

CRIPCOCOSIS EN OVINOS: AISLAMIENTO DE UNA CEPA RINOTROPICA Y ESTUDIO ANATOMOPATOLOGICO

Ovine Cryptococcosis: Isolation of a rhinotropic strain and pathologic anatomy study

Francisco Yegres^{*}
Oswaldo Vale Echeto^{**}
Nicole Richard Yegres^{*}
Guillermo Zeppenfeldt^{*}
Frank Arias

^{*} Programa de Medicina
Universidad Nacional Experimental "Francisco de Miranda"
Apartado 7482. Coro, Estado Falcón, Venezuela

^{**} Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad del Zulia
Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela

RESUMEN

Se tomó una biopsia de un abultamiento en el área nasofacial de un ovino hembra, preñada, mestiza West African de tres 3 años de edad y 25 Kg. de peso. Al examen directo del exudado se observaron abundantes levaduras encapsuladas características del *Cryptococcus neoformans* (*C. neoformans*), la cepa fue aislada en agar dextrosa Sabouraud (SDA) y crecida en agar niger. Se realizó una evaluación histopatológica de la biopsia, observándose numerosas levaduras encapsuladas en una malla de tejido conectivo fibroso con gran cantidad de leucocitos (neutrófilos, macrófagos y linfocitos) en el área de la dermis. El animal fue sacrificado posterior al parto, presentando evidencia de caquexia avanzada e inanición. Se realizaron evaluaciones macroscópicas e histopatológicas, observando una masa de tejido blando, mucinoso, gelatinoso, de color gris ambarino, cubierta por epitelio cutáneo lacerado en el área nasofacial izquierda. Histopatológicamente la masa estaba constituida por tejido fibroconectivo laxo mucinoso, en forma de malla, había gran cantidad de células inflamatorias similares a las de la biopsia, en conjunto con estructuras levaduriformes translúcidas, encapsuladas, de 3 a 9 micras de diámetro, con colágeno y fibrocitos. Se realizó coloración especial de Mucicarmín, evidenciando las características típicas del *C. neoformans*. La cepa aislada fue

experimentalmente inoculada en ratones a nivel del área nasal, reproduciendo las lesiones en estos animales.

Palabras claves: Cryptococcosis, ovino, biopsia, necropsia, inoculación.

ABSTRACT

A biopsy sample was taken from a swelling on the nasofacial area of a pregnant West African ewe, 3 years old and 25 Kg of body weight. On the direct examination great number of capsulated yeasts of *Cryptococcus neoformans* (*C. neoformans*) were observed; the strain was isolated in dextrose Sabouraud agar (DSA) and grown in niger agar. The cutaneous biopsy sample was histopathologically evaluated and a great number of capsulated yeasts were seen in a matrix of collagen and connective tissue along with a number of leukocytes (neutrophils, lymphocytes and macrophages) in the dermal layer. The ewe was euthanized after lambing, showing caquexia and starvation. A pathologic anatomy study was done and there was a soft-gray mass of tissue covered by a lacerated epithelium on the left nasofacial area, and there were other pathologic changes described. Histopathologically, the mass of tissue was composed of mucinous fibroconnective tissue on a net fashion, with a great number of leukocytes similar to those seen in the biopsy; besides, there were many 3 to 9 microns of diameter yeasts with collagen and fibrocytes. A special mucicarmine staining method was made to show the typical characteristics of the *C. neoformans*. The isolated strain

was experimentally inoculated in the nasal area of white mice, reproducing the lesion in these animals.

Key words: Cryptococosis, ovine, biopsy, necropsy, inoculation.

