

Aves e cães como potencial fonte de infecção zoonótica por microsporídeos para o Homem

Birds and dogs as potencial sources of zoonotic infections by microsporidia

Nuno Magalhães¹, Maria Luísa Lobo¹, Francisco Antunes^{1,2} e Olga Matos^{*1}

¹Unidade de Protozoários Oportunistas/VIH e Outras Protozooses do Instituto de Higiene e Medicina Tropical

²Clínica das Doenças Infecciosas, Hospital de Santa Maria, Lisboa, Portugal

Resumo: Os animais podem constituir fonte de infecção de microsporídeos para o Homem. Pretendeu-se com o presente trabalho, identificar microsporídeos patogénicos para o Homem, em várias espécies de aves e cães.

Durante o ano de 2004, foram analisadas amostras de fezes de 132 animais, incluindo 44 pombos domésticos, 38 aves exóticas e 50 cães errantes. Os métodos de diagnóstico laboratorial utilizados foram a coloração pelo Gram-chromotrope, a imunofluorescência indirecta (IFI) com o anticorpo monoclonal (AcM) 3B6 e a técnica de reacção em cadeia pela polimerase (PCR).

Neste estudo, a percentagem de amostras positivas para microsporídeos foi de 13% (17/132). As amostras positivas foram detectadas em cinco pombos domésticos, três papagaios cinzentos, duas caturras, um periquito, um diamante estrela, dois tentilhões japoneses e em três cães. *Encephalitozoon hellem* e *Enterocytozoon bienersi* foram as espécies identificadas. Estes resultados obtidos constituem o primeiro registo de infecção por *E. hellem* e *E. bienersi* em aves, em Portugal. Especula-se sobre os possíveis modos de transmissão de microsporídeos, das aves para o Homem. Assim, os pombos domésticos e algumas espécies de aves exóticas e, por outro lado, os pombos domésticos e os cães, constituem fontes potenciais de infecção, respectivamente por *E. hellem* e por *E. bienersi*, para o Homem.

Palavras-chave: microsporidiose, zoonoses, *Enterocytozoon*, *Encephalitozoon*.

Summary: Animals could be a source of infection of microsporidia to humans. The present work intends to determine the occurrence of human pathogenic microsporidia in birds and dogs.

During the year 2004, a total of 132 animals, including 44 free-living pigeons, 38 exotic birds, and 50 stray dogs were examined. The detection of microsporidia was made by Gram-Chromotrope stain, by immunofluorescence staining with fluorescein-labelled monoclonal antibody (MAb) 3B6, and by polymerase chain reaction (PCR).

Of the 132 animals examined, 13% (17/132) were positive for microsporidia (five free-living pigeons, three African grey parrots, two cockatiels, one budgerigar, one star finch, two Bengalese finches, and three stray dogs). The microsporidian species identified were *Encephalitozoon hellem* and *Enterocytozoon*

bienersi. These results represent the first report of *E. hellem* and *E. bienersi* in birds, in Portugal. Possible modes of transmission of microsporidia from birds to humans are discussed. It was concluded that free-living pigeons and some exotic bird species, and free-living pigeons and dogs, are respectively potential sources of *E. hellem* and *E. bienersi* to man.

Keywords: microsporidiosis, zoonosis, *Enterocytozoon*, *Encephalitozoon*.

Introdução

Os microsporídeos são parasitas intracelulares obrigatórios, de distribuição ubiqüitária, pertencentes ao filo *Microsporidia* Balbiani 1882 (Sprague e Becnel, 1998). Estes microrganismos são, ultra-estruturalmente, simples, não apresentando mitocôndrias, nem peroxissomas nem um aparelho de Golgi clássico. Todavia, possuem um organelo, específico deste tipo de microrganismos, que consiste numa estrutura tubular enrolada em hélice, designada de filamento polar (Vávra e Larsson, 1999). A extrusão deste filamento polar, que inocula o esporoplasma na célula hospedeira, constitui o mecanismo primário de infecção dos microsporídeos. Até à data, estão identificadas aproximadamente 1200 espécies, a maioria das quais infecta animais invertebrados e peixes (Didier et al., 2004).

A primeira descrição de um microsporídeo, remonta a meados do século XIX, nas indústrias de sericultura da França e Itália. O agente em causa, *Nosema bombycis*, provoca uma doença no bicho-da-seda, denominada pebrina (Wittner, 1999). Em 1922, foi identificada, acidentalmente, a primeira infecção por microsporídeos em coelhos de laboratório, que desenvolveram sintomatologia nervosa. Este caso, constituiu o primeiro registo de microsporidiose em mamíferos, sendo *Encephalitozoon cuniculi* a causa da doença (Wright e Craighead, 1922).

