

Artículos Originales

Descripción histopatológica del primer caso de Encefalitozoonosis en Antioquia, Colombia

B. J. RODRÍGUEZ, MV, ESP.; M. ZAPATA, BACT, GRUPO GEIA; L. C. ÁLVAREZ BACT, GRUPO GEIA,
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y DE ZOOTECNIA DE U. DE ANTIOQUIA

RECIBIDO JUNIO 1997; ACEPTADO SEPTIEMBRE 1997)

Resumen

Se reporta por primera vez en el Departamento de Antioquia, Colombia, un caso de Encefalitozoonosis o Encefalitis Enzoótica de los Conejos, una enfermedad zoonótica que afecta principalmente animales y humanos inmunocomprometidos. Se describen las lesiones histopatológicas ocasionadas por su agente etiológico, el *Encephalitozoon cuniculi* y los procedimientos empleados para su diagnóstico. El estudio se efectuó en material de necropsia de un conejo remitido para examen histopatológico al Laboratorio de Patología Animal de la Universidad de Antioquia, en el que se demostró la presencia del parásito con la ayuda de coloraciones especiales, microscopía con luz polarizada e inmunofluorescencia directa.

Palabras claves: *Encephalitozoon cuniculi*, encefalitozoonosis, microsporidia.

Introducción

La encefalitozoonosis es una enfermedad causada por el *Encephalitozoon cuniculi*, un parásito intracelular obligatorio que pertenece al orden Microsporidia del phylum Microspora, que afecta conejos, ratones, hámsters, cobayos, perros, gatos, zorros, visones, primates no humanos y al hombre (1,2).

Este parásito se observó por primera vez en tejido nervioso y renal de un conejo afectado de parálisis motora (3). Originalmente fue descrito como *Encephalitozoon cuniculi* por Levaditi y cols. en 1923, pero la aceptación que el parásito pertenecía al orden microsporidia se efectuó en 1964 por Lainson y cols. quienes lo incluyeron en el género *Nosema*. Sin embargo, Canning en 1977, consideró correcta la denominación de *Encephalitozoon cuniculi* (3,4).

La infección se establece luego de ingerir alimentos contaminados, generalmente con orina, aunque también se ha observado transmisión transplacentaria en algunas especies animales (5,6). La invasión a la célula hospedera ocurre con la ayuda de una organela especializada de la espóra denominada *filamento polar*, el cual es evaginado por la acción de diferentes mecanismos; dicho filamento penetra en la célula hospedera inyectándole en su citoplasma el esporoplasma. La multiplicación del parásito se rea-

liza en el interior de las células por merogonia, después de la cual se forman esporas que salen al exterior de la célula y son hábiles para infectar otras células (5).

El parásito tiene afinidad por células del túbulo renal, células endoteliales y macrófagos (1,5), existiendo un tropismo preferente por tejido nervioso, renal, cardíaco, hepático y pulmonar en los cuales causa encefalitis granulomatosa, nefritis intersticial, focos necróticos y degeneración hialina, necrosis hepática focal no supurativa y neumonía intersticial respectivamente, como lesiones características en conejos (7,8,9). En humanos con SIDA se ha encontrado el parásito produciendo hepatitis, necrosis hepática (3), peritonitis, nefritis túbulo-intersticial, cistitis, bronquitis, neumonía, conjuntivitis y sinusitis (10,11,12,13).

En muchas especies animales infectadas la sintomatología clínica es variable pudiéndose presentar en forma aguda, crónica y frecuentemente latente (1,4,7). En algunos casos de infección con sintomatología evidente se ha observado falta de apetito, pérdida de peso, trastornos en la piel, depresión y muerte (1). Cuando se presentan signos nerviosos estos consisten en hiperestesia, ataxia, opistótonos y tortícolis (10). La enfermedad muestra toda su agresividad al existir otros estados patológicos concurrentes (1).

En muchos casos la infección es inaparente, observándose a lo sumo fiebre ligera (8). También se observan animales asintomáticos que pueden excretar permanentemente el microorganismo en la orina (1,7,8).

Se ha encontrado que la respuesta inmune al *E. cuniculi* es de tipo humoral y celular; evidenciándose la presencia de infección o de previa exposición al parásito por la detección de anticuerpos específicos (14). En trabajos experimentales se demostró que estos anticuerpos reducen la viabilidad de las esporas y aumentan la fagocitosis de estas por parte de los monocitos circulantes (14,15,16). Los títulos de anticuerpos específicos del hospedero demostraron correlación con su estado inmune, pero estos fallaron para proteger en forma pasiva, luego de su transferencia de ratones inmunes a ratones desprotegidos (17). La importancia de las células T en la inmunidad protectora se demostró en estudios con modelos animales, en donde se constató que ellas actúan como células ayudadoras en la producción de anticuerpos y liberación de citoquinas que estimulan los monocitos para la destrucción del parásito (16,17).

