

01672

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

11  
2ej.

EVALUACION DE UN MODELO ANIMAL (*Gallus  
gallus*) PARA LA DETERMINACION DE  
GLIOTOXINA PRODUCIDA POR *Aspergillus  
fumigatus*

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS  
M I C R O B I O L O G I A  
P R E S E N T A :

QFB. ESP. MARIA DEL ROCIO VILLA GONZALEZ

DIRECTOR: Ph. D. ROBERTO A. CERVANTES OLIVARES.

COASESORES: MPA. GRACIELA TAPIA PEREZ.

M. EN C. ALEJANDRO BANDA CASTRO.

MEXICO, D. F.

1998.

267079



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## DEDICATORIAS

*A mis padres*

*Joaquín Villa Palacios  
Guadalupe González Gómez.  
Con mucho cariño y gracias por todo*

*A mis hermanos*

*José  
Marcelino  
Carolina  
Carlos  
Por el ejemplo de constancia y dedicación en su trabajo*

*A mis sobrinos  
Con el deseo de que triunfen en la vida.*

*A todos mis amigos*

## AGRADECIMIENTOS.

A la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM por contribuir en mi formación profesional.

A la B. Universidad Autónoma de Puebla por haberme brindado la oportunidad y el apoyo para realizar mis estudios de Maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Por su apoyo en el financiamiento de mis estudios.

Al Departamento de Microbiología

Al Departamento de Producción: Aves

A mis asesores. Dr. Roberto A. Cervantes Olivares, Dr. Alejandro Banda Castro, Dra. Graciela Tapia Pérez por su apoyo y ayuda constantes.

A los miembros del jurado Dr. Leopoldo Paasch Martínez, Dr. Juan Carlos Valladares de la Cruz, Francisco J. Trigo Tavera, Dr. Roberto A. Cervantes Olivares, Dr. Tamas L. Fehervari Bone por sus aportaciones para el enriquecimiento de este trabajo

Al Dr. René Fernández Román por su asesoría en la inoculación de las aves

A los laboratoristas Guadalupe Juárez Jiménez y Francisco Emilio López López por su eficiente trabajo en el procesado histológico de los órganos.

Al Dr. Roberto A. Cervantes Olivares por su tiempo, paciencia y confianza depositados.

Al Dr. Alejandro Banda Castro, por su amistad y apoyo en todo momento.

Al Dr. Alfredo Sahagún Ruiz y Dr. Jesús Hernández López por su amistad y apoyo para la realización de los geles de Poliácridamida

A mis compañeros y amigos de generación especialmente a MVZ. Ana Laura Miranda Morales, MVZ. Juan Carlos del Río García, MVZ. Hugo Barrios García por su apoyo

A QFB. Elvia Lazo G. y QFB. Carolina Segundo Z. por su ayuda desinteresada.

A todos mis amigos del departamento de Microbiología, por su apoyo y por hacer agradable mi lugar de trabajo

## RESUMEN

**Ma. del Rocío Villa González: Evaluación de un modelo animal (*Gallus gallus*) para la determinación de gliotoxina producida por *Aspergillus fumigatus*. (Bajo la supervisión de PhD Roberto A. Cervantes Olivares, MPA Graciela Tapia Pérez y MCV Alejandro Banda Castro).**

Se determinó la relación entre la producción de gliotoxina y la virulencia de las cepas mediante la evaluación de lesiones histopatológicas, para lo cual se emplearon 150 aves de la línea Arbor Acres, que fueron divididas en 3 grupos que fueron inoculados con cepas de *Aspergillus fumigatus*. El grupo A fue inoculado al primer día de edad, el grupo B al día siete y el grupo C al día 14. A su vez cada uno grupo se dividió en 3 subgrupos; el primero de los cuales consistió de 20 aves que fueron inoculadas con *A. fumigatus* alta productora de gliotoxina (Afag), 20 aves con *A. fumigatus* baja productora de gliotoxina (Afbg) y 10 aves como grupo testigo. La vía de inoculación fue directamente al saco aéreo abdominal utilizando una jeringa de 1 ml y aguja calibre 29 de 13 mm (0.5 pulgadas) con una cantidad de  $5 \times 10^6$  conidias en 0.2 ml de inóculo para ambas cepas, las aves del grupo testigo fueron inoculadas con 0.2 ml de solución salina fisiológica. Se realizaron muestreos a los cinco y diez días postinoculación en todos los grupos. Después de 48 horas de haber sido inoculadas las aves que recibieron Afbg mostraron ligera disnea, depresión, taquipnea y algunos plumas erizadas. Se observaron lesiones macroscópicas en el 35% de las aves. Las lesiones encontradas fueron neumonía y aerosaculitis granulomatosas. A la evaluación histopatológica el 51.66% de las aves inoculadas con Afbg presentaron algún grado de lesión pulmonar en comparación con el 25% de las aves con Afag ( $P < 0.05$ ), la severidad de la lesión fue mayor con Afbg siendo la diferencia estadísticamente significativa con las aves que recibieron Afag y con relación a la edad de inoculación las aves inoculadas al día de edad, mostraron calificaciones mayores de lesión en comparación con las aves inoculadas a los 7 y 14 días ( $P < 0.05$ ). No se observó diferencia en el porcentaje de aves con aislamiento a partir de pulmón con ambas cepas sin embargo, fue más alto en porcentaje de aislamiento en las aves inoculadas al día de edad (67.5%) en comparación con los días siete y catorce (47.5 y 42.5% respectivamente). Por otra parte, el aislamiento fue mayor en las aves muestreadas a los cinco días postinoculación, ya que a los cinco días un 63.33% de las aves fueron positivas mientras que un 41.66% a los diez días ( $P < 0.05$ ). La cepa de *A. fumigatus* baja productora de gliotoxina causó una mortalidad del 10% en aves desafiadas el día uno de edad 2.5% y 5% en aves desafiadas en las edades 7 y 14 días respectivamente. La severidad de la lesión influyó en el porcentaje de aislamiento ya que se obtuvieron mayores resultados positivos en aves con las lesiones más severas observándose diferencias estadísticas significativas. Mediante electroforesis en geles de poliacrilamida se encontró que el perfil de extractos metabólicos 10 diferentes cepas de *A. fumigatus* estuvo constituido por proteínas de 46, 42, 40, 38, 35, 28 y 24 kDa. En el estudio de extractos miceliales fue de 91, 76, 69, 63, 57, 50 y 35 kDa. De acuerdo a las observaciones clínicas y patológicas se observó que Afbg mostró mayor patogenicidad en comparación con Afag esto en contraposición de lo informado por Richard *et al* en estudios publicados con anterioridad.

Palabras clave: Aspergilosis, Gliotoxina, Modelo animal aviar, *Aspergillus fumigatus*, patogénesis.

## SUMMARY

**Ma. del Rocío Villa González: Evaluation of an animal model (*Gallus gallus*) for the determination of gliotoxin produced by *Aspergillus fumigatus*. Supervised by Roberto Cervantes Olivares PhD, Graciela Tapia Pérez MPA and Alejandro Banda Castro MCV.**

The relation between gliotoxin production and virulence of 2 strains of *A. fumigatus* was studied. A total of 150 commercial broilers Arbor Acres were divided into three groups. Group A was inoculated on the first day of life, group B on the seventh day and group C on the fourteenth day. Each group was further divided into three subgroups: 20 birds received the high-producing gliotoxin *A. fumigatus* strain (Afag), Another 20 birds received the low-producing gliotoxin *A. fumigatus* strain (Afbg) and the remaining 10 were left as control group. The birds were inoculated with  $5 \times 10^6$  conidia of *A. fumigatus* per 0.2 ml of inoculum by direct abdominal air sac inoculation, whereas the control birds were given 0.2 ml of saline physiologic solution. Samples were taken five and ten days after the inoculation. After 48 hours postinoculation the birds that received Afbg showed slight disnea and depression. This was the only group that showed any clinical sign. In this group macroscopic lesions appeared in the 35% of the birds and included pneumonia and granulomatous airsacculitis. By histopathological studies was determined that 51.66% of inoculated birds showed any grade of pulmonary lesion in comparison with 25% of the birds that received Afag ( $P < 0.05$ ), the lesion severity was higher with Afbg with significant statistical difference. Regarding the age of inoculation, the birds that were inoculated on the first day showed a higher grade of lesion when compared with birds inoculated on the seventh and the fourteen days ( $P < 0.05$ ). No difference on the recovery of the agent from lung tissue was observed, nevertheless, the percentage was higher from birds inoculated on the first day (67.5%) when compared with the birds inoculated on the seventh and on the fourteenth day (47.5 and 42.5% respectively). The percentage of isolation was higher at fifth day samples with 63.33% whereas 41.66% at tenth day ( $P < 0.05$ ). The birds challenged with Afbg showed signs such as depression disnea, taquipnea and bristly feathers, this strain produced 10% of mortality at one day postinoculation, 2.5% with inoculation at seventh day and 5% when the inoculation was made at 14th day. The lesion severity influenced on the isolation percentage from lung tissues; higher percentages of isolation occurred with birds with large lesion severity, significant statistical difference was observed. In order to better understand the electrophoretic pattern of *A. fumigatus* a series of polyacrylamide gel electrophoresis studies were performed, it was determined that the metabolic extract profiles of 10 strains of *A. fumigatus* is constituted by 46, 42, 40, 38, 35, 28 and 24 kDa proteins. The profile of micelial extracts were constituted by 91, 76, 69, 63, 57, 50 and 35 kDa. According with the clinical and pathological findings, Afbg showed higher pathogenicity in comparison with Afag, this differs from the studies by Richards *et al.*, formerly reported.

