

ESTUDIO HISTOPATOLOGICO DE CASOS CLINICOS SUGESTIVOS

DE MICOSIS PULMONAR EN CERDOS.

TESIS QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
PRESENTA JOSE ALBERTO CHAVEZ ENRIQUEZ

1 9 7 8

7979



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A S E S O R E S:

M.V.Z. CARLOS FIJOAN AGUADE

M.V.Z. ROBERTO A. CERVANTES OLIVARES

TRABAJO REALIZADO EN LA ESCUELA
NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
CUAUTITLAN Y EL INSTITUTO NACIONAL
DE INVESTIGACIONES PECUARIAS

I N D I C E

	Pags.
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	2
MATERIAL Y METODOS.....	8
RESULTADOS.....	19
DISCUSION.....	29
BIBLIOGRAFIA.....	32

Resumen:

En estudios anteriores se ha sugerido la posibilidad de que los hongos, jueguen un papel en el desarrollo de problemas respiratorios del cerdo. Con el fin de esclarecer este problema se obtuvieron 60 muestras de pulmones neumónicos de cerdo en el Rastro de Ferrería.

Las muestras fueron cultivadas en Sabouraud Dextrosa Agar, Extracto de Malta Agar y Micobiotic Agar. Además una porción de tejido neumónico fué fijada y cortada para estudios histopatológicos. Los cortes fueron teñidos con: Hematoxilina-Eosina, Tricrómica de Masson, Shorr, Acido Peryódico de Schiff, Gomory Grocotts y Azul de Alsacia.

Se aislaron hongos en trece ocasiones (21.5%). Aspergillus sp. en 6 (10%), Rhizopus sp. en 4 (6.6%), Penicillium sp. en 2 (3.3%) y Neurospora sp. en una ocasión (1.6%).

Los estudios histopatológicos demostraron la presencia de lesiones. Estas se caracterizaron por: descamación de células del epitelio traqueobronquial, consolidación, enfisema alveolar e intersticial, congestión, hemorragia y marcada infiltración peribronquial y periarterial por macrófagos, linfocitos y polimorfonucleares. En algunos pulmones se observaron formas similares a estructuras fungales.

Con el fin de determinar la correlación estadística entre la presencia de hongos y las lesiones se aplicó el programa Stadiistical Analysis System (S.A.S.) del Departamento de Estadística Experimental de la Universidad Estatal de Carolina del Norte.

I N T R O D U C C I O N .

Generalidades:

Las neumonías en cerdos son producidas por una gran variedad de agentes infecciosos y representan un serio problema en las granjas de engorda intensiva. Aproximadamente un 10% de los animales sacrificados en el Rastro de Ferrería la presentan (Pijoan, Ochoa y Trigo, 1975), mientras que en otras partes del país la incidencia es mayor (Maqueda, 1977).

Su etiología es muy compleja y no parece deberse a un solo agente. Debido a esto, numerosos autores mencionan la posibilidad de una secuencia de microorganismos para explicarla. Dichos autores (Saunders 1946; Huhn 1970; Little 1973; Pijoan, Ochoa, Trigo y Dominguez 1975) mencionan a los virus como agentes invasores primarios, seguidos por un micoplasma que debilita las defensas del aparato respiratorio, con lo cual las bacterias y probablemente los hongos actúan como los agentes productores del proceso patológico.

Es debido a esto que la Neumonía Enzoótica Porcina sea una de las enfermedades que afecten más animales.

Etiología de la Neumonía Forcina en México y otros países:

En México se ha demostrado que el virus vacunal del Cólera Porcino es un factor importante en el desencadenamiento de las lesiones neumónicas en estos animales (Ochoa, Pijoan y Suárez, 1976) permitiendo la colonización del pulmón por Pasteurella multocida.

Asimismo, en un estudio bacteriológico realizado en nuestro país se reportó como el agente más importante productor de neumonías en cerdos a Pasteurella multocida; además del aislamiento de: Pasteurella haemolytica, Streptococcus spp., Escherichia coli, Staphylococcus spp., Corynebacterium spp. y Alcaligenes (Berdetella) bronchisépticus entre otros. En ninguno de los casos se aisló micoplasma. Sin embargo el mismo grupo ha descrito recientemente el aislamiento de Mycoplasma hyorhinis a partir de pulmones neumónicos (Ciprian, Ochoa y Pijoan, 1978). Estos datos parecen indi-

car que los agentes secundarios causales de neumonía varían en cada país (Pijoan, Ochoa y Trigo, 1975).

En Inglaterra el agente más importante productor de neumonías parece ser Haemophilus parahaemolyticus (Little, 1973). En Estados Unidos, al igual que en nuestro país el agente infeccioso más comunmente aislado es Pasteurella multocida (Carter, 1970), aunque recientemente se han descrito neumonías severas causadas por Haemophilus parahaemolyticus (Ochoa y Pijoan, 1978).

Por otro lado se reconoce que algunas formas micóticas son capaces de producir también problemas neumónicos; sobre todo Aspergillus sp. (Emmons, 1971), el cual puede ser encontrado en lesiones producidas por otros agentes. Sin embargo se observa más comunmente la presencia de aspergillus en las paredes de los bronquios, extendiéndose al parénquima adyacente, produciendo una neumonía piógena necrozante aguda. Las hifas de aspergillus tienen una tendencia decidida a invadir los vasos sanguíneos, produciendo una telangiectasis trombótica. Esto da la oportunidad de diseminación del hongo en forma de embolias.

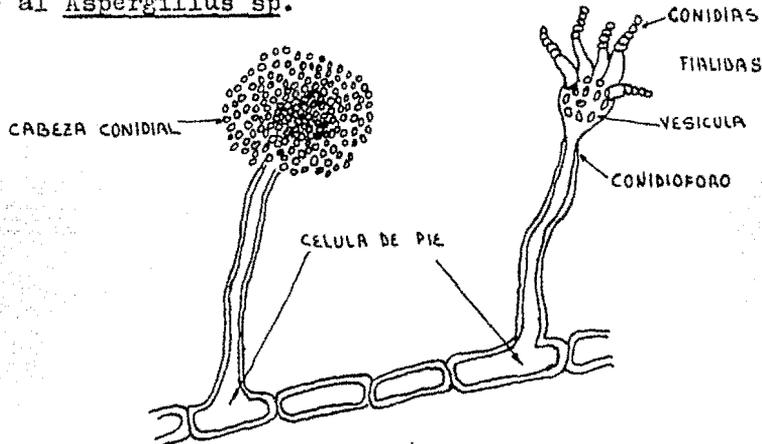
Aspergillus fumigatus produce endotoxinas, por ejemplo: Gene y Best (Emmons, 1971) aislaron una neurotoxina. Sin embargo la patología de la aspergilosis no indica que esta toxina sea importante para la enfermedad. Henrici (1939) aisló una toxina más significativa que puede explicar las lesiones hemorrágicas agudas que se forman en aves y animales cuando son inoculados con grandes cantidades de esporas.