Debido a sus variados síntomas, sus estados subclínicos, su cronicidad y la presencia de estados patológicos colaterales esta enfermedad ha sido difícil de diagnosticar (7,19). Con este fin se han utilizado varios métodos tales como la observación de lesiones macroscópicas (7), la demostración del parásito en cortes histológicos o en orina mediante tinciones especiales (Gram, Giemsa, Warthin-Starry, Ziehl-Neelsen y coloraciones tricrómicas) (7,10,11,19,20) además de la identificación utilizando microscopía electrónica y de luz polarizada (11,21,22), también pruebas serológicas como IFI (23,24), ELISA (6,18,25) y carbón-Inmunoensayo (26), análisis inmunohistoquímicos (9), reacción en cadena de polimerasa (PCR) e Inmunoblot (23). Algunos autores informan de su aislamiento y propagación en cultivos celulares (2).

De otro lado, el *E. cuniculi* está siendo estudiado en varios países del mundo, conociéndose en muchos de ellos prevalencias muy altas en conejos y la comprobación de casos de humanos afectados (1,7). A nivel de Latinoamérica, Argentina y Cuba informan prevalencias entre un 50 y 70% en explotaciones cuniculas y bioterios causando pérdidas económicas e interfiriendo en el desarrollo de trabajos de investigación (1,7,19). En un estudio realizado por Bustos y Cols. (27) en conejos procedentes del departamento de Cundinamarca (Colombia) en el año de 1978, describieron por primera vez en el país las lesiones

histopatológicas de la encefalitis enzoótica de los conejos, pero desde entonces no se han realizado estudios que establezcan la situación epidemiológica ni la distribución geográfica de esta enfermedad en el país.

El propósito de este artículo es describir el primer caso que hasta el presente se conoce de encefalitozoonosis en el Departamento de Antioquia comprobado mediante exámenes histopatológicos, microscopía con luz polarizada e inmunofluorescencia directa.

Materiales y Métodos

Se efectuó un estudio histopatológico en material de necropsia de un conejo (cruce chinchilla x mariposa) de 50 días de edad, que presentó muerte súbita.

El animal fue adquirido por el departamento de Medicina Veterinaria de la Universidad de Antioquia en una tienda agropecuaria de la ciudad de Medellín y hacía parte de un experimento nutricional con *Centrosema acutifolium* como fuente exclusiva de alimentación antes de morir.

Para el estudio histopatológico se tomaron muestras de diferentes órganos, los que se fijaron en formalina bufferada al 10%, se incluyeron en parafina, se llevaron a un procesador de tejidos, se coloraron con tinción habitual de Hematoxilina-Eosina y las siguientes técnicas histoquímicas: Sandiford (Gram modificado), Giemsa, Ziehl Neelsen y tricrómico de Masson. Los cortes se efectuaron de 4mm de espesor y se observaron utilizando microscopía de luz brillante y luz polarizada (20); además se enviaron muestras de tejido renal al Centro de Control y Prevención de Enfermedades Infecciosas de Atlanta (CDC) para su evaluación y caracterización por la técnica de inmunofluorescencia directa.

Se utilizó un tejido en el que se conocía la existencia de *Toxoplasma gondii*, como patrón, para comparar los resultados obtenidos con las diferentes tinciones y la microscopía de luz polarizada.

Resultados

Hallazgos Macroscópicos

En el momento de la necropsia, el animal presentó una mala condición corporal y alteraciones visibles en los siguientes órganos: el hígado se observó de color rojo oscuro, con un área piriforme blanco amarillento deprimida, de 0.7 cm de longitud; los pulmo-

nes presentaron una coloración rojo oscuro, entremezclada con áreas pardo amarillentas irregulares levantadas, de diferentes tamaños; en el corazón se observaron pequeños focos hemorrágicos en la aurícula derecha; los riñones estaban tumefactos, con áreas pálidas irregulares en su superficie y congestión en corteza y médula; el bazo mostró una coloración blanco amarillento en sus bordes; en la serosa estomacal se observó un área pardo rojizo irregular.

