

Presentación sistémica de *Aspergillus* spp con semiología neurológica en un Pastor Alemán: informe de un caso clínico

Systemic presentation of *Aspergillus* spp with neurological involvement in a German Shepherd: clinical case report

Ana Laura Hernández Tapia* Eduardo Carlos Santoscoy Mejía** José Ramírez Lezama***
Roberto A. Cervantes Olivares† Joaquín Arturo Quiroz Mercado‡

Abstract

Infections of the central nervous system are uncommon in dogs. Pathogenic fungi such as *Aspergillus*, *Cryptococcus* spp, *Blastomyces dermatitidis* and *Coccidioides immitis* have been reported. An *Aspergillus* infection is mainly a respiratory event and very seldom it may become disseminated, the German shepherd seems to be the more prone to this type of aspergillosis specially if an immunological deficiency is present. A 1.5 year old female German Shepherd from Cancun, Quintana Roo, State, in the southeast of Mexico was presented to the small animal hospital, she showed tetraparesis, hiporeflex and deep retarded sensitivity in all four members, loss of sensitivity in the left side of the face, absence of pupil reflex and menace reflex as well as absence of muscular tone of the vulva and anal sphincter. The third day after presentation, she died. At necropsy polyencephalomalacia, mielitis and diffuse leucomielitis piogranulomatosa were found. In the cytology of lymph node and other tissues aspergilli like hiphae were observed, this was confirmed by using the highly specific double diffusion test. Then, a PCR test was carried out with tissue fixed in 10% formaldehyde, but it failed probably due to destruction of the DNA.

Key words: SYSTEMIC ASPERGILLOSIS, NEUROINFECTION, IMMUNOSUPPRESSION, MYCOSIS, GERMAN SHEPHERD.

Resumen

La infección del sistema nervioso en el perro es poco común; posibles causas son *Aspergillus* spp, *Cryptococcus neoformans*, *Blastomyces dermatitidis* y *Coccidioides immitis*. La infección por *Aspergillus* spp afecta al aparato respiratorio y en pocas ocasiones se presenta de manera diseminada. Sin embargo, en el Pastor Alemán hay mayor incidencia de éste, pues dicha infección se asocia con una deficiencia inmunológica. Se describe el caso de una perra de raza Pastor Alemán, de 1.5 años de edad, referida de Cancún, Quintana Roo, México, con tetraparesis, hiporreflexia y sensibilidad profunda retardada en los cuatro miembros, disminución de sensibilidad en el lado derecho de la cara y ausencia de reflejo pupilar y de amenaza en ojo derecho; además de ausencia de tono vulvar y de esfínter anal. A los tres días después del ingreso la perra falleció. A la necropsia se encontró polioencefalomalacia, mielitis y leucomielitis piogranulomatosa difusa. En la citología de linfonodo y en la histopatología de diferentes tejidos se identificaron hifas compatibles con *Aspergillus* spp. Con el fin de dar certeza al diagnóstico, se realizó prueba de doble inmunodifusión, que es altamente específica, la cual confirmó el diagnóstico de *Aspergillus* spp. Posteriormente se corrió PCR a partir de una muestra de tejido en formalina al 10%, para identificar la especie, en donde no se lograron resultados, probablemente debido a la destrucción del ADN por el formaldehído.

Palabras clave: ASPERGILOSIS SISTÉMICA, NEUROINFECCIÓN, INMUNOSUPRESIÓN, MICOSIS, PASTOR ALEMÁN.

Recibido el 19 de noviembre de 2008 y aceptado el 28 de octubre de 2009.

*Hospital Veterinario de Especialidades, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F., Tel.: 5622-5864, correo electrónico: heta30@hotmail.com

**Hospital Veterinario de Especialidades, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F., Tel.: 5622-5864.

***Departamento de Patología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F.

†Departamento de Inmunología y Microbiología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F.

‡Hospital Veterinario de Especialidades, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F., Tel.: 5622-5864.

Introduction

Nervous system inflammation is characterized by an increase in blood supply, liquid exudates, lymphocyte migration into the lesion area and central nervous dysfunction. Due to the close anatomical relationship of the nervous system, more than one area can be involved in the inflammatory process, therefore appearing in focal, multifocal or diffuse semiotics. A seldom recorded etiology is mycosis caused by *Aspergillus* spp.¹

Aspergillosis in domestic animals is produced by different species of the *Aspergillus* genus, being *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus* and *Aspergillus deflexus* the most frequent. *Aspergillus* spp is an opportunistic saprophyte formed by septal hyphae, it is found on the ground, in vegetables, forages, and in secondary form, in the atmosphere. Aspergillosis is caught from environmental sources by inhalation or ingestion.^{2,3}

The immune capacity of the host is a fundamental determinant in the infection development. Alterations in immune-mediated cells, immunosuppressors such as chemotherapy, therapeutic glucocorticoids, prolonged treatment with antibiotics, and concurrent infection, are usually related with systemic dissemination of the disease.⁴ The German Shepherd is mentioned as a breed predisposed to opportunistic infections (especially aspergillosis or hyalohyphomycosis) caused by a specific immune defect where IgA low activity has been found.^{5,6}

Aspergillosis has been reported with great frequency as a respiratory affection of dolichocephalous breeds, being *A. fumigatus* the most involved species; systemic presentation has been recorded in few occasions, mostly in German Shepherd dogs, in which *A. terreus* and *A. deflexus* have been identified. Respiratory air ways are the most frequent routes of entrance, with subsequent hematological dissemination.⁶

Disseminated aspergillosis affects multiple organs and develops for several months, almost all dogs presented to consultation manifested terminal disease. Neurological semiotics is characterized by lameness, vertebral pain, which progresses to paraparesis, paraplegia and tetraplegia. The sudden onset of paraplegia may be the result of an infected vertebral disc extrusion or vertebral subluxation. Other clinical signs include anorexia, weight loss, muscular atrophy, pyrexia, weakness, lethargy, vomit and lymph adenomegalia. Uveitis or endophthalmitis might be present months before the generalized disease is present.⁴

Intervertebral disks, kidney glomeruli and uvea are frequent sites of embolic dissemination of mycotic microorganisms.^{4,5,7} Diskospondylitis can be attributed

Introducción

La inflamación del sistema nervioso se caracteriza por aumento del riego sanguíneo, exudación de líquidos, migración leucocitaria al área de la lesión y disfunción del sistema nervioso central. A causa de la estrecha relación anatómica del sistema nervioso, más de un área puede estar involucrada en un proceso inflamatorio, por lo que pueden presentarse con semiótica focal, multifocal o difusa. Una etiología poco registrada es la micosis ocasionada por *Aspergillus* spp.¹