**Key Words.** Aspergillosis, Gliotoxin, Avian animal model, *A. fumigatus*, pathogenicity.

---

## ÍNDICE

---

INTRODUCCIÓN	Páginas
Importancia económica.	1
Características Generales del Hongo	2
Factores predisponentes para la aparición de aspergilosis	4
Características clínico patológicas de la enfermedad	5
Patogenia	6
Signología clínica	7
Lesiones macroscópicas	8
Histopatología	9
Diagnóstico	9
Medidas de Prevención y Control	10
Tratamiento	11
OBJETIVOS	12
MATERIAL Y MÉTODOS	13
RESULTADOS	21
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	28
LITERATURA CITADA	37
FIGURAS	44
CUADROS	50

## Lista de Figuras

<b>Figura</b>	<b>Páginas</b>
<i>Figura 1.</i> Extractos metabólicos de <i>A. fumigatus</i> , teñidas con tinción de nitrato de plata	44
<i>Figura 2.</i> Extractos metabólicos de <i>A. fumigatus</i> , teñidas con tinción de nitrato de plata	44
<i>Figura 3.</i> Extractos miceliales de <i>A. fumigatus</i> , teñidas con tinción de nitrato de plata	45
<i>Figura 4.</i> Extractos miceliales de <i>A. fumigatus</i> , teñidas con tinción de nitrato de plata	45
<i>Figura 5.</i> Pulmones de pollo desafiados a los 7 días de edad con <i>A. fumigatus</i> baja productora de gliotoxina	46
<i>Figura 6.</i> Pared costal izquierda engrosada, de pollo desafiado a los 7 días de edad con <i>A. fumigatus</i> alta productora de gliotoxina	46
<i>Figura 7.</i> Vista de la pared costal izquierda de pollo desafiado a los 7 días de edad con <i>A. fumigatus</i> alta productora de gliotoxina	47
<i>Figura 8.</i> Placas de <i>A. fumigatus</i> en tejido subcutáneo	47
<i>Figura 9.</i> Histopatología de lesión pulmonar con lesión tipo 1 (HE)	48
<i>Figura 10.</i> Histopatología de lesión granulomatosa tipo 2 (HE)	48
<i>Figura 11.</i> Histopatología de lesión granulomatosa tipo 3 (HE)	49
<i>Figura 12.</i> Histopatología de lesión granulomatosa tipo 4 (HE)	49
<i>Figura 13.</i> Número de animales lesionados con Afag y Afbg	60
<i>Figura 14.</i> Promedio de lesiones histopatológicas en aves inoculadas con <i>A. fumigatus</i> a los días 1, 7 y 14 de edad.	60
<i>Figura 15.</i> Frecuencia de aislamiento de <i>A. fumigatus</i> con respecto al grado de lesión	61
<i>Figura 16.</i> Aislamiento de <i>A. fumigatus</i> a los 5 y 10 días postinoculación	61
<i>Figura 17.</i> Aislamiento de <i>A. fumigatus</i> en aves de 1, 7, 14 días de edad	62



**Lista de Cuadros**

<b>Cuadros</b>	<b>Páginas</b>
<i>Cuadro 1.</i> Diseño del experimento	50
<i>Cuadro 2.</i> Diseño Postdesafío	51
<i>Cuadro 3.</i> Frecuencia de lesiones producidas por <i>A. fumigatus</i> alta o baja productoras de gliotoxina	52
<i>Cuadro 4.</i> Calificación promedio de lesiones a las 3 diferentes edades de inoculación con uno u otra cepa de <i>A. fumigatus</i>	53
<i>Cuadro 5.</i> Frecuencia de aislamiento de <i>Aspergillus fumigatus</i> , al día 1, 7 y 14 de edad	54
<i>Cuadro 6.</i> Frecuencia de aislamiento de <i>A. fumigatus</i> en los muestreos, a 5 y 10 días postinoculación	55
<i>Cuadro 7.</i> Frecuencia de aislamiento de <i>A. fumigatus</i> alta y baja productora de gliotoxina	56
<i>Cuadro 8.</i> Frecuencia de aislamiento de <i>A. fumigatus</i> con respecto a la severidad de la lesión	57
<i>Cuadro 9.</i> Ganancia diaria de peso con respecto a la cepa de <i>A. fumigatus</i> en las 3 diferentes edades	58
<i>Cuadro 10.</i> Ganancia diaria de peso a las 3 diferentes edades de acuerdo al grado de lesión	59

## **INTRODUCCION.**

Los hongos del género *Aspergillus* ocupan uno de los primeros lugares dentro de los hongos contaminantes del medio ambiente ya que son ubicuos, se aíslan con frecuencia del aire, suelo, plantas y en especial alimentos que contienen carbohidratos. De las numerosas especies que se conocen, *A. fumigatus* produce la mayor parte de infecciones en aves tanto domésticas como silvestres así como también en mamíferos. Además de *A. fumigatus* existen otras especies como *A. flavus*, *A. niger*, *A. nidulans*, que pueden actuar también como patógenos ocasionales (Bonifaz, 1991).

La importancia de *A. fumigatus* en la avicultura comercial, radica en que es el principal agente causal de la **aspergilosis aviar**, también conocida como neumonía de las criadoras, neumomycosis o neumonía silenciosa, que es una enfermedad con presentación aguda o crónica, afecta por lo general al tracto respiratorio, a otros órganos abdominales y frecuentemente sacos aéreos y peritoneo. El tipo de lesión que produce en dichos sitios es un proceso inflamatorio granulomatoso, que macroscópicamente se caracteriza por la formación de nódulos o placas amarillas o verde-grisáceas.

### **Importancia económica**

La aspergilosis aviar puede causar alta morbilidad y mortalidad especialmente en aves jóvenes (Jungerman, 1977; Patgiri, 1987) y puede estar asociada con pérdidas considerables; se estima que el 10 % de todas las muertes en pollos menores de 14 días son causadas por esta enfermedad (Ainsworth, 1973; Jungerman, 1977; Singh, 1993). En algunos brotes, el porcentaje de morbilidad ha alcanzado hasta un 50 %, las aves sobrevivientes por lo general presentan retraso en el desarrollo, emaciación progresiva lo que obliga al productor a desechar a las aves (Chute y Richard, 1995), por esto la presentación de aspergilosis en las explotaciones avícolas puede ocasionar grandes pérdidas económicas anuales a través de malos resultados de campo, costos adicionales en productos, mano de obra y finalmente incrementa la presentación de huevos infértiles y pollitos de mala calidad (Aloisi, 1996).

Los hongos del género *Aspergillus* también tienen importancia en los animales de compañía; especialmente aves exóticas. En los bovinos los daños comunes son aborto y placentitis, el aborto puede alcanzar arriba del 20 % (Smith, 1987; Sarfati, 1996).

### **Características Generales del Hongo**

En condiciones de laboratorio *Aspergillus fumigatus* es un microorganismo aerobio, crece bien en medios de cultivo de uso común en micología como el medio Sabouraud dextrosa agar (SDA), el medio Czapeck-Dox, agar dextrosa papa (ADP), su crecimiento se ve inhibido por la cicloheximida (actidione), crece a una temperatura óptima de 25 a 37 °C y es termotolerable, proliferando también a 45 °C. Las colonias son planas y blancas al principio y posteriormente se tornan verde azulado al comenzar a madurar las conidias, en especial cerca del centro de la colonia (Raper and Fennell, 1965). Microscópicamente, el conidióforo es corto, liso y puede alcanzar hasta 300µm de longitud y de 5 a 8 µm de diámetro. Puede ser de coloración ligeramente verde o parda, sobre todo en la parte superior, cerca de la vesícula. El conidióforo se alarga poco a poco, pasando de manera imperceptible a formar la vesícula expandida en forma de botella, la vesícula mide de 20 a 30µm de diámetro, y se produce solamente en la mitad superior una serie sencilla de fiálides de 6 a 8µm de largo; las fiálides se dirigen hacia arriba, paralelas al eje del conidióforo. Las conidias son verdes, globosas o subglobosas de 2 a 3µm de diámetro (Raper and Fennell, 1965).

