que los animales infectados no suelen demostrar sintomatología clínica y la excreción de las esporas infectantes, en orina, es esporádica. Por estas razones, los métodos más utilizados para demostrar la infección en animales son las pruebas serológicas, como el ensayo de inmunofluorescencia (IFA), el carbono inmunoensayo (CIA) y la prueba de inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) (Tee et al. 2011; Lonardi et al. 2012).

El análisis histopatológico, en conjunto con el uso de tinciones especiales es el método más sensible para el diagnóstico post-mortem (Csokai et al. 2009). Las tinciones especiales de Gram, Ziehl-Neelsen, y Gomori metamina-plata pueden ser utilizadas para la identificación de las esporas microsporidiales; sin embargo, estas técnicas no permiten diferenciar entre *E. cuniculi* y *E. hellen*, pues son morfológicamente idénticos; por lo cual, otras técnicas diagnósticas, como el PCR, son necesarias para su identificación (García 2002).

Los síndromes clínicos, asociados con *E. cuniculi*, en conejos domésticos, pueden tener tres presentaciones: renal, ocular y neurológica (Sieg et al. 2011; Lonardi et al. 2012).

ENCEFALITIS GRANULOMATOSA

La encefalitozoonosis afecta, predominantemente, conejos; pero, otras especies (perro, y carnívoros silvestres) pueden verse afectadas (Wasson & Pepper 2000; Vandeveldel et al. 2012). Las lesiones, en el sistema nervioso central, no ocurren antes de los 30 días post-infección (Gruber et al. 2008). Su manifestación y formación resulta en síntomas neurológicos, los cuales son: enfermedad vestibular, inclinación de la cabeza, tortícolis, caminar en círculos, nistagmo y movimientos rotacionales a lo largo del cuerpo (Rich 2010; Sieg et al. 2011).

El diagnóstico de encefalitozoonosis, normalmente, se hace post-mortem, dado que es difícil demostrar la presencia del organismo sin los hallazgos histopatológicos (Rich 2010). Estos últimos consisten en una meningoencefalomielitis no supurativa (figura 1, 2, 3 y 4), con formación de granulomas de diversos tamaños en todo el sistema nervioso central, característicamente formados por cantidades variables de histiocitos epitelioides (figura 3), conocidos como "focos hepatoides", por su similitud con el tejido al que hace mención. *E. cuniculi* es capaz de infectar diferentes tipos de células, como neuronas, células epiteliales endimarias y del plexo coroideo, endotelio y macrófagos (Wasson & Pepper 2000). Los microorganismos son difíciles de encontrar, pues no se tiñen con tinciones de rutina de H&E; su número es mayor en procesos agudos y tienden a disminuir en los casos crónicos (Csokai et al. 2009). En los focos inflamatorios o adyacentes a estos se suele observar espacios vacíos; en mayor magnificación contienen esporas parasitarias, las cuales se tiñen positivo con Ziehl-Neelsen (figura 5) y Gram (Grant & Youssef, 2007; Vandeveldel et al. 2012). Aún, en casos con cambios histopatológicos severos, puede que se detecte pocas esporas con la ayuda de Ziehl-Neelsen (Csokai et al. 2009). Además, se ha reportado áreas extensas de malacia, principalmente en las regiones periventriculares y la médula oblongada (Gruber et al. 2008; Csokai et al. 2009). La severidad de estas lesiones varía, indistintamente, en las diferentes regiones del sistema nervioso central, reflejando la localización al azar de los organismos, así como la distribución irregular del cambio vascular inflamatorio (Grant & Youssef 2007).