INTRODUCCIÓN

La Criptococosis es una enfermedad micótica sistémica causada por la levadura *Cryptococcus neoformans*, la cual se adquiere por inhalación [2]. La infección primaria ocurre en pulmón y suele diseminarse al sistema nervioso central si no se diagnostica a tiempo [3]. Los serotipos existentes en Venezuela son A,B y D [9]. El hongo *C. neoformans* ha sido relacionado con gallineros y palomares; estas aves estarían protegidas por su elevada temperatura corporal. Se han descrito casos en equinos, felinos y bovinos, reportándose mastitis por *Cryptococcus* en vacas lecheras [1,2,6]. En el presente estudio patológico y micológico se describe un caso espontáneo de Criptococosis nasofacial en un ovino hembra West-African, procedente del área de Cebollal, Municipio Miranda del Estado Falcón. También se comprueba la patogenicidad de la cepa aislada del ovino por inoculación experimental en ratones blancos [5]. Existen reportes de la existencia de la enfermedad como zoonosis en diferentes especies animales e incluso en el hombre [6]. Los objetivos del presente trabajo son, reportar un caso natural de Criptococosis espontánea en ovinos y el aislamiento de la cepa mediante técnicas micológicas. También se establece un estudio anatomopatológico y se mide el poder patógeno a través de la inoculación de animales experimentales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Un ovino hembra West-African en avanzado estado de gestación fue reportado en el área de Cebollal, Estado Falcón, con una lesión en el área nasofacial izquierda. Se tomó una biopsia por incisión del tejido lesionado y se permitió que el animal tuviera su parto normal. El animal fue tratado con Ketoconazol y yoduro de sodio en el área de la lesión. Posteriormente el animal fue sacrificado para realizar el estudio anatomopatológico [4]. Ratones blancos de laboratorio fueron inoculados experimentalmente con la cepa del hongo previamente aislada.

Estudio micológico

Se realizó un examen directo de la muestra con tinta china. La cepa fue aislada y mantenida en agar Sabouraud. Para la confirmación de la producción de fenoloxidasas el hongo creció en medio de cultivo con extracto de *Guizotia abyssinica* (agar niger).

Biopsia

Se tomó una muestra del tejido obtenido y fue procesada mediante las técnicas rutinarias para tejidos animales y coloreada con Hematoxilina y Eosina [7]. La muestra fue evaluada al microscopio de luz.

Necropsia

El ovino fue sacrificado posterior al parto gemelar, y exanguinado para el estudio anatomopatológico. Se realizó la técnica de necropsia rutinaria mediante incisión ventral y se abordaron los órganos de las cavidades torácicas y abdominal para su correspondiente evaluación [4]. Los cambios patológicos observados fueron fotografiados y los tejidos fueron recolectados y fijados en solución de formalina al 10%, en frascos de vidrio con tapa metálica, por tres días [7].

Los tejidos fijados fueron recortados y colocados en cestas plásticas para el procesamiento de lavado, deshidratación, inclusión, rehidratación y montaje. Las técnicas de coloración fueron Hematoxilina-Eosina (H-E), Mucicarmín y Grocott, según descritas en el manual de técnicas para tejidos animales [7]. Las muestras fueron evaluadas al microscopio de luz y fueron tomadas microfotografías.

Las muestras de tejidos fueron utilizadas para la realización de frotis por aposición y siembra del material en medio de cultivo selectivo. Los frotis fueron clarificados con KOH (Hidróxido de Potasio) al 10% o coloreados con Grocott y tinta china y las muestras sembradas en agar [7].

Estudios de Patogenicidad

Diez (10) ratones blancos como animales de experimentación fueron inoculados en cada fosa nasal con 0,1 ml del cultivo en medio YPG líquido, a temperatura ambiente, de la cepa aislada del ovino e identificada como UNEFM 91001. Los ratones fueron sacrificados a los tres meses y se realizó el estudio anatomopatológico correspondiente [4].

RESULTADOS

En el rebaño se observó un solo animal afectado. La oveja se encontraba en avanzado estado de gestación y presentaba marcada dificultad respiratoria. El tratamiento local instaurado no tuvo éxito, desarrollándose una lesión ulcerativa, sangrante, nodular y proliferativa, de 10 x 15 cm. en el área nasofacial izquierda, FIG. 1. La temperatura corporal del animal era normal.

Micología

Al examen directo se comprobó la presencia de levaduras capsuladas, así como en la coloración con tinta china. Los cultivos presentaron la apariencia pastosa y color crema, característicos de las colonias de *Cryptococcus neoformans*, resultando positivos los cultivos en agar niger.



FIGURA 1. OVINO HEMBRA CON LESIÓN NODULAR PROLIFERATIVA Y ULCERATIVA EN ÁREA NASOFACIAL IZQUIERDA.

