

147
Zej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ CUAUTITLAN ”



ESTABLECIMIENTO DE LA TECNICA DE INMUNOPEROXIDASA
PARA EL ESTUDIO DE LA DISTRIBUCION PULMONAR
DE ESPORAS DE Aspergillus fumigatus

T E S I S

QUE, PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A

JUAN CARLOS VALLADARES DE LA CRUZ

DIRECTORES DE TESIS:

MVZ PhD ROBERTO CERVANTES O.

MVZ PhD FRANCISCO TRIGO T.

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1986



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 está 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.

INDICE

| | Pags. |
|---|-------|
| RESUMEN | 1 |
| I. INTRODUCCION | 3 |
| - El depósito de partículas inhaladas en el aparato respiratorio | 6 |
| - La enfermedad | 10 |
| Historia | 10 |
| Etiología | 12 |
| Epidemiología | 12 |
| Patogenicidad | 13 |
| Signología | 14 |
| Patogenia y lesiones | 15 |
| Diagnóstico | 18 |
| II. OBJETIVOS | 23 |
| III. MATERIAL Y METODOS | 24 |
| IV. RESULTADOS | 32 |
| V. DISCUSION | 40 |
| VI. CONCLUSIONES | 43 |
| VII. LITERATURA CITADA | 44 |

R E S U M E N

La técnica de inmunoperoxidasa ofrece ventajas sobre los métodos convencionales de inmunofluorescencia, y es además una excelente herramienta para el diagnóstico de micosis en tejidos fijados en formalina.

Con el objetivo de evaluar dicha técnica para el diagnóstico de la aspergilosis pulmonar, en el presente trabajo conejos fueron experimentalmente infectados con un aerosol de esporas del hongo y sacrificados a intervalos determinados.

Muestras representativas de pulmón fueron fijadas en formalina amortiguada al 10%, incluidas en parafina y cortadas a 4µm de espesor; posteriormente fueron coloreadas con las técnicas de hematoxilina eosina, - ácido periódico de Schiff (PAS), Gómori y con la técnica indirecta de inmunoperoxidasa. Paralelamente muestras de pulmón fueron seleccionadas para su estudio micológico correspondiente, sembrándose en cajas conteniendo Sabouraud dextrosa agar.

Se observaron las modificaciones en la localización inicial del hongo después de su inhalación, la viabilidad del mismo y las lesiones desarrolladas durante la infección. Al hacer la evaluación comparativa entre las diferentes técnicas de histopatología, se apreció que el método de inmunoperoxidasa mostró una mayor sensibilidad para detectar Aspergillus, incluso en aquellas secciones de tejido donde ya no era posible identificar elementos micóticos con las técnicas de PAS y Gómori.

El uso de la técnica de inmunoperoxidasa ofrece una mayor capacidad para identificar elementos micóticos en infecciones discretas o iniciales.

I. INTRODUCCION

El aparato respiratorio es una de las porciones del organismo que está en contacto permanente con el medio ambiente. El aire inhalado durante la respiración proporciona una comunicación directa del organismo con el exterior, lo que hace inevitable la presencia de agentes patógenos o potencialmente patógenos en dicho aparato. Estos agentes incluyen desde microorganismos infecciosos, tóxicos químicos y polvos minerales, hasta partículas inmunógenas contenidas en el aire (Green, 1977).

A nivel pecuario los agentes patógenos más importantes del aparato respiratorio son los agentes infecciosos. Las infecciones respiratorias de los animales domésticos representan en la actualidad uno de los mayores renglones de pérdidas económicas de la industria pecuaria en México (Pijoan, 1978), debido a su alta incidencia, a los múltiples agentes etiológicos involucrados y al efecto nocivo que presentan sobre la conversión alimenticia y el crecimiento de los animales. Generalmente estos padecimientos no son de carácter mortal (excepto en animales jóvenes), y en cambio, tienden a la cronicidad afectando la eficiencia respiratoria del animal al disminuir la cantidad de tejido funcional (Thomson, 1978). Además retardan el crecimiento de los animales y aumentan sus necesidades de alimentación (Iglesias, 1981).

En México se han realizado diversos estudios para determinar la incidencia de problemas neumónicos en los animales domésticos. Pijoan y col. (1978) informan que aproximadamente un 10% de los cerdos sacrificados en el Rastro de Ferrería, D.F., presentan lesiones de tipo neumónico. Maqueda (1977) encontró una incidencia del 50% de lesiones neumónicas en cer-

dos sacrificados en diferentes rastros del país. Pijoan en 1976 estimó que las pérdidas económicas debidas a padecimientos de tipo neumónico, podrían ser de 13.4 millones de pesos al año, tomando en cuenta los costos y la producción porcina de 1976.

Las infecciones respiratorias utilizan diferentes vías de contaminación, aunque la mayor parte de ellas se transmiten por el aire en forma de aerosoles (Jubb y Kennedy, 1974). Estos padecimientos pueden ser de carácter agudo o crónico, siendo los últimos, los más importantes por su difícil diagnóstico y tratamiento.

Existe un gran número de microorganismos asociados con este tipo de infecciones, como virus, bacterias, parásitos y algunos hongos, que de acuerdo a su patogenicidad se pueden clasificar como:

- a) Patógenos primarios: aquellos capaces de producir enfermedad por sí solos en un hospedador normal.
- b) Patógenos secundarios: los cuales no pueden desencadenar la enfermedad por sí mismos, al no superar los mecanismos de defensa del hospedador, requiriendo por lo tanto que estos mecanismos se vean deprimidos para poder desencadenar la enfermedad. Los factores que pueden deprimir estos mecanismos pueden ser de tipo físico (temperatura, humedad), químico (corticosteroides, gases tóxicos), y las infecciones por un patógeno primario (Pijoan, 1978).

De los agentes infecciosos involucrados en los padecimientos respiratorios, los hongos son quizás de los menos estudiados. Esto puede ser debido al carácter crónico e insidioso de la mayoría de las infecciones producidas por ellos y a que las lesiones macroscópicas producidas suelen ser similares a las desarrolladas por otro tipo de agentes, como Mycobacterium spp. (Trigo y col., 1978). Estudios anteriores realizados en nuestro país sugieren que las infecciones micóticas pulmonares son más frecuentes de lo que generalmente se piensa. En un estudio realizado por Chávez en 1978, se ais

laron hongos en el 21.5% de las muestras de pulmones neumónicos de cerdos obtenidas en el Rastro de Ferrerfa, D.F., de los cuales Aspergillus spp. fué el más frecuentemente involucrado (46.1% de los aislamientos), sugiriendo una actividad como patógeno primario o secundario; mientras que Trigo y col. en 1978 aislaron Aspergillus fumigatus a partir de lesiones de tipo granulomatoso de unos pulmones de un bovino Holstein, también -- procedentes del Rastro de Ferrerfa, D.F.. Estos hallazgos concuerdan con los de otros autores que mencionan que Aspergillus spp. es el hongo con mayor actividad patógena en animales (Austwick en Raper y Fennell, 1966).

EL DEPOSITO DE PARTICULAS INHALADAS EN EL APARATO RESPIRATORIO

Independientemente de su composición, los agentes patógenos o potencialmente patógenos que penetran al pulmón, lo hacen suspendidos como finas partículas en forma de aerosol o como material gaseoso (Green, 1973).

El término aerosol se utiliza para nombrar sistemas de gotas de líquido o pequeñas partículas que están dispersas en el aire y que permanecen suspendidas durante un período considerable. Para que se considere -- que una partícula está en estado de aerosol debe tener dos requisitos esenciales: deben sedimentar lentamente y la suspensión debe ser estable (Green citado por Campos, 1977). El tamaño de las gotas del aerosol está determinado por la humedad existente en el medio ambiente (Little citado por Pijoan, 1978). Cuando la humedad relativa es muy elevada, mayor del 90%, las gotas suspendidas se unen entre sí por puentes de Hidrógeno formando partículas muy grandes que se sedimentan con rapidez sin ser inhaladas. Las humedades relativamente bajas, menores del 50%, no permiten que las gotas permanezcan en el aire, son deshidratadas y tampoco pueden ser inhaladas (Little - citado por Pijoan, 1978).

El depósito de partículas inhaladas en forma de aerosol en la mucosa del tracto respiratorio o en la superficie alveolar depende de varios factores; tanto físicos (inercia, sedimentación y difusión), como inherentes a la propia partícula (tamaño, forma, densidad y solubilidad); así, todas las partículas inhaladas mayores de 10 μm son retenidas en la cavidad nasal, ya sea por las vellosidades propias de la cavidad como por los cambios bruscos de dirección que sufre el aire al ser inhalado, lo que ocasiona que las partículas suspendidas choquen, por inercia, en la superficie epitelial de los cornetes. La sedimentación (depósito por gravedad) depen-

de de la densidad y forma de la partícula, su efecto se observa principalmente en las partículas de 3 a 10 μm , cuando la velocidad del aire es baja, por lo que dichas partículas se depositan en las ramificaciones del árbol traqueobronquial. Sólo aquellas partículas cuyo tamaño está entre 0.5 y 3 μm llegan al alveolo depositándose en sus paredes. Las partículas menores de 0.5 μm , debido a su pequeña masa, no son capaces de adherirse y salen, por difusión, durante la espiración (Green, citado por Iglesias, 1981).

Todo material inhalado, sin embargo, interactúa con los mecanismos pulmonares de defensa del hospedador, que están destinados a la remoción e inactivación de tales partículas; por lo que la localización inicial de las mismas se modificará de acuerdo a la capacidad de estos mecanismos de defensa. El estudio del depósito regional de las partículas inhaladas es importante para comprender la patogénesis de la patología pulmonar, ya que gobierna la localización inicial del material patógeno que penetra al pulmón.