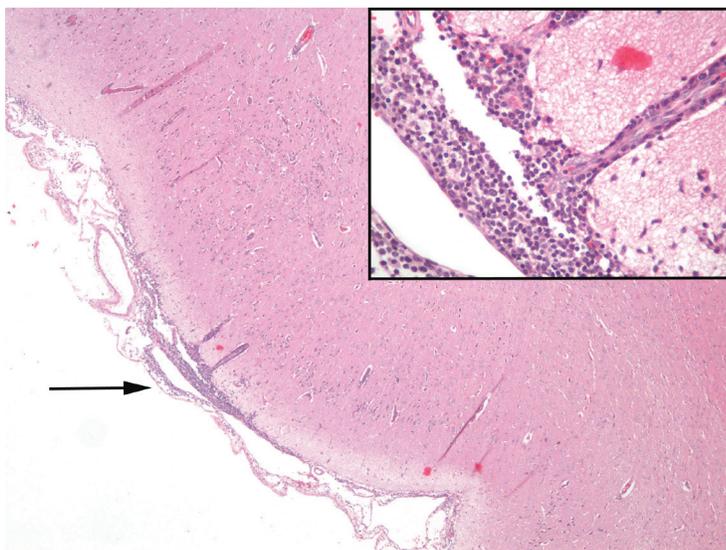


Figura 1. Sistema nervioso central, meningoencefalitis mononuclear severa (flecha), H&E (100x), dilatación de las meninges por infiltrado linfo-histiocitario (recuadro).

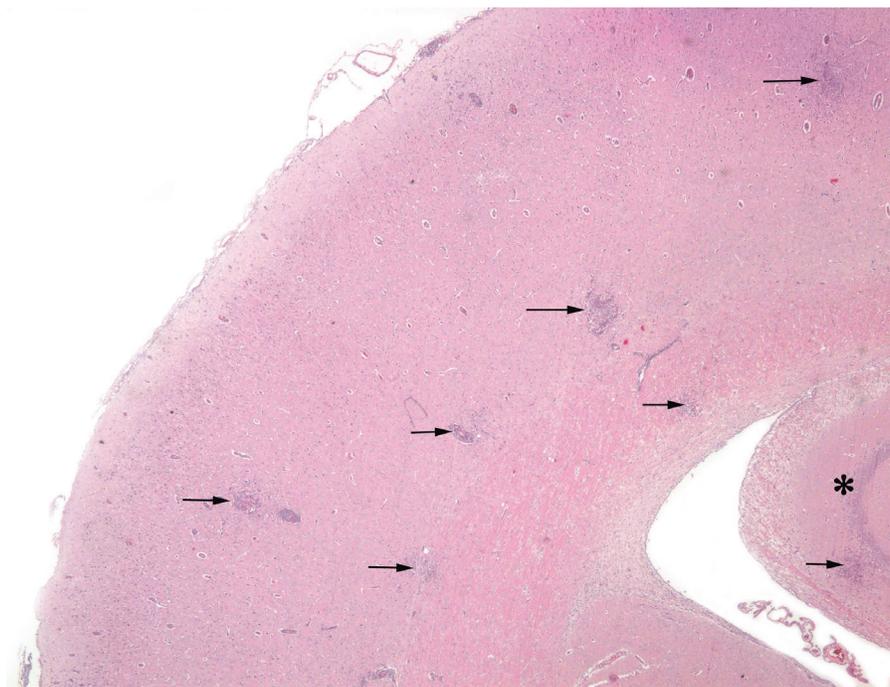


Figura 2. Cerebro e hipocampo (*), encefalitis granulomatosa multifocal severa. Múltiples focos de infiltrado inflamatorio mononuclear (Flecha) H&E 100x.