No Homem, o primeiro caso de microsporidiose, foi descrito no ano de 1959, no Japão, num rapaz de nove anos, com manifestações neurológicas. O agente causador

*Correspondência: Unidade de Protozoários Oportunistas/VIH e outras Protozooses - IHMT
Rua da Junqueira, 96 - 1349-008 Lisboa - Portugal
e-mail: omatos@ihmt.unl.pt
Tel: 351213632600; Fax: 351213632105;

da doença foi identificado como *Encephalitozoon* (Matsubayashi et al., 1959). No período que se seguiu até 1984, houve apenas oito registos de microsporidiose humana, sendo por isso considerada uma doença esporádica. No entanto, poucos anos após o advento da síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA), começaram a surgir casos de microsporidiose humana, em doentes com esta síndrome, provocados por espécies de microsporídeos, até então desconhecidas. Assim, no ano de 1985, foi descoberta a espécie *Enterocytozoon bieneusi*, num doente que sofria de diarreia (Desportes-Livage et al., 1985). Em 1991, foi descrita a espécie *Encephalitozoon hellem*, a partir de lesões de queratoconjuntivite, em três doentes com SIDA (Didier et al., 1991). Dois anos mais tarde, foi descoberta a espécie *Encephalitozoon intestinalis*, inicialmente designada *Septata intestinalis*, isolada também em doentes com SIDA (Cali et al., 1993). Actualmente, conhecem-se 14 espécies de microsporídeos que podem provocar doença no Homem (Didier et al., 2004).

A microsporidiose humana está, com frequência, associada a doentes com deficit imunológico. Apenas um pequeno número de casos tem sido identificado em indivíduos imunocompetentes. Nos últimos anos, as espécies de microsporídeos mais vezes reportadas no Homem foram: *E. bieneusi*, *E. intestinalis*, *E. hellem* e *E. cuniculi*. As duas primeiras espécies, são os principais agentes da microsporidiose intestinal humana.

Nos mamíferos, *E. cuniculi* é o agente causador da encefalitozoonose, afectando em particular, os coelhos, algumas espécies de roedores e os cães (Snowden e Shaddock, 1999). Relativamente às aves, há autores que sugerem, que estes animais constituem o reservatório de *E. hellem* (Suter et al., 1998; Snowden e Logan, 1999).

No cão, a doença provocada por *Encephalitozoon cuniculi* é conhecida por encefalitozoonose canina. O quadro clínico parece desenvolver-se, apenas, nos casos em que há transmissão transplacentária, ou em cães adultos imunodeprimidos. As manifestações nervosas e de insuficiência renal são as mais comuns e afectam, sobretudo, os cachorros, evoluindo amiúde para a morte (Plowright, 1952; Basson et al., 1966; Botha et al., 1979; Stewart et al., 1979). Já foram identificadas outras espécies de microsporídeos no cão, nomeadamente, *E. intestinalis* e *E. bieneusi*, desconhecendo-se, no entanto, a susceptibilidade do cão a estas espécies (Bornay-Llinares et al., 1998; Del Aguila et al., 1999; Lobo et al., 2003).

Nas aves, a maior parte dos casos de infecção por microsporídeos, reporta-se a Psittaciformes (Kemp e Kluge, 1975; Poonacha, et al., 1985; Randall et al., 1986; Black et al., 1997; Pulparampil et al., 1998; Suter et al., 1998; Snowden et al., 2000), embora, já se tenham detectado microsporídeos numa avestruz, em colibris e em diamantes de Gold (Snowden e Logan, 1999; Snowden et al., 2001; Carlisle et al., 2002). Nestes hospedeiros, só a partir de 1997 é que se identificaram espécies de microsporídeos, graças à utilização

de métodos moleculares, tratando-se em todos eles, de infecções por *E. hellem*. A única excepção foi a identificação de *E. bieneusi* isolado em galinhas (Reetz et al., 2002).

Os animais estão envolvidos na epidemiologia de muitas doenças definidoras de SIDA (Glaser et al., 1994). No que respeita à microsporidiose humana, não é claro ainda, se os animais desempenham algum papel na sua epidemiologia. Até à data, a única evidência de transmissão zoonótica de microsporídeos, foi assinalada numa criança, que desenvolveu anticorpos anti-*E. cuniculi*, após ter tido contacto com uma ninhada de cachorros infectada por *E. cuniculi*. O autor deste estudo, sugeriu que a criança, que permaneceu assintomática, terá sido infectada, através do contacto directo com a urina dos cães (McInnes e Stewart, 1991).

Estudos mais recentes, têm vindo a identificar os agentes da microsporidiose humana, em algumas espécies de animais domésticos e silváticos. Estes indícios podem ser aduzidos para se suspeitar da transmissão zoonótica destes agentes infecciosos. Contudo, apesar do estudo das microsporidioses suscitar um interesse crescente, ainda pouco se sabe, sobre a gama de hospedeiros, das várias espécies de microsporídeos e o papel que os animais podem desempenhar na cadeia epidemiológica da microsporidiose. O presente trabalho teve como objectivo pesquisar microsporídeos patogénicos para o Homem, em três grupos de animais: aves exóticas, pombos domésticos e cães errantes.

Material e métodos

População animal estudada

Entre Fevereiro e Outubro de 2004, estudaram-se 38 aves exóticas (Psittaciformes e Passeriformes), 44 pombos domésticos (*Columba livia* var. *domestica*) e 50 cães (*Canis familiaris*).