Las partículas inhaladas que se depositan en la mucosa del tracto respiratorio activan una triple respuesta de defensa del organismo: fagocitosis, aumento de secreción y mecanismos de transporte (Green, 1973). Estos mecanismos de defensa tienen como doble finalidad la remoción y la inactivación de partículas depositadas en este lugar. La remoción está determinada básicamente por el aparato mucociliar, los reflejos tusígeno y del estornudo y el transporte por macrófagos. Los mecanismos de inactivación están representados por las sustancias bactericidas, la fagocitosis de los macrófagos alveolares, el interferon y la fagocitosis inmune. Aunque los sistemas de remoción e inactivación de partículas son independientes uno del otro, trabajan en conjunción (Pijoan, 1978).

A. Mecanismos de remoción:

1) Reflejos: En la primera parte del tracto respiratorio la limpieza de -- de partículas extrañas se lleva a cabo por los reflejos tusígeno y del

estornudo, que son controlados por impulsos nerviosos.

2) Aparato mucociliar: En el árbol traqueobronquial la limpieza se realiza por el aparato mucociliar, compuesto por un epitelio cilíndrico ciliado pseudoestratificado con células caliciformes y por una doble capa de moco que recubre la mucosa. El moco posee una capa externa viscosa en estado de gel, donde se depositan las partículas; y una capa interna, fluida, en estado de sol, donde se mueven los cilios en dirección ascendente, para -- transportar las partículas depositadas hacia la orofaringe y su posterior -deglución y eventual destrucción en el aparato digestivo (Green y col. --- 1977).

Los mecanismos de transporte a nivel traqueobronquial dependen de la actividad secretora de las glándulas serosas y mucosas de la submucosa y de las células caliciformes de la mucosa, y de la actividad del sistema ciliar. Las características de las secreciones y de la actividad ciliar están influenciadas en gran medida por previa exposición a materiales irritantes, presencia de infecciones crónicas en el pulmón y por el estado de hidratación del hospedador (Green y col., 1977)

Existe también un transporte de los espacios periféricos intersticiales del lóbulo a los bronquiolos terminales, a sitios periarteriolares, perivenosos, subpleurales y paraseptales, y de ahí, por los conductos linfáticos, a nódulos reticuloendoteliales distantes (Pijoan, 1978).

3) Transporte por macrófagos: Las partículas fagocitadas por los macrófagos alveolares también son transportadas hacia afuera del alveolo tanto por vía del aparato mucociliar hacia el esófago, como por vía linfática local hacia los ganglios linfáticos bronquiales y mediastínicos. Estas células son los - principales macrófagos nativos del pulmón y es su responsabilidad la captación y detoxificación de las partículas inhaladas. La actividad de fagocito

sis de los macrófagos alveolares se ve favorecida por la sustancia surfac-
tante producida por los neumocitos tipo II, que recubre a las partículas
inhaladas haciendo la fagocitosis más eficiente (Green y col., 1977).

B. Mecanismos de inactivación:

El procesamiento intracelular de partículas inhaladas también depen-
de de las características físicas, químicas y biológicas de la partícula.
Este mecanismo incluye la acción de revestimiento de la sustancia surfac-
tante, interacción química con gases oxidantes e iones metálicos, solubi-
lización de sales, ciertos minerales y otras sustancias químicas bacteri-
cidas como la lisozima, la B lisina y la lactoferrina; sustancias capaces
de inactivar bacterias tanto Gram + como Gram -, y por último, la fagoci-
tosis por los macrófagos alveolares (Pijoan, 1978).

El sistema de fagocitosis alveolar es el más importante mecanismo de
inactivación que posee el pulmón (Pijoan, 1978). Este depende del aparato
enzimático y metabólico y de múltiples factores intracelulares del macró-
fago, que contienen, neutralizan y destruyen el material ingerido por la
célula. Se incluyen propiedades lisosomales y sustancias microbicidas co-
mo el peróxido de Hidrógeno. El proceso de fagocitosis también depende -
del metabolismo energético y de la generación y uso de ATP asociado a la
membrana, sistema que es altamente susceptible a agentes del medio ambien-
te.

Green en 1970, demostró que la fagocitosis es un mecanismo de inacti-
vación más eficiente que el acarréo por el aparato mucociliar, aunque éste
es más rápido (Iglesias, 1981). En algunos casos también se observa fagoci-
tosis y lisis inmune, y parece ser que estas reacciones son mediadas por -
inmunoglobulinas del tipo IgG (Green y col., 1977).

LA ENFERMEDAD

La aspergilosis es una enfermedad infecciosa, micótica, producida por diferentes especies del género Aspergillus, de las cuales A. fumigatus es la que ha sido más frecuentemente involucrada (Ainsworth y Austwick, 1973), aunque existen otras especies como A. flavus, A. niger y A. nidulans que pueden actuar como patógenos (Raper y Fennell, 1966).

La capacidad de los hongos del género Aspergillus de desarrollarse dentro de tejidos vivos, los hace responsables de diferentes enfermedades en el hombre y en los animales; sin embargo, el término aspergilosis es usualmente restringido a la infección del tracto respiratorio, aunque debe usarse para indicar cualquier tipo de infección producida por éstos hongos (Raper y Fennell, 1966).

Historia

La aspergilosis fué quizás una de las primeras micosis animales en ser descubierta, a principios del siglo XIX, cuando las bacterias empezaban a ser estudiadas. P. K. Austwick en el capítulo sobre Patogenicidad del libro "The Genus Aspergillus", de Raper y Fennell (1966), ofrece una excelente reseña histórica de éstos microorganismos remontándose hasta los trabajos de Reamur (1749), quien en una de las primeras observaciones de la actividad patógena del hongo, describe la presencia de mohos sobre huevos incubados. Montagne (1813), realiza la primera descripción del hongo en un animal vivo al informar la presencia de un "moho o mucor azul" dentro de los sacos aéreos torácicos de un pato. Meyer y Emmert (1815) y Jager (1816) descubrieron condiciones similares, mientras que Roger y Montagne (1842) efectúan el

primer reconocimiento de la relación de Aspergillus con lesiones en tales órganos. A partir de Robin (1853), la presencia de Aspergillus en condiciones patológicas es descrita con mayor frecuencia. Probablemente el primer informe de una aspergilosis en mamíferos fue hecho por Rosseau y Serrier (1841) en lesiones pulmonares de un ciervo. Subsecuentemente fue descrita en equinos por Rivolta (1856), en perros por Gotti (1871), en bovinos por Zurn (1876), en conejos por Smith (1915) y en cuyes por Ainsworth y Austwick (1955). En los trabajos de Virchoff (1844) y Sluger (1847), se menciona por primera vez a Aspergillus en las enfermedades pulmonares del hombre.

Las investigaciones en el campo de la bacteriología en la segunda mitad del siglo pasado y en la primera del actual, desplazaron hasta cierto punto el interés de las investigaciones sobre éste y otros hongos. Los trabajos sobre Aspergillus parecen sufrir una pausa hasta 1952, con la revisión de Hinsén y col., Monod y col. (1957), Symmers (1962), y con la recopilación de Raper y Fennell en 1966.

Los informes de los últimos años indican que en el hombre Aspergillus puede producir infecciones de tipo pulmonar, cutáneo, óseo, gastrointestinal, genitourinario y en los sistemas circulatorio y nervioso central (Robbins, 1975; Barret y col., 1977); también se han descrito invasiones oculares, de senos paranasales, así como diseminación a todo el organismo -- (Abernathy citado por Barret y col., 1977). En gatos, ovinos, caballos y conejos ocurre usualmente la forma broncopulmonar, aunque en gatos han sido descritas infecciones sistémicas (Fox y col., 1978), intestinal (Boltón y col., 1973) y asociadas con sinusitis orbital (Wilkinson y col., -- 1982). En equinos Aspergillus ha sido encontrado en la micosis gútural -- (Rawlinson, 1978); mientras que en conejos puede presentarse también una infección gastrointestinal o generalizada (Thurston y col., 1979). En bovinos y ovinos, además de la forma pulmonar puede ocurrir infección uterina con infección y expulsión del feto -aborto micótico-, o infección de -

la glándula mamaria -mastitis micótica- (Gillespie y Timoney, 1983). En el perro sólo se observan infecciones en los senos paranasales y frontales -- (Barret y col., 1977; Poli y col., 1981), o en la presentación sistémica (Wood y col., 1978). En aves la enfermedad es mucho más frecuente y puede ocurrir en pollos (Ghori y Edgar, 1981), patos (Rejo y col., 1978), pavos (Hacking y Blandsford, 1971), gansos y palomas (Taylor, 1966), así como en aves de ornato y de zoológico (Ainsworth y Austwick, 1973). La enfermedad sistémica también ha sido reproducida experimentalmente en monos (Mahajan y col., 1978).

Etiología

Los hongos del género Aspergillus pertenecen al grupo de los Ascomycetos. Son aerobios y se cultivan en medios de rutina para hongos como el de Sabouraud o el de Czapek. En condiciones naturales el crecimiento y esporulación del hongo se ven favorecidos por un exceso de humedad y calor en el medio ambiente, aunado a una abundancia de materia orgánica. Para que Aspergillus se propague se requiere que el medio de crecimiento tenga de 15 a 25% de humedad, temperatura de 30 a 36°C, con un rango de 5.5 a 45°C. Las esporas no pueden germinar a temperaturas de 4.4°C, aunque no mueren, y -- son destruidas con temperaturas de 77 a 100°C. La humedad en el medio ambiente deberá ser entre un 80 y 85% (Ghazilkhanián, 1982).

Epidemiología

La aspergilosis se ha descrito en todo el mundo. Se cree que es más frecuente en la época húmeda del año y se presenta habitualmente donde -- existe aglomeración de animales. Las condiciones de medio ambiente que requiere el hongo para su crecimiento y esporulación se observan con frecuencia en el almacenamiento de granos y forrajes, que se convierten en la principal fuente de infección para los mamíferos domésticos (Jubb y Kennedy, - 1974; Trigo y col., 1978). En el caso de las aves la presencia de camas en

mohecidas en los corrales de crianza representa la mayor fuente de esporas, así como el uso de plantas de incubación contaminadas (Rejo y col., 1978; Gordon, 1980).