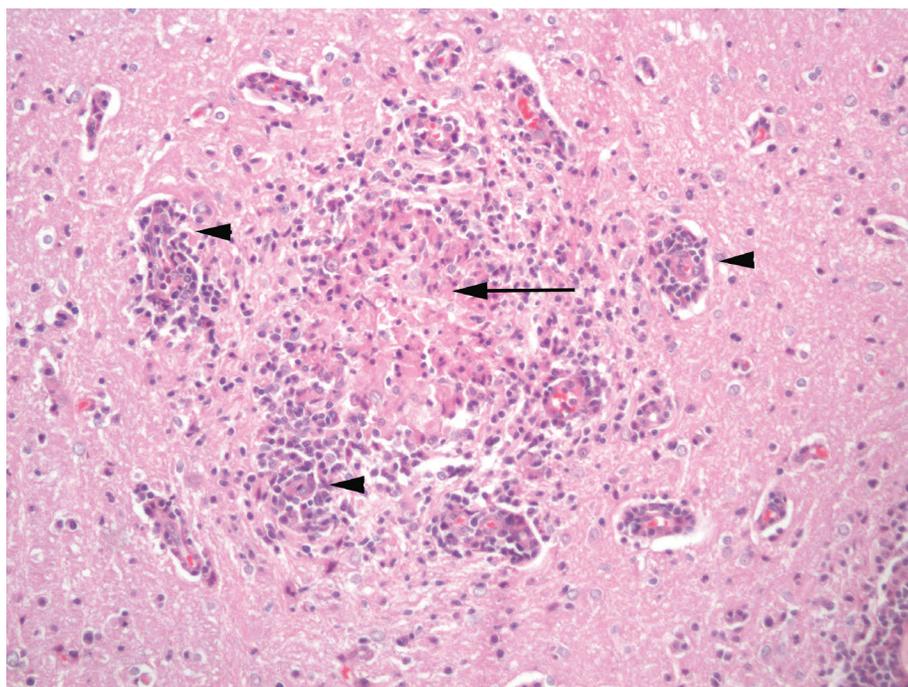


Figura 3. Sistema nervioso central. Focos de necrosis (flecha) asociados a infiltrado inflamatorio granulomatoso. Agregados perivasculares angiocéntricos con linfocitos e histiocitario (punta de flecha) H&E 400x.

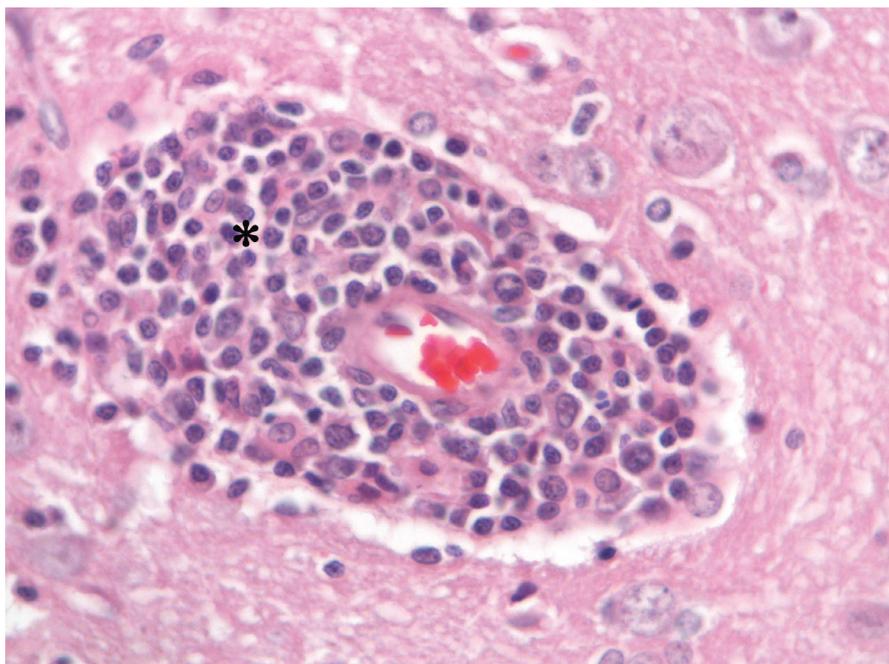


Figura 4. Corteza cerebral. Infiltrado inflamatorio perivascular compuesto predominantemente por linfocitos e histiocitos, en menor grado células plasmáticas H&E 600x.