Biopsia

El estudio y evaluación de la biopsia demostró la presencia de una lesión proliferante, micótica, en el área de la dermis. El tejido lesionado se presentaba como una masa blanda, mucinosa, gelatinosa, de color gris ambarino, cubierta por epitelio cútaneo. Histopatológicamente se pudo determinar que la masa estaba constituida por tejido fibroconectivo laxo en forma de malla con gran cantidad de levaduras capsuladas y células inflamatorias (neutrófilos, macrófagos y linfocitos), FIG. 2, estableciéndose un diagnóstico de Dermatitis micótica proliferativa por *Cryptococcus*.

Necropsia

Durante el estudio del cadáver se observó, a nivel del área nasofacial izquierda, una masa ulcerada, necrosada, proliferante y sangrante constituida por tejido duro fibroso, en su porción externa, y gelatinosa, blanda, de color grisáceo, en su porción interna. El nódulo linfático mandibular se observó tumefacto y exudaba un líquido seroso, FIG. 3.

La condición física del animal era deplorable con avanzado estado de caquexia e inanición, con escasa grasa corporal y perivisceral. La cavidad torácica contenía 5-10 cc de líquido seroso amarillento y en la cavidad abdominal se encontraron dos (2) estructuras quísticas en forma de bolsas, FIG. 4, translúcidas, llenas de un líquido claro y con un punto blanquecino en su interior; este material fue remitido al laboratorio de parasitología para su identificación, pudiendo evidenciar que se trataba de quistes parasitarios (*Cisticercosis*).

La cavidad nasal presentaba una masa gelatinosa, grisácea, blanda, que ocupaba el lumen de la cavidad y presionaba el epitelio nasal, FIG. 5. Había un exudado ambarino pegajoso en las mucosas nasal, traqueal y bronquial. El pulmón izquierdo presentó un área nodular de 1 cm de diámetro y al corte tenía un material caseoso amarillo, FIG. 6. Las vísceras abdominales presentaban un material translúcido, gelatinoso, en su

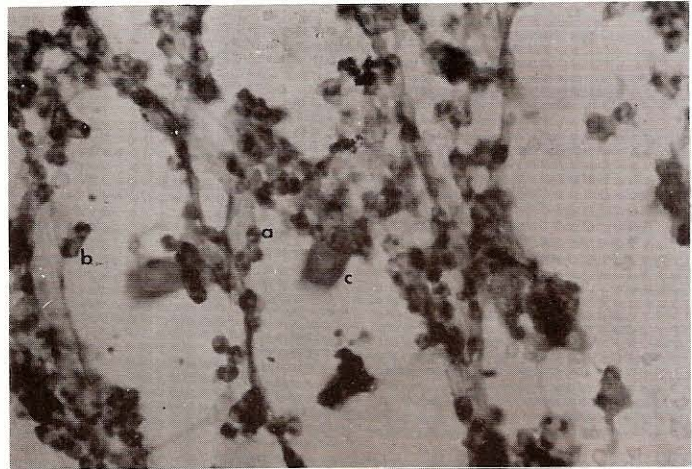


FIGURA 2. BIOPSIA DE MASA TISULAR CON CÉLULAS INFLAMATORIAS NEUTRÓFILOS (a) Y MACRÓFAGOS (b) CON LEVADURAS ENCAPSULADAS (c). 40X MUCICARMIN.

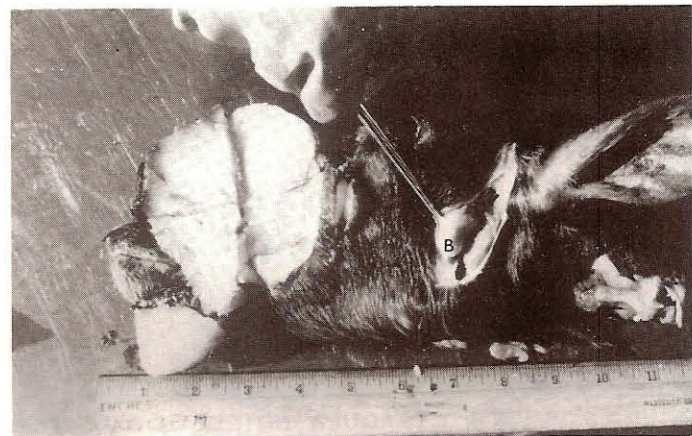


FIGURA 3. ÁREA NASOFACIAL CON MASA DE TEJIDO FIBROSO Y GELATINOSO DE COLOR GRIS (A). NÓTESE LA TUMEFACCIÓN DEL NÓDULO LINFÁTICO MANDIBULAR (B).