Patogenicidad

Las enfermedades producidas por Aspergillus se clasifican en tres grupos:

- 1) Infección o micosis: Es la invasión de tejidos vivos por el hongo, puede ser:
 - a) Primaria: resultado de la entrada del hongo directamente en un tejido sano del hospedador
 - b) Secundaria: resultado del crecimiento del hongo en lesiones previas o como complicación de enfermedades debilitantes.
- 2) Alergia: Asociada con la inhalación de conidias u otro contacto con el hongo.
- 3) Intoxicación: Por la ingestión de medicamentos que contengan metabolitos tóxicos producidos por el hongo.

Aunque algunos autores dudan de la capacidad de Aspergillus para desencadenar una infección primaria (De Vries y Cormane, 1966; Barret y col., -- 1977), la mayoría de ellos coincide en que la aspergilosis puede ser una infección respiratoria primaria iniciada por la inhalación repetida de esporas (Ainsworth y Austwick, 1973; Jubb y Kennedy, 1974; Trigo y col., 1987). -- Aspergillus fumigatus es sólo superado por Histoplasma capsulatum, Coccidioides immitis y Blastomices dermatitidis como causa micótica de enfermedad sistémica en humanos y es el hongo patógeno más frecuente en animales, particularmente en aves (Austwick en Raper y Fennell, 1966).

El papel de Aspergillus como causante de complicaciones en pacientes debilitados o inmunocomprometidos es ampliamente conocido; después de Candida, Aspergillus ha sido el agente más frecuentemente involucrado con

micosis invasivas en tales circunstancias (Schafer y Medoff, 1979). Es frecuente encontrarlo en casos de tuberculosis, enfermedad de Hodking, anemia aplastica, leucemia, linfosarcoma y otro tipo de neoplasias y/o por el tratamiento a largo plazo de antibióticos, corticosteroides, irradiación, citotóxicos y otros agentes inmunosupresores (Sandhu y col., 1970; Robbins, 1975). El papel de algunos de los factores anteriores en la predisposición del hospedador hacia las infecciones oportunistas micóticas - ha sido demostrado en experimentos con animales. Sandhu y col. (1970), -- demuestran un marcado incremento en la susceptibilidad de ratones tratados con cortisona a la exposición de un aerosol de Aspergillus en comparación con ratones no tratados expuestos al mismo aerosol. Kurup y col. (1981), - comprobaron lo anterior en conejos, y White (1977), menciona que existe - un aumento en la germinación de conidias de Aspergillus fumigatus en el pulmón de ratones expuestos en condiciones similares a las anteriores.

Signología

La enfermedad ha sido muy bien estudiada en el caso de las aves, en - las que se puede presentar en cuadros agudos o crónicos. La forma aguda es importante sobre todo en juvenes, donde es llamada "Neumonía de la criadora"; en ocasiones es asociada con la vacunación de organismos vivos como el virus de Newcastle (Ghazikhanian, 1982). Las aves afectadas se muestran indiferentes, se presenta pérdida de apetito, disnea, aumento de temperatura, diarrea fétida y rápida pérdida de peso. Es posible observar convulsiones - en aves afectadas 24-48 horas después de los primeros signos y la muerte - puede sobrevenir en muy corto tiempo (Ainsworth y Austwick, 1973; Gordon, 1960). La forma crónica de la aspergilosis en aves es insidiosa y las aves afectadas pueden sobrevivir por largos periodos con gradual pérdida de condición. Se pueden presentar signos de la enfermedad aguda en forma leve, con anemia, heces amarillentas y estertores respiratorios (Gordon, 1980; -- Ghazikhanian, 1982).

En el caso de los mamíferos, la enfermedad no ha sido lo suficientemente estudiada como para establecer la clasificación de las diferentes manifestaciones clínicas, con referencia a los tipos de lesiones, estado de desarrollo, susceptibilidad individual y factores alérgicos y medioambientales de cada caso; aunque las categorías de aguda, subaguda y crónica pueden ser usadas. La enfermedad aguda ha sido observada en animales jóvenes como corderos, conejos y cuyes; los becerros parecen ser más resistentes a la infección (Eggert y Rambere, citados por Austwick, 1973). La forma crónica es característica, donde hay pérdida progresiva de condición, seguida por la muerte; el cuadro es muy similar al de la tuberculosis. En ovinos puede presentarse muerte sin mostrar signo alguno, mientras que los bovinos pueden exhibir dificultad al respirar, así como una descarga nasal profusa o exudación de serosa a purulenta, aunque sin respuesta febril (Gillespie y Timoney, 1983).

Patogenia y lesiones

En realidad no se conocen muchos aspectos de la patogenia de la aspergilosis pulmonar, como la susceptibilidad de los hospedadores, el número necesario de esporas para iniciar una infección o el poder toxigénico de los organismos (Jubb y Kennedy, 1974).

La forma de transmisión es aerógena y la enfermedad se inicia en forma natural por la inhalación repetida de esporas (Ainsworth y Austwick, -- 1973). La infección puede desarrollarse con la implantación del hongo en la cavidad nasal, bolsas guturales y vías aéreas traqueobronquiales o puede aparecer en forma de bronconeumonía nodular. La localización de los sitios de implantación varía según la especie, por ejemplo, en el perro sólo en la parte superior del tracto respiratorio (Barret y col., 1977; Poli y col. 1981). No existen trabajos que expliquen si la distribución de esporas después de la inhalación juega un papel importante en la localización de las lesiones.

1) Infección aguda: Experimentos en modelos animales (Thurston y col., 1979; Kurup y col., 1981), muestran que 4 horas después de la exposición a un aerosol de esporas de Aspergillus fumigatus se observa la presencia de éstas dentro del espacio alveolar; entre 6 y 12 horas después de la inhalación aparece un ligero engrosamiento de la pared alveolar por macrófagos y linfocitos y un gran número de esporas están presentes en la pared alveolar. A las 24 horas postexposición, aparecen acúmulos multifocales de macrófagos y linfocitos, con algunos neutrófilos, que obliteran severamente los alveolos adyacentes e infiltran la pared alveolar; se observan elementos fungales y esporas germinadas dentro de los macrófagos. A los 4 días aparecen ya múltiples granulomas focales compuestos predominantemente por macrófagos, pero también por linfocitos y algunos elementos polimorfonucleares.

Cuando los hongos crecen sobre la mucosa, se pueden observar a simple vista como un crecimiento blanquecino que más tarde presenta un aspecto purulento de color verdoso. El tipo de reacción corresponde a una necrosis caseosa rodeada de inflamación hemorrágica (Jubb y Kennedy, 1974). La destrucción de la pared bronquial con necrosis del epitelio establecen una ruta de entrada del hongo al parénquima pulmonar (Kurup y col., 1981), aunque no se conoce si la fagocitosis que se lleva a cabo por los macrófagos pulmonares móviles sea otro mecanismo de diseminación hacia el parénquima pulmonar. En aves es característico que aparezcan pequeñas lesiones focales o en forma de placas de color blanquecino en las membranas serosas de los sacos aéreos, que se llegan a engrosar.

Los cambios sufridos en la morfología del hongo in vivo probablemente reflejen los grados de defensa del hospedador. Las conidias inhaladas germinan rápidamente y producen hifas globosas o en forma de células ovales que son características de la infección pulmonar aguda de los animales jóvenes. Entre 4 y 6 días después de la infección aparecen hifas no ramificadas, rectas o en espiral, que podrían indicar que la resistencia inicial a

la infección ha sido superada (Ainsworth y Austwick, 1973).

Esta forma aguda de la enfermedad se caracteriza macroscópicamente por la aparición de uno o varios nódulos de 1 a 10 mm de diámetro, de color gris blanquecino o amarillento, rodeados de una zona estrecha de hiperemia aguda, que se hacen visibles 4 días después de la infección experimental (Thurston y col., 1979).

Los experimentos en animales de Thurston y col. (1979) muestran que las lesiones agudas comienzan a sufrir una reducción gradual en su intensidad a los 8 días postinfección y, 20 días después de la infección lesiones microscópicas significativas, han desaparecido del pulmón.

2) Infección crónica: La infección crónica puede seguir de un ataque agudo, pero también puede desarrollarse lentamente sin signos notables hasta que la disnea, la debilidad y la hemoptisis se hacen obvias.

A medida que las lesiones maduran, si no son progresivas, predominan en los nódulos los macrófagos y las células epitelioides, apareciendo extensamente infiltrados los tejidos septales y haciéndose visible una fibroplasia encapsulante. Las células gigantes no son muy significativas en la lesión, aunque pueden aparecer más tarde en el momento en el que el foco está siendo aislado por la fibrosis; formándose entonces grandes masa de tejido caseo encapsulado (aspergilomas), similares a los que aparecen en la tuberculosis. Cuando las lesiones se localizan en bronquios, el tejido necrótico se puede desprender dejando una caverna bronquiectásica, o bien, es sustituido por tejido de granulación del mismo tipo del que aparece en el estadio crónico de la lesión pulmonar (Jubb y Kennedy, 1974).

Como indicación de la respuesta del hospedador, la forma de las colonias de hongos es distinta en la infección crónica, apareciendo hifas septadas den

samente ramificadas, de 2 a 4 μm de diámetro, que crecen radialmente alrededor de las lesiones, estas hifas son llamadas "actinomicetoides". En lesiones muy viejas las ramificaciones las lesiones pueden encerrarse en una masa compacta de hongos, redonda, con clara delimitación por bordes avanzados, donde no es visible material tisular entre las hifas. Algunas veces pueden encontrarse los "cuerpos asteroides" en nódulos que están -- siendo aislados; éstos son estructuras eosinofílicas y cristalinas, de 1 μm de grosor y 30 a 80 μm de diámetro, envueltas en un material continuo y refringente (Rudolph, 1978).

Puede ocurrir diseminación de la infección a partir de las lesiones pulmonares, siendo el riñón uno de los órganos más afectados (Jubb y Kennedy, 1974).

Diagnóstico

El diagnóstico de las infecciones causadas por los hongos del género Aspergillus depende del aislamiento del hongo a partir del tejido afectado, de la demostración de éste en lesiones características y/o de la demostración de la respuesta inmune por parte del hospedador.

