

Criptococosis en ganado caprino por *Cryptococcus gattii*



Foto 1: Aspecto macroscópico del pulmón de una cabra muerta por criptococosis, con nódulos grisáceos en áreas diafragmáticas y cierta pleuritis.

A. García-Sánchez¹; JM. Alonso²; JM. Benítez-Medina²; D. Risco²; WL. García²; R. Martínez²; J. Rey²; J. Hermoso de Mendoza²; M. Hermoso de Mendoza².

¹ Producción Animal; Centro de Investigación Finca La Orden; Gobierno de Extremadura.

² Sanidad Animal; Facultad de Veterinaria de Cáceres; Universidad de Extremadura.

» Introducción

La criptococosis es una infección fúngica producida por levaduras ambientales del género *Cryptococcus* que incluye dos especies patógenas importantes, *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii*. Estas levaduras presentan, entre otras, importantes diferencias en su ecología y en la epidemiología de la criptococosis que producen.

Los mamíferos, incluido el hombre, son el grupo animal que sufre principalmente la infección natural, aunque pájaros, reptiles y algunos invertebrados pueden también padecer criptococosis. Generalmente la infección es esporádica y ocasional, pero en algunas ocasiones han sido comunicados brotes epidémicos (Torres-Rodríguez y col., 2004).

En ganado caprino, especie en la que se ha descrito en nuestro país y en la que hemos centrado nuestros estudios, la criptococosis puede mostrar una apariencia clínica y lesional similar a la de la tuberculosis e incluso a las verminosis pulmonares, lo que dificulta su diagnóstico, la hace pasar desapercibida, y hace recomendable su revisión.

» Etiología

Son hongos pertenecientes a la división *Basidiomycota*, que en tejidos animales y en condiciones habituales de laboratorio presentan forma de levadura, con una cápsula mucopolisacárida, cuyo polisacárido principal constituido por glucuronoxilomanano (GXM), determina los diferentes serotipos.

En la actualidad este género está constituido por más de 37 especies, que en su gran mayoría no provocan enfermedad, siendo las dos especies patógenas más importantes, *C. neoformans*, con dos variedades -*C. neoformans* var. *grubii* (serotipo A) y *C. neoformans* var. *neoformans* (serotipo D)- así como un híbrido AD, y *C. gattii* (serotipos B y C) (Kwon-Chung y Varma, 2006). A través de diferentes métodos de tipificación genética, como el PCR-huella digital, utilizando cebadores específicos de ADN microsatélite (M13) (Meyer y col., 1999) o minisatélite (GACA)₄, y el análisis de los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (AFLP) (Boekhout y col., 2001), los aislamientos de *Cryptococcus* pueden ser agrupados en 8 tipos moleculares principales, que con algunas excepciones pueden ser correlacionados con los diferentes serotipos: *C. neoformans* var. *grubii* serotipo A

constituye los tipos moleculares VNI=AFLP1 y VNII=AFLP1A; el serotipo híbrido AD comprende VNIII=AFLP3; y *C. neoformans* var. *neoformans* serotipo D, corresponde al genotipo VNIV=AFLP2. Por su parte, *C. gattii* comprende los genotipos VGI=AFLP4, VGII=AFLP6, VGIII=AFLP5 y VGIV=AFLP7, los cuales se corresponden con los serotipos B o C (Meyer y col., 2003).

Los genotipos VNI y VGI son los que presentan mayor prevalencia en ambas especies.

» Epidemiología

Mientras *C. neoformans* es cosmopolita y afecta sobre todo a pacientes humanos inmunodeprimidos, la criptococosis por *C. gattii* se consideraba inicialmente, una micosis con distribución geográfica muy restringida a países tropicales y subtropicales (Kwon-Chung y Bennett, 1984), y los casos clínicos descritos fuera de estas zonas se consideraban excepcionales. Sin embargo, a lo largo de los años se ha incrementado el número de casos de criptococosis producidos por esta especie en zonas de clima templado-continental donde antes no habían sido notificados, y se ha corroborado que esta especie puede afectar a personas y animales con inmunidad celular normal (Speed y Dunt, 1995). En España han sido descritos casos de criptococosis por *C. gattii* tanto en personas (Colom y col., 2005) como en animales (Hermoso de Mendoza y col., 1991; Baro y col., 1998).