As espécies de aves exóticas pertencentes à Ordem Psittaciformes foram as seguintes: *Agapornis* spp. (n=1); *Agapornis fischeri* (n=5); *Agapornis personatus* (n=3); *Agapornis roseicollis* (n=4); *Amazona aestiva* (n=1); *Forpus coelestis* (n=1); *Forpus conspicillatus* (n=1); *Melopsittacus undulatus* (n=4); *Nymphicus hollandicus* (n=2); *Platycercus eximius* (n=1); *Psittacus erithacus* (n=8). As espécies de aves pertencentes à Ordem Passeriformes foram as seguintes: *Bathilda ruficauda* (n=1); *Erythrura gouldiae* (n=1); *Leiothrix lutea* (n=1); *Lonchura domestica* (n=2); *Padda oryzivora* (n=1); *Serinus canaria* (n=1). Do total das 38 aves exóticas, 31 pertenciam a um criador de aves, do concelho do Montijo, e sete pertenciam a agregados familiares, da região da grande Lisboa, que possuem estas aves como animais de estimação.

Dos 44 pombos domésticos estudados, 20 foram capturados na Praça do Império e 22 na Rua Epifânio

Dias, em Lisboa. Os cadáveres dos pombos, foram entregues por elementos do Departamento de Higiene Urbana e Resíduos Sólidos da Câmara Municipal de Lisboa, que procedem regularmente à captura de pombos, para controlo da população columbícola. Colheram-se ainda, duas amostras de fezes de pombos, que se encontravam em gaiolas, no Canil Municipal de Lisboa.

Relativamente aos cães, a escolha do local de amostragem, recaiu sobre os Canis Municipais de Lisboa e de Torres Vedras, onde se colheram, respectivamente, 40 e 10 amostras de fezes.

Colheita de material e processamento das amostras

Os produtos biológicos analisados foram as fezes das aves, colhidas nas gaiolas, e as fezes dos cães. Este material foi acondicionado em recipientes individuais de plástico, estéreis, devidamente identificados. As amostras foram transportadas em sacos isotérmicos, junto a acumuladores térmicos e armazenadas a 4 °C.

Também se efectuaram necrópsias a aves (42 *Columba livia* e 4 *Psittacus erithacus*), que permitiram colher material para análise, da traqueia e do intestino. As necrópsias foram realizadas, sempre que possível, no próprio dia de chegada dos cadáveres ao Instituto de Higiene e Medicina Tropical. Quando não foi possível necropsiar no próprio dia, conservaram-se os cadáveres a -20 °C.

O produto da raspagem da traqueia foi utilizado para esfregaços e para posterior análise, pela técnica de reacção em cadeia da polimerase (PCR). Para este efeito, as zaragatoas da traqueia foram mergulhadas em 1,0 ml de solução de fosfato tamponado salino (PBS), fortemente comprimidas contra a parede do tubo, e conservadas a 4 °C.

A pesquisa de microsporídeos no conteúdo intestinal, retirado durante o exame post-mortem, bem como nas fezes dos animais, efectuou-se em 0,5 g de amostra. Para a concentração de esporos, a partir destas amostras, foi adoptado o método modificado de sedimentação água/éter (Matos et al., 2002). Após o processamento do material, prepararam-se, a partir do sedimento, dois esfregaços finos em lâminas tratadas com poli-L-lisina. Os sedimentos foram reunidos num eppendorf de 2 ml e conservados a -20 °C, para posterior análise por PCR.

Diagnóstico parasitológico

A identificação dos microsporídeos foi realizada, em paralelo, por duas técnicas de coloração – Gram-chromotrope (GC) (Moura et al., 1997) e imunofluorescência indirecta (IFI) com o anticorpo monoclonal (AcM) 3B6 (Enriquez et al., 1997; Matos et al., 2002) – e pela técnica de PCR.

Assim, os esfregaços foram corados pelas duas técnicas supracitadas, considerando-se a amostra positiva, sempre que foram identificados três ou mais esporos (Weber et al., 1992; DeGirolami et al., 1995). Os esporos das espécies de microsporídeos, que infec-

tam os mamíferos e as aves, têm uma forma oval, medindo entre 1,0–3,0 µm x 1,5–4,0 µm (Didier, 1998; Vávra e Larsson, 1999). Como controlo positivo, para as técnicas de coloração, processaram-se em idênticas condições, produtos biológicos de humanos, que se sabia estarem contaminados por microsporídeos.