La aspergilosis en los animales domésticos es producida por diferentes especies del género *Aspergillus*, siendo *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus* y *Aspergillus deflexus* los más frecuentes. El *Aspergillus* spp es un patógeno oportunista saprofita, formado por hifas septadas, se le halla en el suelo, en los vegetales, los piensos y, de forma secundaria, en la atmósfera. La aspergilosis se contrae a partir de fuentes ambientales, por inhalación o por ingestión.^{2,3}

La capacidad inmunitaria del portador es un determinante fundamental en el desarrollo de la infección. Alteraciones en la inmunidad mediada por células, trastornos inmunosupresores como quimioterapia, terapéutica con glucocorticoides, tratamientos prolongados con antimicrobianos, e infección concurrente, suelen relacionarse con la diseminación sistémica de la enfermedad.⁴ Se menciona al Pastor Alemán como una raza predispuesta a infecciones oportunistas (en especial por aspergilosis o hialohifomicosis) por un defecto en la inmunidad específica en donde se ha encontrado baja actividad en la IgA.^{5,6}

La aspergilosis se ha informado con mayor frecuencia como una afección respiratoria en razas dolicefálicas, la especie más involucrada es *A. fumigatus*; la presentación sistémica se ha informado en pocas ocasiones, en la mayoría de los casos en perros Pastor Alemán, en los que se ha identificado *A. terreus* y *A. deflexus*. La vía de entrada más frecuente son las vías respiratorias, con diseminación hematogena subsiguiente.⁶

La aspergilosis diseminada afecta múltiples órganos y se desarrolla durante varios meses, casi todos los perros presentados a consulta manifiestan una enfermedad terminal. La semiótica neurológica se caracteriza por claudicación, dolor vertebral, que progresa a paraparesia, paraplejia y tetraplejia. El inicio súbito de la paraplejia puede resultar por extrusión de un disco intervertebral infectado o subluxación vertebral. Otros signos clínicos comprenden anorexia, pérdida de peso, atrofia muscular, pirexia, debilidad, letargia, vómitos y linfadenomegalia. Es probable la presentación de uveítis o endoftalmitis clínicamente aparentes meses

to thrombosis and secondary vasoconstriction to the inflammatory process. The majority of dogs with disseminated aspergillosis usually do not have nasal condition.⁴

Findings in clinical laboratory consist of eosinophilia, monocytosis, hyperproteinemia, increase in urea, creatinine, alkaline phosphatase and aminotransferase. Radiographies of affected long bones reveal areas of lysis and cortical destruction with similar alterations in sternum and vertebral bodies with diskospondylitis.

Aspergillosis diagnostic methods include urine, blood, synovial liquid, lymph nodes, bone or intervertebral disk material cytological exam, mycological culture, histopathology and serology. Nevertheless, none of these tests is precise enough when considered by itself. Therefore, the diagnostic criterion requires that the dog must be positive to at least two diagnostic tests and preferably to three of them.⁴

This mycosis is characterized by nodular lesions formation, where the center is constituted by a zone of necrosis, where hyphae can be distinguished from fungus. Necrosis areas are surrounded by a variable inflammatory reaction, depending on the infection course. Thus, in acute cases this reaction is scarce and it is mainly constituted by neutrophils and scarce macrophages, accompanied by blood vessel invasion which gives place to vasculitis and thrombosis. In the chronic form, inflammatory infiltrate is abundant and it is formed by giant cells, macrophages, lymphocytes, plasmic cells and fibrous connective tissue.⁸ Macroscopic alterations include focal osteomyelitis and pale multiple granuloma in kidneys and spleen that can also be seen in lymph nodes, myocardium, pancreas, brain and spinal chord.⁴

The ELISA test may provide a fast serological confirmation, but not all infected dogs have detectable antibodies for *Aspergillus*. PCR is being used in a limited experimental and clinical form with the aim to improve sensitivity and specificity in *Aspergillus* detection.

Treatment includes supportive liquid and wide spectrum antibiotic therapeutics, joined with antimycotics like itraconazole, amphotericin B, ketoconazole or fluconazole for long periods; nevertheless, the prognosis is serious when it is a systemic presentation.⁴

Material and methods

Case description

A 1.5 year old German Shepherd bitch was brought to the Hospital Veterinario de Especialidades of the

antes de que se presente la enfermedad generalizada.⁴

Los sitios frecuentes de diseminación embólica de los microorganismos micóticos son los discos intervertebrales, los glomérulos renales y la uvea.^{4,5,7} La discoespondilitis puede atribuirse a trombosis y vasoconstricción secundaria al proceso inflamatorio. La mayoría de los perros con aspergilosis diseminada no suelen tener afección nasal.⁴

Los hallazgos en laboratorio clínico consisten en eosinofilia, monocitosis, hiperproteinemia, aumento de urea, creatinina, fosfatasa alcalina y aminotransferasa. Las radiografías de los huesos largos afectados revelan áreas de lisis y destrucción cortical con alteraciones similares en el esternón y los cuerpos vertebrales acompañados de discoespondilitis.

Los métodos diagnósticos para aspergilosis incluyen examen citológico de orina, sangre, líquido sinovial, linfonodos, hueso o material de disco intervertebral, cultivo micológico, histopatología y serología. Sin embargo, ninguna de estas pruebas es lo bastante precisa cuando se considera de manera aislada. Por lo anterior, el criterio diagnóstico requiere que el perro sea positivo cuando menos a dos y de preferencia a tres pruebas diagnósticas.⁴

Esta micosis se caracteriza por la formación de lesiones nodulares, donde el centro está constituido por una zona de necrosis, en la que se pueden distinguir las hifas de los hongos. Las áreas de necrosis están rodeadas por una reacción inflamatoria variable, dependiendo del curso de la infección. Así, en los cursos agudos esta reacción es escasa y está constituida principalmente por neutrófilos y escasos macrófagos, acompañada por la invasión de vasos sanguíneos que da lugar a una vasculitis y trombosis. En la forma crónica, el infiltrado inflamatorio es abundante y está formado por células gigantes, macrófagos, linfocitos, células plasmáticas y tejido conectivo fibroso.⁸ Las alteraciones macroscópicas incluyen osteomielitis focal y múltiples granulomas pálidos en riñones y bazo que también pueden observarse en linfonodos, miocardio páncreas, cerebro y médula espinal.⁴

La prueba de ELISA puede proporcionar una rápida confirmación serológica, pero no todos los perros con infección diseminada tienen anticuerpos detectables para *Aspergillus*. Se está utilizando PCR en forma experimental y clínica limitada a fin de mejorar la sensibilidad y especificidad de la detección de *Aspergillus*.

El tratamiento incluye terapéutica de apoyo con líquidos y antimicrobianos de amplio espectro, aunada a antimicóticos como itraconazol, anfotericina B, ketoconazol o fluconazol durante periodos largos; sin embargo, el pronóstico es grave cuando la presentación es sistémica.⁴

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia of the Universidad Nacional Autónoma de México (FMVZ-UNAM) for consultation, which had lived in Cancun, Quintana Roo and for the last few months in Veracruz, Veracruz, both entities in Mexico. The vaccination calendar was complete and with preventive treatment for *Dirofilaria* (ivermectin) administered one month ago. The owner reported respiratory disease, tick presence and probable contact with rodents.