El hábitat natural de *C. neoformans* está asociado a palomares u otros lugares donde haya acumulación de excretas de aves. Estas levaduras han sido aisladas repetidamente de los picos y patas de palomas; esto apoyaría la teoría de que la paloma puede actuar como un factor mecánico de propagación. Por su parte, el hábitat de *C. gattii* es menos conocido, y se ha relacionado con la presencia de árboles del género *Eucalyptus*, como *E. blakely*, *E. camaldulensis*, *E. gomphocephala*, *E. rudis*, y *E. tereticornis*.

Montagna y col. (1997) fueron los primeros en comunicar el aislamiento de *C. gattii* de muestras ambientales en Europa, concretamente en eucaliptos de la cuenca mediterránea en Italia. Estas observaciones han sido recientemente corroboradas mediante el aislamiento de *C. gattii* en material en descomposición de algarrobos (*Ceratonia siliqua*), pino (*Pinus halepensis*) y eucalipto (*E. camaldulensis*) en la cuenca mediterránea Española (Colom y col., 2012).

Otro elemento de interés es la presencia de perros y gatos asintomáticos portadores de *C. gattii* en sus senos nasales,

lo que supone un potencial riesgo de criptococosis en estos animales.

La mayoría de los autores considera a la criptococosis como una enfermedad de aparición esporádica, tanto cuando está relacionada con otras enfermedades como cuando aparece como único agente causal (Chapman y col., 1990; Gutiérrez y García Marín, 1999).

» Patogenia

La infección con *C. gattii* ocurre en mamíferos inmunocompetentes, y de esta manera se considera un patógeno primario. Dong y Murphy en 1995 demostraron que *C. gattii* era capaz de inhibir la migración de los neutrófilos tanto bajo condiciones de laboratorio, como en animales infectados, circunstancia que podría explicar por qué los animales inmunocompetentes pueden sufrir la infección. Además, otras investigaciones en modelos animales han puesto de manifiesto que los metabolitos de *C. gattii*, especialmente acetoina y dihidroxiacetona, desarrollan una respuesta proinflamatoria menor que la obtenida con los metabolitos de *C. neoformans*; lo que también favorecería la supervivencia y multiplicación del hongo en el hospedador (Cheng y col., 2009).

En la actualidad, se considera que los 3 factores de virulencia principales de *C. gattii* son su capacidad para crecer a 37°C, su capacidad para combatir el metabolismo oxidativo de las células eucariotas mediante la producción de enzimas como catalasas, superóxido dismutasas, etc, y su cápsula, considerada un potente factor antifagocitario frente a macrófagos y neutrófilos.

La criptococosis se adquiere fundamentalmente por inhalación de las células leva-

duriformes o, según han sugerido varios autores, por basidiosporas. Sin embargo, no debe descartarse la penetración a través de mucosas y aparato digestivo, dado que *C. gattii* ha sido aislado a partir de muestras de contenido intestinal en una cabra (Torres-Rodríguez y col., 2006).

La inhalación de las esporas fúngicas ocasiona una primoinfección pulmonar muy parecida a la tuberculosis. Esta primera etapa de primoinfección puede remitir espontáneamente o progresar dependiendo de la virulencia de la cepa y de la capacidad de resistencia del hospedador. La diseminación hemática desde el tracto respiratorio a órganos como hígado, cerebro u otras partes del cuerpo, es posiblemente el resultado de la propagación de macrófagos en cuyo interior se pueden multiplicar las levaduras (Hansong y col., 2009).

» Clínica y Lesiones

La manifestación clínica de las criptococosis es muy similar, aunque se considera que *C. gattii* es más virulento y tiene menor tendencia a la infección del SNC.

Ngamskulrunroj y col., (2012) pusieron de manifiesto, en un modelo murino, que aunque *C. gattii* es capaz de atravesar la barrera hemato-encefálica generalmente provoca enfermedad pulmonar, en lugar de meningoencefalitis, que es la manifestación más frecuente en los casos de criptococosis producida por *C. neoformans*.