El pronóstico de la aspergilosis pulmonar es grave, la enfermedad cavitatoria es destructiva y expansiva y se puede acompañar de hemoptisis grave, que puede ser fatal (Emmons, 1971; Connat 1950 y Ainsworth, 1973).

Cultivos de Aspergillus sp. y su Morfología:

En medios de cultivo adecuados la mayoría de las especies de aspergillus crecen en poco tiempo como colonias blancas que rápidamente cambian a verde grisáceo con formación de esporas. Las conidiosporas tienen un ancho de 2 a 8 micras, son planas y en la punta se expanden a una vesícula en forma de cópula con 20 a 30 micras de diámetro. El ensanchamiento

gradual de conidiófora a vesícula, la producción de fialidas en solo la unidad superior o los dos tercios de la vesícula, la producción de fialidas solamente, el encurvamiento de las fialidas hasta que se acercan a una orientación paralela con las de arriba, resultando en la producción de una masa columnar de esporas aunado a la presencia de la característica célula del pie, así como el color verde grisáceo de la colonia identifican plenamente al Aspergillus sp.



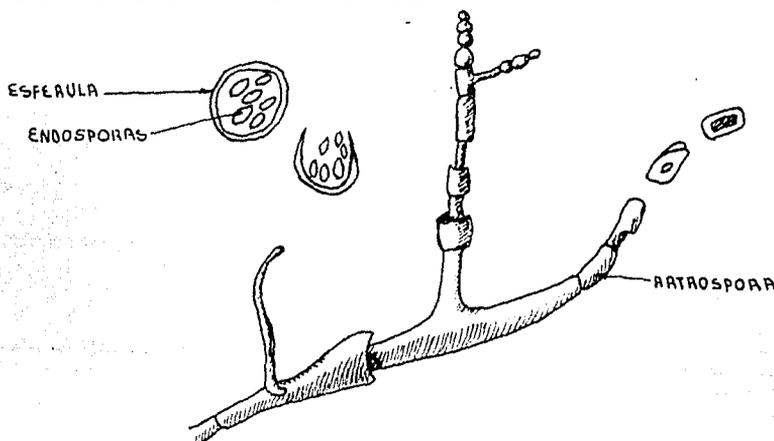
En la mayoría de las lesiones pulmonares y diseminadas en las que solamente se encuentran formas de hifas, se puede hacer una identificación presuntiva de especies de aspergillus basado en la orientación histopatológica, debiendo confirmarse el diagnóstico con el aislamiento del agente en el laboratorio.

Coccidioides immitis:

Este es un hongo dimórfico que produce una enfermedad característica de las zonas desérticas afectando gran variedad de animales, aunque se detecta con mayor frecuencia en perros y bovinos. Este tipo de micosis produce granulomas diseminados en pulmón con lo cual la enfermedad se confunde con tuberculosis. En las lesiones el hongo se encuentra en forma de levadura no infecciosa, con esférulas de 45 micras de diámetro que contienen en su interior las levaduras. En cultivos y en el suelo está en forma miceliada (la cual es altamente infecciosa) presentando estructuras diseminadas llamadas artroesporas. La

enfermedad diseminada es frecuentemente mortal, aunque se piensa que solo se presenta en individuos inmunodeprimidos o que inhalan dosis considerables de artrosporas (Pijoan y Cervantes, 1977).

El diagnóstico de la Coccidioidomicosis se basa en reacciones intradérmicas de hipersensibilidad celular para lo cual se utiliza un antígeno (coccidiolina) derivado de los productos del metabolismo del hongo. Además se puede efectuar el diagnóstico histopatológico de los órganos afectados en los cuales se pueden observar esférulas que se tiñen de rojo con P.A.S. No se recomienda cultivar el hongo, pues la fase miceliada es bastante infecciosa en condiciones de laboratorio.

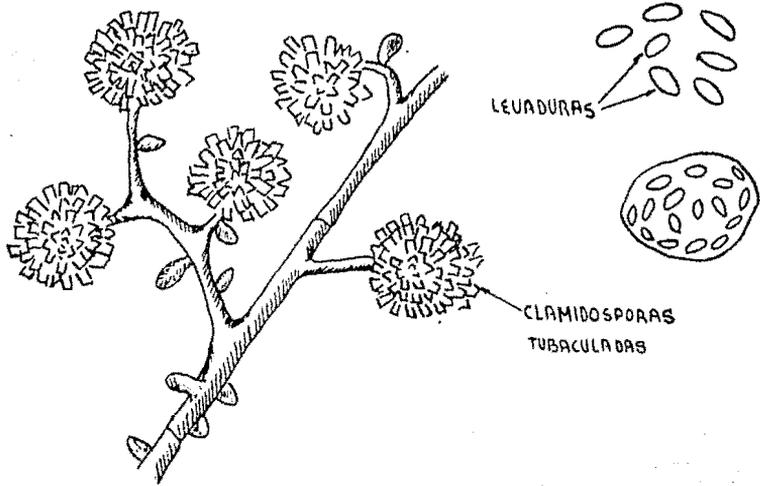


Histoplasma capsulatum:

Es un hongo dimórfico que ocasiona una infección diseminada que afecta a células del Sistema Retículo Endotelial.

La Histoplasmosis afecta a un gran número de animales, aunque es más común observarla en perros. El hongo en los tejidos está en forma de levadura (no infecciosa), produciendo lesiones granulomatosas parecidas a las encontradas en Tuberculosis. Las levaduras son pequeñas y ovaladas. La forma micelial (infecciosa) se puede observar en cultivos.

Para el diagnóstico se efectúa la prueba de intradermoreacción con histoplasmina. Se puede cultivar en Sabouraud sin antibiótico, o bien efectuando un examen histopatológico.

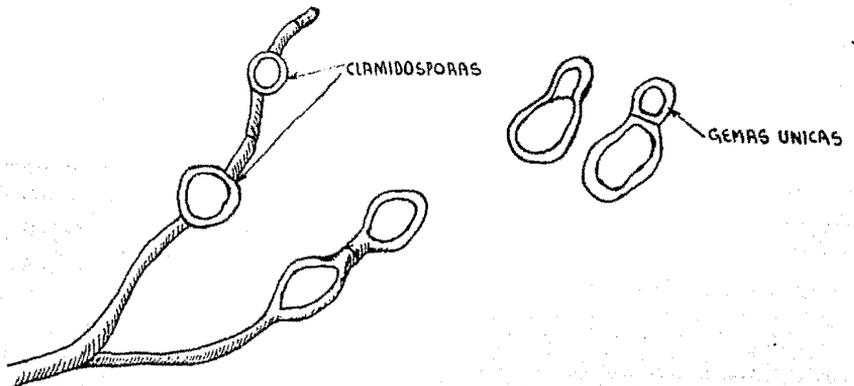


Blastomyces dermatitidis:

Es un hongo que en los tejidos adopta la forma de levadura las cuales alcanzan hasta 20 micras que con frecuencia se encuentran en gemación. La forma micelial se observa en cultivos, con micelios septados, pequeñas conidias que se adhieren por conidióforos cortos a la hifa.

