



101
Rij

Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"CUAUTITLAN"

"DETERMINACION DE ANTICUERPOS CONTRA
Aspergillus fumigatus EN SUEROS DE LA
POBLACION CANINA DEL DISTRITO FEDERAL"

T E S I S

Que para obtener el Título de
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

p r e s e n t a

GENARO ORDUÑA YAÑEZ

Director de la Tesis
Dr. Roberto A. Cervantes Olivares

1986

Cuautitlán Izcalli, Estado de México



V N A M



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

	Pág.
I. INTRODUCCION	1
II. OBJETIVO	4
III. MATERIAL Y METODOS	5
IV. RESULTADOS	12
V. CONCLUSIONES	15
VI. DISCUSION	17
VII. BIBLIOGRAFIA	20

INTRODUCCION

La enfermedad de la Aspergilosis en las especies domésticas, esta difundida ampliamente, siendo el principal agente causal el Aspergillus fumigatus, hongo microscópico encontrado como habitante normal en el medio ambiente, localizado especialmente en vegetales del tipo de los forrajes y henos (1,18).

Este es uno de los hongos que se considera como oportunista, que penetra al organismo generalmente al presentarse en él una baja de defensas o una exposición masiva a las esporas del agente causal. Esta afirmación se basa en trabajos experimentales, donde el diagnóstico de la Aspergilosis fué positivo por pruebas de laboratorio y por observaciones clínicas clásicas que se realizaron (18,19).

La Aspergilosis es una de las micosis que tiene presentación local o diseminada, siendo las manifestaciones clínicas las siguientes:

- Bronco pulmonar alérgica.
- Aspergiloma.
- Invasiva.
- Destrucción de cavidades y cornetes nasales.
- Sinusitis frontal y nasal.

Siendo de importancia señalar los cambios que se presentan en los canideos (1,8,18).

La inspección rutinaria y las manifestaciones clínicas de los casos reportados en la literatura consultada, menciona lo siguiente:

Los canideos estudiados presentaron traumas en la nariz, descargas nasales persistentes del tipo mucohemorrágica, estornudos, disnea por obstrucción nasal anterior y posterior, epistaxis intermitente, sinusitis y destrucción en los cornetes (8,9,14,20).

Debido a que no existe información sobre este tema en nuestro país, se decidió iniciar investigaciones sobre la Aspergilosis, -- realizando estudios serológicos, para conocer la importancia y difusión de la enfermedad, evaluando la cantidad de anticuerpos contra la Aspergilosis Canina.

Las pruebas serológicas que se utilizan para el diagnóstico de la Aspergilosis son: (1,6,7,8,10,16)

- I.- Prueba de la doble difusión (macro y microinmunodifusión).
- II.- Contraimmunoelectroforesis.
- III.- Fijación de complemento.
- IV.- Aglutinación en tibo y con latex.
- V.- Inhibición de la hemoaglutinación.

VI.- Inmunofluorescencia.

De las cuales se utilizarán la prueba de la doble difusión en gel y la prueba de la contrainmunolectroforesis, que se reportan como dos de las pruebas más sensibles para detectar la presencia de anticuerpos contra la Aspergilosis Canina y las que nos podrán dar resultados satisfactorios evaluando la cantidad de anticuerpos que tienen los canideos contra esta enfermedad (6,7,8,9,10).

OBJETIVO

Detectar a través de la realización de dos pruebas inmunológicas como lo son:

La prueba de la doble difusión en gel y la prueba de la contrainmunolectroforesis, la presencia de anticuerpos en contra de Aspergillus fumigatus, en canideos que se encuentran en el Valle y Ciudad de México, para tratar de determinar si este hongo, se encuentra en el medio ambiente, como un factor contaminante para producir la Aspergilosis en los canideos.

MATERIAL Y METODOS

Para la detección de anticuerpos, se utilizaron las siguientes pruebas de laboratorio.

MATERIAL:

1) SUEROS.- Se trabajaron un total de 200 muestras de sangre de canidos del área Metropolitana, basicamente tres zonas especificas - que son: la Delegación Cuáhtemoc, la Delegación Tlalpan y en el Estado de México, el Municipio de Cuautitlán de Romero Rubio.

Para obtener el suero, primero se realizó la venipunción de los canidos en la vena cefálica o en la safena, obteniendose un promedio de 6 mililitros de sangre, dejando reposar la muestra o bien, centrifugando todas las muestras obtenidas en el muestreo entre 2000 a 2500 rpm (revoluciones por minuto), durante 15 minutos.