En ganado caprino, los órganos más frecuentemente afectados son los pulmones, en los cuales produce una neumonía granulomatosa. Aunque también se han descrito casos muy esporádicos de mastitis fúngica por este agente (Pal y Randhawa, 1976).

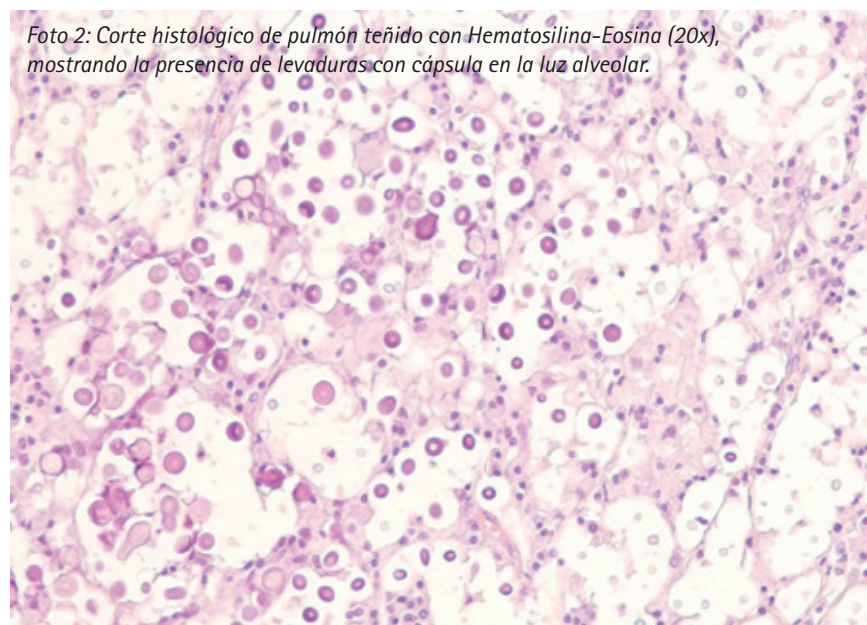


Foto 2: Corte histológico de pulmón teñido con Hematoxilina-Eosina (20x), mostrando la presencia de levaduras con cápsula en la luz alveolar.

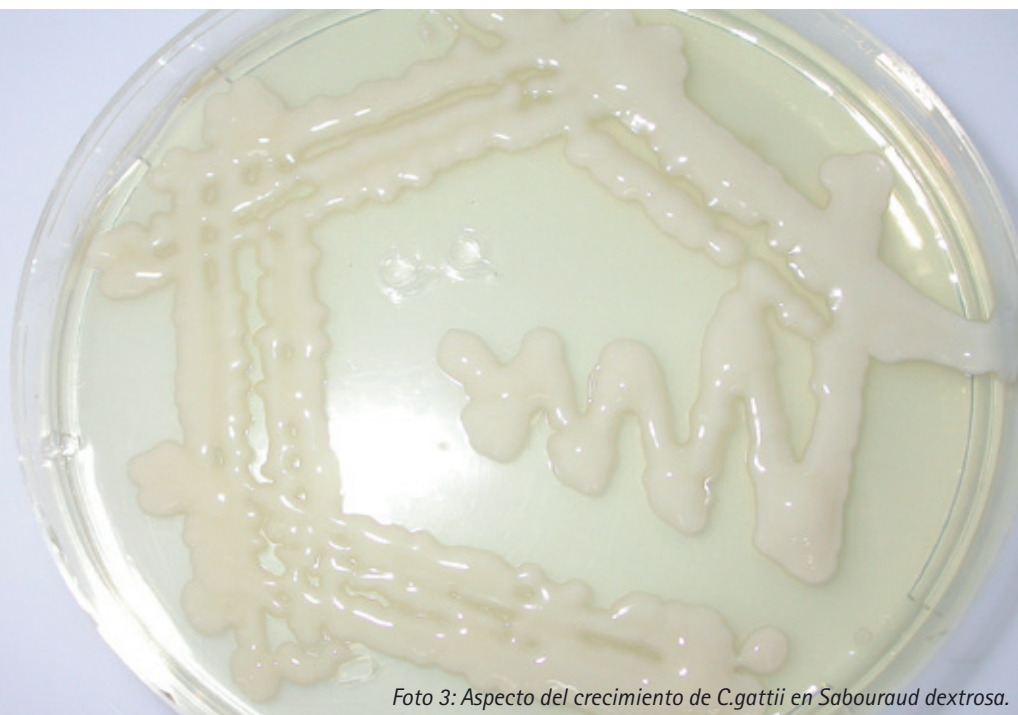


Foto 3: Aspecto del crecimiento de *C.gattii* en Sabouraud dextrosa.