La enfermedad que produce este hongo es de tipo granulomatoso; diseminándose ocasionalmente la infección de los tejidos internos a la piel.

El diagnóstico se puede establecer por exámen histopatológico y cultivo.



Objetivo:

Desde hace muchos años se está investigando en varias partes del mundo la interrelación de agentes infecciosos que causen neumonía en cerdos. En nuestro país se ha desarrollado una serie de trabajos que contribuyen a comprender la compleja etiología de este trastorno. En estos trabajos se han realizado estudios tratando de aislar agentes infecciosos que causen neumonía. En algunos de ellos se reporta la presencia de posibles formas micóticas sin poder determinar el papel que estos hallazgos pudieran tener. En base a esto, en el siguiente trabajo se buscará aislar formas micóticas en pulmones neumónicos de cerdos, relacionando este aislamiento con las alteraciones encontradas macroscópica y microscópicamente, tomando en cuenta las lesiones que producen las micosis profundas en pulmón.

M A T E R I A L Y M E T O D O S .

Para el siguiente trabajo se recolectaron 60 muestras de pulmones neumónicos de cerdos en el Rastro de Ferrería, las cuales fueron utilizadas para intentar el aislamiento y para estudios histopatológicos.

Estudios Micológicos:

Para el aislamiento se esterilizó la superficie de la muestra con una espátula al rojo, se hizo un corte con tijeras flameadas y se tomó parte de la muestra con un asa. Acto seguido se procedió a sembrarla por la técnica de puntos aislados en cajas de Petri conteniendo medios selectivos para hongos, como son: Sabouraud Dextrosa Agar (Sda), Extracto de Malta Agar (E.M.A.) y Micobiotic Agar (Mic). Se incubaron a 28°C en una estufa bacteriológica. A los 5 días las colonias aisladas se separaron en tubos con Sda.

Posteriormente se identificaron los agentes por microcultivo según la técnica de Ridell (Pijoan y Cervantes, 1977) y se tñieron con el colorante Lactofenol Azul de Algodón.

Estudios Histopatológicos:

Para el estudio histopatológico las muestras fueron fijadas durante 3 días en formol al 10% el mismo día de su obtención. Se procedió a deshidratar las muestras en el Histoquinete. Se incluyeron las muestras en parafina utilizando el embebedor de parafina y se cortaron a 6 micras en un microtomo. De aquí se pasaron a un recipiente de flotación de tejidos, el cual lleva agua con grenetina a una temperatura entre 40-50°C. Posteriormente se tñieron con técnicas comunes, como son: Hematoxilina-Eosina, Tricrómica de Masson y Shorr. Asimismo se tñieron con técnicas específicas para hongos, como son: Gomory Grocotts, Acido Peryódico de Schiff y Azul de Alsacia. Las técnicas de procedimiento y las soluciones se encuentran en el cuadro 1.

Las laminillas fueron observadas en un Fotomicroscopio Zeiss a 40, 100, 400 y 1000 aumentos y en un microscopio Reichert " Zetopan " a las mismas magnificaciones. Las fotografí

as fueron tomadas en película Kodak Tri-X.

Análisis Estadístico:

Con el fin de determinar la correlación estadística en tre la presencia de hongos y las lesiones, se aplicó el programa Statistycal Analysis System (S.A.S.) del Departamento de Estadística Experimental de la Universidad Estatal de Carolina del Norte (Barr and Goodnight, 1972). Dicho programa se basa en el método de mínimos cuadrados con número desigual en las clases, de acuerdo con las indicaciones de Harvey (1960). El análisis se efectuó en una computadora I.B.M. 370 del Centro de Estadística y Cálculo del Colegio de Postgraduados, E.N.A. Chapingo, Edo. de Mex.

CUADRO 1:

Técnicas y Fórmulas de las Tinciones Utilizadas

A) Hematoxilina-Eosina.

- 1.- Desparafinar. (*)
- 2.- Lavar con agua de la llave.
- 3.- Hematoxilina de 5 a 10 minutos.
- 4.- Lavar con agua de la llave.
- 5.- Alcohol ácido de 15 a 30 segundos.
- 6.- Lavar con agua de la llave.
- 7.- Eosina de 3 a 5 minutos.
- 8.- Alcohol de 96°, 5 minutos.
- 9.- Alcohol de 96°, 5 minutos.
- 10.- Alcohol absoluto, 5 minutos.
- 11.- Alcohol absoluto, 5 minutos.
- 12.- Xilol, 5 minutos.
- 13.- Xilol, 5 minutos.
- 14.- Montaje en resina sintética.

Soluciones para técnica de Hematoxilina-Eosina.

Hematoxilina (Harris).

Hematoxilina (preparación) en polvo 5 gramos.

Alcohol absoluto 50 ml.

Alumbre de potasio 100 gramos.

Agua destilada 1000 ml.

Oxido de mercurio (rojo) 2.5 gramos.

Eosina al 1%.

Solución madre: Eosina amarillenta 1 gramo.

Alcohol de 96° 100ml.

(*) Técnica para desparafinar:

Xilol durante 5 minutos.

Xilol durante 5 minutos.

Alcohol absoluto durante 5 minutos.

Alcohol de 96° durante 5 minutos.

Alcohol de 70° durante 5 minutos.

CUADRO 1 (cont.)

B) Tricrómica de Masson.

- 1.- Desparafinar.
- 2.- Lavar en agua.
- 3.- (Los cortes fijados en formol deben colocarse durante una hora en solución de Bouin a 50°C ó dejarlos durante 24 horas a temperatura ambiente).
- 4.- Lavar en agua corriente (hasta desaparecer el color amarillo).
- 5.- Lavar en agua destilada.
- 6.- Hematoxilina de Weigert, 10 minutos.
- 7.- Lavado con agua corriente, 10 minutos.
- 8.- Lavado en agua destilada.
- 9.- Solución de Biebrich Escarlata, Fucsina ácida 10 minutos.
- 10.- Lavar en agua destilada.
- 11.- Solución de ácido fosfotungstico y fosfomolibdico 10 a 15 minutos.
- 12.- Solución de azul de anilina, 10 a 15 minutos.
- 13.- Lavar en agua destilada.
- 14.- Acido acético al 1%, 1 a 5 minutos.
- 15.- Deshidratar, aclarar y montar en resina como de costumbre.

Soluciones para la coloración tricrómica de Masson.

Solución de Bouin:

Solución saturada de ácido pícrico 75ml.

Formol del 37 a 40% 25ml.

Acido acético 5ml.

CUADRO 1 (Cont.)