Se conoce desde hace años que *A. fumigatus* produce *in vitro* una gran variedad de sustancias tóxicas las cuales han sido estudiadas por su actividad antimicrobiana, enzimática y tóxica, entre estas se encuentra la elastasa (Rippon, 1990). La producción de elastasa por *A. fumigatus* esta involucrada con la capacidad de causar aspergilosis pulmonar en ratones. Cepas productoras de elastasa mataron a los animales entre 48 a 96 horas y fue evidente la enfermedad pulmonar invasiva (Vartivarian, 1992). Henrici en 1939 describió por primera vez dos endotoxinas de *A. fumigatus*, una que es hemolítica y la otra que es un pirógeno potente. Las glicoproteínas de la pared celular de *A. fumigatus* tienen

una actividad como endotoxina (Vartivarian, 1992), las exotoxinas parecen no participar significativamente en la patogénesis; sin embargo varias enzimas (proteasas, fosfolipasas) pueden presentar propiedades de virulencia (Vartivarian, 1992).

Entre las sustancias sintetizadas por *A. fumigatus* se encuentran: triptoquivalinas, espinulosinas, fumitremorginas A, B y C, toxina TR-2, fumiclavinas A, B y C, verruculógeno, ácido kójico, ácido hevólico, fumigatina, fumigalina y gliotoxina (Mullbacher, 1984; Mullbacher, 1985; Richard, 1984; Bauer, 1989; Sutton, 1994). Químicamente la gliotoxina es un metabolito secundario tiene como estructura química un anillo epipolítidioxipiperazina, con un peso molecular de 326.3 g/mol, su fórmula molecular esta definida  $C_{13}H_{14}N_2O_4S_2$  (Bose and Das, 1968).

Se hipotetiza que tiene efecto en la patogénesis de la infección producida por *A. fumigatus* en las aves, afectando profundamente los mecanismos de defensa (Richard, 1984; Richard, 1995; Richard, 1996). La gliotoxina disminuye significativamente la frecuencia de movimientos ciliares en asociación con el daño epitelial a concentraciones mayores de 0.2µg/ml, otras toxinas como fumigalina y ácido hevólico, son cilioinhibidores a mayores concentraciones (Amitani, 1995).

Se sospecha que una toxina producida por *A. fumigatus* es la responsable de causar lesiones necróticas difusas en pulmones de pavos. Richard *et al.*, en (1995 y 1996) determinaron la presencia de gliotoxina en pulmones de pavos infectados de manera natural y artificial; así como la presencia de ésta en el tejido de ubre de bovino afectada de manera natural por *A. fumigatus* (Bauer, 1989). La gliotoxina, es una micotoxina producida por una amplia variedad de hongos como, *A. terreus*, *A. chevalieri*, *Candida albicans*, *Penicillium cinerascens*, *P. terlikowskii*, *P. obscurum* entre otros, no se conoce en *A. flavus*; fue originalmente identificada por sus propiedades antivirales, amebicidas, antifungales y antimicrobianas, tiene actividad *in vitro*, específicamente contra bacterias Gram positivas, sin embargo la toxicidad del componente evita su uso como antibiótico. Es un potente agente inmunosupresor con acción sobre macrófagos y células presentadoras de antígenos, inhibe la fagocitosis por macrófagos a concentraciones de 20-50 ng/ml (Mullbacher, 1984;

Frame, 1988). Inhibe la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos, inhibe la adherencia al plástico por macrófagos murinos, la estimulación de mitógenos para linfocitos, produce citotoxicidad en linfocitos aviares y previene la replicación de algunos virus por inhibición de la actividad de la transcriptasa reversa, inhibe la transformación de linfocitos de sangre periférica en pavos (Richard, 1984; Eichner, 1986; Richard, 1988; Sutton, 1994). En estudios anteriores se demostró que de las sustancias producidas por *A. fumigatus*, como son el ácido hevílico, fumigalina y gliotoxina, únicamente esta última tiene actividad antifagocítica (Mullbacher, 1984). Por lo que estudios adicionales para establecer el papel en la patogenicidad de dicha sustancia son necesarios.

### **Factores predisponentes para la aparición de aspergilosis**

Los hongos del género *Aspergillus* se encuentran ampliamente distribuidos en el globo terrestre y viven en cualquier sitio que presenta materia orgánica, agua y temperatura apropiada generalmente entre 4 y 60 °C, desde el nivel del mar hasta altitudes de más de 4000 m, en donde se encuentran los últimos vestigios de vegetación, así mismo se desarrollan en lugares más húmedos hasta sitios semidesérticos y aún desérticos en las épocas en que puede haber una ligera humedad en los suelos (Herrera, 1990).

La ubicuidad de los hongos se debe a que en cualquier parte pueden existir condiciones favorables para su desarrollo, el factor más importante es la facilidad con que se distribuyen pequeños fragmentos de sus micelios y sobre todo sus conidias, que se forman en enormes cantidades, por lo general son capaces de tener vida latente un tiempo más o menos largo y de soportar condiciones muy adversas; por su tamaño son transportados fácilmente por las corrientes de aire a lugares muy lejanos y diversos (Herrera, 1990) por lo que la presentación de aspergilosis en aves jóvenes se favorece por el alto contenido de conidias en nidos y camas, así como en los ductos de aire acondicionado durante la incubación.

Durante el manejo y la incubación del huevo fértil, existen numerosos factores que intervienen favorablemente para que *A. fumigatus* esté presente, como son huevos

contaminados, camas y nidos húmedos o sucios, mala calidad del cascarón y fracturas del mismo, así como un inadecuado manejo durante la recolección, desinfección, almacenaje y transporte del huevo fértil. (Quintana, 1991; Aloisi, 1996).

La planta de incubación puede ser un excelente medio para el desarrollo de dicho hongo por deficiente limpieza y desinfección de incubadoras y nacedoras, áreas de trabajo y equipos; uso de desinfectantes con deficiente actividad antifúngica, fallas en la eliminación de huevos no eclosionados y desechos de incubación, como cascarones, plumón y membranas. Durante el proceso de incubación, se requiere de gran cantidad de oxígeno en el ambiente, lo cual es favorecido por sistemas de inyección de aire y sistemas de aire acondicionado, estos implementos son determinantes en el crecimiento de hongos en el medio, ya que los conductos y filtros con deficiente limpieza y desinfección favorecen que los pollitos recién nacidos inhalen las conidias. Así como un mal diseño de la planta que no permita la completa separación de áreas limpias e incubadoras de nacedoras y salas de manejo de pollitos (Hamet, 1991; Quintana, 1991).

### **Características clínico patológicas de la enfermedad**

La infección natural con *Aspergillus fumigatus* en aves se conoce desde hace muchos años y fue una de las primeras enfermedades fúngicas reconocidas en el hombre y en los animales; el período de incubación es muy variable ya que depende de la edad, la cantidad de esporas inhaladas y la susceptibilidad del ave (Mosqueda, 1985).

Se producen principalmente 2 tipos de aspergilosis en las aves domésticas:

- a).- Brotes agudos con morbilidad elevada y alta mortalidad en las aves jóvenes.
- b).- Casos crónicos que afectan a las aves adultas, principalmente a las reproductoras y pavos (Ainsworth, 1973; Jungerman, 1977; Peden, 1992; Chute y Richard, 1995).

La forma aguda es designada comúnmente, por los avicultores como "neumonía de las criadoras" o "neumomicosis". En las aves recién nacidas se pueden observar signos desde el primer o segundo día de edad usualmente la enfermedad puede ser fatal en pocos días en aves jóvenes. Al parecer la fuente común para la transmisión de la infección a través del

huevo, es la contaminación con la cama enmohecida de los nidos y el almacenamiento deficiente del huevo (Mosqueda, 1985). En embriones de pollo y pavo muertos dentro del huevo, *A. fumigatus* aparece como filamentos blancos diseminándose con numerosas esporas de color verde, especialmente en la cámara de aire y la membrana interna del cascarón.