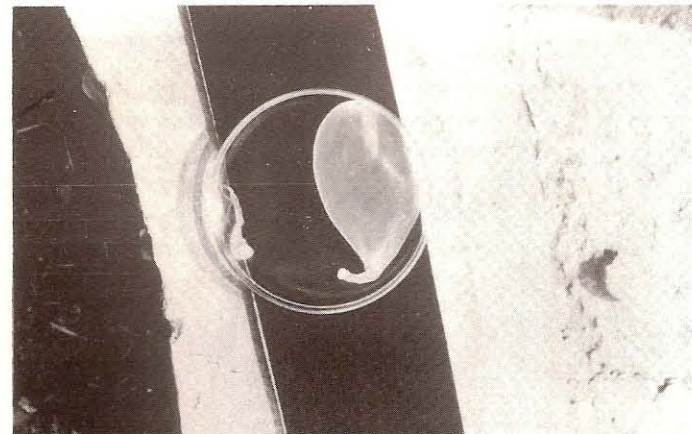


FIGURA 4. ESTRUCTURAS QUÍSTICAS EN FORMA DE BOLSAS TRASLÚCIDAS CON LÍQUIDO CLARO EN SU INTERIOR.

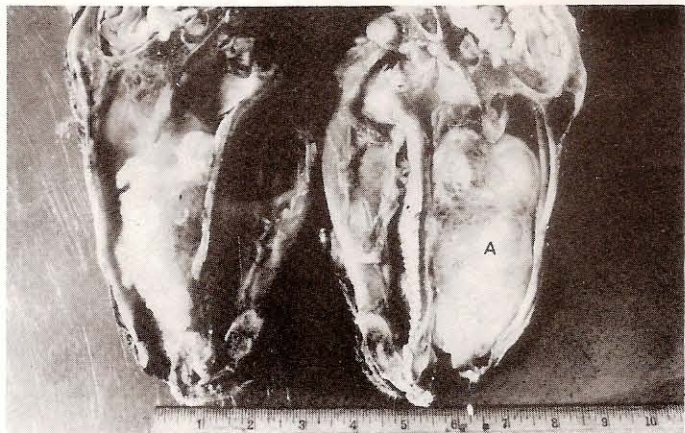


FIGURA 5. MASA TISULAR GELATINOSA GRISÁCEA (A) OCUPANDO EL LUMEN DE LA CAVIDAD NASAL.

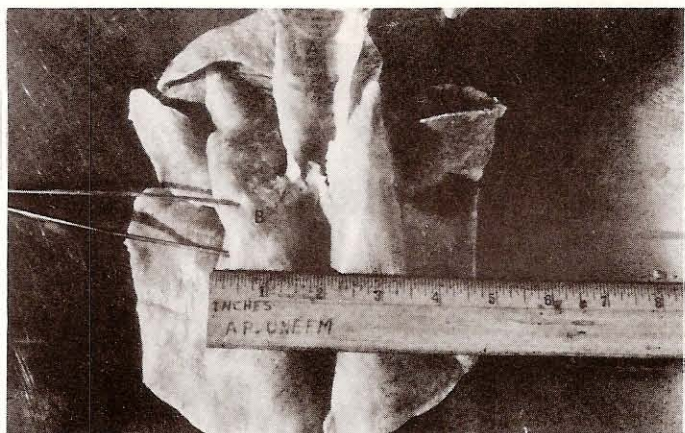


FIGURA 6. PULMÓN Y TRÁQUEA. NÓTESE EL EXUDADO ESPUMOSO (A) EN TRÁQUEA Y EL ÁREA NODULAR EN EL PULMÓN IZQUIERDO.