Extracção de DNA

Para o isolamento de DNA a partir dos vários tipos de amostras, utilizou-se uma adaptação do método Mini-BeadBeater/sílica (Alves et al., 2001; Matos et al., 2004). Assim, a 0,3 g de partículas de zircónio, 900 µl de tampão de lise e 60 µl de álcool isoamílico, adicionaram-se 400 µl de amostra. A mistura foi agitada no Mini-BeadBeater, durante dois minutos e meio, de modo a provocar a quebra mecânica da parede dos esporos. De seguida, centrifugou-se a mistura à velocidade de 20200 x g, durante 15 segundos e recolheu-se o sobrenadante. Depois, adicionaram-se 40 µl de suspensão aquosa de sílica em pó (SiO₂) (1% [p/v]; pH 2,0), ao produto de lise dos esporos e agitou-se suavemente a suspensão num agitador electrónico, durante 30 minutos, à temperatura ambiente. Após a agitação, centrifugou-se a suspensão à velocidade de 20200 x g, durante 15 segundos e desprezou-se o sobrenadante, seguindo-se a lavagem do DNA, composta por quatro etapas. Cada lavagem consiste em ressuspender a sílica numa solução, centrifugar à velocidade de 20200 x g, durante 15 segundos, e rejeitar o sobrenadante. As duas primeiras lavagens foram efectuadas com 200 µl de tampão de lavagem, e as duas últimas, com 200 µl de etanol 80% e acetona absoluta. Após a última lavagem, colocou-se o sedimento resultante na incubadora, à temperatura de 55 °C, até à evaporação completa do solvente. Por último, ressuspendeu-se a sílica com DNA, em 40 µl de água destilada estéril e incubou-se a 55 °C, durante cinco minutos. Após a incubação, sedimentou-se a sílica por centrifugação a 20200 x g, durante dois minutos. Recolheu-se o sobrenadante (solução de DNA) para um eppendorf limpo e conservou-se a solução a -20 °C.

Identificação das espécies de microsporídeos

A identificação, pela técnica de PCR, das espécies de microsporídeos, é baseada na amplificação do gene (SSU-rRNA), que codifica a pequena subunidade do ribossoma. Para a identificação molecular, ao nível da espécie, foram utilizados pares de primers, específicos para *E. bienersi* (Da Silva et al., 1996), *E. intestinalis* (Da Silva et al., 1997), *E. cuculi* e *E. hellem* (Visvesvara et al., 1994). A amplificação foi realizada em 25 µl de solução, contendo tampão de PCR 1x, 3 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 10 pmol/ml de cada primer, 1U/µl de Taq polimerase e 8,0 µl de solução de DNA. Para cada uma das reacções, foi preparado um tubo de controlo negativo, em que a amostra foi substituída por água esterilizada, e um

tubo de controlo positivo, em que a amostra foi substituída por DNA da espécie a pesquisar. A reacção de amplificação, para *E. bienewisi*, *E. cuniculi* e *E. hellem*, consistiu num passo de três minutos a 94 °C, seguido de 36 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 55 °C e 90 segundos a 72 °C e de um segundo passo de nove minutos a 72 °C. Para a detecção de *E. intestinalis* a reacção de amplificação consistiu num passo de três minutos a 94 °C, seguido de 36 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 45 °C e 90 segundos a 72 °C e de um segundo passo de 10 minutos a 72 °C. As reacções de amplificação foram realizadas num termociclador (Perkin Elmer, modelo 480).

Os produtos de amplificação foram analisados em gel de agarose (Seakem) a 2% (m/v) em tampão TAE 1x [Tris-acetato 0,4 M, EDTA 0,01 M, pH 8,3]. Para a coloração do DNA, incorporou-se no gel 5,0 µl/ml de brometo de etídio. As bandas de DNA foram visualizadas no sistema Eagle Eye II (Stratagene), sendo as imagens captadas por câmara de vídeo e digitalizadas para análise em computador.

Crítérios de positividade. Uma amostra foi considerada positiva, quando obedecia aos seguintes critérios de positividade: positiva em ambas as técnicas de coloração (GC e IFI com AcM 3B6); positiva por uma técnica de coloração, se confirmada por PCR; positiva quando se conseguiu detectar o gene SSU-rRNA pela técnica de PCR.

Resultados e discussão

De entre os 132 animais estudados, a proporção de resultados positivos, para microsporídeos, foi de 13% (17/132). A proporção de resultados positivos em cada grupo de animais estudados, distribui-se do seguinte modo: aves exóticas 23,6% (9/38); pombos domésticos 11,4% (5/44); cães 6% (3/50).

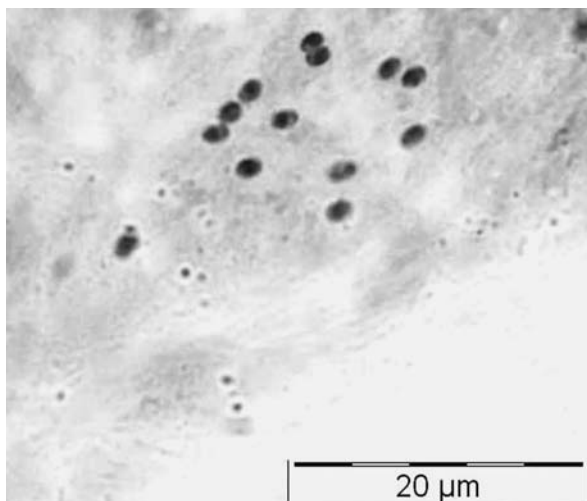


Figura 1 - Esmregaço da mucosa traqueal de um papagaio cinzento (*Psittacus erithacus*). Coloração pelo Gram-chromotrope

Dos 17 casos positivos, 13 foram identificados até à espécie, pela técnica de PCR. As espécies de microsporídeos identificadas e respectivos hospedeiros, constam no Quadro 1. Nos restantes quatro casos positivos, a identificação dos microsporídeos foi feita pelas técnicas de Gram-chromotrope e IFI com AcM 3B6, tendo os resultados destas amostras sido negativos, pela técnica de PCR.