El suero obtenido se depositó en frascos viales estériles de 5 mililitros. Agregándoles para la conservación del suero 0.2 mililitros de Timerosal Lilly 0.1g (marca comercial Merthiolate blanco de Laboratorios Lilly Elanco) y se congelaron a -70°C , hasta su uso

2) ANTIGENO.- El antígeno es del tipo metabólico, que fué obtenido después de cultivar el Aspergillus fumigatus en un medio líquido de Glucosa Peptona durante 6 semanas.

3) SUERO CONTROL.- Obtenido de un caso en un canideo que presentó

la enfermedad de Aspergilosis.

Para poder obtener resultados que nos resulten confiables, se realizaron dos pruebas inmunológicas.

4) PRUEBA DE LA DOBLE DIFUSION EN GEL Y LA PRUEBA DE LA CONTRAINMUNOELECTROFORESIS.

Las dos pruebas utilizadas requirieron en forma especial del siguiente material:

A.- Prueba de la doble difusión en gel:

- Cajas de Petri de plástico estériles.
- Medio de Agarosa a base de:

Acido Bórico (H_3BO_3)	- - - - -	7.7 g.
Tetraborato Disódico ($Na_2B_4O_7 - 10 H_2O$)	- - -	13.4 g.
Agarosa al 1%	- - - - -	1g/100 ml.
Azida de Sodio 5g/100 ml.	- - - - -	1ml/200 ml.
Agua Destilada a 70°C	- - - - -	500 ml.
- Solución Bufferada de Fosfatos (PBS) a base de:

Cloruro de Sodio (NaCl)	- - - - -	8 g.
Fosfato de Potasio Dibásico (K_2HPO_4)	- - - -	1.21 g.
Fosfato de Potasio Monobásico (KH_2PO_4)	- - - -	0.34 g.
Agua Destilada	- - - - -	1000 ml.
- Sacabocados (marca comercial) del No. 1 y No. 2.

- Placas de vidrio de 10 cm. por 10 cm. y de .2 cm. de grosor.

B.- Prueba de la contrainmunolectroforesis:

- Placas de vidrio de 10 cm. por 30 cm. y de .2 cm. de grosor.
- Medio de Agarosa.
- Solución Bufferada de Fosfatos (PBS).
- Sacabocados del No. 1.
- Aparato de Contrainmunolectroforesis, marca LKB (Bromma) - 2117 Multiphor y LKB (Biochrom) 2103 Power supply.

MÉTODOS:

A.- Para la prueba de la doble difusión en gel, se agregan 10 mililitros del medio de agarosa en las cajas de Petri, una vez gelificado el medio, se realizan con el sacabocados las perforaciones, como se muestran en el esquema No. 1. (hoja No. 11). Depositando en el centro, el antígeno de Aspergillus y alrededor los sueros -- sospechosos.

Se dejan las cajas con las muestras a temperatura ambiente en cámara húmeda, durante 5 días. Al sexto día se lavan las muestras con PBS con un PH de 7.4, dejando las muestras durante 48 horas, - cambiando la solución cada 24 horas.

Posteriormente se lava con agua destilada durante 24 horas y el medio se coloca sobre placas de vidrio y se dejan secar las --

muestras a temperatura ambiente con la finalidad de que el medio se deshidrate sobre las placas.

Una vez que el medio esta deshidratado, se procede a la tinción de las líneas, con la tinción de negro de amido.

B.- En la prueba de la contrainmunolectroforesis, se realiza la misma técnica que en la prueba anterior, pero en una placa se agregan 60 mililitros del medio de agarosa y una vez gelificado el medio, se procede a realizar las perforaciones, como se muestra en el esquema No. 2 (hoja No 11), colocando tanto el antígeno como los sueros sospechosos.

Posteriormente se corre la prueba aplicando al aparato una intensidad de 2 miliampers por centímetro, esperando 45 minutos.

Al término de la prueba se lava la placa con solución bufferada de fosfatos (PBS) en igual forma que en la prueba de la doble difusión.

C.- TINCION DE LINEAS DE PRECIPITACION:

En el desarrollo y explicación de este método, hablaremos tanto del material como de la técnica a desarrollar para las dos pruebas inmunológicas.

MATERIAL:

- Solución de negro de amido a base de:

Gránulos de negro de amido 1 g. en 1000 mililitros de Gel - Wash.