En las aves adultas el período de incubación es más prolongado (de semanas o tal vez de meses), y el momento en que la enfermedad se inicia es difícil o imposible de determinar, la incidencia de la enfermedad crónica no es grande, pero en parvadas comerciales hay pérdidas económicas significativas cuando aves adultas mueren por esta enfermedad. La aspergilosis es más significativa en situaciones de confinamiento, en donde pueden estar implicados factores de estrés o donde hay cama o granos mohosos (Jungerman, 1977).

Estudios comparativos de aspergilosis indican que los pavos son la especie más susceptible y en segundo lugar los pollos (Chute y Richard, 1995). Ghorí en 1979 realizó la comparación entre estirpes de gallináceas, las cuales resultaron ser más susceptibles la línea Single Comb White Leghor - Auburn en comparación con la línea Athens - Canadian y la línea Vantress x Arbor Acres.

### **Patogenia**

Se conoce muy poco respecto a la patogenia de la aspergilosis, es necesario aclarar varias cuestiones.

Los factores predisponentes a la aspergilosis son desconocidos como la susceptibilidad de los huéspedes, el número de conidias necesarias para iniciar una infección, el poder toxigénico de los organismos, el papel de la inmunidad y de la hipersensibilización, entre otras (Jubb, 1985).

Se considera que la ruta más común de la infección es por vía respiratoria mediante la inhalación de las partículas infectivas (conidias), desde el alimento, cama y el medio ambiente contaminados. Debido a su tamaño pequeño de 2-3 $\mu$ m de diámetro la conidia puede alcanzar las partes bajas del pulmón, ahí las conidias son engolfadas por los

macrófagos alveolares y monocitos en los cuales pueden sobrevivir y germinar dando como resultado la hifa donde ellas se adhieren a células epiteliales antes de desarrollar la infección. (Jubb, 1985; Paris, 1997). La adherencia implica que el patógeno reconozca ligandos de proteínas o de carbohidratos sobre la superficie de las células huésped con un constituyente de la membrana basal subyacente al epitelio y endotelio, tales como fibrinógeno, laminina, colágeno o fibronectina para que posteriormente cause daños a los tejidos (Bouchara, 1995).

Las lesiones son caracterizadas por inflamación granulomatosa con necrosis, hemorragias y elementos fungales intralesión y son invasivas localmente.

Las lesiones en las especies aviares son comúnmente confinadas a los pulmones y sacos aéreos también se presenta la infección en mucosa oral, tráquea, cerebro, ojo, piel, hueso, hígado, riñón y pasajes nasales (Chute y Richard, 1995), manifestándose como: aspergilosis pulmonar, aspergilosis sistémica, osteomycosis, oftalmítis, dermatitis granulomatosa necrótica aunque esta última es poco común en las aves (Chute y Richard, 1995).

### **Signología clínica**

En la forma aguda de la enfermedad las aves jóvenes los signos principales son: disnea, jadeo y respiración acelerada, somnolencia, pérdida de apetito, emaciación, pérdida de peso, polidipsia, fiebre, disfagia en casos en que esta comprometida la mucosa esofágica (Chute y Richard, 1995) en las etapas tardías se puede encontrar diarrea fétida. El diagnóstico diferencial debe realizarse con infecciones causadas por *Salmonella pullorum* (Ainsworth, 1973; Jungerman, 1977; Mosqueda, 1985).

En algunos casos el hongo invade el cerebro, lo cual se ha visto en pavos jóvenes, provocando signos nerviosos como: torticolis, opistótonos, incoordinación, pérdida del equilibrio, y ataxia (Mosqueda, 1985; Richard, 1995), algunas veces hay convulsiones, las aves afectadas mueren entre 24-48 horas después del inicio de los signos. Se puede encontrar oftalmítis micótica afectando la parte posterior del ojo la cual puede ser el resultado de una diseminación del microorganismo por vías hematogena o linfática a partir



de una lesión respiratoria primaria, estas infecciones oculares por lo general son unilaterales, se puede presentar ceguera por crecimiento del hongo en las cámaras del ojo y en algunas aves se puede encontrar exudados caseosos o placas debajo de la membrana nictitante en los sacos conjuntivales (Jungerman, 1977; Mosqueda, 1985; Beckman, 1994; Chute y Richard, 1995).

La aspergilosis crónica se manifiesta con pérdida de peso, anemia, heces amarillentas y la presencia de estertores (Jungerman, 1977).

### **Lesiones macroscópicas**

En la aspergilosis los pulmones son los órganos frecuentemente más afectados, pueden presentar áreas de consolidación, difusa o nodular y engrosamiento de las paredes de los sacos aéreos con un crecimiento blanco mohoso en la superficie, el exudado es brillante, caseoso, amarillo verdoso, los nódulos son elevados con exudado inflamatorio en el centro se puede encontrar tejido necrosado, las lesiones pulmonares típicas aparecen con uno o muchos nódulos discretos de 1-10 mm de diámetro, rodeados de un halo rojizo de hiperemia, éstos pueden ser ocultos, especialmente en animales jóvenes, por congestión severa pulmonar. En casos avanzados el microorganismo muchas veces esporula en la superficie de lesiones caseosas y en las paredes de los sacos aéreos engrosados, lo cual es evidente a simple vista. La infección puede generalizarse y ocurrir la diseminación de la infección desde las lesiones pulmonares a órganos en los cuales desarrolla metástasis, incluyendo las meninges y el riñón o quedar limitada a un solo órgano (Jubb, 1985; Trigo, 1992; Singh, 1993). En ocasiones se puede presentar ascitis teñida de rojo (Julian, 1990; Chute y Richard, 1995).

Experimentalmente se han observado lesiones más severas en sacos aéreos y en peritoneo, de aves infectadas por vía intra-saco aéreo y lesiones más marcadas en pulmones, tráquea, corazón, hígado y bolsa de Fabricio de aves infectadas por vía intra traqueal (Singh, 1979). Se puede decir que el desarrollo y la severidad de lesiones varía con la dosis y la ruta de infección.

## **Histopatología**

Las lesiones tempranas en pulmones con aspergilosis son caracterizadas por acumulación focal de linfocitos, con algunos macrófagos y algunas células gigantes, sin embargo las lesiones llegan a ser rápidamente necróticas. Las lesiones nodulares se ven con un núcleo central de necrosis caseosa, en la cual se encuentran organismos rodeados por una amplia zona de tejido granulomatoso epiteliode. Puede haber células gigantes de tipo cuerpo extraño, así como linfocitos y fibroblastos. Más tarde, esas lesiones aparecen como una extensa área necrótica, central conteniendo heterófilos distribuidos de manera irregular, rodeada por pocas células gigantes y una capa delgada de tejido fibroso. Lesiones similares se han observado en cerebro de pavos infectados (Chute y Richard, 1995).

Las hifas podrán detectarse con mayor facilidad en los tejidos si se utilizan colorantes con ácido peryódico de Schiff (PAS) y tinción de Grocott (Jubb, 1985; Smith, 1987; Trigo, 1992), apareciendo en los granulomas como filamentos septados, ramificados en forma dicotómica de 2 a 4  $\mu\text{m}$  de diámetro y en ocasiones los micelios cortos pueden aparecer casi esféricos, pero no se encuentran verdaderas esporas (Smith, 1987), en cortes de tejido de bronquios, bronquiolos y sacos aéreos bien oxigenados se observan a los microorganismos esporulando asexualmente (Ridell, 1987).

## **Diagnóstico**

Los signos y las lesiones no son patognomónicos aunque estas últimas son bastante características, los nódulos en los pulmones de los pollos son muy similares a los que se encuentran en pulorosis (Gordon, 1985; Chute y Richard, 1995). La presencia del hongo puede ser demostrada mediante el examen directo de los nódulos o placas, digeridos en KOH al 20 % identificándose a las hifas dentro del exudado como estructuras ramificadas en forma dicotómica, septadas, de 2 a 4  $\mu\text{m}$  de diámetro. La confirmación de una infección fungal es con las muestras obtenidas asépticamente, las cuales deben sembrarse en agar dextrosa Sabouraud con antibióticos así como también la realización de

microcultivos seriados, para poder observar y diagnosticar con base a sus características específicas (Gordon, 1985; Patgiri, 1987; Chute y Richard, 1995). Así mismo se pueden realizar estudios histopatológicos, utilizando tinciones de ácido peryódico de Schiff y Gomori Grocott para la observación de estructuras de *Aspergillus* así como demostrar el tejido dañado (Patgiri, 1987).