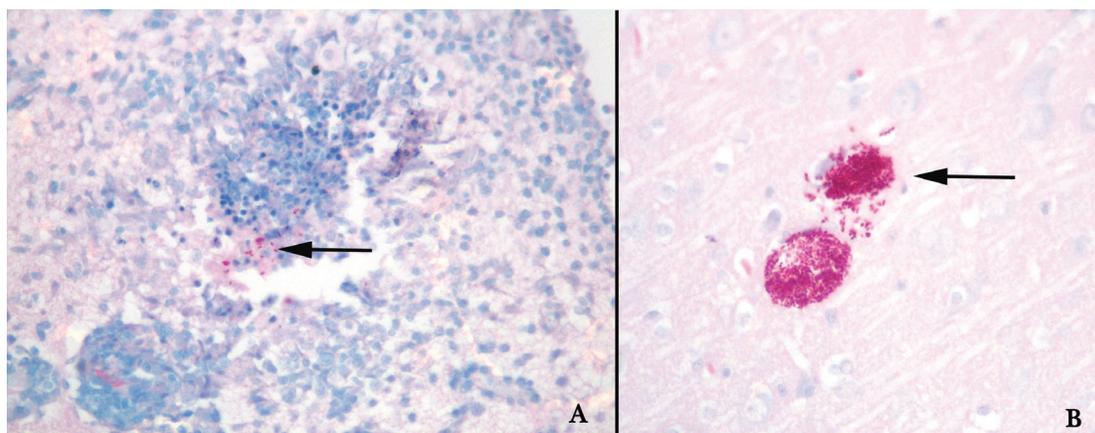


Figura 5. Sistema nervioso central, (A) esporas parasitarias ácido-alcohol resistentes Ziehl Neelsen (Flecha) 100x, (B) magnificación de figura A 400x Tinción de Ziehl Neelsen.

UVEITIS FACOCLÁSTICA

Debido a la proximidad de la úvea con otros tejidos oculares, y a la alta vascularidad de esta estructura, la inflamación uveal es parte de casi todos los procesos de inflamación intraocular (Wagner & Fehr, 2007). La uveítis se asocia a trauma ocular, queratitis ulcerativa, infección sistémica (a causa de *Pasteurella* spp. o *Staphylococcus*) y una ruptura espontánea del lente (uveítis facoclástica) (Kern 1997).

La uveítis facoclástica se ha reportado en diferentes especies; sin embargo, en conejos es una patología no asociada a un insulto traumático previo que predisponga a la ruptura de la cápsula del lente (Wolfer et al. 1993). Más recientemente, hay reportes de uveítis leucocitoclástica asociada a *E. cuniculi* en conejos (Oglesbee 2011; Varga 2014).

Este síndrome se caracteriza por un nódulo inflamatorio blanco adherido al lente o a la porción rota de la cápsula del lente, que se extiende a la cámara anterior y a la úvea anterior. La uveítis facoclástica es secundaria a la ruptura espontánea del lente, generalmente resulta en una uveítis granulomatosa localizada y formación de un granuloma. Histopatológicamente, se observa un infiltrado inflamatorio granulomatoso alrededor de la zona de ruptura de la cápsula del lente (Figuras 6, 7 y 8). Los neutrófilos están presentes, profundamente, dentro de la corteza del lente y están rodeados por un anillo de tejido fibroso que contiene linfocitos y células plasmáticas. En estos animales, el daño se asocia a la presencia de *E. cuniculi* con la ruptura del lente, uveítis y formación de cataratas. La inflamación está más confinada y circunscrita que en el síndrome septicémico y la presencia o no de *E. cuniculi*. Además, puede presentarse abscesos del iris, usualmente encapsulados, y compuestos del acúmulo de neutrófilos degenerados, linfocitos y células plasmáticas (Oglesbee 2011; Varga 2014).