- Solución de Gel Wash:

Metanol - - - - -	500 ml.
Agua Destilada - - - - -	400 ml.
Acido Acético Glacial - - - - -	100 ml.

METODOS:

Se disuelve el negro de amido en un litro de la solución de - Gel Wash, teniendo preparadas las soluciones en recipientes para teñir y lavar las muestras.

La técnica para la tinción de las líneas es la siguiente:

- Colocar las placas con las muestras para teñirlas durante - 40 minutos, con la solución de negro de amido.

- En otro recipiente se decoloran las muestras con la solu- ción de Gel Wash en una relación de 5:4:1, durante 40 minutos.

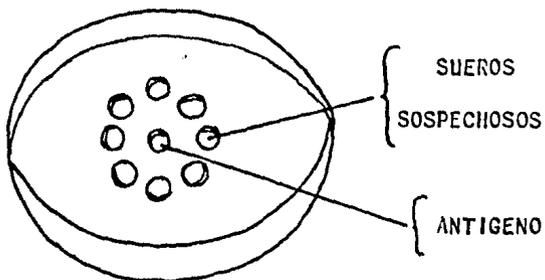
- Se realiza otro lavado en otro recipiente con la misma dura ción que en el anterior.

- Por último se da otro lavado con una solución de Gel Wash - con glicerina durante 15 minutos.

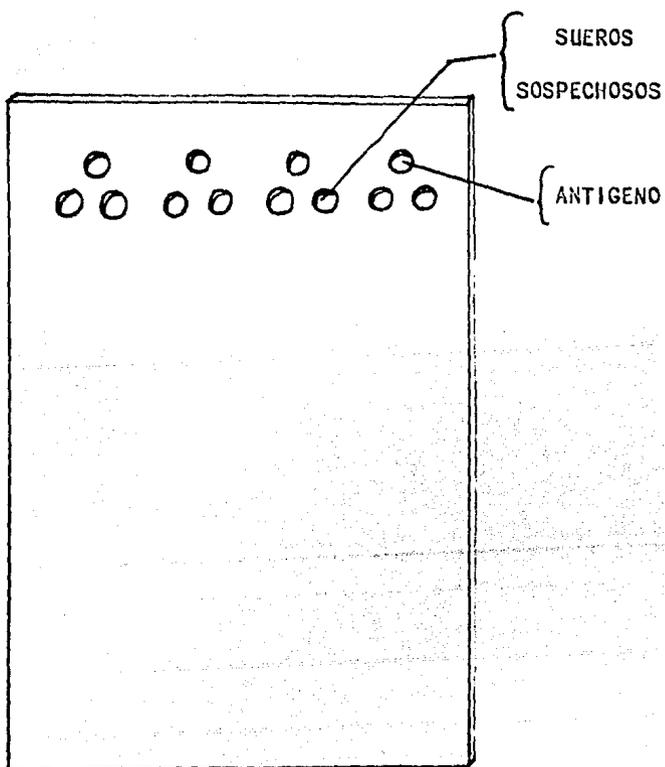
Al término de los lavados y tinciones se dejan las muestras - al medio ambiente para que se sequen y se proceda a la lectura de los resultados, las líneas que resulten positivas a las pruebas -

se teñiran de un color azul oscuro.

ESQUEMA No. 1



ESQUEMA No. 2



RESULTADOS

Las 200 muestras trabajadas, provinieron de canideos de ambos sexos, con edades variables entre los 2 meses y los 11 años de edad. (Ver el cuadro No. 1).

Algunos de los animales muestreados, presentaron una sintomatología respiratoria con tos, estornudos, en un porcentaje del 7.5 por ciento; otros con aparentes secuelas de moquillo, en un 2.5% y el porcentaje mayor lo ocuparon animales que a la examinación externa se encontraron sanos, con un 90%. (Ver el cuadro No. 2).

De los estudios realizados con la prueba de doble difusión en gel y la de contrainmunolectroforesis, los resultados de las muestras, fueron negativos.