La criptococosis pulmonar en cabras se describe frecuentemente asociada a otros procesos como pleuroneumonía (Aller y col., 1971), artritis-encefalitis (Ellis y col., 1988) y tuberculosis (Gutiérrez y García Marín, 1999). Sin embargo, también se han descrito algunos casos de formas puras de la enfermedad en rebaños de cabras en España, concretamente en la provincia de Cáceres (Baro y col., 1998; Torres-Rodríguez y col., 1999; García y col., 2010) y zona sur de Salamanca (González-Fernández y col., 2000), así como en Australia (Chapman y col., 1990).

Los animales afectados, principalmente cabras adultas explotadas en sistemas de producción extensivos o semi-extensivos, mostraron en todos los casos síntomas respiratorios similares, consistentes en descarga nasal mucopurulenta, tos, disnea y caquexia progresiva, sobreviniendo la muerte entre 2 y 4 semanas. La diseminación al sistema nervioso central, determinó que algunos animales mostraron ataxia, midriasis, ceguera y parálisis progresiva, compatible con meningoencefalitis.

El número de animales afectados en los brotes descritos hasta la fecha, ha variado entre el 2,5 y el 12% de los animales del rebaño. Aunque los animales afectados generalmente fueron sometidos a tratamiento antibiótico, obviamente ineficaz, todos ellos terminaron muriendo, alcanzando la letalidad el 100%. Si bien es cierto, que en ninguno de los brotes descritos, existió constancia de la presentación de casos subclínicos.

En la realización de la necropsia, las principales alteraciones anatomopatológicas macroscópicas se localizaron en el tracto respiratorio. Los pulmones aparecen

hiperémicos, ligeramente engrosados, con zonas de consolidación difusa y con diversos nódulos blanco-grisáceos, de localización preferentemente subpleural, en lóbulos diafragmáticos, que al corte muestran una notable cantidad de moco en los bronquios, pudiéndose observar en algunos animales una ligera pleuritis fibrinosa en las áreas donde aparecen estos nódulos. La formación de masas pseudotumorales llamadas criptocomas en pulmones y cerebro se asocia sobre todo a *C. gattii*.

Las lesiones histológicas se caracterizan por la presencia de áreas con neumonía granulomatosa, en las que se observa un intenso infiltrado de macrófagos en luz alveolar y en tabiques interalveolares. También existe en el seno de la lesión una moderada cantidad de linfocitos, algunos neutrófilos y numerosas células gigantes, algunas de las cuales pueden contener en su interior las levaduras. Éstas también pueden aparecer libres en el interior de alvéolos y en ocasiones con una escasa

respuesta inflamatoria en el parénquima pulmonar adyacente, mientras otras veces se observa una reacción fibrosa en la pared alveolar (Gutiérrez y García Marín, 1999).

González-Fernández y col., (2000) describen también una forma de neumonía piogranulomatosa en alguno de los animales afectados en el sur de la provincia de Salamanca, no descrita anteriormente, y que presentaba como principal característica la abundancia de neutrófilos junto con una menor cantidad de microorganismos en el seno de la misma.

La criptococosis puede producirse en otras especies animales, como en ganado vacuno donde aparece como causa frecuente de mamitis, produciéndose raras veces la forma respiratoria. En caballo, perro, gato y otras especies la criptococosis afecta a otros órganos, provocando granulomas en la piel, cavidad nasal, sistema nervioso central y pulmones (Scott, 1994).

Diagnóstico

Es necesaria la realización de un diagnóstico diferencial de la criptococosis pulmonar caprina con otros procesos del aparato respiratorio, sobre todo tuberculosis y neumonía verminosa, con los cuales puede guardar una cierta similitud, tanto desde el punto de vista clínico como en lo referente a las lesiones macroscópicas que se observan.