Los mecanismos de transmisión de la enfermedad aún no han sido totalmente descritos, aunque se cree que la transmisión es vertical durante el desarrollo embrionario del lente (Dublielzig et al. 2010). El parásito invade el cristalino de los conejos en desarrollo dentro del útero, cuando la cápsula del cristalino es muy delgada o está ausente. Después del nacimiento, el parásito causa la ruptura de la cápsula del lente, en su punto más delgado en la superficie anterior, provocando la salida del material del lente, en la cámara anterior del ojo, causando una uveítis facoclástica (Varga, 2013).

En la presentación intraocular, también puede darse la presencia de hipopión en los conejos afectados (Rich 2010). Además, el ojo afectado puede estar con hipotonía, y tener una presión intraocular más baja del valor normal (Williams 2012). Generalmente, esta condición es unilateral en conejos afectados por *E. cuniculi* (Harcourt-Brown 2004); sin embargo, la literatura reporta, ocasionalmente, lesiones bilaterales (Künzel et al. 2007). Los signos clínicos incluyen una secreción uveal amarillenta o blanca; una masa de la cámara anterior, que progresa a uveítis; el glaucoma refractario al tratamiento, congestión episcleral y miosis. La extracción temprana del lente se ha sugerido como un tratamiento para prevenir el desarrollo de la uveítis (Aroch et al. 2008). En la evaluación física de conejos, que presenten uveítis facoclástica, normalmente no se aprecian otras alteraciones, por lo que el impedimento visual no debería afectar la calidad de vida de los animales (Künzel et al.

2007). El diagnóstico de la uveítis facoclástica incluye la examinación histológica del lente y los tejidos circundantes o la inmunohistoquímica después de la enucleación. La citología de un aspirado del material del lente, teñido con la tinción tricromo modificada de Weber para detectar las esporas microsporidiales, y el PCR de ese material puede identificar el microsporidio detectado como *E. cuniculi* (Künzel et al. 2007). La uveítis anterior responde pobremente al tratamiento con antibióticos tópicos y corticosteroides. El uso de albendazol ha demostrado detener el progreso de la enfermedad; sin embargo, no resuelve la lesión (Williams 2012). Generalmente, se ha recomendado la extracción del lente afectado, o la enucleación (Wagner & Fehr 2007).

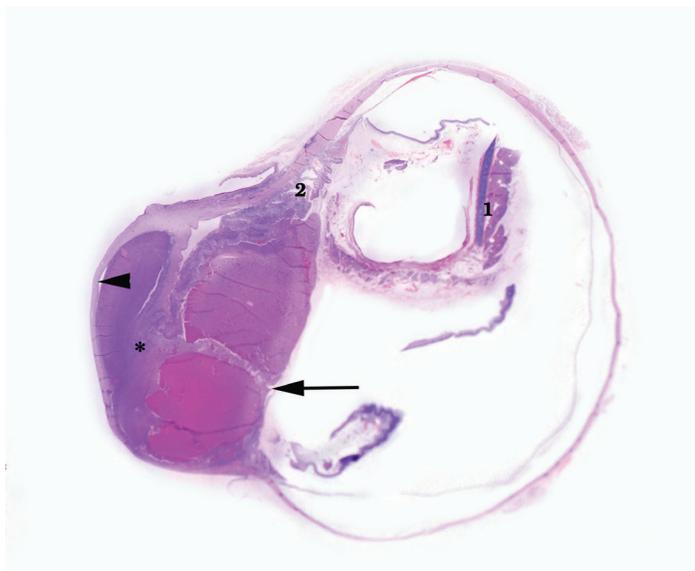
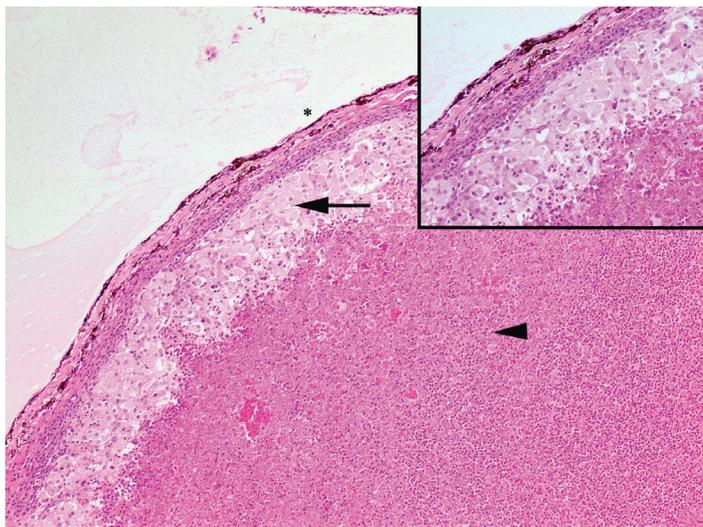