CUADRO No. 1
DISTRIBUCION DE LOS CANIDEOS POR EDADES

	EDAD	MACHOS	HEMBRAS	MUESTRAS	PORCENTAJE
C I S E S	2	1	1	2	1
	3	1	3	4	2
	4	0	1	1	0.5
	5	2	2	4	2
	6	1	3	4	2
	7	0	2	2	1
	8	0	2	2	1
	10	1	0	1	0.5
	11	0	2	2	1
A Ñ O S	1	15	12	27	13.5
	2	20	18	38	19
	3	18	12	30	15
	4	3	4	7	3.5
	5	12	9	21	10.5
	6	7	13	20	10
	7	6	4	10	5
	8	6	11	17	8.5
	9	2	2	4	2
	10	0	3	3	1.5
	11	1	0	1	0.5
			TOTAL	200	100

CUADRO No. 2

DISTRIBUCION DE LOS CANIDEOS POR SU SIGNOLOGIA

CARACTERISTICAS	CANTIDAD	PORCENTAJE
ANIMALES SANOS	180	90.0
ANIMALES CON PROBLEMAS RESPIRATORIOS	15	7.5
ANIMALES CON POSIBLES SECUELAS DE MOQUILLO	5	2.5
TOTAL	200	100.0

CONCLUSIONES

Los sueros provenientes de canideos de las tres diferentes zonas del área Metropolitana, dos en el Distrito Federal y una en el Estado de México, no se les detectó la presencia de anticuerpos en contra de Aspergillus fumigatus, con las pruebas empleadas.

Esto sugiere que la incidencia de la Aspergilosis Canina es poco importante y que los estudios para detectarla, debieron ser en grupos de animales que presenten la signología característica (trauma en la nariz, seguida de descargas nasales persistentes mucohemorrágicas, estornudos, disnea, epistaxis intermitente, sinusitis y destrucción en cornetes).

Por otro lado, aunque la prueba de doble difusión es poco sensible, se ha demostrado, que es adecuada para el diagnóstico de casos activos de Aspergilosis. Sin embargo, es importante señalar -- que existen pruebas más sensibles, tales como ELISA, para la detección de anticuerpos circulantes, de tal manera que para un estudio de Ig G, en individuos aparentemente sanos, la prueba de elección sería esta última.

Es por ello necesario y se recomienda continuar con las investigaciones sobre esta enfermedad, pues es el primer antecedente de un trabajo experimental realizado en México, para detectar la pre-

sencia de anticuerpos contra el Aspergillus fumigatus.

DISCUSION

Como se menciona en los resultados, todas las muestras se encontraron negativas, con las pruebas realizadas.

Esto difiere notablemente con lo encontrado por Cervantes (3), en estudios realizados en el área urbana de Glasgow, Escocia. El - reporta un 14.6% de animales positivos con anticuerpos en contra - de Aspergillus fumigatus, en un muestreo de 200 canideos. La razón para esta diferencia, puede ser, por los factores ambientales, pero sobre todo, factores de manejo, ya que se sabe que los canideos en Escocia, son utilizados como perros pastores, lo que propicia, un mayor índice de contacto con el agente causal.

Una menor diferencia en los resultados, se observa en el artículo de Lane y Warnock (8), quienes reportan que en un estudio realizado de 84 canideos, el 11.9% sufrían Aspergilosis nasal, pero estos autores, solo muestrearon animales que mostraban la signología clásica, ya anteriormente señalada.

Es importante señalar, que la mayoría de los casos reportados en la literatura (4,5,8,9,13,14), solo se refieren a casos aislados, que presentaban signos de la enfermedad y en la mayoría de ellos, el análisis serológico fue posterior al hallazgo microbiológico y en algunos de ellos (5), fueron encontrados a la necropsia.

Se sabe que la prueba de doble difusión en gel, es efectiva y segura para el diagnóstico de Aspergilosis (8,13), pero poco efectiva cuando se efectúa un análisis de animales aparentemente sanos.

El hecho de que todas las muestras resultaron negativas, llamó poderosamente la atención, ya que se sabe de la alta contaminación que existe en el Valle y Ciudad de México. Esto pudiera haber afectado la presentación de casos con anticuerpos en contra de A. fumigatus, pues este agente se encuentra en forma abundante en ambientes con heno, pajas y materia orgánica vegetal, en donde estos tipos de ambiente, están muy reducidos en nuestra ciudad, por lo que se considera que esta investigación ha cubierto el vacío de información, detectando en forma negativa la presencia de anticuerpos contra Aspergillus fumigatus en las áreas muestreadas. Así mismo, consideramos que esta investigación, debería de ser continuada, pero muestreando animales con la signología característica de los animales con la Aspergilosis Canina. Ya que aunque en este trabajo se encontraron animales con problemas respiratorios, pero no con la presentación de los signos clásicos de la enfermedad, ello no significa que el agente causal de la Aspergilosis, no se encuentre en el medio ambiente, pues es el primer trabajo en donde se aplica la serología, en la detección de anticuerpos en contra de la enfer