Hematoxilina de Weigert:

Solución " A " :

Hematoxilina 1 gramo.

Alcohol de 96° 100 ml.

Solución "B":

Sol. acuosa de Cloruro férrico al 29%, 4 ml.

Agua destilada 95 ml.

Acido clorhídrico concentrado 1 ml.

__Para la solución de trabajo se mezclan partes iguales de las soluciones "A" y "B".

Solución de Biebrich Escarlata Fucsina Acida:

Sol. acuosa de Escarlata Biebrich acuosa al 1%, 90 ml.

Sol. acuosa de Fucsina ácida al 1% 10 ml.

Acido acético 1 ml.

Solución de ácido fosfotúngstico y fosfomolibdico:

Se disuelven 5 gramos de ácido fosfotúngstico y 5 gramos de ácido fosfomolibdico en 200ml. de agua destilada.

Solución de anilina:

Anilina azul 2.5 gramos.

Acido acético 2 ml.

Agua destilada 100ml.

(Drury and Wallington, 1967)

CUADRO 1 (cont.)

C) Acido Peryódico de Schiff. (PAS)

Pijación.- Formol al 10%.

Cortes por parafina de 6 micras.

Específica para tinción de: hongos, membrana basal, mucopolisacáridos y amibas.

Técnica de procedimiento.

- 1.- Desparafinar
- 2.- Lavar en agua destilada.
- 3.- Acido Peryódico al 0.5% 10 a 15 minutos.
- 4.- Lavar en agua destilada.
- 5.- Reactivo de Schiff 10 a 15 minutos hasta que el corte esté rosa pálido.
- 6.- Lavar en agua corriente.
- 7.- Metabisulfito de sodio al 5%, 5 minutos (checar al microscopio).
- 8.- Lavar en agua destilada 1 minuto.
- 9.- Hematoxilina de Harris, de 30 segundos a 1 minuto.
- 10.- Lavar en agua corriente.

Método de preparación del Schiff.

Moler bien la fucsina en un mortero, agregar el agua poco a poco, vaciar en un matraz de 500ml., agregar el bisulfito y agitar. Después agregar el ácido clorhídrico agitando durante 30 minutos. Al filtrar agregar carbón activado hasta que salga incoloro. Se guarda en refrigeración en frasco ámbar.

(Drury and Wallington, 1967)

CUADRO 1 (cont.)

D) Gomory Grocotts.

(demostración de hongos)

Fijación.- Formol al 10%.

Cortes en parafina de 6 micras.

Técnica de procedimiento.

- 1.- Desparafinar y deshidratar.
- 2.- Oxidar en solución de ácido crómico al 40%. 1 hora.
- 3.- Lavar en agua corriente. Varios minutos.
- 4.- Solución de bisulfito de sodio (para remover los cristales de ácido crómico). 1 minuto.
- 5.- Lavar en agua corriente. 5 a 10 minutos.
- 6.- Lavar en agua destilada durante 30 segundos.
- 7.- Solución de trabajo de metenamina-nitrato de plata, en la estufa a 58-60°C una hora en la estufa.
- 8.- Lavar en agua destilada. Varios cambios.
- 9.- Cloruro de oro. 2 a 5 minutos.
- 10.- Lavar en agua corriente.
- 11.- Quitar la plata que no esté reducida en bisulfito de sodio. 2 a 5 minutos.
- 12.- Lavar en agua corriente.
- 13.- Contrastar en solución de trabajo de verde claro. 30 a 45 segundos.
- 14.- Deshidratar, aclarar y montar como de costumbre.

Resultados:

Hongos - contorno de negro.

Mucina - gris oscuro.

Algunas partes de micelios e hifas - rosa oro.

Fondo - verde pálido.

CUADRO 1 (cont.)

Soluciones para la técnica de Gomory Grocotts.

Solución de ácido crómico (Trióxido de cromo).

Acido crómico 4 gramos.

Agua destilada 100 cc.

Solución de nitrato de plata al 5%.

Nitrato de plata 5 gramos.

Agua destilada 100 cc.

Solución de borax al 5%.

Borax (tetraborato de sodio) 5 gramos.

Agua destilada 100 cc.

Esta solución se pone a calentar a 45-50°C hasta que se disuelva.

Solución de nitrato de plata-metenamina.

Solución de nitrato de plata al 5% 5 cc.

Solución de metenamina al 3% 100 cc.

Al preparar esta solución se forma un precipitado blanco que se disuelve inmediatamente. Guardar en el refrigerador.

Solución de trabajo de nitrato de plata-metenamina.

Solución stock de nitrato de plata-metenamina 25 cc.

Agua destilada 25 ml.

Solución de borax al 5% 2 ml.

Solución de bisulfito de sodio al 1%.

Bisulfito de sodio 1 gramo.

Agua destilada 100 cc.

Solución de metenamina.

Hexametenetetramina 3 gramos.

Agua destilada 100 cc.

CUADRO 1 (cont.)

Solución de cloruro de oro al 0.1%.

Solución de cloruro de oro al 1% 10 cc.

Agua destilada 90 cc.

Esta solución se puede usar varias veces.

Solución de tiosulfato de sodio al 2%.

Tiosulfato de sodio 2 gramos.

Agua destilada 100 cc.

Solución de verde claro al 0.2%.

Colorante de Light SF amarillento 0.2 gramos.

Agua destilada 100 cc.

Acido acético glacial concentrado 0.2 gramos.

Para esta tinción se requiere mucha limpieza y precaución;

toda la cristalería que se usa se tendrá que lavar con mezcla crómica (dicromato de potasio, agua destilada y ácido sulfúrico), solución de yodo y enjuagar con agua destilada.

(Drury and Wallington, 1967)

CUADRO 1 (cont.)

E) Técnica de Shorr.

- 1.- Desparafinar.
- 2.- Lavar en agua.
- 3.- Hematoxilina de Harris de 1 a 3 minutos.
- 4.- Lavar en agua.
- 5.- Alcohol ácido de 10 a 15 segundos (alcohol de 70. 100 ml. y ácido clorhídrico 1 ml.).
- 6.- Lavar en agua corriente.
- 7.- Agua amoniacal durante 10 segundos (agua 100ml. y amoníaco 1 ml.).
- 8.- Lavar en agua corriente durante 5 minutos.
- 9.- Colorante de Shorr de 1 a 2 minutos.
- 10.- Alcohol de 96° para el lavado.
- 11.- Alcohol absoluto durante 5 minutos.
- 12.- Alcohol absoluto durante 5 minutos.
- 13.- Xilol durante 5 minutos.
- 14.- Xilol durante 5 minutos.
- 15.- Montaje en resina como de costumbre.

Soluciones para la técnica de Shorr.

Colorante de Shorr.

Alcohol de 50° 100 ml.

Escarlata de Biebrich 0.50 gramos.

Orange G 0.25 gramos.