Neck pain, lameness of thoracic members, anorexia, fever, hematemesis, paraparesis progressing to tetraparesis, with ten days of evolution, was the cause of consultation. Treatment with enrofloxacin, dexametazone, non steroidal anti-inflammatories, tetrazepam and B complex was administered, with no improvement reported.

The patient was alert during the physical exam, with 7% of dehydration, popliteal and inguinal lymph adenomegalia, abdominal pain, body condition 2/5,* fever and hyperemic conjunctiva. Tetraparetic, with anal and vulvar sphincter tone absent, loss of sensitivity on tail, painful extension and flexion of neck and along spinal column was observed. Thoracic and pelvic limbs miotatic reflexes were found hyporeflexive with deep retarded sensitivity. Bladder was found full and difficult to empty. In cranial nerves evaluation, absence of pupil reflex and threat in right eye, as well as a decrease in sensitivity in the right side of the face.

The ophthalmological exam showed bilateral conjunctiva hyperemia. Right eye showed myosis without pupil response, iris hyperemia and tumefaction and opacity of the posterior segment (Figure 1). Left eye showed no alterations.

A radiographic study of the spinal column was performed, but no apparent changes were observed. In the thoracic study no alterations were found in pulmonary fields, incidentally bone lysis in 6th and 7th sternebrae was observed, which suggests osteomyelitis (Figure 2). Splenomegaly was observed in the abdomen study (Figure 3).

Results

Hemogram

Total proteins, 80 g/L (range 60-75), neutrophils, 15.2×10^9 /L (range 6.0 – 11.5), presence of anisocytosis, polychromasia, metarubricytes and rubricytes. Neutrophilia and hyperproteinemia was interpreted caused by chronic inflammation and presence of immature cells of the erythroid line associated with hematopoietic activity.

Material y métodos

Descripción del caso

Fue presentada al Hospital Veterinario de Especialidades de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, de la Universidad Nacional Autónoma de México (FMVZ-UNAM) una perra Pastor Alemán de 1.5 años de edad, que había vivido en Cancún, Quintana Roo, y los últimos dos meses en la ciudad de Veracruz, Veracruz, ambas entidades en México. El calendario de vacunación se encontraba completo y con tratamiento preventivo contra *Dirofilaria* un mes atrás. El propietario informó de enfermedad respiratoria, presencia de garrapatas y probable contacto con roedores.

El motivo de la consulta fue dolor en cuello, claudicación de miembros torácicos, anorexia, fiebre, hematemesis, paraparesis con progresión a tetraparesis, con diez días de evolución. Se administró tratamiento con enrofloxacin, dexametazona, antiinflamatorios no esteroidales, tetrazepam y complejo B, sin informar mejoría.

Al examen físico se encontró una paciente alerta, con 7% de deshidratación, linfadenomegalia de poplíteos e inguinales, dolor en abdomen medio, condición corporal 2/5,* fiebre y conjuntivas hiperémicas. Se observó tetraparética, con ausencia de tono del esfínter anal y vulvar, pérdida de sensibilidad en la cola, dolor a la extensión y flexión del cuello y a lo largo de la columna vertebral. Los reflejos miotáticos de los miembros torácicos y pélvicos se encontraron hiporreflejos con sensibilidad profunda retardada. La vejiga se encontró plétorica y de difícil vaciamiento. En la evaluación de nervios craneales se observó ausencia de reflejo pupilar y de amenaza en ojo derecho, así como disminución de sensibilidad en el lado derecho de la cara.

El examen oftalmológico mostró hiperemia conjuntival bilateral. El ojo derecho presentó miosis sin respuesta pupilar, hiperemia y tumefacción del iris y opacidad del segmento posterior (Figura 1). El ojo izquierdo no mostró alteraciones.

Se realizó estudio radiográfico de la columna vertebral, pero no se observaron cambios aparentes. En el estudio de tórax no se apreciaron alteraciones en campos pulmonares, de manera incidente se observó lisis ósea en las esternebrae 6 y 7, lo cual es sugerente de osteomielitis (Figura 2). En el estudio de abdomen se observó esplenomegalia (Figura 3).

*Calificación de la condición corporal canina utilizando el sistema de cinco puntos c/c 2/5 = bajo peso.



Figura 1. Imagen del ojo derecho, se observa hiperemia conjuntival y miosis.

Figure 1. Image of right eye, conjunctival hyperemia and myosis is observed.

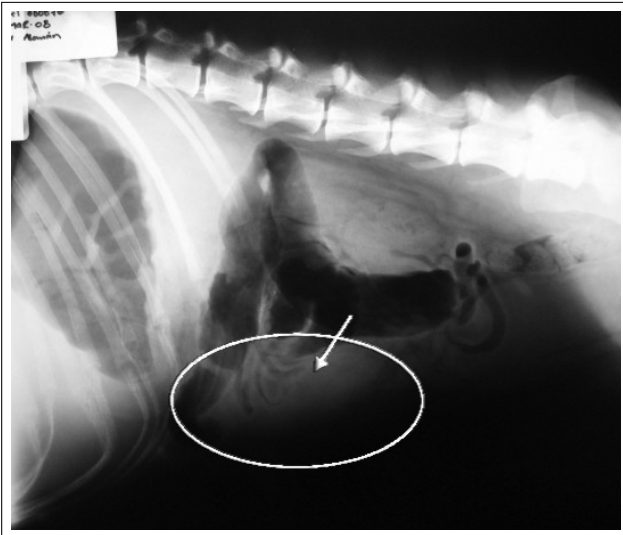


Figura 3. Estudio radiográfico de abdomen proyección Li-Ld, se observó esplenomegalia (flecha) que posteriormente a la necropsia se determinó esplenitis piogranulomatosa grave difusa.

Figure 3. Radiographic study of abdomen projection LI-RI, splenomegaly (arrow) was observed. At necropsy, serious diffuse pyogranulomatous splenitis was determined.

Biochemistry

Urea, 40.14 mmol/L (range 2.1-7.9); creatinine, 313 μ mol/L (range 60-130); ALT, 192 U/L (range < 70); AST, 294 U/L (range < 55); alkaline phosphatase (AP), 255 U/L (range < 189); amylase, 2 553 U/L (range < 1 110); globulins, 41 g/L (range 23-39); phosphorous 2.16 mmol/L (range 0.80-1.80). Interpretation: kidney hyperazotemia, hyperamylasemia and hyperphosphoremia associated with acute kidney failure. ALT and AST increase caused by liver degradation, AP increase of steroidal origin and hyperglobulinemia caused by chronic inflammation.