El aislamiento se puede realizar en agar Sabouraud dextrosa con cloranfenicol a 37°C. No se puede utilizar ciclohexidina (actidiona) ya que los criptococos se inhiben en su presencia. Las cepas de *C. neoformans* y *C. gattii*, presentan una cápsula mucopolisacárida que les confiere aspecto macroscópico mucoso, cremoso y color blanco amarillento. Las colonias de *C. gattii* crecen, en los medios convencionales, generalmente más mucosas y húmedas que las colonias de *C. neoformans*. Ambas especies presentan formas de levadu-

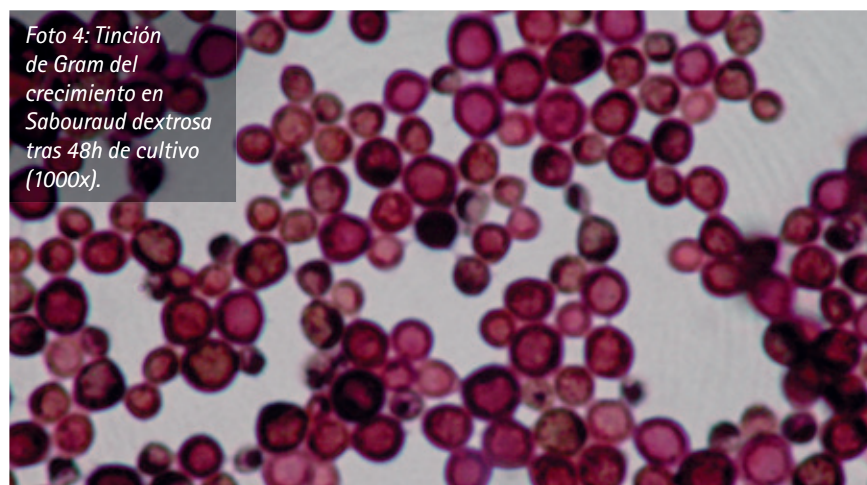


Foto 4: Tinción de Gram del crecimiento en Sabouraud dextrosa tras 48h de cultivo (1000x).

ra esférica, ovoide y a veces de forma alargada, con gemación unipolar o multipolar.

La similitud en las características generales de ambas especies no permite identificar cada especie por separado en un laboratorio de forma rutinaria. En caso de aplicar alguna técnica de identificación comercial de levaduras como, por ejemplo, el sistema API20CAUX *Clinical Yeast System* (bioMérieux), el resultado que se obtiene para las dos especies es el mismo, *C. neoformans*.

Teniendo en cuenta que la criptococosis causada por ambos patógenos no es patogénica y las pruebas laboratoriales como los kit de serotipificación y medios de cultivo necesarios para la diferenciación de las dos especies no son fáciles de obtener, en la mayor parte de los casos no se llega a la identificación de la especie involucrada.

Conviene destacar que en todos los casos de criptococosis caprina estudiados por nuestro grupo, el agente causal se identificó como *C. gattii* mediante la reacción en cadena de la polimerasa, se determinó que todos los aislamientos pertenecían al serotipo B, y la posterior tipificación molecular a través de RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) los clasificó como pertenecientes al genotipo VGI.

► Tratamiento y control

La mayoría de animales que sufre criptococosis presenta buen pronóstico si se establece un tratamiento precoz. El problema radica por una parte en la dificultad de su diagnóstico con síntomas poco específicos como adelgazamiento, tos, descarga nasal y disnea. Y por otra parte, en la necesidad de establecer tratamientos de muy larga duración (meses, incluso años), muchas veces inviable económicamente.

Los estudios de susceptibilidad antifúngica *in vitro* han puesto de manifiesto la mayor susceptibilidad de *C. gattii* frente a Flucitosina y Anfotericina B que *C. neoformans* (Gómez-Lopez y col., 2008). Fluconazol, Ketaconazol y otros azoles también han mostrado buena actividad frente a *C. gattii* (Gómez-López y col., 2008).

Anfotericina B y flucitosina se usan frecuentemente en asociación. Igualmente, la combinación de Ketaconazol e Itraconazol se ha descrito efectiva en algunos gatos experimentalmente infectados, incluso en animales con síntomas neurológicos.