Fast-Green FCF 0.075 gramos.

Acido Fosfomolibdico 0.50 gramos.

Acido fosfotúngstico 0.50 gramos.

Acido acético glacial 1 cc.

(Drury and Wallington, 1967)

CUADRO 1 (cont.)

F) Técnica de Azul de Alscia- P.A.S.

- 1.- Desparafinar.
- 2.- Azul de Alscia 5 minutos.
- 3.- Lavar en agua corriente.
- 4.- Lavar en agua destilada.
- 5.- Tratar con ácido peryódico 2 minutos.
- 6.- Lavar con agua destilada.
- 7.- Reactivo de Schiff 8 minutos.
- 8.- Lavar con agua corriente 10 minutos.
- 9.- Deshidratar, aclarar y montar.

Resultados:

Mucina ácida - azul.

Mucina neutra - magenta.

Mezcla de mucina ácida y neutra - púrpura.

Soluciones.

Azul de Alscia al 1% en ácido acético al 3%.

Acido peryódico al 1% en agua destilada.

Reactivo de Schiff.

Fuscina básica 2 gramos.

Metabisulfito de sodio 5 gramos.

Acido clorhídrico concentrado 8 cc.

Agua destilada 192 cc.

Carbón activado 2 gramos.

El montaje y la conservación se hizo en cubreobjetos y resina sintética, observandose los cortes en microscopio compuesto.

(Drury and Wallington, 1967)

CUADRO 1 (cont.)

F) Técnica de Azul de Alsacia- P.A.S.

- 1.- Desgranar.
- 2.- Azul de Alsacia 5 minutos.
- 3.- Lavar en agua corriente.
- 4.- Lavar en agua destilada.
- 5.- Tratar con ácido periyódico 2 minutos.
- 6.- Lavar con agua destilada.
- 7.- Reactivo de Schiff 8 minutos.
- 8.- Lavar con agua corriente 10 minutos.
- 9.- Deshidratar, aclarar y montar.

Resultados:

Mucina ácida - azul.

Mucina neutra - magenta.

Mezcla de mucina ácida y neutra - púrpura.

Soluciones.

Azul de alsacia al 1% en ácido acético al 3%.

Acido periyódico al 1% en agua destilada.

Reactivo de Schiff.

Fuscina básica 2 gramos.

Metabisulfito de sodio 5 gramos.

Acido clorhídrico concentrado 8 cc.

Agua destilada 192 cc.

Carbón activado 2 gramos.

El montaje y la conservación se hizo en cubreobjetos y resina sintética, observandose los cortes en microscopio compuesto.

(Drury and Wallington, 1967)

CUADRO 1 (cont.)

F) Técnica de Azul de Alscacia- P.A.S.

- 1.- Desgerafinar.
- 2.- Azul de Alscacia 5 minutos.
- 3.- Lavar en agua corriente.
- 4.- Lavar en agua destilada.
- 5.- Tratar con ácido peryódico 2 minutos.
- 6.- Lavar con agua destilada.
- 7.- Reactivo de Schiff 8 minutos.
- 8.- Lavar con agua corriente 10 minutos.
- 9.- Deshidratar, aclarar y montar.

Resultados:

Mucina ácida - azul.

Mucina neutra - magenta.

Mezcla de mucina ácida y neutra - múpura.

Soluciones.

Azul de alscacia al 1% en ácido acético al 3%.

Acido peryódico al 1% en agua destilada.

Reactivo de Schiff.

Fuscina básica 2 gramos.

Metabisulfito de sodio 5 gramos.

Acido clorhídrico concentrado 8 cc.

Agua destilada 192 cc.

Carbón activado 2 gramos.

El montaje y la conservación se hizo en cubreobjetos y resina sintética, observandose los cortes en microscopio compuesto.

(Drury and Wallington, 1967)

RESULTADOS .

Estudios Micológicos:

En el cuadro 2 se muestra el resultado del aislamiento en porcentaje. Se puede ver que se aisló Aspergillus sp. en 6 ocasiones, Rhizopus sp. en 4, Penicillium sp. en 2 y Neurospora sp. solamente una ocasión.

Estudios Histopatológicos:

Los estudios histopatológicos demostraron la presencia de lesiones. Estas se caracterizaron por: descamación de las células del epitelio traqueobronquial, atelectacia, congestión, hemorragia, enfisema alveolar e intersticial, obstrucción de bronquios y bronquiolos por excesiva producción de mucina (figs. 1 y 2), vacuolización de células epiteliales alveolares, presencia de células polimorfonucleares e infiltración peribronquial, peribronquiolar y periarterial por células mononucleares, las cuales en su mayoría fueron macrófagos y linfocitos (figs. 3 y 4). El porcentaje en el que se encontraron estas lesiones se observa en el cuadro 3.

Por otro lado se observó que la descamación de células epiteliales, la infiltración de células polimorfonucleares y la obstrucción por mucina constituyeron el 15.8% de las lesiones que se presentaron en las muestras; la atelectacia, la congestión y la hemorragia un 5.3% de las alteraciones encontradas; mientras que la infiltración de células mononucleares, el enfisema y la vacuolización de células epiteliales alveolares aparecieron en un 23.8% de las muestras.

También se puede indicar que el enfisema se relacionó en un 100% con los aislamientos de hongos, la descamación de células epiteliales a nivel traqueobronquial y alveolar en un 46%, la obstrucción por mucina en un 53%, la infiltración de células mononucleares, infiltración de células polimorfonucleares y vacuolización de células epiteliales alveolares se relacionaron con los aislamientos en un 38%.

En algunos pulmones se observaron formas similares a estructuras fungales, las cuales se muestran en las figuras 5 y 6.

Análisis Estadístico:

Los resultados del análisis estadístico están en el cuadro 4. Se puede ver que la correlación más significativa fué entre la obstrucción de bronquios por mucina y la presencia de hongos. También hubo correlación estadística entre la presencia de atelectacia y fibrosis, congestión y hemorragia y enfisema y descamación de células epiteliales.

CUADRO 2

AISLAMIENTO DE HONGOS A PARTIR DE
PULMONES NEUMONICOS.