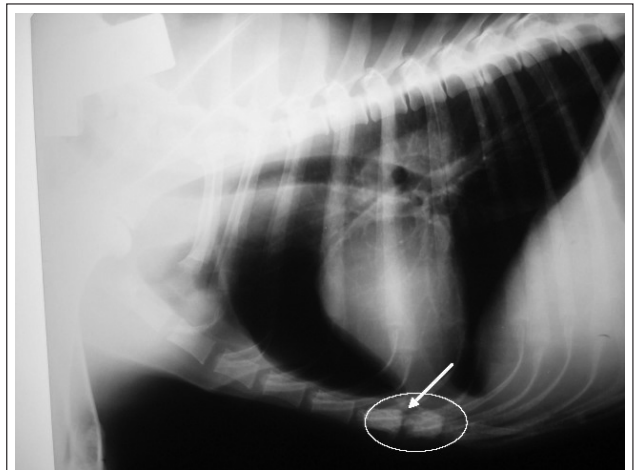


Figura 2. Proyección radiográfica Li-Ld (lateral izquierda-lateral derecha), no se encontraron cambios radiográficos aparentes en el parénquima pulmonar. Incidentalmente se observó lisis ósea en las esternebras 6 y 7 (flecha), ello sugiere osteomielitis.

Figure 2. Radiographic projection LI-RI (left lateral-right lateral), there were no apparent radiographic changes in pulmonary parenchyma. Osteolysis in sternbrae 6 and 7 (arrow) were observed by chance, suggesting osteomyelitis.

Resultados

Hemograma

Proteínas totales, 80 g/L (rango 60-75), neutrófilos, 15.2×10^9 /L (rango 6.0-11.5), presencia de anisocitosis, policromasia, metarrubricitos y rubricitos. Se interpretó neutrofilia e hiperproteinemia por inflamación crónica y presencia de células inmaduras de la línea eritroide asociadas en hematopoyesis activa.

Bioquímica

Urea, 40.14 mmol/L (rango 2.1-7.9); creatinina, 313 μ mol/L (rango 60-130); ALT, 192 U/L (rango < 70); AST, 294 U/L (rango < 55); fosfatasa alcalina (FA), 255 U/L (rango < 189); amilasa, 2 553 U/L (rango < 1 110); globulinas, 41 g/L (rango 23-39); fósforo, 2.16 mmol/L (rango 0.80-1.80). Interpretación: hiperazotemia renal, hiperamilasemia e hiperfosforemia asociadas con insuficiencia renal aguda. Incremento de ALT y AST por degeneración hepática, incremento de FA de origen esteroide y hiperglobulinemia por inflamación crónica.

Urianálisis

Se encontraron cúmulos de leucocitos y hematuria asociados con inflamación de vías urinarias, así como proteinuria de origen posrenal. La densidad

Urinalysis

Leukocytes cumulus and hematuria were found associated with urinary tract inflammation, as well as proteinuria of post-renal origin. Density was found below critical point (1.016) associated with acute kidney failure.

Hyperchloremic metabolic acidosis [(pH 7.28) (range 7.35 – 7.45); HCO_3^- , 9.6 mmol/L (range 17 – 25); chlorine, 123 mmol/L (range 108 – 117)], associated with acute kidney failure, was found in the gasometry study.

Changes suggesting retinal detachment and ciliary body thickening compatible with uveitis were observed in the ultrasound study of the right eye (Figure 4a and 4b). Splenomegaly, as well as mixed echogenicity in liver and spleen was found in the abdominal ultrasound.

Direct immunofluorescence to diagnose distemper, serum microagglutination to diagnose *Leptospira* and serum tests for *Ehrlichia* spp and *Dirofilaria* were carried out resulting negative.

Fine needle aspiration of left caudal mammary lymphatic nodule was performed (Figure 5), which several days later was reported as a pyogranulomatous inflammation alteration with hyphae and intra-lesion yeasts compatible with *Aspergillus* spp (Figure 5).

Associating tetraparesis, renal failure and ocular damage with probable infection by leptospirosis, symptomatic treatment was started consisting on liquid therapy, antibiotics, analgesics, neuroprotectors (B complex and vitamin E), diazepam, bicarbonate and gastric protectors. There was progression of clinical signs and the patient died three days after its hospital admission.

The body was sent to necropsy and in the histopathological study, serious diffuse pyogranulomatous anterior uveitis in right eye was reported (Figure 7), serious diffuse polyencephalomalacia (Figure 8, 9), and serious diffuse pyogranulomatous myelitis and leuckomyelitis (Figure 10), serious multifocal pyogranulomatous nephritis (Figure 11), serious diffuse pyogranulomatous serositis, serious pyogranulomatous splenitis, serious diffuse pyogranulomatous lymphadenitis, serious diffuse pyogranulomatous thyroiditis.

Grocott staining was done in all tissues where abundant hyphae of *Aspergillus* spp were found (Figure 12), which was confirmed with double immunodiffusion test (Figure 13), having a final diagnosis of disseminated aspergillosis with neurological damage.

Discussion

Cases of aspergillosis in several animal species have

se encontraba por debajo del punto crítico (1.016) asociado en insuficiencia renal aguda.

En el estudio de gasometría se encontró acidosis metabólica hiperclorémica [(pH 7.28) (rango 7.35-7.45); HCO_3^- , 9.6 mmol/L (rango 17-25); cloro, 123 mmol/L (rango 108-117)], asociada con insuficiencia renal aguda.

En el ultrasonido del ojo derecho se observaron cambios sugerentes de desprendimiento de retina y engrosamiento a nivel del cuerpo ciliar compatible con uveítis (Figura 4a y 4b). En el ultrasonido abdominal se observó esplenomegalia, así como ecogenicidad mixta en hígado y bazo.

Se realizó prueba de inmunofluorescencia directa para diagnóstico de moquillo, microaglutinación en suero para diagnóstico de *Leptospira*, y pruebas de serología para *Ehrlichia* spp y *Dirofilaria*, las cuales fueron negativas.

Se efectuó aspirado con aguja fina de linfonodo mamario caudal izquierdo (Figura 5), del que se informó en días posteriores como alteración inflamatoria piogranulomatosa con hifas y levaduras intralesionales compatibles con *Aspergillus* spp (Figura 6).

Asociando la tetraparesis, insuficiencia renal y afectación ocular a probable infección por leptospirosis, se dio tratamiento sintomático consistente en terapia de líquidos, antibióticos, analgésicos, neuroprotectores (complejo B y vitamina E), diazepam, bicarbonato y protectores gástricos. Hubo progresión de signos clínicos y la paciente murió tres días después de su ingreso al hospital.