Figura 6: Ojo. Presencia de exudado celular entre córnea (punta de flecha) y lente, extendiéndose hacia la cámara anterior (*) y uvea anterior (2), con ruptura de la cápsula lente (flecha) y desprendimiento de retina (1) submicro H&E.

Figura 7. Ojo: uveítis facoclástica severa. Infiltrado inflamatorio granulomatoso (flecha) adyacente al cuerpo ciliar desprendido de la esclera (*), gran cantidad de material necrótico, células inflamatorias degeneradas y fibrina (punta de flecha) producto del proceso inflamatorio 200x H&E. Gran cantidad de macrófagos con citoplasma amplio espumoso (recuadro) 400x H&E.



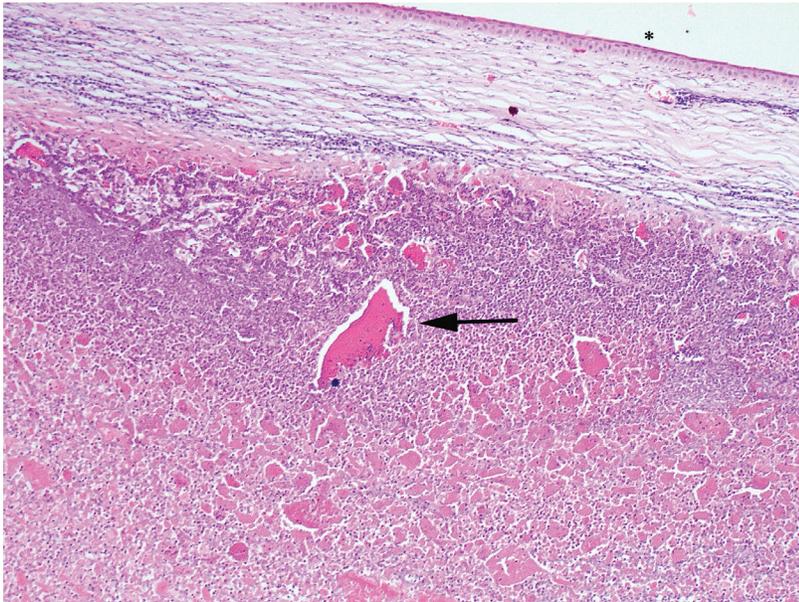


Figura 8. Córnea (*): uveítis facoclástica severa. Restos de cristalino destruido, entremezclado con material necrótico, células inflamatorias degeneradas y fibrina adyacentes a la córnea 400x H&E.