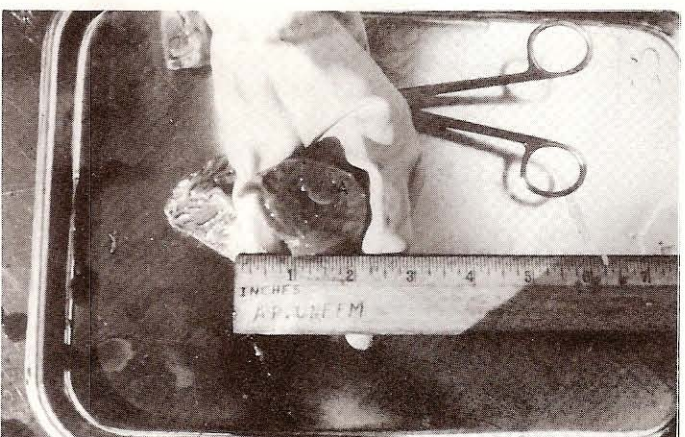


FIGURA 7. PARED VENTRICULAR IZQUIERDA CON ENGROSAMIENTO Y PUNTILLADO BLANQUECINO (A).

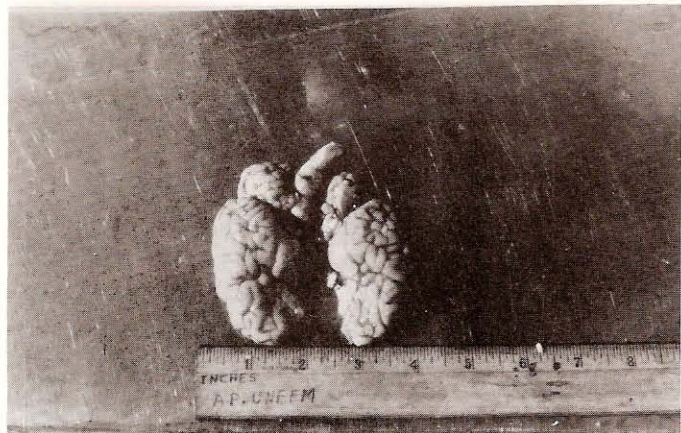


FIGURA 8. CEREBRO CON VASODILATACIÓN Y CONGESTIÓN DE LAS MENINGES.

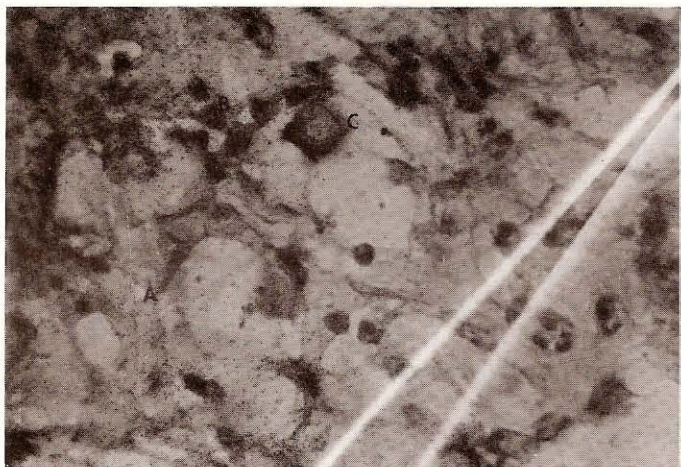


FIGURA 9. OBSÉRVESE EL TEJIDO EN FORMA DE MALLA (A). LAS CÉLULAS INFLAMATORIAS (B) ALREDEDOR DE LAS LEVADURAS CAPSULADAS (C). 60X. MUCICARMÍN.

periferia. El hígado estaba reducido de tamaño y de color oscuro.

El corazón no presentaba grasa en el surco coronario, sino un material seroso-gelatinoso. El ventrículo izquierdo tenía la pared engrosada, FIG. 7, y presentaba un puntillado blanquecino al corte; el ventrículo derecho estaba dilatado y tenía una pared flácida. El bazo estaba reducido de tamaño. Algunos nódulos linfáticos cérvico-faciales estaban tumefactos y hemorrágicos.

El cerebro presentaba congestión de las meninges y vasodilatación marcada, FIG. 8.