Es importante tener en cuenta que la infección por *C. gattii* está asociada

principalmente con la exposición a eucaliptos, particularmente durante el periodo de floración, de manera que evitando la exposición a este tipo de árboles, se puede reducir el riesgo de infección. Sin embargo, como ya ha sido comentado, pueden existir otras muchas fuentes de exposición aún no bien definidas.

► Bibliografía

- ALLER B, SANTIAGO E, ESCUDERO A, Y COL. 1971. CRIPTOCOCOSIS PULMONAR EN CABRAS. REVISTA DEL PATRONATO DE BIOLOGÍA ANIMAL, 15: 287- 297.
- BARÓ T, TORRES-RODRÍGUEZ JM, DE MENDOZA MH, Y COL. 1998. FIRST IDENTIFICATION OF AUTOCHTHONOUS CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS VAR. GATTII ISOLATED FROM GOATS WITH PREDOMINANTLY SEVERE PULMONARY DISEASE IN SPAIN. J. CLIN. MICROBIOL. 36: 458-461.
- BOEKHOUT T, THEELEN B, DIAZ M, Y COL. 2001. HYBRID GENOTYPES IN THE PATHOGENIC YEAST CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS. MICROBIOLOGY. 147: 891-907.
- CHAPMAN HM, ROBINSON WF, BOLTON JR, Y COL. 1990. CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS INFECTION IN GOATS. AUSTR. VET. J. 37: 1170-1172.
- CHENG PY, SHAM A, KRONSTAD JW. 2009. CRYPTOCOCCUS GATTII ISOLATES FROM THE BRITISH COLUMBIA CRYPTOCOCCOSIS OUTBREAK INDUCE LESS PROTECTIVE INFLAMMATION IN A MURINE MODEL OF INFECTION THAN CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS. INFECT. IMMUN. 77: 4284-4294.
- COLOM MF, FRASES S, FERRER C, Y COL. 2005. FIRST LOCAL CASE OF HUMAN CRYPTOCOCCOSIS DUE TO CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS VAR. GATTII IN SPAIN. J. CLIN. MICROBIOL. 43: 3548-3550.
- COLOM MF, HAGEN F, GONZALEZ A, Y COL. 2012. CERATONIA SILIQUA (CAROB) TREES AS NATURAL HABITAT AND SOURCE OF INFECTION BY CRYPTOCOCCUS GATTII IN THE MEDITERRANEAN ENVIRONMENT. MED MYCOL. 50: 67-73.
- DONG ZM, MURPHY JW. 1995. EFFECTS OF THE TWO VARIETIES OF CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS CELLS AND CULTURE FILTRATE ANTIGENS ON NEUTROPHIL LOCOMOTION. INFECT. IMMUN. 63: 2632-2644.
- ELLIS TM, ROBINSON WF, WILCOX GE. 1988. THE PATHOLOGY AND AETIOLOGY OF LUNG LESIONS IN GOATS INFECTED WITH CAPRINE ARTHRITIS-ENCEPHALITIS VIRUS. AUSTR. VET. J. 65: 69-73.
- GARCÍA A, MARTÍNEZ R, BENÍTEZ JM. 2010. NUEVO CASO DE NEUMONÍA CAPRINA CAUSADA POR CRYPTOCOCCUS GATTII. X CONGRESO NACIONAL DE MICOLOGÍA.
- GÓMEZ-LÓPEZ A, ZARAGOZA O, DOS ANJOS MARTINS M. 2008. IN VITRO SUSCEPTIBILITY OF CRYPTOCOCCUS GATTII CLINICAL ISOLATES. CLIN. MICROBIOL. INFECT. 14: 727-730.
- GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ J, PÉREZ-PÉREZ V, FERRERAS-ESTRADA MC, Y COL. 2000. CRIPTOCOCOSIS PULMONAR EN CABRAS. PRODUCCIÓN OVINA Y CAPRINA, SEOC 2000; XXV: 441-443.
- GUTIÉRREZ M, GARCÍA-MARÍN JF. 1999. CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS AND MYCOBACTERIUM BOVIS CAUSING GRANULOMATOUS PNEUMONIA IN A GOAT. VET. PATHOL. 36: 445-448.