1) Aislamiento: El aislamiento de Aspergillus a partir de tejidos infectados requiere de técnicas selectivas de cultivo que disminuyan la contaminación bacteriana y aseguren que el hongo aislado provenga del sitio de la lesión y no de otras fuentes. Los medios más utilizados para el aislamiento son el Sabouraud dextrosa agar (SDA) y el agar extracto de maltosa. -- Las especies son diferenciadas por la estructura de las cabezas conidiales y por el color de la masa de esporas. El libro "The Genus Aspergillus" de Kaper y Fennell (1966), facilita en gran medida la diferenciación de las especies.

2) Serología: La utilización de técnicas serológicas para el diagnóstico -

de la aspergilosis es de gran importancia en medicina humana (Hearn y Mackenzie, 1978), aunque es muy poco usada en animales. Bee y col. (1939, citados por Ainsworth y Austwick, 1973), establecieron que la fijación de complemento era el método más sensible para la detección de anticuerpos. Experimentos más recientes (Lane y Waenock, 1977; Poli y col., 1981), indican que ésta prueba es altamente sensible para la detección de anticuerpos precipitantes durante la infección.

3) Histopatología: El otro método que se utiliza para el diagnóstico de la aspergilosis es el examen histopatológico, que tiene como doble finalidad la observación de los cambios microscópicos que suceden en el tejido afectado, y la demostración del hongo en tales lesiones. Una de las coloraciones de rutina para la observación de los cambios microscópicos es la de hematoxilina eosina (HE), la cual colorea pobremente a los hongos. Coloraciones más específicas como la del ácido periódico de Schiff (PAS) y la de --Gómori, que colorean las hifas de rojo y negro, respectivamente, permiten una detección más segura de los hongos (Trigo y col., 1978). Para la diferenciación del hongo involucrado en las lesiones, en un examen histopatológico, se utiliza un criterio morfológico que en ocasiones es muy difícil de emplear; por ejemplo, Cryptococcus neoformans no encapsulados en tejidos humanos pueden parecerse a pequeños organismos de Histoplasma capsulatum y lo mismo sucede con pequeñas formas de Blastomices dermatitidis, que pueden ser confundidas con las anteriores (El Nageeb y Hay, 1981).

Debido a lo anterior se ha buscado el establecimiento de un sistema que permita, al mismo tiempo que se identifica plenamente al hongo, la observación de la respuesta microscópica del tejido afectado. Coons y Kaplan (1950), descubrieron una técnica para la demostración de antígenos en tejidos, la inmunofluorescencia. Técnica que involucra el uso de anticuerpos específicos contra los antígenos que se desea determinar. Los anticuerpos son marcados con isotiocianato de fluoresceína y la visualización de los

resultados se realiza en un microscópio de luz ultravioleta, observando los sitios de reacción antígeno-anticuerpo como un puntilleo fluorescente. Esta técnica ha sido utilizada muy poco para la identificación de hongos en tejidos infectados (Kaplan y Kruff, 1969), y además existen ciertas desventajas en su utilización, como son la dificultad para reconocer la morfología distintiva y la respuesta microscópica del tejido en observación a la infección; el requerir de tejidos frescos congelados y el hecho de que las preparaciones no pueden ser montadas permanentemente, ya que la inmunofluorescencia pierde intensidad progresivamente (Petts y Roitt, 1971; Burns, 1975; Taylor y col., 1983).

Las desventajas de los métodos anteriores estimularon el desarrollo de un método alternativo para marcar anticuerpos que tuviera la misma especificidad pero que pudiera ser usado con tejidos procesados en forma convencional. Naktun y Pierce (1967) y Avrameas (1969), describieron una técnica con la cual se realizan preparaciones permanentes y en las que se requiere únicamente del microscópio de luz visible para su observación, utilizando muestras de tejidos procesadas en forma convencional, fijadas en formalina e incluidas en parafina (Petts y Roitt, 1971). El marcado de los anticuerpos específicos se realiza con peroxidasa de rábano picante, la cual puede ser localizada en los tejidos, por la adición de un sustrato cromogénico que produce una reacción coloreada que es apreciada en un microscópio de luz visible.

Las ventajas de éste método son las siguientes:

- a) Utiliza muestras de tejidos procesadas por métodos convencionales.
- b) La preparación puede ser contrastada con otra coloración, ej. hematoxilina, y puede ser observada en un microscópio de luz visible.
- c) El detalle morfológico obtenido por esta inmunoloración es equivalente al observado en métodos convencionales.
- d) Las preparaciones obtenidas pueden utilizarse para realizar estudios posteriores, ya que proporciona un registro permanente del material en ob-

servación (Taylor y col., 1981).

Esta coloración, que es llamada de inmunoperoxidasa, posee tres variantes (Heyderman, 1979, citado por El Nageeb y Hay, 1981). La primera es un método directo que emplea el antisuero específico conjugado con peroxidasa. La segunda variante o método del "sandwich" utiliza primero un antisuero no marcado y la peroxidasa se conjuga con un segundo anticuerpo. El tercer método es el más complejo e involucra una técnica en tres etapas, en la cual la peroxidasa anticuerpo (PAP) es el tercer componente y el segundo anticuerpo un puente entre el conjugado y el primer antisuero; éste es el método que lleva más tiempo pero es el más sensible.

Diferentes experimentos (Burns, 1975; Bootsman y col., 1975-76; Shu y Albini, 1976; Knowles y col., 1977; Currante y Gregory, 1978; Varnke y col. 1978), demuestran que el método de inmunoperoxidasa posee la misma especificidad que el de inmunofluorescencia para el marcado de anticuerpos específicos de muy diverso orígenes, incluyendo hormonas, enzimas e inmunoglobulinas. Petts y Roitts (1971) utilizaron la técnica para marcar frotis de Treponema pallidum, mientras que Taylor y col. (1981) mencionan que la técnica ha sido utilizada para la identificación de antígenos de virus como el Herpes, el de Rabia y otros.

El Nageeb y Hay (1981), utilizaron la técnica de inmunoperoxidasa por el método indirecto, para la identificación de hongos del género Aspergillus en tejidos humanos y animales infectados, demostrando que las hifas del hongo presentes en el tejido infectado son claramente distinguibles y, aunque no fue posible la distinción entre las dos especies de Aspergillus (A. fumigatus y A. flavus), utilizadas en el experimento, se demostró que no ocurre reacción cruzada con el antisuero de Candida. Los autores anteriores concluyen que la utilización de la técnica de la inmunoperoxidasa, por el método indirecto, permite el reconocimiento específico de Aspergillus en

material infectado fijado en formalina e incluido en parafina, aún cuando no esté presente en cantidades suficientes para ser identificado - por los criterios morfológicos convencionales, lo que permite un diagnóstico rápido y seguro de este tipo de infecciones.

Por lo expresado en líneas anteriores, el presente trabajo se enfocará al establecimiento de la técnica de inmunoperoxidasa, por el método indirecto, para realizar un estudio de la distribución pulmonar de Aspergillus fumigatus en el tejido pulmonar de animales experimentalmente infectados y sacrificados a intervalos determinados, con la finalidad de observar las modificaciones de la localización del hongo realizadas por los mecanismos de defensa del pulmón, así como las lesiones producidas por el mismo durante la infección.

II. OBJETIVOS

1. Establecer la técnica de inmunoperoxidasa, método indirecto, para la visualización de Aspergillus fumigatus en tejido pulmonar infectado experimentalmente.
2. Determinar la localización primaria de esporas de Aspergillus fumigatus en el aparato respiratorio inferior después de la inhalación de un aerosol conteniendo 20×10^5 esporas/ml.
3. Determinar si los mecanismos de remoción y/o inactivación de partículas del pulmón modifican la localización y la viabilidad de las esporas de Aspergillus fumigatus depositadas en él.
4. Observar la evolución de las lesiones producidas en una aspergilosis pulmonar experimental.

III. MATERIAL Y METODOS

A. Cepa de Aspergillus fumigatus: Para el presente estudio se utilizó una cepa de Aspergillus fumigatus tipo A-20 aislada de un caso de aborto micótico bovino en la Escuela Veterinaria de Glasgow, Escocia. La cepa fue -- crecida en Sabouraud dextrosa agar (SDA), a temperatura ambiente por 6 - días, y los subcultivos frescos fueron usados durante todo el experimento*.

B. Producción del aerosol: La cepa de A. fumigatus utilizada fue cultivada por el método convencional de picadura en tubos conteniendo 10 ml de SDA - e incubados a temperatura ambiente por 6 días. La recolección de las esporas se realizó con una solución estéril de medio Tween 80 al 1% en solución salina fisiológica. El conteo de las esporas fue realizado por el método de hemocitómetro utilizando una cámara de Neubauer y una pipeta de Thoma para glóbulos blancos, coloreando las esporas con una solución de azul de metileno al 1%.

* Existe cierta variación antigénica entre las diferentes cepas de Aspergillus, así como por los pases sucesivos en medios de cultivo, pero no se conoce con exactitud, el grado de variación de los determinantes antigénicos del hongo.

Comunicación personal: Dr. R. Cervantes, 1984.

La concentración de la suspensión fue ajustada a 20×10^5 esporas/ml y la viabilidad de las esporas fue determinada por el cultivo de 0.5 ml de la suspensión en placas con SDA, que fueron incubadas a 37°C por 24 horas en una estufa bacteriológica.

C. Animales de experimentación: Fueron utilizados en todo el experimento conejos blancos de Nueva Zelanda, de aprox. 2 kg o más de peso, obtenidos del Módulo de Conejos del Centro de Producción Agropecuaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, U. N. A. M..

D. Exposición de los animales al aerosol: Los conejos fueron expuestos al aerosol de esporas de A. fumigatus en una cámara de exposición diseñada por Caballero y col. (1985) en la Unidad de Estudios de Postgrado de la F. E. S. Cuautitlán, a partir de un modelo de exposición utilizado por López y col. en experimentos anteriores (López y col., 1982).