Histopatología

La masa de tejido nasofacial estaba constituida por tejido fibroconectivo laxo en forma de malla y presentaba gran cantidad de células inflamatorias (neutrófilos, macrófagos y linfocitos); se observaron numerosas estructuras levaduriformes, capsuladas, translúcidas, FIG. 9, de 3-9 micras de diámetro,

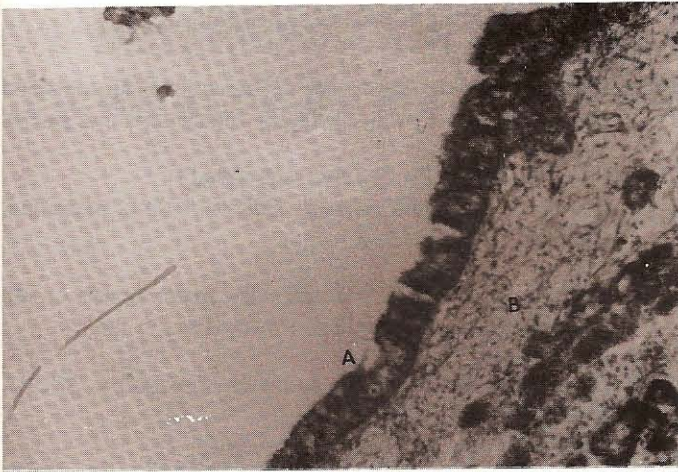


FIGURA 10. MUCOSA NASAL CON EXFOLIACIÓN Y PÉRDIDA DE CILIOS (A). NÓTESE EL SUAVE INFILTRADO DE MONONUCLEARES EN SUBMUCOSA (B). 40X (H-E).

mezcladas con colágeno y fibrocitos. La mucosa nasal estaba exfoliada y con un leve infiltrado de mononucleares en la submucosa, FIG. 10. El parénquima pulmonar presentó vasodilatación e hiperemia difusa, atelectasia y enfisema, con acúmulos de tejido linfoide en algunas áreas. Había broncodilatación marcada e hiperplasia del epitelio bronquial con infiltración difusa de macrófagos.

El corazón presentó palidez de las fibras cardíacas con hialinización del citoplasma y pérdida de las estrías transversales. Se observaron estructuras quísticas intrafibrilares (Sarcocystis) de color morado, con moderado infiltrado linfocitario interfibrilar.

El tejido esplénico presentó disminución del tamaño de los centros de Malpighi y áreas de hemorragia con hemosiderosis en la pulpa roja. Los nódulos linfáticos tenían un infiltrado linfocitario con células plasmáticas e hiperplasia reticular con fibrosis.

El tejido hepático presentó tumefacción de hepatocitos con desorganización estructural. Se observaron áreas focales de infiltrado linfocitario y congestión moderada de los sinusoides.

El parénquima cerebral, cerebelo y médula espinal, presentaron moderado grado de vacuolización y gliosis. Los vasos meníngeos estaban dilatados y congestivos.

Inoculación experimental

Todos los ratones experimentales inoculados desarrollaron granulomas nasales, FIG. 11, en forma nodular, en los cuales se comprobó la presencia del hongo por examen directo y estudios patológicos. Ninguno de los ratones presentó manifestaciones nerviosas que indicara afección en el sistema nervioso central. Aún cuando se observó un incremento del tamaño de los pulmones e hígado en los ratones inoculados,



FIGURA 11. GRANULOMA NASAL EN RATÓN INOCULADO. OBSÉRVESE EL NÓDULO (A).

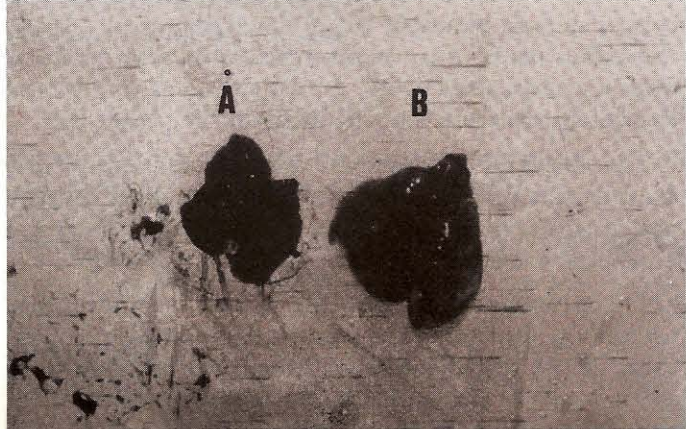


FIGURA 12. NÓTESE EL INCREMENTO SIGNIFICATIVO DE TAMAÑO EN PULMÓN (B) INOCULADO.