Da análise dos resultados obtidos, pelas diferentes técnicas, verifica-se que nem sempre houve conformidade dos resultados. Dos 17 casos positivos, identificados neste trabalho, nove (53%) foram apenas detectados pela técnica de PCR, quatro (23,5%) foram detectados por PCR e por mais uma técnica de coloração, e quatro (23,5%) foram detectados, apenas, pelas duas técnicas de coloração. A discordância de resultados pode estar relacionada com o limite de detecção de esporos de cada técnica. Um estudo cego, que comparou a qualidade dos parâmetros de detecção da técnica de PCR e de uma técnica de coloração (tricrómio modificado), indicou um limite de detecção de 10^2 esporos por ml para a PCR, e de 10^4 esporos por ml para a técnica de coloração (Rinder et al., 1998). Em contrapartida, houve quatro casos positivos, para ambas as técnicas de coloração, não confirmados por PCR. Este facto justifica a utilização simultânea de técnicas de coloração e de métodos moleculares, de modo a aumentar a sensibilidade do rastreio.

Relativamente às espécies de aves em que se identificou *E. hellem*, não se encontrou qualquer referência bibliográfica, que as mencionasse, como hospedeiros de *E. hellem*. Todavia, um trabalho realizado na Austrália, já tinha sugerido que o tentilhão japonês, poderia ser hospedeiro de *E. hellem* (Carlisle et al., 2002).

Estes achados, não constituem uma total surpresa, considerando que *E. hellem* tem sido observado num número crescente de espécies de aves domésticas e silváticas. O caso considerado mais surpreendente, corresponde à observação de *E. bienewisi* em pombos domésticos, não só porque há somente um registo de infecção por *E. bienewisi*, em aves, mas, também, porque não se encontrou nenhuma referência de infecções, por microsporídeos, em pombos.

No que diz respeito aos microsporídeos, não identificados até à espécie, detectados num periquito e numa caturra, é plausível que pertençam à espécie *E. hellem*, uma vez que, se trata da única espécie de microsporídeo observada em Psittaciformes, para além de esta espécie já ter sido reportada em periquitos (Black et al., 1997).

Relativamente aos aspectos clínicos das aves infectadas por *E. hellem*, não havia sintomas nem sinais, que levassem a pensar que as aves estivessem doentes. Assim, e à semelhança do que acontece no Homem, a microsporidiose poderá ser, também, uma doença oportunista nas aves.

Também se optou por pesquisar *E. intestinalis* e *E.*

Quadro 1 - Animais positivos para a pesquisa de microsporídeos

Animais	Microsporídeos	Produtos biológicos	Origem
Diamante estrela (<i>Bathilda ruficauda</i>)	<i>E. hellem</i>	Fezes	Criador de aves
Tentilhão japonês (<i>Lonchura domestica</i>)	<i>E. hellem</i>	Fezes	Criador de aves
Tentilhão japonês (<i>Lonchura domestica</i>)	<i>E. hellem</i>	Fezes	Criador de aves
Papagaio cinzento (<i>Psittacus erithacus</i>)	<i>E. hellem</i>	Raspagem da traqueia	Criador de aves
Papagaio cinzento (<i>Psittacus erithacus</i>)	<i>E. hellem</i>	Fezes	Criador de aves
Papagaio cinzento (<i>Psittacus erithacus</i>)	<i>E. hellem</i>	Fezes	Criador de aves
Caturra (<i>Nymphicus hollandicus</i>)	<i>E. hellem</i>	Fezes	Particular
Caturra (<i>Nymphicus hollandicus</i>)	Microsporídeos	Fezes	Criador de aves
Periquito (<i>Melopsittacus undulatus</i>)	Microsporídeos	Fezes	Criador de aves
Pombo doméstico (<i>Columba livia</i>)	<i>E. hellem</i>	Conteúdo intestinal	Praça Império
Pombo doméstico (<i>Columba livia</i>)	<i>E. hellem</i>	Conteúdo intestinal	R. Epifânio Dias
Pombo doméstico (<i>Columba livia</i>)	<i>E. hellem</i>	Raspagem da traqueia e conteúdo intestinal	R. Epifânio Dias
Pombo doméstico (<i>Columba livia</i>)	<i>E. hellem</i> e <i>E. bienersi</i>	Fezes	Canil Mun. Lisboa
Pombo doméstico (<i>Columba livia</i>)	<i>E. hellem</i> e <i>E. bienersi</i>	Fezes	Canil Mun. Lisboa
Cão (<i>Canis familiaris</i>)	Microsporídeos	Fezes	Canil Mun. Lisboa
Cão (<i>Canis familiaris</i>)	Microsporídeos	Fezes	Canil Mun. Lisboa
Cão (<i>Canis familiaris</i>)	<i>E. bienersi</i>	Fezes	Canil Mun. Torres Vedras

cuniculi, nas amostras de fezes das aves. Os resultados da pesquisa foram todos negativos, permanecendo a ideia de que estas espécies só infectam mamíferos.