medad de la Aspergilosis Canina en México.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Ainsworth G. C. Austwick P. K. C. (1973) Micosis de los animales Edit. Academia 2a. Ed. 56-76.
- 2.- Barret R. E. Hoffer R. E. and Schultz R. D. (1977) Treatment and immunological evaluation of three cases of canine aspergilliosis. J. Amer. Anim. Hosp. Ass. 13, 328-334.
- 3.- Cervantes Olivares R. A. (1983) Studies of antigens from Aspergillus fumigatus, their use in Veterinary Micology. Ph. D. Thesis, Glasgow, Escocia.
- 4.- Dawson Christine O. Baker G. J. and Mackey Lindsay J. (1973). Aspergillosis of the nasal passage in a dog with tonsillar -- carcinoma. Vet. Rec, 93 (8), 222-224.
- 5.- Foster J. S. and Stoddart Patricia (1976) Treatment of fungal sinusitis with autogenous vaccine. A case report. Vet. Med. - Sm. Anim. Clin. 71, 920
- 6.- Huppert M. (1972) Manual de procedimientos estandarizados para el serodiagnóstico de las micosis sistémicas. Washington, D. C., Organización Panamericana de la Salud. Parte I. 10-16.
- 7.- Kauffman H. F. and de Vries K. (1980) Antibodies against Aspergillus fumigatus. Int. Archs Allergy appl. Immun. 62: 252-264.

- 8.- Lane J. G. Clayton-Jones D. G. Thoday K. L. and Thomsett L. R. (1974) The diagnosis and successful treatment of Aspergillus fumigatus infection of the frontal sinuses and nasal chambers of the dog. J. small Anim. Pract. 15, 79-87.
- 9.- Lane J. G. and Warnock D. W. (1977) The diagnosis of Aspergillus fumigatus infection of the nasal chambers of the dog -- with particular reference to the value of the double diffusion test. J. small Anim. Pract. 18, 169-177.
- 10.- Llopis F. Sánchez-Cuenca J. M. González-Molina A. and Basomba A. (1982) Detection of Aspergillus antigen and anti Aspergillus precipitating antibodies by a new method the radial immunoelectro-osmophoresis (RIEOP). Clinical Allergy. 12, -- 417-424.
- 11.- Mishra S. K. Staib F. Rajendran C. and Folkens U. (1982) Serodiagnostic value of culture filtrate antigens from Aspergilli with septate phialides. Sabouraudia. 20, 63-74.
- 12.- Penn R. L. Lambert R. S. and George R. B. (1983) Invasive -- Fungal Infections. The Use of Serologic Tests in Diagnosis -- and Management. Arch Intern Med. 143, 1215-1220.
- 13.- Poli G. Ponti W. Balsari A. Addis F. and Montellaro C. M. -- (1981). Aspergillus fumigatus and specific precipitins in --

- dogs with turbinate changes. Vet. Rec. 109, (17), 143-145.
- 14.- Richardson M. D. Warnock D. W. Bovey S. E. Lane J. G. (1982) Rapid serological diagnosis of Aspergillus fumigatus infection of the frontal sinuses and nasal chambers of the dog. -- Resch. Vet. Sc. 33, 167-169.
- 15.- Seeliger H. P. R. (1982) Significance of Immunological Methods for Diagnosis of Fungal Disease. Chemotherapy 28, 54-63.
- 16.- Sepúlveda R. Longbotton Joan L. and Pypys J. (1979) Enzyme -- linked immunosorbent assay (ELISA) for IgG and IgE antibodies to protein and polysaccharide antigens of Aspergillus fumigatus. Clinical Allergy. 9, 359-371.
- 17.- Sheth Neela K. Kurup Viswanath P. and Barron Barbara A. (1980) The role of Aspergillus fumigatus antigens in blood coagulation and platelet function. Microbios. 28, 91-96.
- 18.- Vázquez Oliveros Adriana y Tenorio Gutiérrez Víctor R. (1979) Producción de un Antígeno de Aspergillus para la Prueba de Inmunodifusión en gel. Tesis. ENEP-C. 1-17.
- 19.- Warnock D.W. and Hann Elizabeth M. (1981) Further evaluation of indirect immunofluorescence methods for detection of antibodies against Aspergillus fumigatus. Sabouraudia. 19, 49-54.
- 20.- Wood Gary L. et al. (1975) Disseminated Aspergillosis in a --

a dog. J. Am. Vet. Med. Ass. 172, No. 6, 704-707.