CONCLUSIÓN

Encephalitozoon cuniculi es una causa común de enfermedad neurológica y ocular en conejos domésticos (Grant & Youssef 2007; Gruber et al. 2008; Csokai et al. 2009). Su diagnóstico definitivo es, en muchos casos, difícil. Los análisis serológicos pueden ser difíciles de interpretar ya que títulos positivos pueden ser indicativos de exposición y no de infección verdadera (Keeble & Shaw 2006; Turner 2010). Demostrar la presencia de *E. cuniculi* requiere del uso de histopatología. El estudio histopatológico es un método común para la determinación postmórtem de una infección por *E. cuniculi*, en conjunto con el uso de tinciones especiales de Ziehl Neelsen, ha demostrado ser el método más sensible de diagnóstico post mortem (Csokai et al. 2009; Rich 2010; Turner 2010; Quesenberry & Carpenter, 2012). La encefalitis granulomatosa es la causante de los síndromes neurológicos presentes en la infección aguda, y la muerte por los cambios en el comportamiento (anorexia, tortícolis). El síndrome vestibular es el signo clínico más común de esta enfermedad (Harcourt 2003). Los animales enfermos pueden ser tratados con albendazol, oxcitetraciclina, corticoesteroides, entre otros, con el fin de reducir la inflamación en el sistema nervioso central (Quesenberry & Carpenter 2012). Sin embargo, algunos animales se recuperan del cuadro neurológico sin necesidad de administrar tratamiento alguno (Harcourt 2003).

La uveítis facoclástica, en general, no afecta la calidad de vida del animal. Esta suele presentarse de forma unilateral. Se cree que la presentación de la lesión está asociada con la transmisión vertical del parásito. Cuando existe ruptura del lente ocular, es posible realizar PCR e identificar *E. cuniculi* con este material (Rich 2010). Además, los hallazgos histopatológicos, con la presencia o no del protozooario, el cual puede identificarse con una tinción gram, pues los parásitos son gram positivos o una tinción Ziehl Neelsen

(Dubielzig et al. 2010). Para el tratamiento se puede realizar una enucleación, administrar corticoesteroides y antihelmínticos sistémicos como albendazole o fenbendazole; sin embargo, este tratamiento no revertirá las alteraciones oculares, aunque, si el animal mejora su condición, este es aceptable (Turner, 2010).

BIBLIOGRAFÍA

- Aroch, I., Holmberg, B.J., Sutton, G.A. and B.P. Wilcock. 2008. Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology. Pages 71-72 in General Pathology of the Eye. 4th ed. Saunders Elsevier, USA.
- Csokai, J., Joachim, A., Gruber, A., Tichy, A., Pakozdy, A. and F. Kunzel. 2009. Diagnostic markers for encephalitozoonosis en pet rabbits. *Vet. Parasit.* 163: 18-26.
- Dubliezig, R.R, Ketring, K.L., G.J. McLellan and D.M. Albert. 2010. Veterinary Ocular Pathology: a comparative review. Pages 266-267 in *The Uvea*. Elsevier, UK.
- Garcia, L. 2002. Laboratory Identification of the Microsporidia. *Journal of Clinical Microbiology*. June, 1892-1901.
- Grant, M. and S. Youssef. 2007. Pathology of domestic Animals. Pages 433-434 in *Nervous system*. 5th ed. Elsevier, USA
- Gruber, A., Pakozdy, A., Weissenbock, H., Csokai, J. and F. Kunzel. 2008. A Retrospective Study of Neurological Disease in 118 Rabbits. *J. Comp. Path.* 140: 31-37.
- Harcourt-Brown, F. 2003. Textbook of Rabbit Medicine. Pages 304-305 in *Ophthalmic Diseases*. Science, UK.
- Harcourt-Brown, F.M. 2004. Encephalitozoon cuniculi Infection in Rabbits. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*. 13: 86-93.
- Jeklova, E., Jekl, V., Kovarcik, K., Hauptman, K., Koudela, B., Neumareyova, H., Knotek, Z. and M. Fladyna. 2009. Usefulness of detection of specific IgM and IgG antibodies for diagnosis of clinical encephalitozoonosis in pet rabbits. *Vet. Parasit.* 170: 143-148.
- Keeble, E. J., and D.J. Shaw. 2006. Seroprevalence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in domestic rabbits in the United Kingdom. *Vet. Rec.* 158: 539-544.
- Kern, T.J. 1997. Rabbit and Rodent Ophthalmology. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*. 6: 138-145.
- Künzel, F., Gruber, A., Tichy, A., Edelhofer, R., Nell, B., Hassan J., Leschnik, M., Thalhammer, J. G. and A. Joachim. 2008. Clinical symptoms and diagnosis of encephalitozoonosis in pet rabbits. *Vet. Parasit.* 151: 115-124.
- Quesenberry, K.E., and J.W. Carpenter. 2012. Ferrets, Rabbits and Rodents: Clinical Medicine and Surgery. Pages 246-247 in *Neurologic and Musculoskeletal Diseases*. 3rd ed. Elsevier, USA.