Las características de la cámara son las siguientes: Cámara rectangular de madera, revestida de formaica (1.50x1.20x1.00 m). Tres nebulizadores (modelo 645 Devilbis) fueron conectados respectivamente a tres perforaciones en la parte lateral izquierda de la cámara. El aerosol fue generado por introducción de aire a presión a la suspensión de esporas, por medio de una compresora ajustada a 10 PSI. El aerosol residual fue eliminado del sistema para su inactivación con la ayuda de una bomba de vacío ajustada a 10 PSI, la cual fue acoplada a tres tubos de salida presentes en la parte lateral derecha de la cámara (Figuras 1 y 2).

El volumen de la suspensión de esporas fue de 1.5 ml/animal; estos fueron expuestos al aerosol por un lapso de 30 minutos. La dosis recibida y el tiempo de exposición fueron calculados en experimentos anteriores.

Se utilizó un grupo control de animales que fue expuesto, en condiciones similares a las anteriores, a un aerosol conteniendo únicamente medio líquido SDA estéril.

E. Obtención de las muestras: Los conejos fueron divididos en lotes y sacrificados a intervalos determinados postinoculación (Cuadro 1), utilizando como método de eutanasia pentobarbital sódico.

La piel de cada animal fue desinfectada y removida y la cavidad torácica fue expuesta por corte de los cartílagos costocentrales, para extraer la tráquea junto con los pulmones.

1) Examen micológico: El pulmón izquierdo de cada animal fue separado y depositado en cajas de Petri estériles. Después de flamear su superficie -- con una espátula al rojo, se realizaron varios cortes con tijeras flameadas y se tomaron muestras con un asa, para sembrarse en cajas de Petri con teniendo SDA, según la técnica de los grupos separados. Las cajas fueron incubadas a 28°C en una estufa bacteriológica.

2) Examen patológico: Después de su observación macroscópica, el pulmón derecho de cada animal fue fijado por introducción intratraqueal de formalina amortiguada al 10%. Posteriormente a un tiempo de fijación no menor de 24 horas, se seleccionaron muestras de cada uno de los lóbulos; las muestras fueron deshidratadas, incluidas en parafina y se realizaron cortes de 4 un de espesor. Posteriormente se procedió a su coloración -- con las técnicas para histopatología de hematoxilina eosina, ácido periódico de Schiff (PAS) y Gómori para hongos, según el manual de Métodos de coloración para Histopatología del Instituto de Patología de las -- Fuerzas Armadas, U.S.A.. Así como con la técnica de inmunoperoxidasa, método indirecto, modificada de la utilizada por Burns en experimentos anteriores (Burns, 1975).

Coloración de inmunoperoxidasa, método indirecto:

- a) Desparafinar los cortes en 2 cambios de xileno (10 minutos cada uno) y rehidratar el alcohol absoluto (2 min.), alcohol 96° (2min.), alcohol 80° (2min.) y alcohol 70° (2min.).
- b) Lavar 15 min. en buffer Tris*, 3 veces, 5 min. cada uno.
- c) Bloquear la actividad de la peroxidasa endógena con una sol. fresca - de peróxido de Hidrógeno 0.5% en metanol (30 min.).
- d) Lavar 15 min. en buffer Tris*, 3 veces, 5 min. cada uno.
- e) Tratar los cortes con una sol. 0.001% de Tripsina (1:250 Dyfco) en - 0.001% de CaCl en buffer Tris*, a T° ambiente, por 5 min. (romper los enlaces cruzados de proteína formados durante la fijación).
- f) Lavar 15 min en buffer Tris*, 3 veces, 5 min. cada uno.
- g) Incubar los cortes con el suero de ovino antiAspergillus** (1:10 en buffer Tris*), a T° ambiente, por 60 min..
- h) Lavar 15 min. en buffer Tris*, 3 veces, 5 min. cada uno.
- i) Incubar los cortes con el conjugado Peroxidasa-IgG conejo antiIgG ovino (Cappel Labs.**), 1:20 en buffer Tris*, a T° ambiente, por 60 min..
- j) Lavar 15 min. en buffer Tris*, 3 veces, 5 min. cada uno.
- K) Colorear el producto final con 0.05% de 3,3'diaminobenzidina tetrahidroclorada (Sigma) y 0.01% de peróxido de Hidrógeno con la sol. siguien

te:

Disolver 5 mg de 3,3'diaminobenzidina tetrahidroclorada*** (Sigma) en 10 ml de una sol buffer Tris* 1:10 en sol. salina fisiológica y adicionar 0.1 ml de Peróxido de Hidrógeno 1% inmediatamente antes de su uso.

l) Lavar 15 min. en buffer Tris*, 3 veces, 5 min. cada uno.

m) Colorear los cortes con hematoxilina de Harris (sol. de trabajo), 45 seg., deshidratar, aclarar en xileno y montar en resina sintética.

* La sol. buffer Tris HCl 0.5M, pH 7.6, se utiliza para todos los lavados, así como para la dilución de los sueros y del sustrato de la Peroxidasa.

** Los reactivos biológicos utilizados fueron:

i) Suero de ovino antiAspergillus 1:10 en buffer Tris*, que fue obtenido por inoculación de antígeno de A. fumigatus, tipo A-20, obtenido en la Escuela Veterinaria de Glasgow, Escocia, por Cervantes (1981).

ii) Conjugados comerciales Peroxidasa-IgG conejo antiIgG ovino (Cappel Labs., West Chester, Pennsylvania).

Las diluciones de ambos reactivos fueron obtenidas en estudios previos utilizando comparativamente diluciones dobles.

*** Como sustrato para la Peroxidasa se utilizo 3,3'diaminobenzidina - tetrahidroclorada (Sigma Chemical Co.).

Todas las reacciones se llevaron a cabo en muestras de tejido procesadas con técnicas convencionales de histopatología (fijación en formalina e inclusión en parafina).

CUADRO 1

"Tiempo de sacrificio de los animales después de su inoculación"

| GRUPO | TIEMPO DE SACRIFICIO POSTINOCULACION | No DE ANIMALES |
|----------------|---|----------------|
| 1 | 15 minutos | 2 |
| 2 | 6 horas | 3 |
| 3 | 12 horas | 3 |
| 4 | 24 horas | 3 |
| 5 | 48 horas | 3 |
| 6 | 96 horas | 3 |
| 7 | 8 días | 3 |
| 8 | 15 días | 3 |
| CONTROL | | |
| A | 6 horas | 1 |
| B | 12 horas | 1 |
| C | 48 horas | 1 |
| D | 8 días | 1 |

FIGURA 1

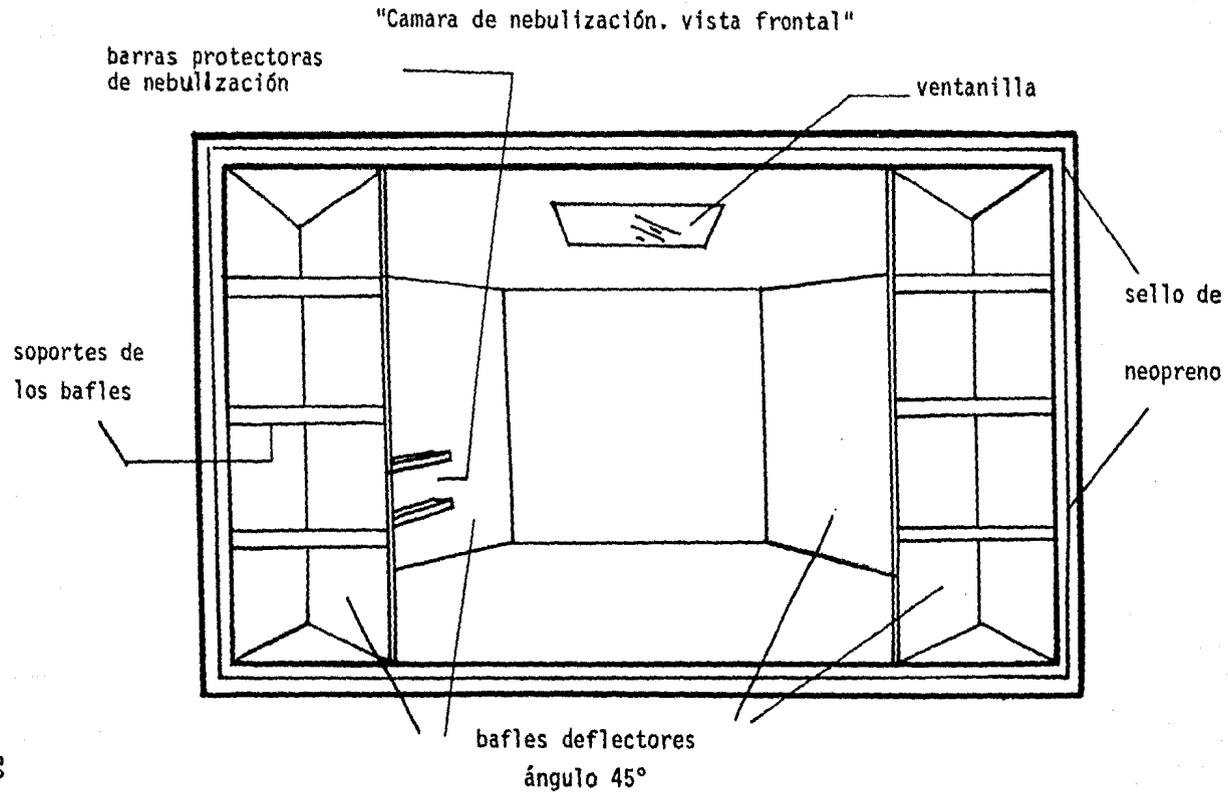
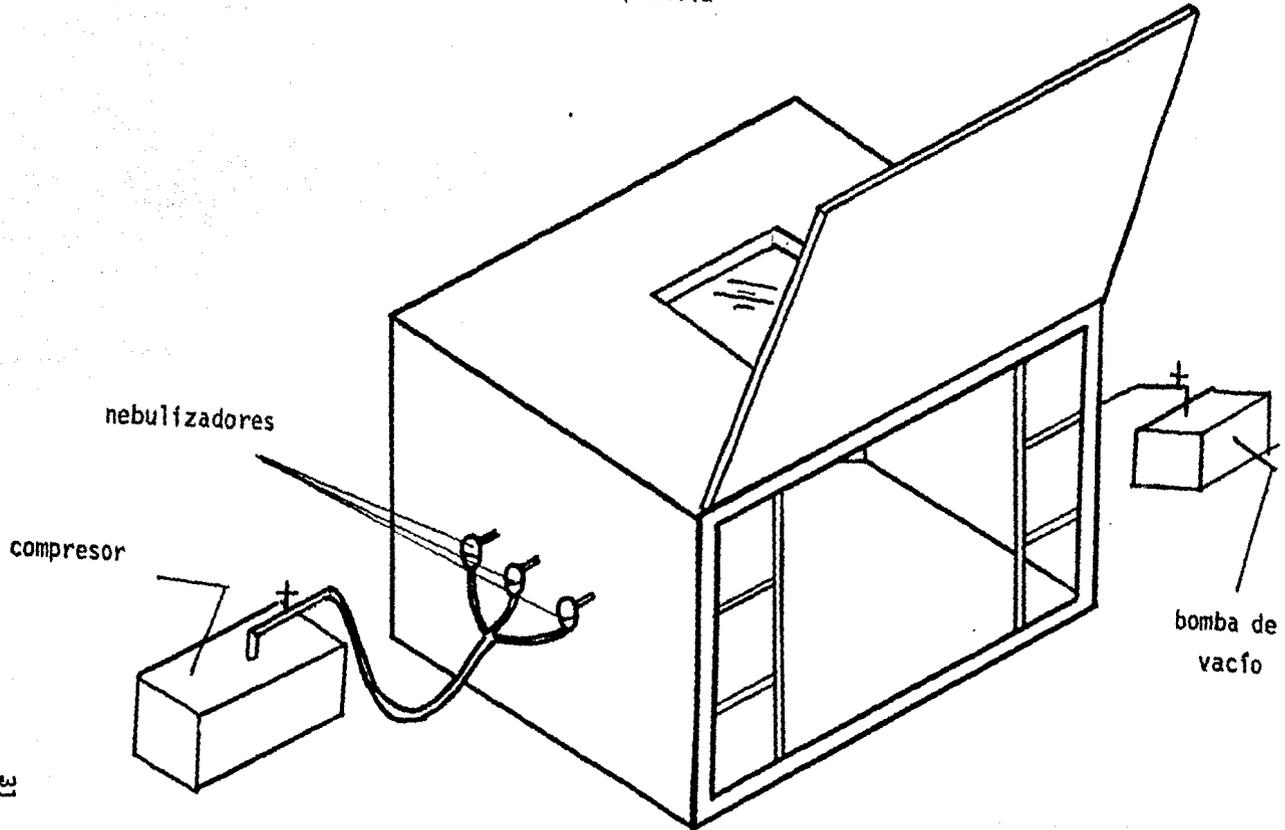