Como já foi referido, alguns autores ventilam a hipótese de as aves serem os reservatórios de *E. hellem* e os humanos serem, apenas, hospedeiros acidentais, desenvolvendo a doença apenas em condições de imunodepressão. Mas, como poderá *E. hellem* ser transmitido das aves para o Homem? Um investigador inglês (Curry, 1999), traça um modo pos-

sível de transmissão dos esporos de microsporídeos, das aves para o Homem, isto é, nas aves as infecções por microsporídeos localizam-se, com frequência, no intestino e nos rins, sendo os esporos eliminados nos dejectos. Como o teor de água dos dejectos das aves é muito reduzido, estes secam rapidamente, propiciando à formação de poeiras. A inalação destas poeiras orgânicas, contendo esporos viáveis, pode desencadear infecção no Homem, particularmente se estiver imunodeprimido. Saliente-se que, os microsporídeos

patogénicos para o Homem medem entre 1 e 3 mm, podendo, assim, ser transportados pelas poeiras ditas inaláveis (<5 mm), isto é, que podem atingir o alvéolo pulmonar. Este modo de transmissão está descrito para outros agentes patogénicos, nomeadamente *Histoplasma capsulatum* e *Chlamydomyces psittaci*.

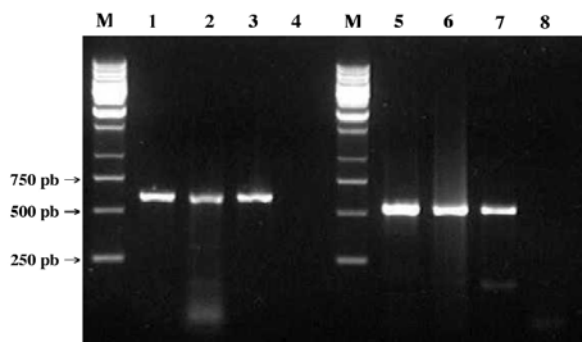


Figura 2 - Análise de fragmentos de DNA em gel de agarose. Legenda: M- marcador de peso molecular; 1 e 5 - controlos positivos de *E. bienewisi* e *E. hellem*, respectivamente. 2 e 3 - amostras de pombos domésticos positivas para *E. bienewisi*; 4 e 8 - controlos negativos; 6 e 7 - amostras de papagaio cinzento e diamante estrela, respectivamente, positivas para *E. hellem*.

Relativamente aos cães em que se detectaram microsporídeos, tratava-se de animais adultos aparentemente sãos. A detecção de *E. bienewisi*, numa amostra de fezes de cães, não foi de todo inesperada, uma vez que esta espécie já tinha sido reportada em Portugal e em Espanha (Del Aguila et al., 1999; Lores et al., 2002; Lobo et al., 2003).

As espécies *E. cuniculi* e *E. intestinalis*, não foram, também, identificadas nas fezes dos cães. O facto de não se ter pesquisado *E. cuniculi* na urina, pode justificar o insucesso na detecção desta espécie. No entanto, de acordo com as referências bibliográficas consultadas, quer *E. intestinalis*, quer *E. cuniculi*, ainda não foram isolados em cães, na Europa, por métodos microscópicos ou moleculares.

A identificação de microsporídeos, potencialmente patogénicos para o Homem, em amostras de aves exóticas, pombos domésticos e cães, alerta para o potencial zoonótico desta doença. A caracterização genotípica dos isolados, aqui encontrados, constitui o próximo passo no estudo epidemiológico da microsporidiose, em Portugal.

Agradecimentos

Os autores agradecem a colaboração do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, da Câmara Municipal de Lisboa, do Canil Municipal de Torres Vedras e de Luís Baião.