Hallazgos Microscópicos

El hígado presentó congestión severa portal y sinusoidal, cambio hidrópico leve, infiltración mononuclear focal en el parénquima y en espacios porta; así como aumento leve en las células de Kupffer. En los pulmones se observó neumonía intersticial aguda, hemorragias, enfisema y edema intersticial leves; además, algunas células con leve picnosis y cariorexosis. En el corazón se encontró moderada congestión y focos hemorrágicos en miocardio con presencia escasa de mononucleares difusos. El bazo presentó leve depresión en los nódulos linfoides. En el estómago no se encontró alteración de la arquitectura. En los riñones se observó nefritis intersticial subaguda (Fig. 1), cambios degenerativos en los túbulos renales y presencia de acúmulos numerosos de microorganismos con forma de bastón y extremos romos, de 3µm de longitud aproximadamente, los cuales se tiñeron pobremente con Hematoxilina-Eosina (Fig. 2) y se localizaron en el lumen tubular y en el tejido intersticial renal; estos parásitos se visualizaron con gran claridad con las coloraciones de Ziehl-Neelsen (Fig. 1) y Giemsa, con la coloración de Sandiford se constató que eran Gram positivos (Fig. 3) y se observó que tomaron una coloración pardo oscura, al utilizar la coloración tricrómica de Masson. Al observar los microorganismos con luz polarizada presentaron leve birrefringencia.

Las muestras que se enviaron al CDC de Atlanta fueron analizadas y se confirmó la presencia de esporas de *Encephalitozoon cuniculi* que se observaron de color verde manzana al reaccionar con un anticuerpo primario anti-*E. cuniculi* marcado con fluoresceína y ser incididos con luz ultravioleta.

Discusión

Las lesiones macroscópicas y microscópicas encontradas en este estudio; así como los resultados obtenidos con las tinciones especiales realizadas, la microscopía con luz polarizada y la inmunofluorescencia directa, están de acuerdo con los hallazgos comunicados por otros autores, en conejos que sufrieron encefalitozoonosis (1,7).

Con excepción de la toxoplasmosis, en la que la nefritis intersticial es menos frecuente, no existen referencias de otras enfermedades asintomáticas que causen tales alteraciones renales en el conejo (7).

El *E. cuniculi* es un parásito de gran similitud en cortes histológicos al *T. gondii*, con el que se ha confundido; no obstante, el primero se ha descrito como un organismo gram positivo y el segundo como gram negativo, lo que se constató en este estudio al comparar el microorganismo problema con *T. gondii* previamente diagnosticado en tejido (1,4,9). Otros autores comunican la afinidad del *E. cuniculi* por tinciones que contengan Hematoxilina férrica; en el presente trabajo se confirmó dicha observación ya que este microorganismo se coloreó de manera positiva con la coloración Tricrómica de Masson (4,20).

La birrefringencia producida por *E. cuniculi* al ser incidido con luz polarizada se ha utilizado como patrón para diferenciarlo de las coccidias, parásitos en los que dicha característica no se observa (21). La pobre birrefringencia observada en el parásito de este estudio, hace pensar en la necesidad de estandarizar el tipo de filtro y la longitud de onda ideal para hacer tal diferenciación en nuestro medio.

De todo lo anterior se concluye que las coloraciones especiales aquí empleadas fueron de gran utilidad para la identificación del *E. cuniculi* en tejidos y para establecer un diagnóstico diferencial con *T. gondii* en nuestro medio; además, se identificó por primera vez en el departamento de Antioquia una enfermedad en conejos, la cual puede convertirse en un factor de riesgo para la salud pública y para la industria cunícola.

Los datos registrados en otros países indican una prevalencia de *E. cuniculi* en criaderos de conejos, entre el 50 y el 70% (7). En nuestro país este dato se desconoce, por ello se recomiendan investigaciones futuras, con el propósito de implementar técnicas diagnósticas confiables y masivas que permitan establecer la situación epidemiológica de esta enfermedad en el departamento de Antioquia y en el país.