El cuerpo se envió a necropsia y en el estudio histopatológico se informó uveítis anterior piogranulomatosa grave difusa en el ojo derecho (Figura 7), polioencefalomalacia grave difusa (Figuras 8, 9), mielitis y leucomielitis piogranulomatosa grave difusa (Figura 10), nefritis piogranulomatosa multifocal grave (Figura 11), serositis piogranulomatosa grave difusa, esplenitis piogranulomatosa grave, linfadenitis piogranulomatosa grave difusa y tiroiditis piogranulomatosa grave difusa.

Se realizó tinción de Grocott en todos los tejidos en donde se observaron abundantes hifas de *Aspergillus* spp (Figura 12), lo cual se confirmó con la prueba de doble inmunodifusión (Figura 13), quedando como diagnóstico final aspergilosis diseminada con afectación neurológica.

Discusión

En México se ha informado de casos de aspergilosis en varias especies animales.^{9,10} En perros se han documentado casos de aspergilosis nasal desde hace 16 años; sin embargo, no hay datos publicados de neuroinfección causada por este agente. Se menciona



Figura 4. CA: cámara anterior, CR: cristalino CP: cápsula posterior del cristalino CV: cámara vítrea. Ultrasonido normal del ojo izquierdo. en comparación con el ojo derecho donde se observa (flecha) una imagen ecogénica de tipo linear en el segmento posterior, asociada en el desprendimiento de retina y engrosamiento a nivel del cuerpo ciliar, sugere de uveítis.

Figure 4. AC: anterior chamber, CR: crystallin, CP: crystallin posterior capsule, VC: vitreous chamber. Left eye normal ultrasound, in contrast to right eye where there is (arrow) a linear type echogenic image in the posterior segment, associated with the retinal detachment and engorgement at ciliary body level, suggesting uveitis.



Figura 5. Palpación del linfonodo mamario caudal izquierdo en preparación para punción con aguja fina.

Figure 5. Palpation of the left caudal mammary lymphatic nodule for fine needle puncture.

been reported in Mexico.^{9,10} Since 16 years ago, cases of nasal aspergillosis have been documented; nevertheless, there are no published data on neuroinfection caused by this agent. Aspergillosis is mentioned as a national distribution mycosis, where the climatic conditions represent no factor because the disease has been recorded in all types of climates and seasons of the year.

Aspergillosis in dogs is a disease that is characterized by mainly affecting the upper respiratory tract and, with low incidence, it has been reported a disseminated presentation affecting the nervous system. For such reason, while determining the presumptive diagnoses

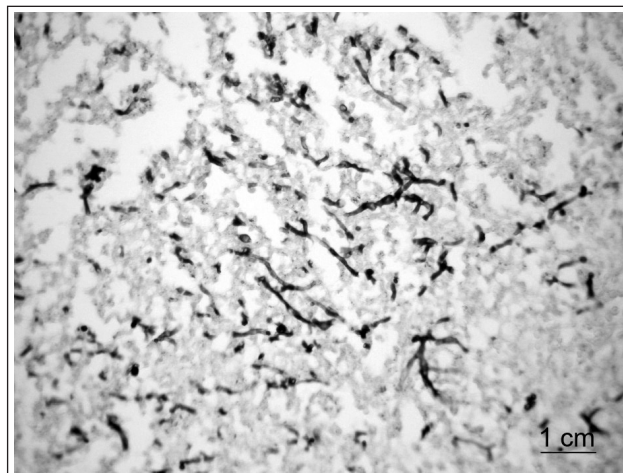


Figura 6. Presencia de hifas de *Aspergillus* spp teñidas con tinción de Grocott, encontradas en la punción del linfonodo mamario caudal (Objetivo 10X).

Figure 6. Presence of *Aspergillus* spp hyphae stained with Grocott stain, found in the caudal mammary lymphatic nodule puncture (Objective 10X).

a la aspergilosis como una micosis de distribución nacional, en la que aparentemente las condiciones climáticas no representan un factor debido a que la enfermedad se ha registrado en todo tipo de climas y estaciones del año.

En el perro la aspergilosis es una enfermedad que se caracteriza por afectar principalmente el tracto respiratorio superior y, con poca incidencia, se ha informado una presentación diseminada con afección al sistema nervioso. Por tal motivo, al determinar los diagnósticos presuntivos en esta paciente no se consideró la micosis como causa primaria de la neuroinfección.

in this patient, the mycosis as primary neuroinfection cause was not considered.

On the contrary, leptospirosis constitutes a high incidence disease; it causes kidney damage, uveitis, it is of neurological semiotic and considering that there was contact with rodents and that the preliminary tests determined kidney damage, uveitis and neurological damage, the medical care was focused on neuroinfection caused by leptospirosis.

Other probable neuroinfection pathologies were discarded, such as canine distemper (for respiratory disease history) ehrlichiosis (for tick infestation) and dirofilariasis (for being a frequent pathology in the patient's residence). The results of these tests, including leptospirosis, were negative.

Complimentary diagnostic tests were carried out, which included lung, abdominal and spinal column radiographic studies, as well as abdominal and ocular ultrasound, which in that moment they did not seem to be conclusive of pathology.

A retrospective study of this case was performed, considering review, clinical profile and analysis of the diagnostic test results; from this the following is concluded: *a)* The German Shepherd is a breed predisposed to opportunist infections specially by aspergillosis, due to an immunological deficiency.^{4,5,11} There are other factors that increase the dissemination of the disease. In this case, systemic dissemination was favored due to previous glucocorticoid treatment. *b)* The clinical signs such as lameness, vertebral pain with progression to paraparesis and finally tetraparesis, correspond to the neurological signs described in literature in the case of a systemic dissemination with neurological damage.^{4,5} *c)* The laboratory results indicated kidney hyperazotemia, hyperamylasemia, hyperglobulinemia, AST, ALT and FA increase, associating this last with kidney damage and hepatocellular degeneration, being frequent alterations that have been reported in case of disseminated infection. Nevertheless, these findings are not specific of such disease.^{4,5} *d)* There were no radiographic changes in the spinal column and pulmonary fields. Osteolysis in sternebrae 6 and 7 was observed by chance, suggesting osteomyelitis, which in this case it was later associated with the fungus dissemination.⁴ *e)* The abdominal radiographic study showed splenomegaly confirmed by ultrasound, where there was also alteration of spleen, liver and kidney echogenicity, that was later associated with multifocal pyogranulomatous nodules present in these organs.¹² *f)* It has been reported that disseminated aspergillosis can cause anterior uveitis, chorioretinitis, panuveitis, retinal exudative detachment, optic neuritis or endophthalmitis.¹³ In this case it was clinically manifested as uveitis, retinal detachment

Por el contrario, la leptospirosis constituye una enfermedad de alta incidencia, causa daño renal, uveítis, es de semiótica neurológica y al considerar que hubo contacto con roedores y que las pruebas preliminares determinaron daño renal, uveítis y afección neurológica, el manejo médico se orientó hacia una neuroinfección por leptospirosis.