Bibliografia

- Alves M, Matos O, Antunes F (2001). Multilocus PCR-RFLP analysis of *Cryptosporidium* isolates from HIV-infected patients from Portugal. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 95: 627-632.
- Basson PA, McCully RM, Warnes WEJ (1966). Nosematosis: report of a canine case in the Republic of South Africa. *Journal of the South African Veterinary Medical Association*, 37 (1): 3-9.
- Black SS, Steinohrt LA, Bertucci DC, Rogers LB, Didier ES (1997). *Encephalitozoon hellem* in *Budgerigars* (*Melospittacus undulatus*). *Veterinary Pathology*, 34 (3): 189-198.
- Bornay-Llinares FJ, Silva AJ, Moura H, Schwartz DA, Visvesvara GS, Pieniazek NJ, Cruz-López A, Hernández-Jauregui P, Guerrero J, Enriquez FJ (1998). Immunologic, microscopic and molecular evidence of *Encephalitozoon intestinalis* (*Septata intestinalis*) infection in mammals other than humans. *Journal of Infectious Diseases*, 178: 820-826.
- Botha WS, Van Dellen AF, Stewart CG (1979). Canine encephalitozoonosis in South Africa. *Journal of the South African Veterinary Association*, 50 (2): 135-144.
- Cali A, Kotler D, Orenstein J (1993). *Septata intestinalis* N. G., N. sp., an intestinal microsporidian associated with chronic diarrhea and dissemination in AIDS patients. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 40 (1): 101-112.
- Carlisle MS, Snowden K, Gill J, Jones M, O'Donoghue P, Prociv P (2002). Microsporidiosis in a Gouldian finch (*Erythrura [Chloebia] gouldiae*). *Australian Veterinary Journal*, 80 (1/2): 41-44.
- Curry A (1999). Human microsporidial infection and possible animal sources. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 12: 473-480.
- Da Silva AJ, Schwartz DA, Visvesvara GS, Moura H, Slemenda SB, Pieniazek NJ (1996). Sensitive PCR diagnosis of infectious by *Enterocytozoon bienewisi* (Microsporidia) using primers based on the region coding for small-subunit rRNA. *Journal of Clinical Microbiology*, 34 (4): 986-987.
- Da Silva AJ, Slemenda SB, Visvesvara GS, Schwartz DA, Mel-Wilcox C, Wallace S, Pieniazek NJ (1997). Detection of *Septata intestinalis* (Microsporidia) Cali et al. 1993 using polymerase chain reaction primers targeting the small subunit ribosomal RNA coding region. *Molecular Diagnostic*, 2: 47-52.
- DeGirolami PC, Ezratty CR, Desai G, McCullough A, Asmuth D, Wanke C, Federman M (1995). Diagnosis of intestinal microsporidiosis by examination of stool and duodenal aspirate with Weber's modified trichrome and uvitex 2B stains. *Journal of Clinical Microbiology*, 33 (4): 805-810.
- Del Aguila C, Izquierdo F, Navajas R, Pieniazek NJ, Miró G, Alonso A, Da Silva A, Fenoy S (1999). *Enterocytozoon bienewisi* in animals: rabbits and dogs as new hosts. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 46 (5): 8S-9S.
- Desportes-Livage I, Le Charpentier Y, Galian A, Bernard FB, Cochand-Priollet B, Lavergne A, Ravisse F, Modigliani R (1985). Occurrence of a new microsporidian: *Enterocytozoon bienewisi* n. g., n. sp., in the enterocytes of a human patient with AIDS. *Journal of Protozoology*, 32: 245-250.