Hongo.	N ^o . de aislamientos	%
<u>Aspergillus sp.</u>	6	10.0
<u>Rhizopus sp.</u>	4	6.6
<u>Penicillium sp.</u>	2	3.3
<u>Neurospora sp.</u>	1	1.6

CUADRO 3

PORCENTAJE DE LESIONES HISTOPATOLOGICAS

EN LOS PULMONES NEUMONICOS.

l e s i ó n .	%
Atelectacia.	28.3
Congestión.	1.8
Descamación y destrucción de células epiteliales.	41.6
Hemorragia.	1.8
Infiltración de células mononucleares.	35.0
Infiltración de células polimorfonucleares.	26.6
Obstrucción de bronquios y bronquiolos por excesiva producción de mucina.	26.6
Enfisema.	68.3
Vacuolización de células epiteliales alveolares.	40.0

Fig. 2:

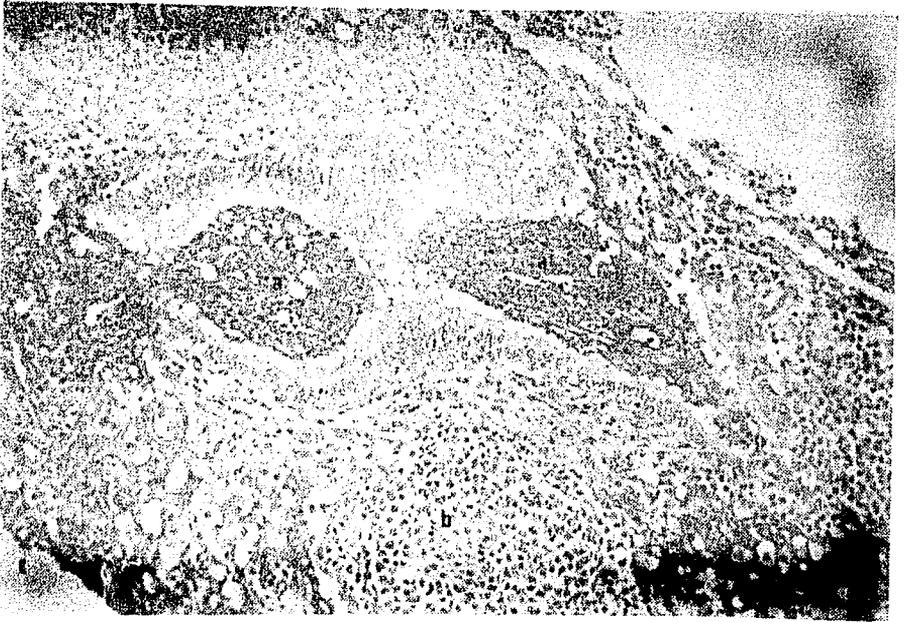


a.- Mucina obstruyendo la luz de un bronquiolo.

b.- El epitelio del bronquiolo dá la apariencia de ser de tipo columnar.

Técnica Gomory- Grocotts. X 400.

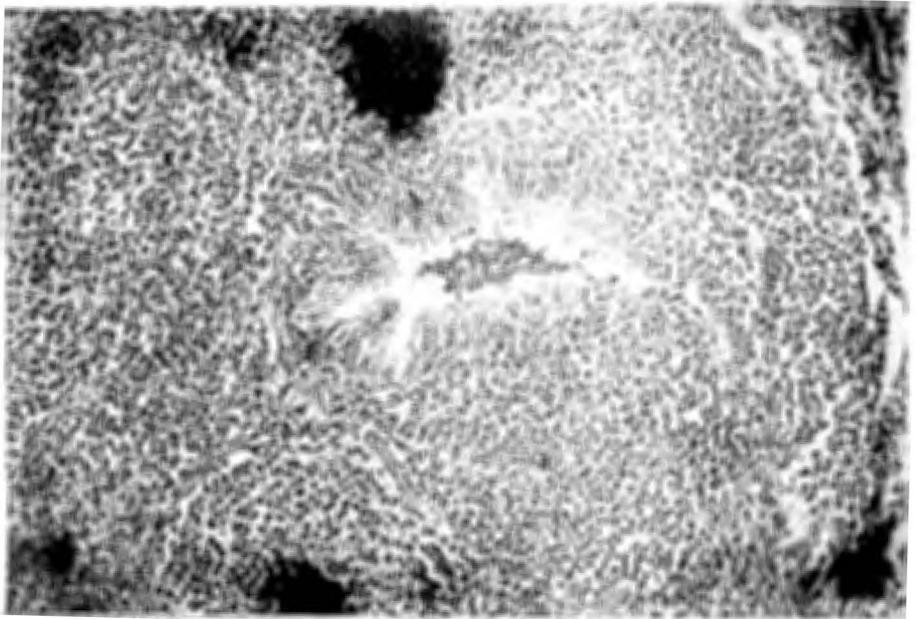
Fig. 1: .



- a.- Mucina obstruyendo la luz de un bronquio.
- b.- Alrededor del bronquio se observa la proliferación de las células de los nódulos linfoides regionales.

Técnica de P.A.S. X 100.

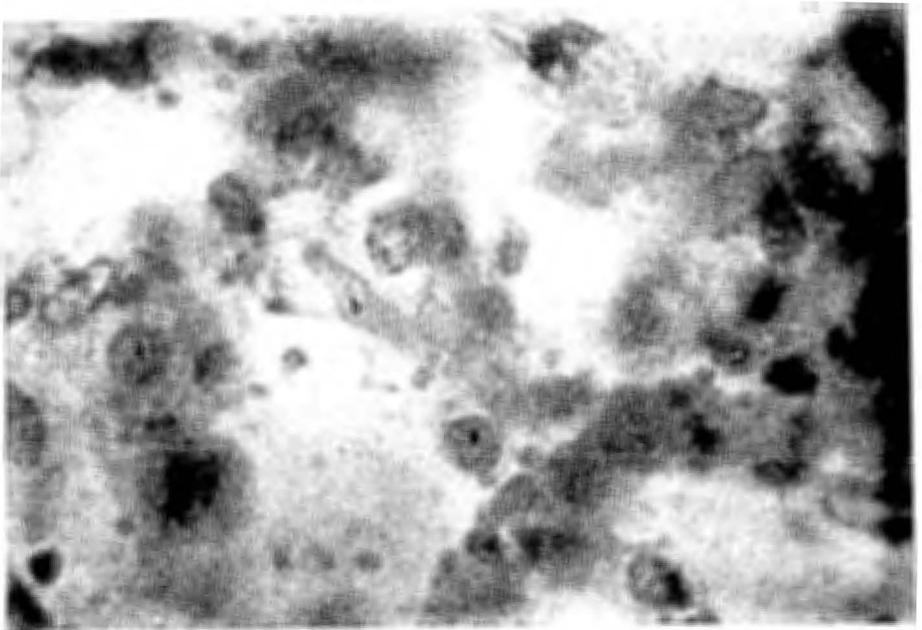
Fig. 3



- a.- Infiltración de células **mononucleares**
(linfocitos) alrededor del bronquiolo.
- b.- Aumento de tamaño del epitelio del
bronquiolo.

Técnica de P.A.S. X 100.