Se descartaron otras patologías probables de neuroinfección, como moquillo canino (por historia de enfermedad respiratoria), ehrlichiosis (por infestación con garrapatas) y dirofilariasis (por tratarse de una patología frecuente en el lugar de residencia de la paciente). Los resultados de estas pruebas, incluyendo leptospirosis, fueron negativos.

Se realizaron pruebas diagnósticas complementarias que incluyeron estudio radiográfico de campos pulmonares, de abdomen y de columna vertebral, así como ultrasonido abdominal y ocular, las cuales en ese momento no parecían ser concluyentes de una patología.

Se realizó una revisión retrospectiva de este caso, considerando la reseña, historia clínica y análisis de los resultados de las pruebas diagnósticas, de lo anterior se concluye lo siguiente: *a)* El Pastor Alemán es una raza que se encuentra predispuesta a infecciones oportunistas en especial por aspergilosis, debido a una deficiencia inmunológica.^{4,5,11} Existen otros factores que incrementan la disseminación de la enfermedad. En este caso, el haber recibido tratamiento previo con glucocorticoides favoreció la disseminación sistémica. *b)* Los signos clínicos como claudicación, dolor vertebral con progresión a paraparesis y finalmente tetraparesis, corresponden a los signos neurológicos informados en la literatura en el caso de una disseminación sistémica con afección neurológica.^{4,5} *c)* Los resultados de laboratorio indicaron hiperazotemia renal, hiperamilasemia, hiperglobulinemia, incremento de AST, ALT y FA, asociando esto último en el daño renal y degeneración hepatocelular, siendo alteraciones frecuentes que se han informado en el caso de infección disseminada. Sin embargo, estos hallazgos no son específicos de dicha enfermedad.^{4,5} *d)* No se encontraron cambios radiográficos en el estudio de columna vertebral, ni de campos pulmonares. De manera incidental se encontró lisis ósea en las esterneras 6 y 7, lo anterior sugirió osteomielitis, que en este caso se asoció posteriormente con la disseminación del hongo.⁴ *e)* En el estudio radiográfico de abdomen se encontró esplenomegalia confirmada en el ultrasonido, en donde además se observó alteración de la ecogenicidad en el bazo, hígado y riñón, que después se asociaron con los nódulos piogranulomatosos multifocales presentes en estos órganos.¹² *f)* Se ha publicado que la aspergilosis disseminada puede causar uveítis anterior,

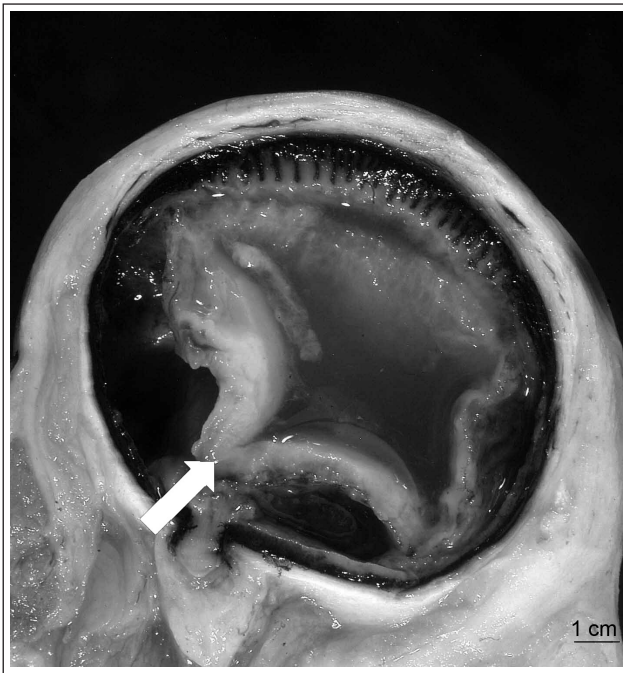


Figura 7. Corte sagital del ojo derecho, se aprecia inflamación y necrosis a nivel del tracto uveal (flecha).

Figure 7. Sagittal cut of the right eye, inflammation and necrosis is shown at the uveal tract (arrow).

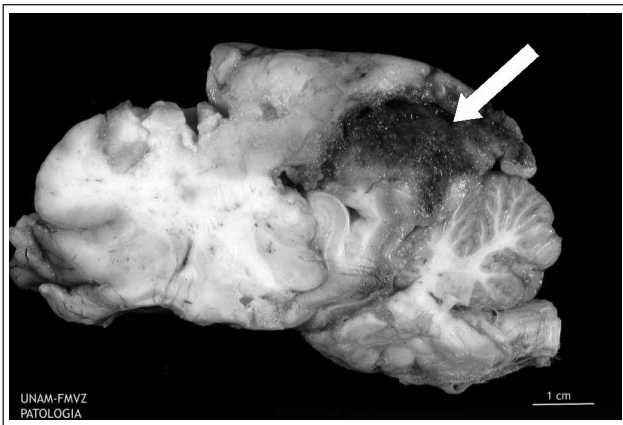


Figura 9. Corte coronario de cerebro, se aprecia meningitis granulomatosa (flecha) causada por *Aspergillus* spp.

Figure 9. Coronal brain cut, granulomatous meningitis (arrow) caused by *Aspergillus* spp is shown.

and myosis. This finding was confirmed by ocular ultrasound and finally at necropsy. *g*) Puncture of lymphatic nodules was performed at the second day of hospitalization when a diagnosis of pyogranulomatous inflammation was given and *Aspergillus* spp hyphae were recorded. This result should have oriented the diagnosis; unfortunately, it was obtained after the patient's death. *h*) In regard to the neurological semiotic presented in the patient (paresis, tetraparesis, hyporeflexia, decreased sensitivity, etc.), this was caused by *Aspergillus* spp dissemination in the nervous

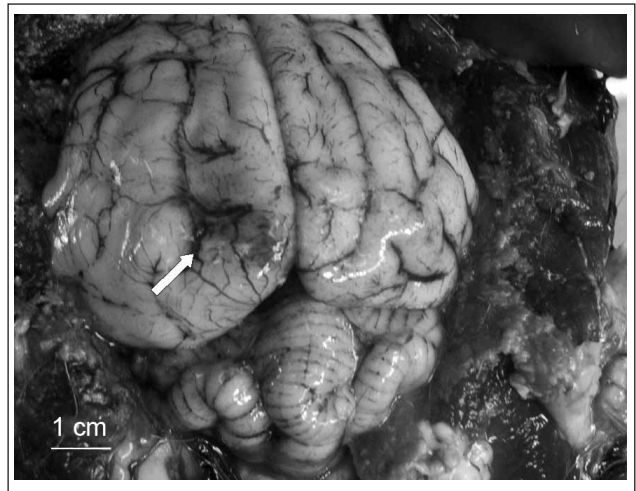


Figura 8. Sección de cerebro posterior, se observa una área de necrosis licuefactiva (flecha).