Se pueden utilizar pruebas serológicas para detectar anticuerpos contra *Aspergillus* spp, como inmunofluorescencia indirecta, inmunodifusión en gel de agar, contrainmunolectroforesis, pruebas de ELISA, aunque en recientes estudios epidemiológicos se realizan estudios con técnicas moleculares como pruebas de Western-Blot, por lo que ha hecho necesario conocer los perfiles electroforéticos de *Aspergillus fumigatus*, cabe señalar que estas técnicas únicamente son utilizadas en humanos. Los perfiles electroforéticos de cepas del medio ambiente y de cepas aisladas de humanos muestran bandas de proteínas de 145, 101, 88, 84, 77, 73, 63, 51, 49 y 40 kDa (Piechura, 1987; Loudon, 1994)

### **Medidas de Prevención y Control**

La aspergilosis debe ser prevenida por medio de adecuados programas higienicos-sanitarios diseñados estratégicamente.

Se recomienda evitar alimentos y cama húmeda, limpieza y desinfección diaria de bebederos y comederos o la aspersión del suelo con soluciones químicas. Se recomienda una ventilación eficaz de los almacenes de alimento y casetas para reducir la microflora del medio ambiente (Chute y Richard, 1995).

Para prevenir la infección de los huevos fértiles se recomienda tener cuidado en la higiene de los nidos, condiciones de almacén y la frecuente recolección de los huevos (Gordon, 1985).

Debido al alto riesgo de infección en las plantas de incubación se hacen necesarias medidas sanitarias específicas para prevenir la enfermedad, como la organización y estructura de la

planta. Es recomendable el principio de “tráfico en un solo sentido” (Mosqueda, 1985; Aloisi, 1996).

### **Tratamiento**

En brotes se utiliza, una solución de sulfato de cobre en 1:2000 en el agua de bebida puede ser usada para prevenir la diseminación, aunque no se recomienda para ser utilizada de uso continuo (Hofstad, 1988; Chute y Richard, 1995).

Las aves en cautiverio de mayor valor pueden ser tratadas usando fungicidas en el alimento o por inyección. La inyección consiste de una mezcla de anfotericina B a 1 mg/Kg de peso para tratar una infección primaria y cloramfenicol a 75 mg/Kg para combatir infecciones bacterianas secundarias.

Se pueden administrar 100,000 UI de nistatina una vez al día por vía subcutánea para combatir infecciones fúngicas secundarias, el total del volumen no deberá exceder 3 ml/ Kg de peso (Patgiri, 1987), también se puede utilizar 5- fluorocitosina, tiabendazol o ketoconazol.

**OBJETIVO GENERAL.**

Estudio del comportamiento de cepas de *Aspergillus fumigatus* con respecto a su aislamiento y caracterización, producción de gliotoxina y virulencia en modelo animal y comparación de los perfiles electroforéticos.

**OBJETIVOS PARTICULARES.**

- 1.- Caracterizar las cepas productoras de aspergilosis aviar mediante su identificación macroscópica y microscópica.
- 2.- Comparar los perfiles electroforéticos de diferentes cepas de *A. fumigatus*, con el fin de establecer el patrón de los mismos.
- 3.- Determinar la relación existente entre la cantidad de producción de gliotoxina y la virulencia de la cepa mediante la evaluación de lesiones histopatológicas.

**HIPOTESIS.**

A mayor producción de gliotoxina mayor grado de patogenicidad de la cepa.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Material Biológico.

#### Identificación Macroscópica y Microscópica de Cepas Aisladas de Casos de Aspergilosis en Aves.

Cada una de las cepas fueron sembradas en agar dextrosa Sabouraud (Bioxon) y agar Czapeck-Dox por punto único, las cuales fueron incubadas de 4 a 5 días a temperaturas 30 °C y 45 °C para observar la prueba de termotolerancia, observando características macroscópica y microscópica; auxiliándose con manuales de identificación (Raper and Fenell, 1965).

#### Origen y Procedencias de las cepas de *Aspergillus fumigatus* y *A. niger*.

- 1.- Cepa # 1, *Aspergillus fumigatus* aislada del medio ambiente de incubadoras, procedente de Tehuacan Puebla.
- 2.- Cepa # 2, *A. fumigatus* aislada del medio ambiente de incubadoras, procedente de Tehuacan Puebla.
- 3.- Cepa # 3, *A. fumigatus* aislada de pulmón de pollo de engorda de 5 días de edad con signos clínicos y lesiones de aspergilosis, procedente de Zuazua, Nuevo León.
- 4.- Cepa #4, *A. fumigatus* aislada de tejido pulmonar de pollo, procedente de Tehuacan Puebla.
- 5.- Cepa # 5, *A. fumigatus* aislada de pulmón de gallina reproductora pesada de un día de edad sin signos clínicos, procedente de una incubadora de Benito de Juárez, Nuevo León.
- 6.- Cepa # 6, *A. fumigatus* aislada de pulmón de pollo de engorda de un día de edad sin signos clínicos, procedente de una incubadora de Salinas Victoria, Nuevo León.
- 7.- Cepa # 7, *A. fumigatus* de origen aviar y donada por el laboratorio de la Compañía productora de alimentos pecuarios, de Nuevo León S. A. de C. V.
- 8.- Cepa # 8, *A. fumigatus* aislada de pulmones de pollo procedente de Tehuacan Puebla.

- 9.- Cepa # 9, *A. fumigatus* aislada de medio ambiente procedente de Tehuacan Puebla.
- 10.- Cepa # 10, *A. fumigatus* aislada de pulmones de pollo procedente de Tehuacan Puebla.
- 11.- Cepa # 11 *A. fischeri* aislada de pulmón de pollo de engorda de un día de edad sin signos clínicos, procedente de una incubadora de Salinas Victoria, Nuevo León.
- 12.- Cepa de *A. niger* de la Micoteca del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

### **Producción de Proteínas Metabólicas y Miceliales de las Cepas de *A. fumigatus***

#### **Producción de Proteínas Metabólicas**

Las cepas se sembraron por punto único en medio agar dextrosa Sabouraud (Bioxon) las cuales fueron incubadas a 30 °C por 1 semana, se le agregaron 10 ml de solución salina isotónica estéril con tween 80 al 1% y las conidias fueron removidas suavemente con la punta de una pipeta de vidrio estéril; las conidias de la suspensión fueron contadas usando un hematocitómetro; las cuales se ajustaron con diluciones decimales a una concentración de  $50 \times 10^6$  esporas/ml con solución salina isotónica.

Cada cepa se inoculó a una concentración de  $50 \times 10^6$  conidias, en botellas de Roux conteniendo 100 ml de medio (10 % líquido amniótico de equino, 4 % de glucosa y 1 % de peptona) las cuales fueron incubadas en posición horizontal a 30 °C durante 1 semana y a temperatura ambiente durante 2 semanas.

Después del período de incubación el medio fue decantado y filtrado a través de papel filtro tipo Whatman (Cervantes, 1983) y modificado, agregando 1mM PMSF (metilsulfonil fluoruro) (Gibco BRL), 0.1mM TLCK (Tosil lisinaclorometil cetona) (Gibco BRL) 5 mM Iodoacetamida (Aldrich) (Sambrook *et al.*, 1989; Coligan, 1994) el filtrado fue colocado en una membrana de diálisis (Sigma) con punto de corte de 14000 y dializado con agua corriente por 24 horas a 4 °C, para ser concentrado a 10 X, drenado por osmolaridad con azúcar glass y posteriormente dializada durante 24 horas a 4 °C. Una vez concentrado el

antígeno metabólico fue filtrado a través de filtro Millipore con membrana de  $0.45\mu\text{m}$  y se adicionó timerosal a una concentración de 1:10000 para ser almacenado  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### **Producción de Proteínas Miceliales**

Al micelio obtenido después de las 3 semanas de incubación se le agregaron 100 ml de solución salina de Coca's (cloruro de sodio 5 g, bicarbonato de sodio 2.75 g, fenol 4 g, agua destilada c.b.p. 1000 ml), fue almacenado a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 10 días, en agitación constante. La solución de Coca's, fue decantada y filtrada a través de papel filtro tipo Whatman, (Cervantes, 1983) modificado, agregando 1mM PMSF (metilsulfonil fluoruro) (Gibco BRL) 0.1mM TLCK (Tosil lisina clorometil cetona) (Gibco BRL) 5 mM Iodoacetamida (Aldrich) (Sambrook *et al.*, 1989; Coligan, 1994) el filtrado fue colocado en membranas de diálisis (Sigma) con punto de corte de 14000 y dializado con agua corriente por 24 horas  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  posteriormente fue concentrado 10 X, drenando por osmolaridad con azúcar glass. Una vez concentrado el extracto micelial, fue filtrado a través de filtro Millipore con membrana de  $0.45\mu\text{m}$  al cual se le adiciono timerosal a una concentración de 1:10000 y posteriormente ser almacenado a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

La concentración de proteína de los extractos micelial y metabólico fue determinada por la técnica de Bradford comparada contra un estándar de albúmina sérica bovina (Bradford, 1976).