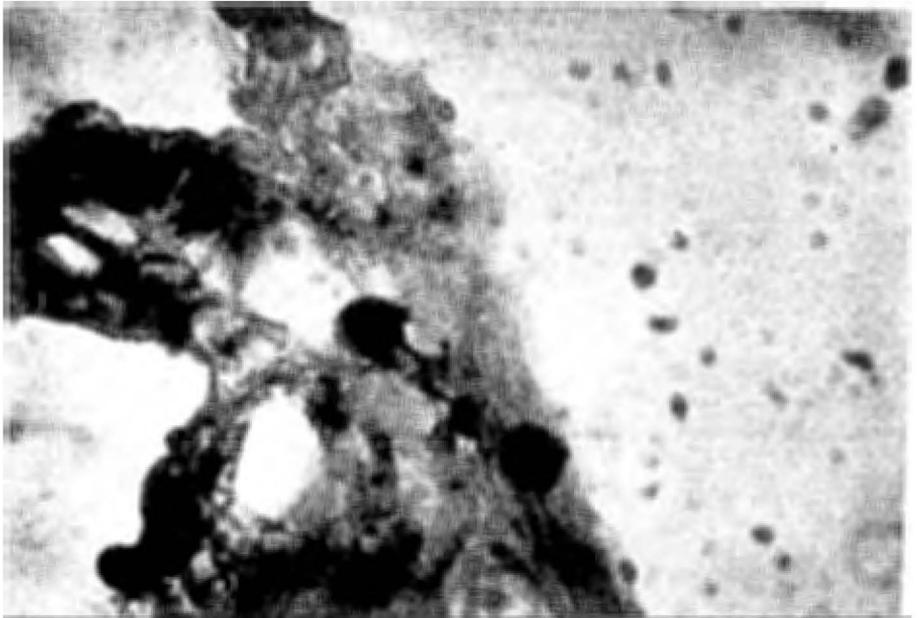
Fig. 4:



- a.- Infiltración de células mononucleares (linfocitos y macrófagos) en el alveolo pulmonar.
- b.- Estructura alargada semejante a una hifa.

Técnica de Masson X 1000.

Fig. 5:



c.- Estructura similar a una conidiospora.

Técnica de Masson X 1000.

CUADRO 4.

CORRELACION ESTADISTICA ENTRE LAS DIVERSAS

LESIONES Y LOS HONGOS.

Correlación entre:	Probabilidad =
Atelectacia - Fibrosis	0.0140 +
Congestión - Obstrucción de bronquios y bronquiolos por mucina	0.1123
Congestión - Hemorragia	0.0001 +
Enfisema - Descamación de células epiteliales	0.0157 +
Hemorragia - Obstrucción de bronquios y bronquiolos por mucina	0.0965
Infiltración de células mononucleares (linfocitos y macrófagos) - Infiltración de células polimorfonucleares	0.2420
Infiltración de células mononucleares - <u>Neurospora sp.</u>	0.1606
Infiltración de células polimorfonucleares - Atelectacia	0.1730
Infiltración de células polimorfonucleares - <u>Aspergillus sp.</u>	0.2264
Obstrucción de bronquios y bronquiolos por mucina - <u>Rhizopus sp.</u>	0.2915
Obstrucción de bronquios y bronquiolos por mucina - <u>Penicillium sp.</u>	0.0137 +
Obstrucción de bronquios y bronquiolos por mucina - <u>Neurospora sp.</u>	0.0863

+ Valores estadísticamente significativos.

DISCUSION .

El estudio de los agentes etiológicos que inciden en el aparato respiratorio es muy complicado. Esto se debe al hecho de que el pulmón neumónico usualmente está invadido por una flora variada de gérmenes oportunistas. En estas condiciones resulta difícil, utilizando exclusivamente técnicas de aislamiento, decidir cuales de los microorganismos presentes son patógenos primarios, cuales patógenos secundarios y cuales oportunistas apatógenos. Para resolver este dilema se puede recurrir a la inoculación experimental de animales, pero este proceso, además de costoso, se complica debido a que muchas de las enfermedades respiratorias son infecciones mixtas en las que los agentes involucrados actúan de acuerdo a secuencias más o menos rigurosas (Pijoan - en prensa). Otra alternativa es utilizar el análisis estadístico, tratando de correlacionar la presencia del agente con la presencia de lesiones características, o de aquellas que el investigador defina como de severidad. Este proceso tiene algunos inconvenientes, entre los que destaca la necesidad de utilizar máquinas computadoras debido al grán volumen de cálculos necesarios para dicho análisis. Aun así, el análisis estadístico es el método más económico y rápido a nuestro alcance, para valorar la patogenicidad de un microorganismo, y por estas razones, fué elegido para el siguiente trabajo.

El método estadístico nos permitió comprobar que algunos hongos se relacionan con ciertas lesiones de grán severidad y son, al parecer, patógenos para el cerdo. Dichos hongos son Penicillium sp. y Neurospora sp. que se relacionaron estrechamente con una lesión severa que no se encuentra comunmente en neumonías: La obstrucción total de la luz bronquial y bronquiolar por mucina. Sin embargo, algunos hechos impiden que se puedan emitir conclusiones definitivas. Por ejemplo, la obstrucción de bronquios por mucina fué observada en 26.6% de los pulmones estudiados, mientras que Penicillium sp. solo se aisló el 3.3% de las ocasiones. y Neurospora sp. el 1.6% (1 ocasión). En

este último caso, la asociación del agente con la lesión puede ser puramente incidental. Esta discrepancia entre el porcentaje de presencia de la lesión, y el de los hongos puede deberse a dos factores:

a.- Es posible que no exista relación alguna entre los agentes y la lesión. En este caso la lesión debería ser debida a alguna otra causa.

b.- Los métodos de aislamiento pueden haber sido inadecuados, y detectado solo una parte pequeña de los hongos presentes. Esta explicación es bastante factible si tomamos en cuenta que el aislamiento de hongos a partir de pulmón no ha sido muy estudiada, y es probable que los métodos y medios de cultivo óptimos no hayan sido encontrados aún.

Otra importante incongruencia que se debe comentar es la aparente falta de correlación entre Aspergillus sp. y las lesiones severas del pulmón. En efecto, aspergilus es el más común de los patógenos respiratorios, y fué encontrado en mayor porcentaje también en este estudio. Debido a esto, cabría esperar la correlación de este hongo con las lesiones severas, y en especial con la obstrucción por mucina, y sin embargo no fué así. Por otro lado es cierto que Aspergillus sp. (y tambien Penicillium sp.) son contaminantes comunes de los alimentos de los cerdos, los cuales con frecuencia inhalan sus esporas, sin que aparentemente esto conduzca a una proliferación del agente. En estos casos es factible aislar el hongo debido a la presencia de esporas recién inhaladas, sin que esto signifique que existe infección.