- Lonardi, C., Grilli, G., Ferrazi, V., Dal Cin, M., Rigolin, D. and A. Piccirillo. 2012. Serological survey of *Encephalitozoon cuniculi* infection in commercially reared rabbit does in Northern Italy. Res. Veter. Scien. 94: 295-298.
- Müller, M. 1977. What are the microsporidia? Parasitology Today. 13: 455-456.
- Oglesbee, B. 2011. Blacwell´s Five-Minute Veterinary Consult: Small Mammal. Pages 1023-1024 in Rabbits Anterior Uveitis. 2nd ed. Wiley-Blackwell, UK.
- Ozkan, O., Ozkan, T. A. and K. Zafer. 2010. Encephalitozoonosis in New Zealand Rabbits and potential transmission risk. Vet. Parasit. 179: 234-237.
- Rich, G. 2010. Clinical Update on Testing Modalities for Encephalitozoon cuniculi in clinically Sick Rabbits. J. of. Exot. Pet. Med. 19: 226-230.
- Sieg, J., Hein, J., Jass, A., Sauter-Louis, C., Hartmann, K. and A. Fischer. 2011. Clinical evaluation of therapeutic success in rabbits with suspected encephalitozoonosis. Vet. Parasit. 187: 328-332.
- Szabo J.R. and J.A. Shaddock. 1987. Experimental encephalitozoonosis in neonatal dogs. Veterinary Pathology. 24: 99-108.
- Tee, K.Y., J.P. Kao, H.Y. Chiu, M.H. Chang, J.H. Wang, K.C. Tung, F.P. Cheng, and J.T. Wu. 2011. Serological survey for antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits in Taiwan. Vet. Parasit. 183:68-71.
- Turner, S.M. 2010. Oftalmología de pequeños animales. Páginas 218-219 en Uveítis en Conejos. Elsevier, España.
- Vandeveld, M., Higgins, R., Oevermann, A. 2012. Veterinary Neuropathology Essentials of Theory and Practice. Pages 68-69 in Inflammatory Diseases. Wiley-Blackwell.
- Varga, M. 2014. Textbook of Rabbit Medicine. Pages 363-364 in Ophthalmic Diseases. 2nd ed. Butterworth-Heinemann Elsevier. London, UK.
- Wagnerová, P., B. Sak, D. Kvetonová, M. Marsaleka, I. Langovác and M. Kvác. 2013. Humoral immune response and spreading of *Encephalitozoon cuniculi* infection in experimentally infected ponies. Vet. Parasit. 197:1-6.
- Wagner, F. and M. Fehr. 2007. Common Ophthalmic Problems in Pet Rabbits. J of Ex. Pet. Med. 16: 158-167.
- Wasson, K., and R.L. Pepper. 2000. Mammalian microsporidiosis. Veterinary Pathology. 37: 113-128.
- Williams, D. 2012. Ophthalmology of Exotic Pets. Pages 46-47. The Rabbit Eye. Wiley-Blackwell, UK.
- Wolfer, J., Grahon B., Wilcock, B., Percey, D. 1993. Phagoclastic uveítis in the rabbit. Progress in Veterinary and Comparative Ophthalmology. 3:92-97.