FIGURA 2

"Camara de nebulización y sistema en operación
en perspectiva"



IV. RESULTADOS

A. Estudio micológico: Los resultados del examen micológico de las muestras se observan en el Cuadro 2. Formas viables de Aspergillus fumigatus fueron recuperadas de los pulmones de todos los animales sacrificados a los 15 minutos, 6 horas y 12 horas después de la exposición al aerosol de esporas. No fue posible recuperar A. fumigatus de las muestras de los animales sacrificados a las 24 y a las 48 horas postexposición, observándose crecimiento bacteriano en ellas. A. fumigatus fue recuperado en un tercio de las muestras de los animales sacrificados a las 96 horas y a los 8 días postexposición, y en todas las muestras de los animales sacrificados 15 días después de la exposición. Las muestras provenientes de los animales del lote Control resultaron negativas al aislamiento microbiológico.

B. Estudio patológico:

1) Cambios macroscópicos: En los animales sacrificados 96 horas o más después de la exposición al aerosol de esporas de A. fumigatus fueron observados nódulos blanquecinos, delimitados, de aprox. 2 mm de diámetro, de consistencia suave y distribución multifocal, afectando a todos los lóbulos pulmonares. Los animales sacrificados antes de 96 horas postexposición no presentaron cambios patológicos aparentes en el tejido pulmonar.

No se observaron cambios patológicos aparentes, en los otros tejidos de los animales expuestos al aerosol de esporas, ni en ningún tejido de los animales utilizados como Control.

2) Cambios microscópicos: Después de 15 minutos de que los animales fueron expuestos al aerosol de esporas de A. fumigatus se observó la presencia de éstas en el espacio alveolar.

Seis horas después de la exposición, infiltración discreta de macrófagos, linfocitos, eosinófilos y de algunos neutrófilos en las paredes alveolares; así como una escasa infiltración de células mononucleares en vénulas y en la submucosa bronquiolar. En algunos alveolos se presentó edema, hilos de fibrina y algunos macrófagos de citoplasma espumoso acumulados en la luz, rodeados por linfocitos. Esporas de hongos fueron observadas en la superficie alveolar y dentro de algunos macrófagos alveolares.

Entre 12 y 24 horas postexposición se presentó congestión moderada, engrosamiento de algunas paredes alveolares por macrófagos, linfocitos y eosinófilos; además de pequeños nódulos formados principalmente por macrófagos, linfocitos y algunos neutrófilos, localizados a nivel peribronquial; también se presentó infiltración mononuclear en la mucosa y submucosa de algunos bronquios. Esporas y material amorfo, sugestivo de restos de hongos se observaron dentro de los macrófagos de los nódulos y de las paredes alveolares engrosadas.

A las 48 horas después de la exposición se detectó congestión severa, infiltración severa de células mononucleares y eosinófilos en la pared alveolar, obliterando la luz de los alveolos adyacentes a la zona de infiltración. También había nódulos broncocéntricos formados por macrófagos grandes de citoplasma grumoso de color claro, y por grupos de linfocitos, rodeando células en necrosis. Material amorfo, sugestivo de restos de hongos, fue observado dentro de los macrófagos de la zona de lesión.

A las 96 horas (4días) se observaron múltiples granulomas focales de localización peribronquial, formados predominantemente por macrófagos, con grupos de linfocitos y células gigantes en formación. En el centro de los granulomas aparecieron masas de tejido necrótico y algunos polimorfonucleares. Se apreció precipitación de un material eosinófilo, refringente, de forma alargada, dispuesto en forma radiada, formando estructuras redondeadas concéntricas. Pequeñas hifas de forma redondeada aparecieron dentro de los granulomas, entre el tejido necrótico y en el centro de las estructuras refringentes. A nivel alveolar también pudo observarse engrosamiento severo de algunas paredes alveolares, por infiltración de células mononucleares.

A los 8 días postexposición, los granulomas estaban completamente desarrollados e incluyeron a la pared bronquial, ocupando en uno de los animales más del 60% de la superficie del tejido pulmonar. Los granulomas presentaron áreas confluentes de necrosis, macrófagos y polimorfonucleares, así como células gigantes, disminuyendo el número de linfocitos en la lesión. En el centro de los granulomas había grandes estructuras eosinofílicas, de forma redondeada y aprox. 40-50 μ m de diámetro (cuerpos asteroides), localizadas entre el tejido necrótico y los macrófagos. Hifas plenamente desarrolladas, de forma alargada, fueron detectadas entre el tejido necrótico y dentro de las células gigantes, así como en el centro de los cuerpos asteroides.

A los 15 días postexposición, las lesiones presentaron una reducción gradual en su intensidad, disminuyendo el número de las células inflamatorias, la cantidad de tejido necrótico y el tamaño de los cuerpos asteroides; aumentaron en cambio, los fibroblastos de las lesiones. Hifas y algunos restos amorfos, sugestivos de hongos en procesos de degradación se siguieron observando en las lesiones, generalmente confinados dentro de las células gigantes.

En el cuadro 3 se presentan las características histológicas de las lesiones observadas a nivel pulmonar en el presente experimento.

C. Resultados de la técnica de inmunoperoxidasa: La presencia de Aspergillus fumigatus en el tejido pulmonar de los animales experimentalmente infectados, fue demostrada por la observación de un precipitado café-dorado a lo largo de la pared de las esporas e hifas del hongo. El color morado del resto del tejido, obtenido con la coloración de contraste (hematoxilina) permitió destacar el color dorado del material micótico identificado, sin perjudicar la intensidad de la coloración inmuno-específica.

La coloración de fondo inespecífica fue reducida por la aplicación de una sol. de Peróxido de H. en metanol, y por la aplicación de una sol. de Tripsina en Tris, ambos previo al tratamiento de los cortes con el suero hiperinmune.

La técnica fue también utilizada para colorear cortes histológicos de un caso de campo de aspergilosis pulmonar en pollos de 5 días de edad* en donde las características hifas ramificadas de Aspergillus fueron claramente identificadas. Se utilizaron las mismas diluciones de los reactivos empleadas en las preparaciones de los conejos inoculados experimentalmente.

Cortes histológicos de pulmón de conejo y de ave, sin cambios patológicos aparentes, fueron negativos a la inmunocoloración cuando se procesaron con la misma técnica.

* Proporcionados por el Dr. Roberto Cervantes (1985).