Figure 8. Section of posterior brain, a liquefactive necrosis area is shown (arrow).

coriorretinitis, panuveítis, desprendimiento exudativo de retina, neuritis óptica o endoftalmítis.¹³ En este caso se manifestó clínicamente como una uveítis, desprendimiento de retina y miosis. Este hallazgo se confirmó mediante el ultrasonido ocular y finalmente a la necropsia. *g*) Se realizó punción de linfonodos al segundo día de hospitalizada cuando se dio un diagnóstico de inflamación piogranulomatosa y se registraron hifas de *Aspergillus* spp; este resultado habría orientado el diagnóstico, pero desafortunadamente se obtuvo después de la muerte de la paciente. *h*) En cuanto a la semiótica neurológica presentada en la paciente (paresis, tetraparesis, hiporreflexia, disminución de la sensibilidad, etc.), ésta fue causada por la diseminación de *Aspergillus* spp al sistema nervioso, originando en encéfalo y médula espinal áreas multifocales de infiltrado inflamatorio, zonas hemorrágicas y áreas de malacia.

Finalmente se logró llegar al diagnóstico de aspergilosis con los cambios histopatológicos que orientaron al patólogo hacia una infección micótica, por lo que se realizó tinción de Grocott en varios tejidos, lo que permitió la visualización de hifas de *Aspergillus* spp, que posteriormente fue confirmada con la prueba de doble difusión realizada en el Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ-UNAM, en donde también se efectuó PCR, pero no se logró identificar la especie.

En cuanto a la vía de entrada de la infección, se sabe que la forma más común es la vía respiratoria, en donde el hongo puede afectar sólo vías respiratorias altas con una diseminación hematogena subsiguiente, sin una afección nasal aparente, por lo que se orientó más hacia esta vía de entrada. Otras vías citadas probables son la gastrointestinal, a través de una

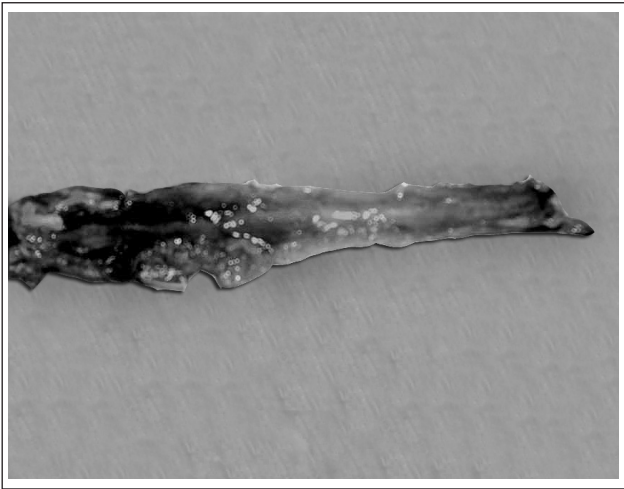


Figura 10. Sección de médula espinal con área extensa de hemorragia.

Figure 10. Spinal cord section with extensive hemorrhagic area.

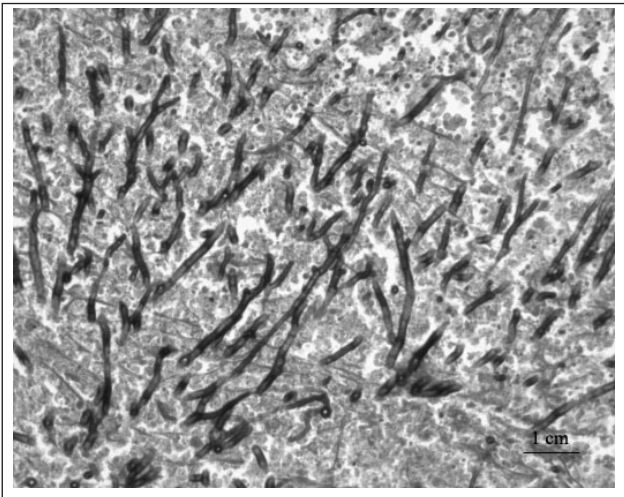


Figura 12. Acercamiento (40X) de hifas de *Aspergillus* spp, teñidas con tinción de Grocott, obtenidas de diferentes órganos a la necropsia.

Figure 12. Magnification (40X) of *Aspergillus* spp hyphae, stained with Grocott stain, obtained from different organs at necropsy..

system, originating multifocal areas of inflammatory infiltration, hemorrhagic zones and malacia areas in the encephalon and spinal cord.

Finally, aspergillosis diagnosis was obtained by the histopathological changes that oriented the pathologist towards a mycotic infection; therefore, Grocott staining was performed in several tissues, which allowed seeing *Aspergillus* spp hyphae and later confirmed by the double diffusion test carried out at the Departamento de Microbiología e Inmunología of the FMVZ-UNAM, where the PCR test was also performed, but it was impossible to identify the species.

In regard to the entry route of the infection, it is known that the most common way is the respiratory

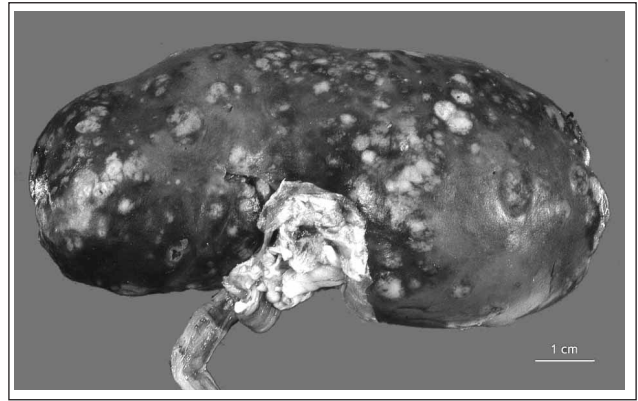


Figura 11. En los riñones se observaron múltiples nódulos blancos de diferentes tamaños asociados con nefritis piogranulomatosa multifocal, característica de infección por *Aspergillus* spp.

Figure 11. Multiple white nodules of different sizes associated with multifocal pyogranulomatous nephritis were observed in the kidneys, being a characteristic of infection by *Aspergillus* spp.

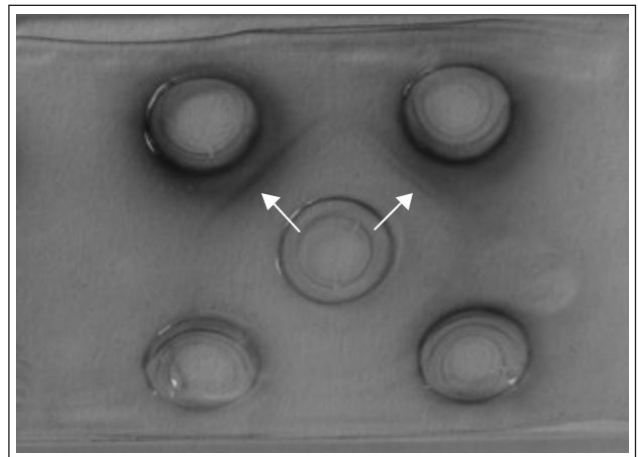


Figura 13. Prueba de doble difusión que confirmó el diagnóstico de aspergilosis. Nótese las líneas de precipitación que dan como positiva esta prueba.