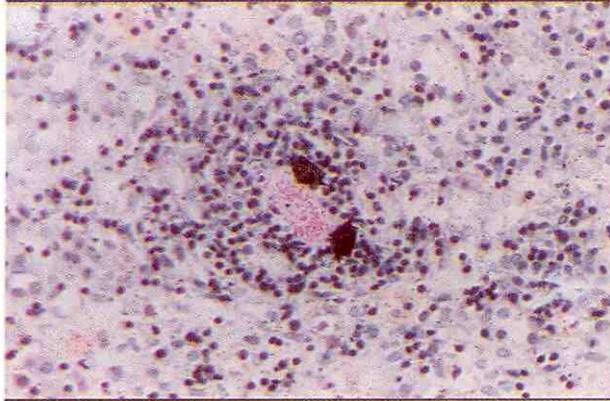


Figura 1. Riñón; nefritis intersticial, Infiltrado mononuclear rodeando vacuola parasitófora de *E. cuniculi* (flecha). Ziehl Neelsen x 100.

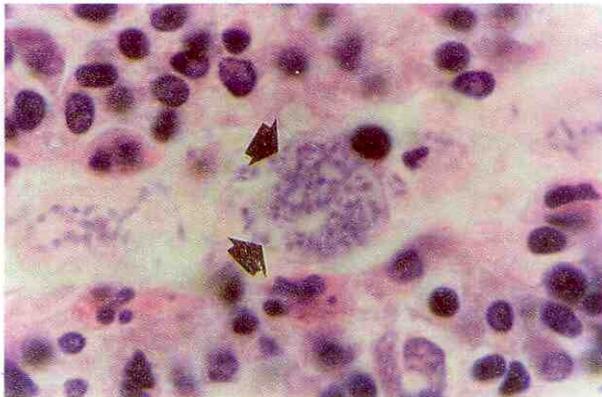


Figura 2. Riñón; Nefritis intestinal, infiltrado mononuclear rodeando vacuola parasitófora de *E. cuniculi* (flecha). Hematoxilina - Eosina x 1000.

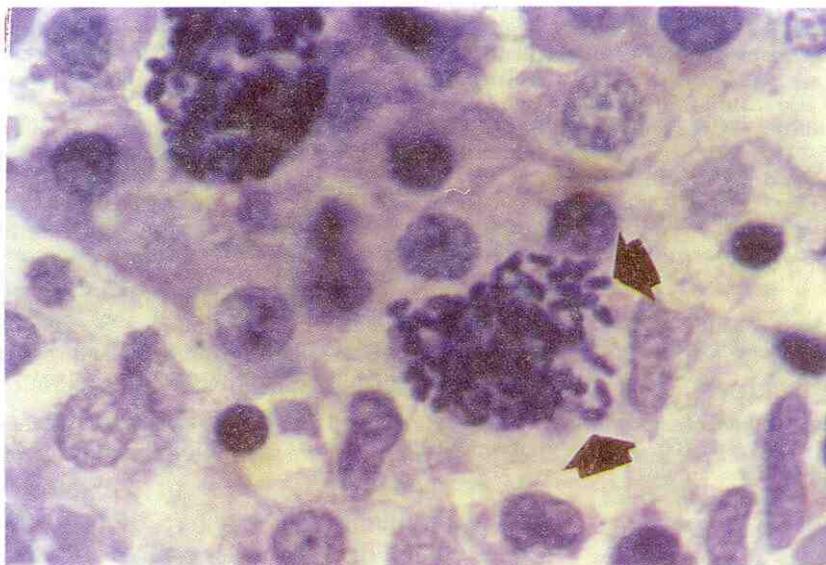


Figura 3. Riñón; Esporas gram positivas de *E. cuniculi* en Vacuola parasitófora (flecha). Sandiford (Gram para tejido) x 1000.

Summary

"Encephalitozoonosis In Antioquia, Colombia. Histopathological Description". The first case of rabbit encephalitozoonosis in the state of Antioquia, Colombia is described. This disease specially attacks the immunocompromised animals and humans. The procedures for indentification of its etiological agent, the Encephalitozoon cuniculi, are related here, as well as the histopathological lesions in different rabbit organs.

Key words: Encephalitozoon cuniculi, encephalitozoonosis, microsporidia.