### **Separación de proteínas metabólicas y miceliales de *A. fumigatus* y *A. niger* en geles dodecil sulfato de sodio de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

Los geles de SDS-PAGE se realizaron como lo describió Laemmli en 1970, con un gel concentrador al 4 % de poliacrilamida y un gel separador al 12 % de poliacrilamida, preparados en una cámara Mini- PROTEAN- II Cell (Bio-Rad). Las muestras de proteínas fueron suspendidas en el buffer de lisis, calentándose a ebullición por 5 minutos, las cuales se ajustaron a  $4\text{ }\mu\text{g}$  por pozo. Las proteínas de los extractos metabólicos y miceliales fueron



separadas por electroforesis a 100 volts por 60-120 minutos hasta que el frente del buffer saliera. En todos los geles se incluyó un marcador de bajo peso molecular estándar sin teñir (Bio- Rad).

Las bandas de proteínas fueron visualizadas utilizando la tinción de nitrato de plata (Morrissey, 1981).

### Determinación de gliotoxina

La producción de gliotoxina *in vitro* fue realizada por la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC), utilizando una gliotoxina estándar la cual presentó un tiempo de retención de 3.03 min. y un área de 79.7794 %, la evaluación de la producción de la gliotoxina fue realizada antes y después de la inoculación en el Laboratorio de Tecnología de Calidad de la FES-Cuautitlan, UNAM<sup>1</sup>.

Cepa	Tiempo de retención en min.	% de Área
1	2.53	8.32
2	3.08*	3.65
3	2.98*	70.67
4	3.58	1.48
5	2.53	26.63
6	ND	
7	2.53	11.17
8	ND	
9	2.58	18.73
10	ND	
11	ND	
12	ND	

ND= No se determinó la cuantificación de gliotoxina en estas cepas

<sup>1</sup> Q. F. B. Carolina Moreno Ramos

\*tiempo de retención similar al de la gliotoxina.

Nota: Las cepa # 2 fue utilizada como *A. fumigatus* alta productora de gliotoxina (Afag) y la cepa # 7 utilizada como *A. fumigatus* baja productora de gliotoxina (Afbg).

### **Procesamiento de las cepas de *A. fumigatus* para la inoculación de las aves**

Las cepas de *A. fumigatus* # 2 y # 7 alta y baja productoras de gliotoxina respectivamente, fueron sembradas por punto único en placas de agar dextrosa Sabouraud (Bioxon) durante 1 semana a 30 °C, las conidias fueron recolectadas con solución salina isotónica con tween 80 al 1 %, éstas fueron sedimentadas por centrifugación y lavadas con solución salina isotónica estéril, se realizaron diluciones decimales para contar las conidias en un hematocitómetro y ser ajustadas a una concentración de  $25 \times 10^6$  conidias/ml e inocular a las aves con 0.2 ml de la suspensión por vía saco aéreo.

### **Aves de experimentación**

Se utilizaron 150 aves de engorda comerciales Arbor Acres, no sexadas de un día de edad, con un peso promedio de 40.7 g, las cuales fueron criadas en baterías con calefacción dentro de unidades de aislamiento del Departamento de Producción animal: Aves, (FMVZ-UNAM), se alimentaron con una dieta comercial (22% proteína cruda (PC) y 2900 Kcal de energía metabolizable) la cual fue monitoreada para certificarla libre de *Aspergillus spp*; el agua y el alimento se proporcionaron a libre acceso

### **Inoculación en Aves Clínicamente Sanas**

#### **Inoculación de aves con cepas de *A. fumigatus* alta y baja productoras de gliotoxina**

Se emplearon 150 aves de la línea Arbor Acres, las cuales fueron divididas en 3 grupos, el grupo A inoculado al día uno, grupo B al día siete y el grupo C al día 14 de edad, cada uno de los grupos fueron subdivididos en 3 subgrupos, de los cuales 20 aves fueron inoculadas con *A. fumigatus* alta productora de gliotoxina y 20 aves con *A. fumigatus* baja productora de gliotoxina, empleándose la vía intra saco aéreo con 0.2 ml de

la suspensión de conidias y 10 aves fueron utilizadas como grupo testigo, inoculadas con 0.2 ml de solución salina fisiológica. El inóculo fue dispensado con una jeringa de 1ml y aguja calibre 29, de 13 mm (0.5 pulg.) de manera directa en el saco aéreo abdominal izquierdo comprendido en el espacio entre la columna vertebral y la última costilla, dirigiendo la aguja en dirección craneo-ventral (Cuadro 1).

### **Diseño postdesafío**

Un 50 % de cada grupo fue sacrificado por émbolo de aire al día 5 postinoculación y el otro 50 % sacrificado al día 10 postinoculación. Posteriormente se realizó la necropsia de todas las aves, de las cuales se recolectaron muestras de pulmón izquierdo para el aislamiento micológico, estudio histopatológico y para la determinación de gliotoxina. Cada una de las aves fueron pesadas antes de la inoculación y del sacrificio (Cuadro 2).

### **Aislamiento micológico**

Inmediatamente después de realizar la necropsia, se tomó aproximadamente un  $\text{cm}^3$  de la porción lesionada del pulmón, en caso de no encontrarse lesión aparente se tomó una muestra la cual fue sembrada por puntos aislados en placas con medio de agar dextrosa Sabouraud (Bioxon) con cloramfenicol al 0.05 % e incubadas a 30 °C, durante 7 días, revisándolas diariamente para observar el desarrollo y morfología colonial característica, posteriormente se realizó la tinción de azul de algodón y microcultivo para su identificación microscópica.

### **Procesamiento de los órganos para el estudio histopatológico**

Se tomaron las muestras de pulmón izquierdo de aproximadamente 1  $\text{cm}^3$  preferentemente aquellas en donde se encontraban los nódulos característicos provocados por aspergilosis y colocados en formalina amortiguada al 10 % para su fijación y posteriormente incluidas en parafina y cortadas a 4 $\mu\text{m}$ , las cuales se tiñeron utilizando la técnica de Hematoxilina- Eosina (H-E), así como también mediante la técnica de ácido

periódico de Schiff (PAS) (Heffess, 1995).

### **Clasificación de lesiones histopatológicas en tejido pulmonar**

Se realizó una descripción de las lesiones presentes en pulmones en los diferentes muestreos, las lesiones fueron evaluadas utilizando el criterio propuesto por (Campuzano, 1997) modificado:

0 = Sin lesiones.

1 = Infiltración focal o difusa leve de células mononucleares.

2 = Presencia de granulomas discretos sin la presencia de hifas de *A. fumigatus*.

3 = Granulomas con áreas de necrosis central y presencia de hifas de *A. fumigatus*, y fibrosis de discreta a moderada.

4 = Coalescencia de lesiones granulomatosas, fibrosis severa, abarcando más del 50 % de tejido, con o sin presencia de hifas.

### **Muestras para la determinación de gliotoxina**

Para la determinación de gliotoxina se guardó la porción de pulmón restante, cuyas muestras han sido mantenidas en bolsas de plástico y almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su posible utilización.

### **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Para analizar la relación que había entre la edad de inoculación, el tipo de cepa y el día de sacrificio con la lesión resultante se utilizó un análisis estadístico empleando la prueba de  $\chi^2$  con el procedimiento **FREQ**, por el método de Mantel- Haenszel utilizado para cuando existen valores esperados menores a cinco (Dawson, 1993) implementado en el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System) para P C.

Para el análisis de peso de las aves se utilizó como variable de respuesta, la ganancia de peso diario (GPD), y como variables independientes el grado de lesión (0, 1, 2), las cepas de *A. fumigatus* alta y baja productoras de gliotoxina y el grupo testigo.

El método utilizado para el análisis de varianza para modelos desbalanceados mediante el

procedimiento GLM (General Linear Model) del paquete SAS (Statistical Analysis System) con la suma de cuadrados tipo IV. La fórmula para su cálculo fue la siguiente:

$$\text{GPD} = \frac{\text{Peso Final} - \text{Peso Inicial}}{\text{Días al Sacrificio}}$$

Para analizar la variable de respuesta grado de lesión y como variables independientes las cepas de *A. fumigatus* alta y baja productoras de gliotoxina y el grupo testigo, se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal- Wallis, (Dawson, 1993) expresando los resultados en términos de promedios.