Figure 13. Double diffusion test that confirmed aspergillosis diagnose. Observe the precipitation lines (arrow) that give positive to this test.

herida, o quemaduras, ocular y ótica (en el caso de una otitis).

En este caso no se descarta la posibilidad de una vía de entrada peritoneal a través de alguna herida, ya que la paciente realizaba pruebas de agilidad con aros en campo abierto boscoso (en Cancún, Quintana Roo) y pudo adquirir el hongo de esta forma, además de que no se encontraron cambios histopatológicos notables en campos pulmonares ni corazón, ello sugiere proliferación micótica en esta zona en comparación con abdomen, en donde los cambios son muy marcados. Sin embargo, estos datos no son concluyentes sobre la vía de entrada.

Los perros con enfermedad diseminada tienen un pronóstico grave vital. Al llegar la paciente al hospital,

via, where the fungus can only damage the upper respiratory tract with a subsequent hematogenous dissemination, without apparent nasal damage; therefore, it was focused on this entry route. Other probable cited vias are the gastrointestinal, through a wound, or ocular and otic (in the case of otitis) burns.

In this case, the possibility of a peritoneal entry via through some sort of wound can not be discarded, since the patient used to perform dog agility trails in open woods (in Cancun, Quintana Roo) and could have acquired the fungus in this form, besides there were no notable histopathological changes in pulmonary fields or heart, this suggests mycotic proliferation in this zone in contrast to abdomen, where changes are deeply marked. Nevertheless, these data do not confirm the entry via.

Dogs with disseminated disease have a fatal prognosis. As the patient arrived to the hospital, the infection was multifocal and of poor prognosis. It was not possible to have a definite diagnosis before the patient's death and a symptomatic treatment was given; nevertheless, the patient was in a terminal stage and there was nothing to do.

Disseminated aspergillosis is an apparent rare sickness, but it must be considered in the differential diagnosis of neurological diseases in dogs, without forgetting that the disseminating infection by *Aspergillus* spp can result in a granulomatous inflammation in multiple organs and systems, including the central nervous system, causing neurological deficit, also the German Shepherd breed is the most involved in this type of aspergillosis. There are no reported cases on human infection from dogs or cats. The infection takes place from common environmental sources; nevertheless, immunosuppressed persons should not be exposed to sick animals.^{4,7}

Acknowledgements

Special thanks to MV Monica Lores Alpizar and Cristina Martinez Elizalde for their support on data collection. To the Departamento de Patología: MVZ Enrique Aguilar Hernandez, MVZ Juan Francisco Muñoz Gutierrez, MVZ Alma Rosa Garcia Jimenez (histotechnologist), Lucia Rangel Luna, Maria del Carmen Navarrete Gonzalez, Ariel Deliber Sanchez Lopez and Jaime Cordova Lopez (photographer) for his collaboration in the obtainment of photographs.

Referencias

1. ETTINGER SJ, FELDMAN EC. Tratado de medicina interna veterinaria. Enfermedades del perro y del gato. 6ª ed. Vol.1. Madrid España: Saunders Company, 2007
2. CARTER GR. Essentials of veterinary bacteriology and

la infección era multifocal de mal pronóstico. No se logró llegar al diagnóstico antes del fallecimiento de la paciente, por lo que se dio un tratamiento sintomático; sin embargo, la paciente se encontraba en estado terminal, por lo que el desenlace era inevitable.

La aspergilosis diseminada es un padecimiento aparentemente raro, pero debe ser considerado en el diagnóstico diferencial de enfermedades neurológicas en el perro, sin olvidar que la infección diseminada por *Aspergillus* spp puede resultar en inflamación granulomatosa en múltiples órganos y sistemas, incluyendo el sistema nervioso central, causando déficit neurológico, además la raza Pastor Alemán es la más involucrada en este tipo de aspergilosis. No hay casos documentados sobre infección en personas a partir de perros o gatos. La infección ocurre a partir de fuentes ambientales comunes; sin embargo, las personas inmunosuprimidas no deben exponerse a animales enfermos.^{4,7}

Agradecimientos

Se agradece el apoyo de la MV Mónica Lores Alpizar y Cristina Martínez Elizalde por la recolección de datos. Al Departamento de Patología: MVZ Enrique Aguilar Hernández, MVZ Juan Francisco Muñoz Gutiérrez, MVZ Alma Rosa García Jiménez (histotecnóloga), Lucía Rangel Luna, María del Carmen Navarrete González, Ariel Deliber Sánchez López y Jaime Córdova López (fotógrafo) por su colaboración en la obtención de fotografías.

mycology. 6ª ed. Iowa USA: Black well Publishing Company, 2004.

3. ERNST B. Tratado de Microbiología veterinaria. Zaragoza España: Blakwell Scientific Publications, 2004.
4. GREEN C. Enfermedades infecciosas en perros y gatos. 2ª ed. México D.F. McGrawHill-Interamericana, 2000.
5. DALLMAN MJ, TOBIAS L, DOSS R. Disseminated aspergillosis in a dog with diskospondylitis and neurologic deficits. J Am Hosp Assoc 1992;200: 511-513.
6. JEFF SK. Disseminated aspergillosis atributable to *Aspergillus deflexus* in a Springer Spaniel. J Am Vet Med 1990; 197: 871-874.
7. CARTAGENA JC, ENGEL J, TORRENT V, MORA E, MADORRÁN C. Rinoscopía aplicada al diagnóstico de aspergilosis nasal. Revista Argos 2001; 26: 42-43.
8. PÉREZ J, CARRASCO L. Diagnóstico histopatológico de micosis en patología veterinaria. Rev Iberoam Micología 2000; 17: 18-22.
9. ROSILES MARTÍNEZ R. Brote de Aspergilosis en gaviotas. Vet Méx 2000; 31:27-29.
10. MARKEY BK, QUINN PJ. Microbiología y enfermedades infecciosas veterinarias. Zaragoza, España: Acribia, 2002.
11. DOMINIQUE P, CÉCILE G. Update on Canine

- sinonasal Aspergillosis. Vet Clin Small Anim Pract 2007; 37: 901-916.
12. DENNING DW. Aspergillosis: diagnosis and treatment. Int J Antimicrob Agents, 1996; 6: 161-168.
13. HENDRIX DVH. Diseases and surgery of canine anterior uvea. In: GELATT KN, editor. Veterinary Ophthalmology. 4^a ed. Iowa, USA: Blackwell Publishing; 2007: 812-857.