- Didier ES, Didier PJ, Friedberg DN, Stenson SM, Orenstein JM, Yee RW, Tio FO, Davis RM, Vossbrinck CR, Millichamp N, Shaddock JA (1991). Isolation and characterization of a new human microsporidian, *Encephalitozoon hellem* (n. sp.), from three AIDS patients with keratoconjunctivitis. *Journal of Infectious Diseases*, 163: 617-621.
- Didier E (1998). Microsporidiosis. *Clinical Infectious Diseases*, 27: 1-8.
- Didier ES, Stovall ME, Green LC, Brindley PJ, Sestak K, Didier PJ (2004). Epidemiology of microsporidiosis: sources and modes of transmission. *Veterinary Parasitology*, 126: 145-166.
- Enriquez FJ, Ditrich O, Palting JD, Smith K (1997). Simple diagnosis of *Encephalitozoon* sp. microsporidial infections by using a panspecific antiexospore monoclonal antibody. *Journal of Clinical Microbiology*, 35 (3): 724-729.
- Glaser CA, Angulo FJ, Rooney JA (1994). Animal-associated opportunistic infections among persons infected with the human immunodeficiency virus. *Clinical Infectious Diseases*, 18: 14-24.
- Kemp RL, Kluge JP (1975). *Encephalitozoon* sp. in the blue-masked lovebird, *Agapornis personata* (Reichenow): first confirmed report of microsporidia infection in birds. *Journal of Protozoology*, 22 (4): 489-491.
- Lobo ML, Teles A, Cunha MB, Henriques J, Lourenço AM, Antunes F, Matos O (2003). Microsporidia detection in stools from pets and animals from the zoo in Portugal: a preliminary study. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 50 (6): 581-582.
- Lores B, Del Aguila C, Arias C (2002). Enterocytozoon *bieneusi* (Microsporidia) in faecal samples from domestic animals from Galicia, Spain. *Memórias do Instituto Oswaldo da Cruz*, 97 (7): 941-945.
- Matos O, Lobo LM, Gonçalves L, Antunes F (2002). Diagnostic use of 3 techniques for identification of microsporidian spores among AIDS patients in Portugal. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 34: 591-593.
- Matos O, Lobo ML, Teles A, Antunes F (2004). Is microsporidial infection in animals a potential source for human microsporidiosis? *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 35 (Suppl 1): 48-53.
- Matsubayashi H, Koike T, Mikata T, Hagiwara S (1959). A case of *Encephalitozoon*-like body infection in man. *Archives in Pathology*, 67: 181-187.
- McInnes EF, Stewart CG (1991). The pathology of subclinical infection of *Encephalitozoon cuniculi* in canine dams producing pups with overt encephalitozoonosis. *Journal of the South African Veterinary Association*, 62 (2): 51-54.
- Moura HDA, Schwartz DA, Bornay-Llinares FJ, Sodr e FC, Wallace S, Visvesvara GS (1997). A new improved "quick-hot Gram-chromotrope" technique that differentially stains microsporidian spores in clinical samples, included paraffin-embedded tissue sections. *Archives in Pathology Laboratory Medicine*, 121: 888-893.
- Plowright W (1952). An encephalitis-nephritis syndrome in the dog probably due to congenital *Encephalitozoon* infection. *Journal of Comparative Pathology*, 62: 83-92.
- Poonacha KB, William PD, Stamper RD (1985). *Encephalitozoonosis* in a parrot. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 186 (7): 700-702.
- Pulparampil N, Graham D, Phalen D, Snowden K (1998). *Encephalitozoon hellem* in two eclectus parrots (*Eclectus roratus*): identification from archival tissues. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 45 (6): 651-655.
- Randall CJ, Lees S, Higgins RJ, Harcourt-Brown NH (1986). Microsporidian infection in lovebirds (*Agapornis* spp.). *Avian Pathology*, 15: 223-231.
- Reetz J, Rinder A, Thomschke A, Manke H, Schwebs M, Bruderek A (2002). First detection of the microsporidium *Enterocytozoon bieneusi* in non-mammalian hosts (chickens). *International Journal of Parasitology*, 32 (7): 785-787.
- Rinder H, Janitschke K, Aspöck H, Silva A, Deplazes P, Fedorko DP, Futh U, Hüngrer F, Lehmacher A, Meyer CG, Molina JM, Sandfort J, Weber R, Löscher T (1998). Blinded, externally controlled multicenter evaluation of light microscopy and PCR for detection of Microsporidia in stool specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 36 (6): 1814-1818.
- Snowden K, Logan K (1999). Molecular identification of *Encephalitozoon hellem* in an ostrich. *Avian Diseases*, 43: 779-782.
- Snowden KF, Shaddock JA (1999). Microsporidia in higher vertebrates. In Wittner M, Weiss LM (eds.), *The Microsporidia and Microsporidiosis*. American Society of Microbiology, Washington DC, pp. 393-417.
- Snowden KF, Logan K, Phalen DN (2000). Isolation and characterization of an avian isolate of *Encephalitozoon hellem*. *Parasitology*, 121: 9-14.
- Snowden K, Daft B, Nordhausen RW (2001). Morphological and molecular characterization of *Encephalitozoon hellem* in hummingbirds. *Avian Pathology*, 30: 251-255.
- Sprague V, Becnel JJ (1998). Note on the Name-Author-Date combination for the taxon *Microsporidies Balbiani*, 1882, when ranked as a Phylum. *Journal of Invertebrate Pathology*, 71: 91-94.
- Stewart CG, Van Dellen AF, Botha WS (1979). Canine encephalitozoonosis in kennels and the isolation of *Encephalitozoon* in tissue culture. *Journal of the South African Veterinary Association*, 50 (3): 165-168.
- Suter C, Mathis A, Hoop R, Deplazes P (1998). *Encephalitozoon hellem* infection in a yellow-streaked lorry (*Chalcopsitta scintillata*) imported from Indonesia, 143 (25): 694-695.
- Vávra J, Larsson JIR (1999). Structure of the Microsporidia. In Wittner M, Weiss LM (eds.), *The Microsporidia and Microsporidiosis*, American Society of Microbiology, Washington DC, pp. 7-84.
- Visvesvara GS, Leitch GJ, Da Silva AJ, Croppo GP, Moura H, Wallace S, Slemenda SB, Schwartz DA, Moss D, Bryan RT, Pieniazek NJ (1994). Polyclonal and monoclonal anti-body and PCR-amplified small-subunit rRNA identification of a microsporidian, *Encephalitozoon hellem*, isolated from an AIDS patient with disseminated infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 32 (11): 2760-2768.
- Weber R, Bryan RT, Owen RL, Wilcox CM, Gorelkin L, Visvesvara GS (1992). Improved light-microscopical detection of microsporidia spores in stool and duodenal aspirates. *New England Journal of Medicine*, 326 (3): 161-166.
- Wittner M (1999). Historic perspective on the Microsporidia: expanding horizons. In Wittner M, Weiss LM (eds.), *The Microsporidia and Microsporidiosis*, ASM Press, Washington D.C., p.1-6.
- Wright JH, Craighead EM (1922). Infectious motor paralysis in young rabbits. *Journal of Experimental Medicine*, 36: 135-140.