## RESULTADOS.

### CARACTERIZACION DE LAS CEPAS DE *Aspergillus*.

Las cepas sembradas en placas de agar Czapeck- Dox incubadas a 37 °C mostraron colonias con crecimiento radial, planas, blancas en el inicio y ligeramente vellosas, pero conforme se desarrollaron las conidias tomaron un color verde azulado oscuro y un aspecto pulverulento, los bordes se observaron de color blanco, el reverso de la colonia se presento incolora. Los cultivos viejos mostraron una apariencia gris ahumada, al examen microscópico se apreciaron vesículas incoloras, con forma parecida a la de un matraz invertido con fondo redondeado y cuello largo, con una serie de fiáldes dispuestas hacia arriba de manera paralela al eje de la vesícula, situada en la mitad superior en una formación aglomerada más o menos paralela. La pared del conidióforo era incoloro y liso, las conidias fueron esféricas, de color verde y presentaron hifas septadas, todas las cepas fueron corroboradas como *A. fumigatus*, excepto la cepa # 11 la cual fue diferenciada de las anteriores por abundantes cabezas conidiales de color verde olivo, sosteniéndose los esterigmas sobre las tres cuartas partes de la cabeza, conidias en cadena, ligeramente rugosas y subglobosas, y presentaron cleistotecios, la cual fue identificada como *A. fischeri*.

Las cepas crecieron bien a temperatura de 45 °C.

### PERFILES ELECTROFORETICOS DE LAS DIFERENTES CEPAS DE

#### *Aspergillus fumigatus*.

##### Perfil electroforético de los diferentes extractos metabólicos

Los extractos metabólicos obtenidos a partir de medio de cultivo de las diferentes cepas de *A. fumigatus* mostraron un perfil electroforético constante, el cual incluye bandas de proteínas de peso molecular aproximado de 46, 42, 40, 38, 35, 28 y 24 kDa (Fig. 1 y 2). Las bandas de 46 y 24 kDa fueron las más evidentes por lo que aparentan ser proteínas mayoritarias en *A. fumigatus*. La banda de 35 kDa estuvo ausente en las cepas 4, 8, 9 y 10. La banda de 28 kDa no fue observada en las cepas 1, 4, 8, 9 y 10, mientras que en la cepa 5 se detectó en menor densidad. Adicionalmente, al perfil descrito, la cepa 11 mostró tres

bandas de 31, 26 y 16 kDa; mientras que las cepas 1, 3, 4 mostraron una banda de 42 kDa; ausentes en el resto de las cepas. Las bandas por arriba de 46 kDa no fueron consideradas por migrar a la misma distancia que algunas de las proteínas del medio de cultivo empleado para el desarrollo del microorganismo la cual esta señalado con la letra M.

### **Perfil electroforético de los diferentes extractos miceliales**

Los extractos miceliales de las cepas de *A. fumigatus* mostraron un perfil electroforético constante, el cual incluye bandas de proteínas de peso molecular aproximado de 91, 72, 69, 63, 57, 50 y 35 kDa (Fig. 3 y 4) mientras que el extracto micelial de *A. niger* presento un perfil diferente que incluye bandas de 100, 91, 76 y 58 kDa.

Los extractos miceliales de las cepas 1, 4, 8, 9, 10 y 11 mostraron una banda de 33 kDa, y la cepa 11 mostró una banda 83 kDa ambas no observadas en las otras. La cepa de *A. fumigatus* mostró un perfil electroforético del extracto micelial diferente al de *A. niger* compartiendo únicamente 2 bandas una de 91 y otra de 63 kDa.

### **OBSERVACIONES CLÍNICAS**

Después de la aplicación de las conidias, todos los animales aparecieron normales antes de las 48 horas, sin signos clínicos relacionados a la disfunción respiratoria. A partir de las 48 horas postinoculación, dos animales desafiados al primer día de edad con la cepa de *A. fumigatus* baja productora de gliotoxina mostraron decaimiento, disnea, taquipnea y plumas erizadas; dos aves más del mismo grupo mostraron los mismos signos a las 96 horas postinoculación. En el grupo de aves desafiado a los 7 días de edad un pollo mostró los mismos signos a las 72 horas y el grupo de aves desafiado al día 14 de edad, 2 aves presentaron signos similares 6 días postinoculación. Los animales desafiados con la cepa alta productora de gliotoxina no mostraron signos.

## **MORTALIDAD**

La cepa de *A. fumigatus* baja productora de gliotoxina mostró una mortalidad del 10 % en las aves desafiadas al día uno de edad, 2.5 % y 5 % en aves desafiadas en las edades 7 y 14 días respectivamente. La cepa de *A. fumigatus* alta productora de gliotoxina *in vitro* no causó mortalidad.

## **EVALUACIÓN MACROSCÓPICA**

A la necropsia se observaron lesiones granulomatosas confinadas primordialmente a los pulmones y membranas de sacos aéreos, en raras ocasiones en hígado, las lesiones en el pulmón y saco aéreo izquierdo estuvieron más marcadas que las de pulmón derecho, abarcando entre 20% - 75% con distribución ventro caudal (Fig. 5). Las lesiones constituidas por exudado inflamatorio con aspecto nodular de color blanco-amarillento, de diversos tamaños que oscilaban desde 1 mm hasta varios milímetros de diámetro. Se presentó engrosamiento de los sacos aéreos con membranas opacas, los pulmones se encontraron de consistencia de blanda esponjosa a dura, de coloración ligeramente blanca en la superficie. En ocasiones se observó engrosamiento y lesiones granulomatosas en la pared intercostal (Fig. 6 y 7). Las placas o granulomas se encontraron firmemente adheridos dentro o sobre la superficie de los órganos involucrados (Fig. 7 y 8). En una ocasión las lesiones alcanzaron la cara interna del muslo (Fig. 8).

La severidad de las lesiones se incrementó al día 10 postinoculación con un marcado aumento en el tamaño y en el número de nódulos, la severidad fue ligeramente mayor en las aves desafiadas con Afbg. A la necropsia, las aves empleadas como grupo testigo no mostraron cambios patológicos.

## **EXAMEN HISTOPATOLÓGICO**

El examen histopatológico de secciones de tejido pulmonar mostraron abundantes macrófagos, células epitelioides y células gigantes de cuerpo extraño (Fig. 9) se observó la presencia de centros necróticos conteniendo heterófilos, rodeados por células gigantes,



una de las cepas empleadas, resultando de la suma de los valores obtenidos de multiplicar el número de aves afectadas por el tipo de lesión y dividido entre el total de aves utilizadas en el grupo.

Las aves inoculadas al primer día de edad, con la cepa de *A. fumigatus* baja productora de gliotoxina sufrieron un promedio de lesión mayor (2.55) en comparación con las aves que fueron inoculadas con la cepa de *A. fumigatus* alta productora de gliotoxina (0.85) lo que resultó estadísticamente significativo ( $P < 0.05$ ).

Las aves desafiadas en los 7 ó 14 días de edad con las cepas de *A. fumigatus* alta ó baja productoras de gliotoxina no mostraron una diferencia significativa en el grado de lesión promedio ( $P > 0.05$ ).

El comportamiento de la lesión promedio en las 3 diferentes edades de inoculación se muestran en el Cuadro 4 y en la Figura 14.

#### **AISLAMIENTO DE *Aspergillus fumigatus* A PARTIR DE TEJIDO PULMONAR EN AVES INOCULADAS EXPERIMENTALMENTE**

En las aves empleadas como grupo testigo en las 3 diferentes edades de desafío (uno, siete ó 14 días de edad) no se aisló *A. fumigatus*.

Con relación a la edad de inoculación. En las aves inoculadas con *A. fumigatus* se obtuvieron 27 aves (67.5 %) con microorganismos viables a partir de muestras de tejido pulmonar en aves desafiadas al primer día de edad, así como 19 aves (47.5 %) y 17 aves (42.5 %) desafiadas a los 7 y 14 días de edad respectivamente. Los resultados se observan en el Cuadro 5.

Al realizar el análisis estadístico de  $\chi^2$ . Los resultados muestran diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ), en las aves inoculadas al día uno de edad no así en los días 7 y 14. Figura 15.

Con relación al número de aislamientos y el día de sacrificio: se encontraron 38 aves (63.33%) y 25 aves (41.66%), con microorganismos viables en tejido pulmonar al día 5 y

10 postinoculación respectivamente; los datos se observan en el Cuadro 6. Los resultados analizados con la prueba de  $\chi^2$ , muestran ser estadísticamente significativos ( $P < 0.05$ ). Figura 16.