Referencias

- González H., Zapata L, Bagnis E. Encefalitozoonosis. Primera comunicación en Argentina. Vet Arg, 1987; 4: 144-149.
- Shadduk JA, Bendele R, Robinson GT. Isolation of the causative organism of canine encephalitozoonosis. Vet Pathol, 1978; 15: 449-460.
- Terada S, Reddy KR, Jeffers LJ, Lennox J, Cali A, Schiff ER. Microsporidian hepatitis in the acquired immune deficiency syndrome. Ann Intern Med, 1987; 107: 61-62.
- Protozoos: *Microspora Sprague*. En: Soulsby EJ. Parasitología y Enfermedades Parasitarias en los Animales Domésticos. 7a. ed. México: Editorial Interamericana, 1987: 521-770.
- Canning EU, Hollister WS. Microsporidia of mammals-widespread pathogens or opportunistic curiosities?. Parasitol Today, 1987; 3: 267-273.
- Hollister WS, Canning EU, Viney M. Prevalence of antibodies to *Encephalitozoon Cuniculi* in stray dogs as determined by an ELISA. Vet Record, 1989; 124: 332-336.
- Merino N, García G, Díaz C. Encefalitozoonosis asintomática en conejos de la provincia Habana. Rev Salud Anim, 1990; 1: 29-34.
- Nervous system. En: Jubb KV, Kennedy PC, Palmer N. Pathology of Domestic Animals, vol 1. 4a. ed. San Diego: Academic press, INC; 1993; 267-439.
- Park J, Ochiai K, Itakura CH. Direct ABC immunohistochemistry to *Encephalitozoon cuniculi*. J Vet Med Sci, 1993; 55: 325-328.
- Weber R, Deplazes P. Neue parasitäre erkrankungen beim menschen: Infektionen durch Mikrosporidien und Cyclospora species. Schweiz Med Wochenschr, 1995; 125: 909-923.
- Weber R, Bryan RT, Schwartz DA, Owen RL. Human microsporidial infections. Clin Microbiol Rev, 1994; 7: 426-461.
- Ledford DK, Overman MD, Gonzalvo D, et al. Microsporidiosis myositis in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. Ann Inter Med, 1985; 102: 628-630.
- Weber R, Bryan RT. Microsporidial infections in immunodeficient and immunocompetent patients. Clin Infect Dis, 1994; 19: 517-521.
- Niederborn JY, Shadduck JA. Role of antibody and complement in the control of *Encephalitozoon cuniculi* infections by rabbit macrophages. Infect. Immun, 1980; 27: 995-1002.
- Szabo JR, Shadduk JA. Immunologic and clinicopathologic evaluation of adult dogs inoculated with *Encephalitozoon cuniculi*. J Clin Microbiol, 1988; 26: 557-563.
- Schmidt EC, Shadduk JA. Mechanism of resistance to the intracellular protozoon *Encephalitozoon* in mice. J Immunol, 1984; 133: 2712-2719.
- Schmidt EC, Shadduk JA. Murine encephalitozoonosis model for studying the host-parasite relationship of a chronic infection. Infect Immun, 1983; 40: 936-942.
- Hollister WS, Canning EU, Willcox A. Evidence for widespread occurrence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* (Microspora) in man provided by ELISA and other serological test. Parasitol, 1991; 102: 33-43.
- Shadduk JA, Pakes SP. Encephalitozoonosis (Nosematosis) and Toxoplasmosis. Am J Pathol, 1971; 64: 657-672.
- Armed Forces Institute of Pathology. Laboratory Methods in Histotechnology. Washington, DC: American Registry of Pathology, 1994. 279.
- Tiner JD. Birefringent spores differentiate *Encephalitozoon* and others Microsporidia from *Coccidia*. Vet Pathol, 1988; 25:227-230.
- Rijpstra AC, Canning EU, Van Kettel RJ, Eeftinck Schattenkerk JKM, Laarman JJ. Use of light microscopy to diagnose small-intestinal microsporidiosis in patients: with AIDS. J Infect Dis, 1988; 157: 827-831.
- Visvesvara GS, Leitch GJ, Da Silva AJ, et al. Polyclonal and monoclonal antibody and PCR-Amplified small-subunit rRNA identification of a Microsporidian *Encephalitozoon hellem*, isolated from an AIDS patient with disseminated infection. J Clin Microbiol, 1994; 32: 2768-2768.
- Cox JC, Gallichio HA. An evaluation of immunofluorescence in the serological diagnosis of *Nosema cuniculi* infection. Res Vet Sci, 1977 22:50-52.
- Hollister WS and Canning EU. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* and its use in determination of infections in man. Parasitol, 1987. 94: 202-219.
- Van Dellen AF, Stewart CG, Botha WS. Studies of encephalitozoonosis in vervet monkeys (*Cercopithecus pygerythrus*) orally inoculated with spores of *Encephalitozoon cuniculi* isolated from dogs (*Canis familiaris*). Onderstepoort J. Vet. Res, 1989; 56: 1-22.
- Bustos F, Mogollón JD, Lozano F, González HF. Encefalitis enzoótica de los conejos. Revista ACOVEZ, 1979; 2: 37-39.