- HANSONG M, HAGEN F, STEKEL DJ, Y COL. 2009. THE FATAL OUTBREAK ON VANCOUVER ISLAND IS CHARACTERIZED BY ENHANCED INTRACELLULAR PARASITISM DRIVEN BY MITOCHONDRIAL REGULATION. PNAS. 106: 12980-12985.
- HERMOSO DE MENDOZA M, ALONSO JM, REY J, Y COL. 1991. DOS BROTES DE CRIPTOCOCOSIS EN CABRAS EN LA PROVINCIA DE CÁCERES. XIII CONGRESO NACIONAL DE MICROBIOLOGÍA.
- KWON-CHUNG KJ, BENNETT JE. 1984. EPIDEMIOLOGIC DIFFERENCES BETWEEN THE TWO VARIETIES OF CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS. AM. J. EPIDEMIOL. 120: 123-130.
- KWON-CHUNG KJ, VARMA A. 2006. DO MAJOR SPECIES CONCEPTS SUPPORT ONE, TWO OR MORE SPECIES WITHIN CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS? FEMS YEAST RES. 6: 574-587.
- MEYER W, MARSZEWSKA K, AMIRMOSTOFIAN M, Y COL. 1999. MOLECULAR TYPING OF GLOBAL ISOLATES OF CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS VAR. NEOFORMANS BY POLYMERASE CHAIN REACTION FINGERPRINTING AND RANDOMLY AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA -A PILOT STUDY TO STANDARDIZE TECHNIQUES ON WHICH TO BASE A DETAILED EPIDEMIOLOGICAL SURVEY. ELECTROPHORESIS, 20: 1790-1799.
- MEYER W, CASTANEDA A, JACKSON S, Y COL. 2003. MOLECULAR TYPING OF IBEROAMERICAN CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS ISOLATES. EMERG. INFECT. DIS. 9: 189-195.
- MONTAGNA MT, VIVIANI MA, PULITO A, Y COL. 1997. CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS VAR. GATTII IN ITALY. NOTE II. ENVIRONMENTAL INVESTIGATION RELATED TO AN AUTOCHTHONOUS CLINICAL CASE IN APULIA. J. MYCOL. MED. 7: 93-6.
- NGAMSKULRUNGROJ P, CHANG Y, SIONOV E, Y COL. 2012. THE PRIMARY TARGET ORGAN OF CRYPTOCOCCUS GATTII IS DIFFERENT FROM THAT OF CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS IN A MURINE MODEL. AM. SOC. MIC. 8: 3(3).
- PAL M, RANDHAWA HS. 1976. CAPRINE MASTITIS DUE TO CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS. SABAOURAUIDA. 14: 261-263
- SPEED B, DUNT D. 1995. CLINICAL AND HOST DIFFERENCES BETWEEN INFECTIONS WITH THE TWO VARIETIES OF CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS. CLIN. INFECT. DIS. 21: 28-34.
- SCOTT DB. 1994. MYCOSES. EN: INFECTIOUS DISEASES OF LIVESTOCK, 1521-1535. ED. COEZTER, J.A.W.; THOMSON, G.R.; TUSTIN, R.C. OXFORD UNIVERSITY PRESS. OXFORD. (REINO UNIDO).
- TORRES-RODRÍGUEZ JM, MOREIRA Y, BARÓ-TOMÁS T. 2004. SPONTANEOUS INFECTION OF ANIMALS WITH CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS AND CRYPTOCOCCUS GATTII. MIKOL LEK. 11: 303-307.
- TORRES-RODRÍGUEZ JM, HERMOSO DE MENDOZA M, ALVARADO-RAMÍREZ E, Y COL. 2006. CRYPTOCOCCOSIS BY CRYPTOCOCCUS GATTII IN IMMUNOCOMPETENT GOATS IN SPAIN AND REVIEW OF THE LITERATURE. ACTA SCI. VET. 34: 245-253.



Foto 5: Toma de muestras en un eucalipto, posible nicho ecológico de *C. gattii* junto a otros árboles como los algarrobos en la cuenca mediterránea Española.