C U A D R O 2

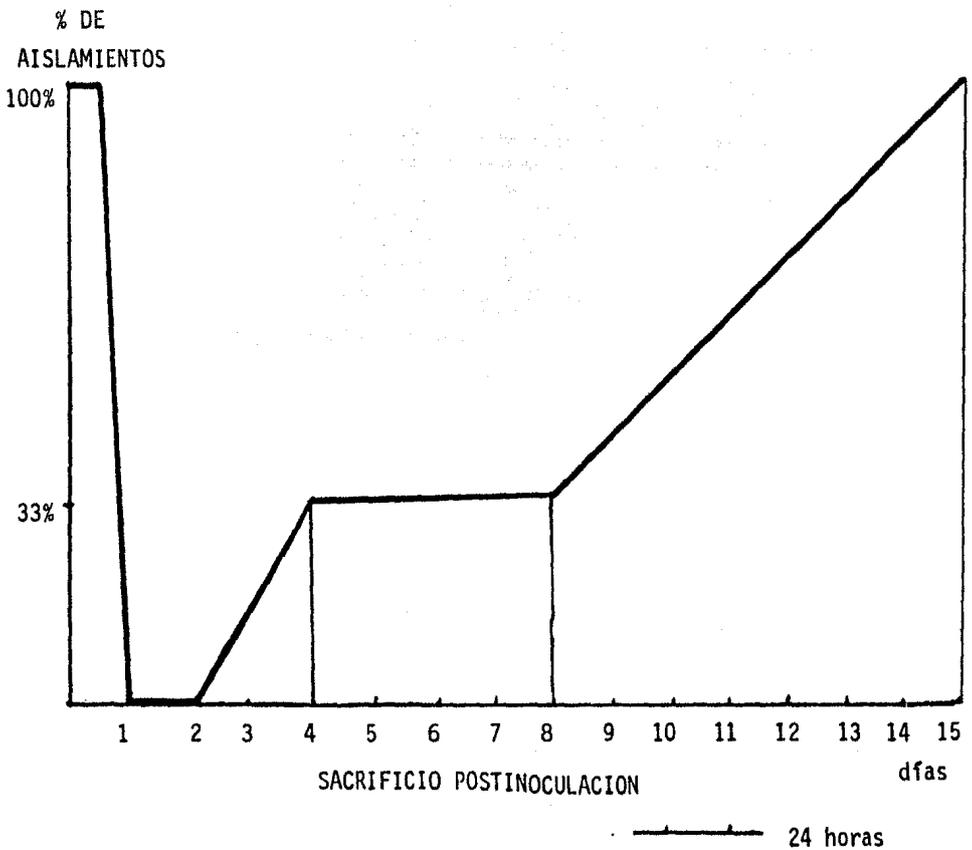
"Recuperación de Aspergillus fumigatus de pulmones de conejos expuestos a un aerosol de esporas de A. fumigatus"

| GRUPO | TIEMPO DE SACRIFICIO POSTINOCULACION | No ANIMALES POR LOTE | No MUESTRAS POSITIVAS | % |
|---------|---|-------------------------|--------------------------|------|
| 1 | 15 minutos | 2 | 2 | 100% |
| 2 | 6 horas | 3 | 3 | 100% |
| 3 | 12 horas | 3 | 3 | 100% |
| 4 | 24 horas | 3 | -* | -- |
| 5 | 48 horas | 3 | -* | -- |
| 6 | 96 horas | 3 | 1 | 33% |
| 7 | 8 días | 3 | 1 | 33% |
| 8 | 15 días | 3 | 3 | 100% |
| CONTROL | | 4 | - | -- |

* Crecimiento bacteriano

FIGURA 3

"Recuperación de Aspergillus fumigatus de pulmones de conejos expuestos a un aerosol de esporas de A. fumigatus, expresado en porcentaje".



C U A D R O 3

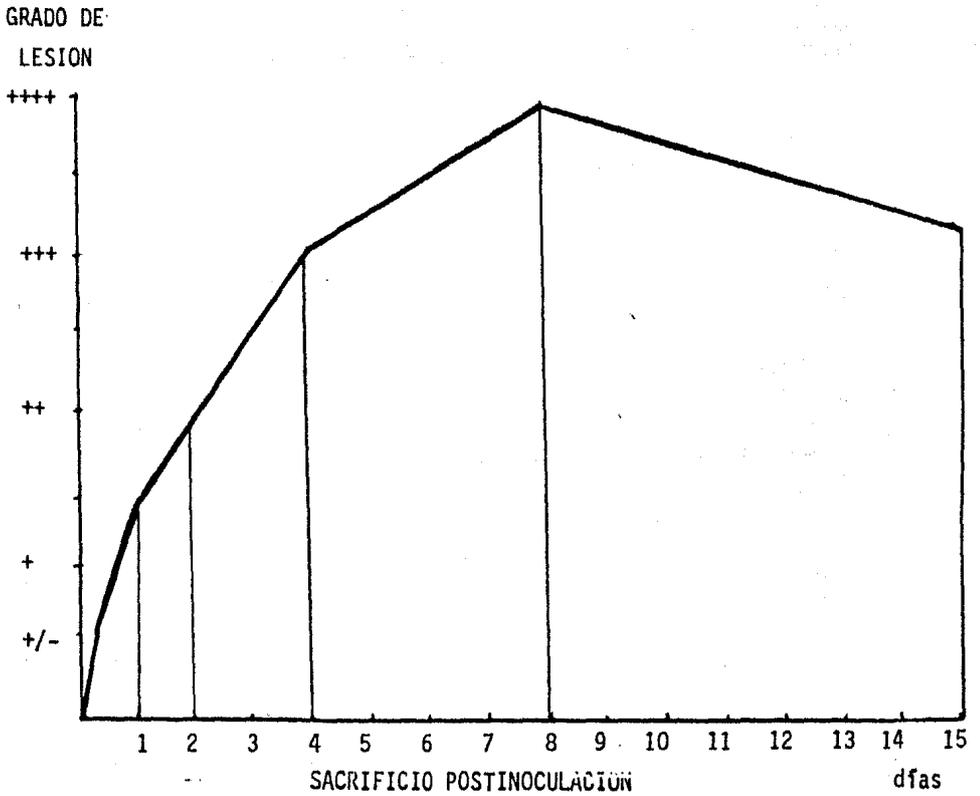
"Características histológicas de lesiones observadas en pulmones de conejos expuestos a un aerosol de esporas de A. fumigatus".

| TIEMPO DE SACRIFICIO POSTINOCULACION | No ANIMALES POR LOTE | GRADO DE LESION* |
|---|-------------------------|------------------|
| 15 minutos | 2 | - |
| 6 horas | 3 | +/- |
| 12 horas | 3 | +/- a + |
| 24 horas | 3 | + a ++ |
| 48 horas | 3 | ++ |
| 96 horas | 3 | +++ a ++++ |
| 8 días | 3 | ++++ |
| 15 días | 3 | +++ |
| CONTROL | 4 | - |

- * Los hallazgos histopatológicos del pulmón fueron evaluados por un sistema arbitrario de graduación de "-" a "++++", donde:
- (-) sin cambios patológicos
 - (+/-) pequeña colección de 4-6 macrófagos espumosos rodeados de linfocitos
 - (+) engrosamiento de las paredes alveolares con severa infiltración mononuclear; infiltración mononuclear peribronquial.
 - (++) discretos granulomas con A. fumigatus en el centro, severa infiltración mononuclear en la pared alveolar
 - (+++) granulomas con áreas centrales de necrosis, hifas poco desarrolladas, pequeños cuerpos asteroides
 - (++++) grandes granulomas con zonas confluentes de necrosis, hifas desarrolladas y cuerpos asteroides grandes

FIGURA 4

"Grado de lesión histopatológica de pulmones de conejos expuestos a un aerosol de esporas de A. fumigatus".



V. D I S C U S I O N

Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que la aspergilosis pulmonar puede ser producida en conejos por exposición única a un aerosol de esporas viables de Aspergillus fumigatus, como ha sido descrito previamente por Thurston y col. (1979) en conejos, y por Sandhu y col. (1981) en ratones.

La demostración de las lesiones y del agente acusal en las mismas fue realizado con la técnica de inmunoperoxidasa, método indirecto; con las técnicas convencionales de histopatología de Hematoxilina Eosina, -ácido periódico de Schiff y Gómori para hongos; así como por el aislamiento de A. fumigatus a partir del tejido pulmonar afectado.

Con la coloración de inmunoperoxidasa se obtuvo el marcado específico del material micótico de A. fumigatus en el tejido pulmonar infectado y procesado con métodos convencionales de histopatología (fijación en formalina e inclusión en parafina), lograndose identificar desde pequeñas esporas y restos de hongos, hasta hifas desarrolladas, sin necesidad de utilizar el criterio morfológico usual para la identificación de hongos en tejidos infectados, que requiere que éstos estén presentes en cantidades relativamente considerables o en su forma plenamente desarrollada. Estos hallazgos son similares a los obtenidos por El Nageeb y Hay (1981), para la identificación de Aspergillus en tejido infectados y procesados con técnicas convencionales para histopatología. El uso de esta inmunocoloración provee una alternativa para la identificación de antígenos de hongos en tejidos infectados, ya que, a diferencia de la técnica de inmunofluorescencia, además de utilizar muestras procesadas

convencionalmente, se requiere sólo de un microscópio de luz visible para la observación de resultados, permite observar con detalle la respuesta microscópica del tejido afectado y proporciona un registro permanente del material en observación (Taylor y col., 1981).

La observación microscópica de las muestras indica que 15 min. después de que los animales son expuestos a un aerosol de esporas de A. fumigatus, se observa la presencia de éstas en la superficie alveolar; -- seis horas después aparecen dentro de macrófagos alveolares, que se tienden a agrupar en alveolos y bronquiolos. Entre 12 y 24 horas postexposición hay infiltración mononuclear peribronquial y pequeños nódulos de macrófagos con esporas y restos de hongos en su interior, que se hacen más aparentes a las 48 horas. A partir de las 96 horas y hasta los 8 días postexposición, las lesiones evolucionan hasta bronconeumonía granulomatosa, con áreas confluentes de necrosis, células gigantes y cuerpos asteroides; hifas desarrolladas se observan en las células gigantes y en los cuerpos asteroides. Finalmente 15 días después de la exposición las lesiones disminuyen en intensidad, pero las hifas desarrolladas persisten en las células gigantes.

En el presente estudio, los cambios microscópicos observados en los pulmones de los conejos infectados son muy similares a los observados - por Kurup y col. (1981), por instilación intratraqueal de una suspensión de esporas, y por Thurston y col. (1979) por exposición a un aerosol de esporas; ambos trabajos fueron realizados utilizando conejos como animales de experimentación.

Los resultados del examen micológico indican que el número de conidias viables se reduce drásticamente en el pulmón entre 24 y 48 horas después de la exposición a un aerosol de esporas, y aparentemente, la viabi-

lidad del hongo tiende a incrementarse después de éste intervalo. Se observó un mayor porcentaje de recuperación de Aspergillus a partir del pulmón después de 96 horas (33% de recuperación), 8 días (33% de recuperación) y 15 días (100% de recuperación), contra 0% de recuperación a las 24 y 48 horas postexposición, posiblemente porque los mecanismos de defensa del pulmón estaban siendo superados en éste momento. Estos resultados difieren de los obtenidos por Thurston y col. (1979), quienes informan que la viabilidad del hongo decrece progresivamente con el tiempo.