FIG. 12, no se pudo demostrar diseminación del hongo a nivel de estas vísceras.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Se reporta, por primera vez en el país un caso de *Cryptococcosis* en ovinos. Se estudia la virulencia (poder patógeno) y poder de invasión del agente causal. Aún cuando el animal presentó evidencia de lesiones significativas de una desnutrición global aguda, con inmunodepresión y estado de preñez avanzado, la cepa del hongo no se diseminó en el ovino. Este hongo es considerado oportunista y recientemente ha sido relacionado con el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (S.I.D.A.) [8,9]. Hay un reporte de una cepa aislada del líquido cefaloraquídeo de un paciente positivo para Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), dicha cepa fue rinotrópica en ratones inoculados por vía intraperitoneal. [8].

La incapacidad de invasión sistémica podría estar relacionada con la temperatura corporal [1], siendo ésta de 39°C en ovinos, en condiciones ambientales naturales, de esta ma-

nera la condición para el desarrollo e invasión del hongo es poco probable. Sin embargo, en virtud de que no se detectó invasión y diseminación sistémica del hongo en los ratones, animales susceptibles a desarrollar Criptococosis cerebral se considera que la cepa aislada difiere biológicamente de las que usualmente se aíslan de procesos patológicos en humanos.[9] Se concluye que es de singular importancia continuar algunos estudios sobre los aspectos biológicos del aislado para dilucidar las características que no permiten una invasión sistémica y diseminación al sistema nervioso central.

Las lesiones de atrofia serosa de la grasa y las observadas en el bazo, reflejan un estado de desnutrición global aguda, los sarcocystes fueron considerados como hallazgo anatomopatológico en un animal inmuno-deprimido.

Las observaciones anatomopatológicas generales evidencian un estado de desnutrición e inmunodepresión en el ovino y se pudo demostrar que el hongo tiene características rinotrópicas debido a las lesiones focales en área nasofacial externa y cavidad nasal, FIG. 1. Esto concuerda con reportes de investigación sobre una cepa rinotrópica en ratones [5,8].

Las lesiones observadas en pulmón fueron consideradas como un foco abscedado o caseoso probablemente debido a una bacteria piogénica. La presencia de quistes parasitarios en la cavidad abdominal es frecuente en estos animales, FIG. 4.

Los resultados de este trabajo aportan información original sobre el efecto patógeno y los cambios patológicos observados en una Criptococosis natural en un ovino. También se concluyó que la inoculación experimental de ratones con la cepa aislada, reprodujo la enfermedad como ocurre en su forma natural.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Blood, D.C; Henderson, J.A. y Radostits, O.M. Medicina Veterinaria 6ta. Edición. Editorial Interamericana. pp 16. 1988.
- [2] Casas, G. Micología General. Ediciones de la Biblioteca. UCV. pp 197-200. 1989.
- [3] Da Silva C., Parto, E. y Costa, J.E. Cryptococosis en Micología Médica. Sarvier. Sao Paulo, Brasil. 1984.
- [4] De Aluja, A. Necropsia en animales domésticos. CECSA pp 29-62. 1985.
- [5] Dixon, D.M. and Polak, A. In vivo and in vitro studies with an atypical rhinotropic isolate of cryptococcus neoformans Mycopathologia 96: 33-40. 1986.
- [6] Hull, T. G. Diseases Transmitted from Animals to Man. 5th Edition. Charles C. Thomas Publisher pp 468-469, 889. 1963.
- [7] Humason, G. Animal Tissue Thechiques. 4th Edition. Freeman & Co. pp 76-84. 1979.
- [8] Robert, A.F.; Abruzzo, G.K. and Ruiz, A. Cryptococcus neoformans: A central nervous system isolate from an AIDS patient that is rhinotropic in a normal mouse model. Mycopathologia. 102: 79-86. 1988.
- [9] Villanueva, E.; Mendoza, M. y Torres, E. Serotipificación de cepas de Cryptococcus neoformans aisladas en Venezuela Acta Científica Venezolana. 40: 151-154. 1989.