En algunos casos (figs. 4 y 5) se encontraron estructuras semejantes a micelios ó a vesículas dentro del pulmón. La apariencia de estas no es similar a la ilustrada en la literatura para casos de aspergilosis pulmonar. Sin embargo, debe haber una notable diferencia entre la apariencia histopatológica de una micosis profunda terminal en humanos y los casos descritos aquí. En el caso de humanos, la infección, de naturaleza crónica se establece y disemina durante un período muy largo, usualmente de varios años. En estas condiciones, el hongo prolifera en el pulmón lentamente hasta terminar con la vida del

individuo. En ese momento, el hongo ha tenido tiempo para desarrollarse, y se encuentran hifas perfectamente distinguibles en el parénquima. La situación en los animales domésticos, y en especial los cerdos, es distinta. En estos casos el animal es sacrificado cuando aún es joven, y tiene solo pocos meses de vida. En estas condiciones el hongo, que casi siempre se manifiesta de forma muy crónica, no ha tenido tiempo para invadir el pulmón y proliferar. Por esta razón, no es de esperarse que la apariencia histopatológica de las micosis pulmonares de animales de abasto sea similar a la encontrada en casos terminales en humanos.

Que las estructuras encontradas son de naturaleza muy debatible puede ilustrarse al mencionar que dichos casos fueron mostrados a cinco patólogos competentes, tanto médicos veterinarios como médicos cirujanos. Uno de los expertos se manifestó en el sentido de que las estructuras eran definitivamente de origen fungal; dos que definitivamente no eran de éste origen y dos no llegaron a ninguna conclusión.

Debido a esto, es importante recalcar que estos estudios se deben continuar. Se pueden utilizar otras técnicas (por ejemplo inmunofluorescencia) trabajando incluso sobre los mismos casos, para ver si en efecto, las estructuras en cuestión son hongos o no.

La definición final sobre la presencia o ausencia de micosis pulmonar en cerdos es importante, debido a la aparentemente elevada incidencia de esporas y aún formas miceliadas en los alimentos para animales. En caso de encontrarse que en efecto existen dichas micosis, será necesario ejercer un control más estricto sobre la manufactura, procesamiento y manejo de los alimentos que se destinan para los animales de abasto.

B I B L I O G R A F I A .

- 1.- Ainsworth, C.G. and Austwick, P.K.C.: Fungal Diseases of Animals. Farham Royal Common-Wealth Agricultural Bureaux. 1973; pags. 37-52.
- 2.- Barr, J.A. and Goodnight, J.H.: A user's guide to the Stadistical Analysis System. North Carolina State University Press, N.C. 1972.
- 3.- Blood, D.C. and Henderson, J.A.: Medicina Veterinaria. Nueva Editorial Interamericana. Tercera Edición. 1976, México; pags. 594-595.
- 4.- Brunner, D.W. and Gillespie, J.H.: Hagan's Infectious Diseases of Domestic Animals. 6a edition. Editorial Cornell University Press. Ithaca (U.S.A.). 1973; pags. 552-556.
- 5.- Carter, G.R.: Pasterellosis. Diseases of Swine. Editor H.W. Dunne. Iowa State University Press. 1970; pag. 563.
- 6.- Ciprian, A.; Ochoa, V.G. y Pijoan, A.C. (1978): Identificación de Mycoplasma hyorhinis en Pulmones Neumónicos de Cerdos en México. Memorias de la XIV Convención de la A.M.V.E.C. Los Mochis.
- 7.- Connat, N.F.; Smith, D.T.; Baker, R.D.; Callaway, J.L. and Martin, D.S.: Manual of Clinical Micology. Editorial Philadelphia and London, W.B. 1950; pags. 377-402.
- 8.- Dunne, H.W.: Diseases of Swine. 3a Edition; Iowa State University Press. Ames, Iowa (U.S.A.). 1970; pag. 534.
- 9.- Drury, R.A.B. and Wallington, E.A.: Carleton's Histological Technique. 4a edición. Oxford University Press. 1967; pags. 114-212.
- 10.- Emmons, C.W.; Binford, C.H. and Utz, J.P.: Medical Micology. 2a edition. Lea and Febiger (U.S.A.). 1971; pags. 256-274.

- 11.- Harvey, W.R.: Least Square Analysis of Data with Uniquel Subclass Number. U.S.D.A. ARS. 20-8, U.S. Print Office. Washington, D.C. 1960.
- 12.- Henrici, A.T.: An Endotoxin from Aspergillus fumigatus. 1939: J. Immunol. 36: 319-338.
- 13.- Little, T.W.A.: The Role of Haemophilus in Porcine Respiratory Disease. Tesis de Ph. D. London University. Inglaterra. 1973.
- 14.- Lundborg, M. and Holma, B. (1974): The Influence of Aspergillus fumigatus Spores and Polystyrene Particles on the number of Lung Macrophages in Rabbits; Sabouraudia. 12: 105-111.
- 15.- Maqueda, J.J. (1977): Incidencia de Neumonía Enzoótica en varios Estados Productores de Cerdos en la República Mexicana (Estudio Preliminar). Memorias del Primer Congreso Latinoamericano de Veterinarios Especialistas en Cerdos; Universidad Autónoma Metropolitana. México.
- 16.- Ochoa, V.G. y Pijoan, A.C. (1978): Neumonías severas en Cerdos causadas por Haemophilus parahaemoliticus; Aislamiento del Agente y Descripción de la Enfermedad. Memorias de la XIV Convención de la A.M.V.E.C. Los Mochis.
- 17.- Pijoan, A.C.; Campos, M.; Suárez, F. y Larios, F. (1977): Efecto del Virus Vacunal del Cólera Porcino sobre la Actividad Bacteriolítica de los Macrófagos Alveolares de Cerdo. Resúmenes de la XIV Reunión Anual del I.N.I.P.; S.A.R.H. México.
- 18.- Pijoan, A.C. y Cervantes, O.R. (1977): Manual de Micología Veterinaria. Universidad Nacional de Estudios Profesionales. Universidad Nacional Autónoma de México.
- 19.- Pijoan, A.C. y Domínguez, J.L. (1975): Incidencia de Metastrongylus spp. en Pulmones Neumónicos y no Neumónicos de Cerdo. Tec. Pec. Mex. 28: 38-39.

- 20.- Pijoan, A.C.; Ochoa, V.G. y Trigo, F. (1975): Aislamiento e Identificación de Bacterias de Pulmones Neumónicos de Cerdo. Tec. Pec. Mex. 29; 46-49.
- 21.- Pijoan, A.C. and Ochoa, V.G. (1978): Interaction between a Hog Cholera Vaccine Strain and Pasteurella multocida in the Production of Porcine Pneumonia. J. Comp. Path.
- 22.- Smith, H.A. and Jones, T.C.: Patología Veterinaria. 1ª edición; Editorial Pueblo y Educación. La Habana. 1975; pags. 425-430.
- 23.- Turner, G. and Rowlands, R.T. (1976): Cytochrome Abnormalities and Cyanide-Resistant Respiration in Extranuclear Mutants of Aspergillus nidulans. J. Bact. 125; 389-397.
- 24.- Warnock, D.W. and Eldred, G.F. (1975): Immunoglobulin Classes of Antibodies to Aspergillus fumigatus in Patients with Pulmonary Aspergillosis. Sabouraudia. 13; 204-208.