VI. CONCLUSIONES

1. La aspergilosis pulmonar puede ser producida en conejos por exposición única a un aerosol de esporas viables de Aspergillus fumigatus.
2. La técnica de inmunoperoxidasa, método indirecto, es sensible para la detección de antígenos de A. fumigatus en tejido pulmonar infectado y procesado con técnicas convencionales de histopatología, y puede ser utilizada para el diagnóstico de ésta enfermedad.
3. La mayoría de las esporas de A. fumigatus inhaladas en un aerosol, que no se pierden en la exhalación, son depositadas a nivel alveolar, removidas por fagocitosis y parcialmente digeridas por los macrófagos alveolares.
4. La viabilidad de las esporas de A. fumigatus en el pulmón, decrece rápidamente entre 24 y 48 horas después de su inhalación, aunque formas viables persisten hasta por 15 días o más, después de la misma.
5. Las lesiones desarrolladas en la aspergilosis pulmonar experimental - consisten en bronconeumonía granulomatosa, con una intensidad máxima a los 8 días postinoculación, y con reducción gradual y daño residual después de éste período.

VII. LITERATURA CITADA

1. Ainsworth, C. and Austwick, P.: Fungal diseases of animals, Farham Royal Common-Wealth Agricultural Bureaur, 1973.
2. Barret, R., Hoffer, R. and Schultz, R.: Treatment and immunological evaluation of three cases of canine aspergillosis, J. Am. Anim. Hos. Ass. - 13: 328-334, 1977.
3. Black, L. and Nightingales, J.: Aspergillus fumigatus infection in the nasal cavity of a dog: its treatment with amphotericin B, Vet. Rec. 92: 447-450, 1973.
4. Burns, J.: Background staining and sensivity of unlabelled antibody-enzyme (PAP) method: Comparison with the peroxidase labelled antibody sandwich method using formalin fixed paraffin embedded material, Histochemistry 43: 291-294, 1975.
5. Caballero, S., Sotres, F., Lara, V., Alarcón, F., Camacho, J. y Ciprian, A.: Elaboración y evaluación de un sistema de infección por aerosoles bacterianos, Memorias de la XX Reunión Nacional AMVEC, Mérida, Yuc., 1985.
6. Campos, M.: Efecto del virus vacunal del Cólera Porcino sobre la actividad bacteriolítica de los macrófagos alveolares del cerdo. Tesis de Licenciatura. FMVZ-UNAM, México, 1977.
7. Chávez, J.: Estudio histopatológico de casos clínicos sugestivos de micosis pulmonar en cerdos. Tesis de Licenciatura. FMVZ-UNAM, México, 1978.

8. El Nageeb, S. and Hay, R.: Immunoperoxidase staining in the recognition of Aspergillus infection, Histopathology 5: 437-444, 1981.
9. Emanuelson, S.: Granulomatous fungal disease in a turgcoat, J. A. V. M. A. 173(9): 1241, 1978.
10. Falini, B. and Taylor, G.: New development in immunoperoxidase technique and their application, Arch. Pathol. Lab. Med. 107(3), 1983.
11. Fox, F., Murphy, J. and Shalev, M.: Systemic fungal infections in cats, J. A. V. M. A. 173(9): 1191-1195, 1978.
12. Garbolino, F., Gevrey, J., Nihououannen, J. et Reynaud, M.: Rhinite necrosante aspergillare, Revue Med. Vet. 129(4): 581-589, 1978. .
13. Ghazilkhani, G.: Aspergillosis: not a mystery, Poultry Digest 8: 396-400, 1982.
14. Gillespie, J. y Timoney, J.: Hagan y Bruner. Enfermedades infecciosas de los animales domésticos, 4° Edición. Ed. La Prensa Médica Mexicana, México, 1983.
15. Ghori, H. and Edgar, A.: Comparative susceptibility and effect of mild Aspergillus fumigatus infection on three strains of chicken, Poultry Sci. - 58: 14-17, 1979.
16. Gordon, R.: Enfermedades de las aves, Ed. El Manual Moderno, México, 1980.
17. Green, G.: Lung defense mechanisms, Med. Clin. North. Am. 57(3): 547-562, 1973.

18. Green, G.: Defense mechanism of the respiratory membrane, Am. Rev. Res. Dis. 11: 479-514, 1977.
19. Hearn, V. and Mackenzie, D.: The preparation and chemical composition of freccion from Aspergillus fumigatus wall and protoplast possessing antigenic activity, Inst. Med. Res. 9: 35-44, 1978.
20. Iglesias, G.: Estudio sobre sustancias bactericidas presentes en secreciones traqueobronquiales de cerdos embrionarios. Tesis de Maestría. FES-Cuautitlán, UNAM, México, 1982.
21. Jubb, K. y Kennedy, F.: Patología de los animales domésticos, Ed. Labor S. A., Tomo I, México, 1982
22. Kurup, V. and Shelt, N.: Experimental aspergillosis in rabbits, Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 4(2): 161-174, 1981.
23. Lane, J. and Warnock, D.: The diagnosis of Aspergillus fumigatus infection on the nasal chambers of the dog with particular reference of the double diffusion test, J. Small. Animal Pract. 18: 169-177, 1977.
24. Lehman, P. and White, L.: Rapid germination of Aspergillus conidia in mouse kidney and kidney extract, Sabouraudia 16: 203-209, 1978.
25. López, A., Gilka, F., Lillie, R., Thomson, R., Maxie, M. and Millan, I.: A mouse model for estimation of Pasteurella haemolytica deposition in calf lung following aerosol exposure, Can. J. Com. Med. 46: 314-316, 1982.
26. Lundborg, M. and Holma, B.: The influence of Aspergillus fumigatus spores and polystyrene particles on the number of macrophages lung in rabbits, Sabouraudia 12:1(5-11), 1974.

27. Mahan, V. Dayal, Y., Patra, C. and Bathia, I.: Experimental aspergillosis in monkeys, Sabouraudia 16: 199-201, 1978.
28. Maqueda, J.: Incidencia de Neumonía Enzoótica en varios Estados productores de cerdos en la República Mexicana, Memorias del Primer Congreso Latinoamericano de Veterinarios Especialistas en cerdos, U. A. M., México, 1977.
29. Petts, V. and Roitt, I.: Peroxidase conjugates for demonstration of tissue antibodies; evaluation of the technique, Clin. Exp. Immun. 9: 407-418, 1971.
30. Pijoan, C., Ochoa, G. y Trigo, F.: Aislamiento e identificación de bacterias de pulmones neumónicos de cerdo. Tec. Pec. Mex. 29: 46-49, 1975.
31. Pijoan, C.: Infecciones mixtas del aparato respiratorio, Ciencia Veterinaria 2: 216-232, 1978.
32. Poli, G., Ponti, W, and Balsari, A.: Aspergillus fumigatus and specific precipitins in dog with turbinate changes, Vet. Rec. 108: 143-145, 1981.
33. Raper, K. and Fennell, D.: The genus Aspergillus. Ed. Robert E. Krisger Publishing Company Huntington, New York, 1970.
34. Rawlinson, A. and Jones, E.: Guttural pouch mycosis in two horses, Aust. Vet. J. 54: 135-138, 1978.
35. Rejo, T., González, A. y Pupo, B.: La aspergilosis pulmonar en patos - producida por Aspergillus flavus y su contaminación a partir de camadas y plantas de incubación, Rev. Avicultura 22: 151-155, 1978.

36. Robbins, S.: Patología estructural y funcional. Ed. Interamericana, - México, 1975.
37. Rudolph, R. von, Weber, A. und Müller, A.: Spontane lungenaspergillose mit "asteroides bodis" bei hauskaninchen, Berl. Münch. Tierärztl. 91: 264-267, 1978.
38. Sandhu, D., Sandhu, R., Damodaran, V. and Randhawa, H.: Effect of cortisone on bronchopulmonary aspergillosis in mice exposed to spores of various Aspergillus species, Sabouraudia 8: 32-38, 1970.
39. Schaffer, P., Medoff, G. and Kobayashi, G.: Demonstration of antigenemia by radioimmunoassay in rabbit experimentally infected with Aspergillus, J. Infect. Dis. 139(3): 313-319, 1979.
40. Taylor, G., Phil, D. and Kledzik, C.: Immunohistologic techniques in surgical pathology. A spectrum of "new" special stains, Human Pathol. 12 (7): 590-596, 1981.
41. Thomson, R.: General Veterinary Pathology, W. B. Saunders Company, Philadelphia, 1978.
42. Thurston, J., Cysewsky, S and Richard, J.: Exposure of rabbits to spores of Aspergillus fumigatus or Penicillium spp., survival of fungi and microscopic changes in the respiratory and gastrointestinal tracts, Am. J. Vet. Res. 40(10): 1143-1149, 1979.
43. Trigo, F., Cervantes, R. y Ontiveros, L.: Aspergilosis pulmonar en un bovino, Veterinaria México 9(4): 183-187, 1978.
44. Vries, G. de, and Cormane, R.: A study on the posible relationships - between certain morphological and fisiological properties of Aspergillus

fumigatus fres, and its presence in, or, human and animal (pulmonary) tissue, Micopathol. Mycol. Appl. 39: 241-253, 1969.

45. White, L.: Germination of Aspergillus fumigatus conidia in the lung of normal and cortisone treated mice, Sabouraudia 15: 37-41, 1977.

46. Wilkinson, G., Sutton, R. and Grono, L.: Aspergillus infection associated with cellulitis and sinusitis in a cat. J. Small Anim. Pract. 23: 127-131, 1982.

47. Wood, G., Hirds, D., Selver, R., Rinaldi, M. and Boorman, A.: Disseminated aspergillosis in a dog, J. A. V. M. A. 172(6): 704-707, 1978.