Por otro lado en las aves desafiadas con las cepas de *A. fumigatus* alta o baja productoras de gliotoxina, se aisló al microorganismo en 63 aves (52.5 %) obteniéndose en 30 ocasiones (25 %) la cepa de *A. fumigatus* alta productora de gliotoxina y en 33 (27.5%) la cepa de *A. fumigatus* baja productora de gliotoxina. El análisis estadístico realizado con la prueba de la prueba de  $\chi^2$ , no muestra diferencia estadística significativa ( $P > 0.05$ ). Los datos se observan en Cuadro 7.

La frecuencia de aislamiento de *A. fumigatus* con relación al grado de lesión pulmonar se muestra en el Cuadro 8. De las aves desafiadas con conidias de *A. fumigatus* se obtuvieron 63 aves (52.5 %) con aislamiento del microorganismo viable a partir de muestras de tejido pulmonar, de las cuales se obtuvo el aislamiento en 28 aves (23.33 %) con grado de lesión 4; en 6 aves (5 %) con grado de lesión 3; en 2 aves (1.66 %) con grado de lesión 2, en 5 aves (4.16%) con grado de lesión 1 y en 22 aves (18.33%) sin lesión, las frecuencias de aislamiento se observan en la Figura 17.

## GANANCIA DE PESO DIARIO

### Ganancia de peso con relación al día de inoculación

Las aves del grupo inoculadas al primer día de edad con la cepa de *A. fumigatus* baja productora de gliotoxina, mostraron una ganancia de peso promedio menor ( $13.10 \pm 1.3g$ ), cuando fueron comparadas con las aves inoculadas con la cepa alta productora de gliotoxina ganando un peso de ( $15.35 \pm 1.36g$ ), aunque los resultados no mostraron diferencia estadísticamente significativa ( $P > 0.05$ )

En las aves inoculadas al día 7 ó 14 de edad, los promedios resultantes de ganancia de peso diaria son numéricamente diferentes, pero no estadísticamente significativos ( $P > 0.05$ ). Los resultados se aprecian en el Cuadro 9.

### **Ganancia de peso con relación al grado de lesión**

Debido a que la cantidad de animales lesionados clasificados con grado 1, 2, 3, 4, fue muy pequeño se decidió reagrupar en solo 3 categorías quedando de la siguiente manera:

(0)=0; (1 y 2) = 1; (3 y 4) = 2.

Las aves cuyas lesiones fueron clasificadas con grado de lesión 0, 1, 2 en las edades de uno, siete, y catorce días de edad, mostraron una ganancia de peso promedio numéricamente diferente, pero estadísticamente no significativos ( $P>0.05$ ) el comportamiento de los valores promedio se observan en Cuadro 10.

## DISCUSION Y CONCLUSIONES

La ruta de inoculación en el saco aéreo abdominal ha mostrado ser útil como técnica de desafío en la especie aviar, determinando la patogenicidad relativa de las cepas de *A. fumigatus* alta y baja productoras de gliotoxina *in vitro*, aunque es una ruta artificial de exposición, los signos y las lesiones observadas fueron comparables con aquellas encontradas por Dyar (1984), Beckman (1994), Richard (1995) en casos naturales o como señala Richard (1983), Peden (1992) en casos artificiales empleando otras vías de desafío.

Los resultados encontrados mostraron que la aspergilosis puede ser reproducida en pollos de 1, 7 ó 14 días de edad con conidias viables de cepas de *A. fumigatus* alta o baja productoras de gliotoxina, con un inóculo de  $5 \times 10^6$  conidias contenidas en 0.2 ml de solución salina isotónica, con el cual la enfermedad fue manifestada en 46 aves (38.33%) con diferente grado de lesión pulmonar, mientras que por medio de aislamiento y cultivo del microorganismo se encontró en 63 aves (52.5%) a partir de muestras de tejido pulmonar. Las aves empleadas como grupo testigo no mostraron cambios patológicos ni clínicos y con aislamiento negativo.

Los signos sólo se manifestaron en aves desafiadas con la cepa de *A. fumigatus* baja productora de gliotoxina a partir de las 48 horas después de la inoculación, las cuales mostraron decaimiento, disnea, taquipnea y plumas erizadas todas éstas murieron posteriormente, alcanzando el 10 % de mortalidad en aves desafiadas al día uno de edad, 2.5 % y 5 % en aves de siete y catorce días, respectivamente. Los resultados mostraron que las aves más jóvenes son más susceptibles a la aspergilosis, quizás esto se deba a la inmadurez de su sistema inmunológico, a medida que las aves son mayores sus mecanismos de defensa aumentan.

A la necropsia los hallazgos predominantes fueron aerosaculitis, neumonía y poliserositis, comparables con los hallazgos encontrados por Peden (1992), se presentaron lesiones granulomatosas en pulmón y sacos aéreo abarcando entre 20 a 75 % del pulmón con distribución ventro caudal. Los granulomas se presentaron de color blanco amarillento de

tamaño variable, desde 1 hasta varios mm de diámetro, de consistencia de blanda esponjosa a dura, el pulmón izquierdo y saco aéreo fue siempre más severamente involucrado que el pulmón derecho. Estos resultados concuerdan con los encontrados con Peden (1992) posiblemente la severidad aumento en este sitio debido a que fue el sitio de inoculación. Se encontró engrosamiento de las membranas de sacos aéreos y de tejidos colonizados por *A. fumigatus*; estudios similares fueron descritos por Singh (1979), Chute (1995) y Kunkle (1996). No se encontraron lesiones significativas en otros tejidos examinados y en 6 ocasiones se presentó ascitis teñida de rojo, estos resultados concuerda con estudios anteriores señalados por Chute H. L y Richard (1995), Julian and Goryo (1990).

### **Evaluación histopatológica**

Microscópicamente del 20 al 100% del parénquima pulmonar estuvo involucrado, con granulomas multifocales coalescentes que lesionaron un área mayor del parénquima pulmonar. Estas lesiones mostraron acumulación focal de linfocitos, abundantes macrófagos y células epitelioides iniciado la formación de células gigantes, así como la presencia de nódulos granulomatosos, con zona necrótica central conteniendo una masa de hifas de grosor uniforme, septadas y con ramificación dicotómica, conteniendo heterófilos rodeando por células gigantes, macrófagos, linfocitos y una ligera cantidad de tejido fibroso comparado con estudios anteriores reportados por Singh (1979), Beckman (1994) Chute (1995), Kunkle (1996).

Se observó que al examen histológico, cortes de tejido pulmonar teñidos con H-E de aves desafiadas, no revelaron diferencias en las lesiones causadas excepto más tejido fue involucrado en la enfermedad con la cepa de *A. fumigatus* baja productora de gliotoxina. Se observo que en el caso de la cepa baja productora de gliotoxina la cantidad de parénquima pulmonar involucrado fue mayor, no obstante la severidad de las lesiones fue similar con ambas cepas, aún más las lesiones macroscópicas y microscópicas aparentemente fueron más severas en pollos infectados con la cepa baja productora de gliotoxina. Esto estaría en desacuerdo con lo reportado por Richard *et al.*, (1995), (1996) quienes atribuyen que la

gliotoxina posiblemente sea un factor de virulencia de *A. fumigatus* ya que en trabajos anteriores han demostrado la presencia de gliotoxina en cepas de *A. fumigatus* recuperadas de tejido pulmonar de aves infectadas natural y experimentalmente

En el presente trabajo el desarrollo y la severidad de las lesiones encontradas varió con las cepas inoculadas así como también las lesiones macroscópicas y microscópicas frecuentemente más severas en pollos infectados con la cepa de *A. fumigatus* baja productora de gliotoxina.

#### **Aislamiento de *A. fumigatus* a partir de tejido pulmonar con relación a la edad**

Con relación a la edad de inoculación se obtuvo mayor cantidad de aislamientos a partir de tejido pulmonar en las aves inoculadas al primer día, ya que 27 aves resultaron con aislamiento positivo (67.5 %) en comparación con 19 aves (47.5 %) y 17 (42.5 %) en las edades de 7 y 14 días respectivamente. Al realizar el análisis estadístico de  $\chi^2$  resultó altamente significativo ( $P < 0.05$ ), en aves desafiadas al día uno de edad; en tanto los resultados obtenidos de aves desafiadas a los días 7 y 14 días de edad no mostraron diferencia estadística significativa ( $P > 0.05$ ). Los resultados muestran que la probabilidad de aislar al microorganismo a partir de tejido pulmonar es mayor en aves inoculadas al día uno de edad, disminuyendo en aves inoculadas a 7 o 14 días de edad. Los resultados muestran un incremento marcado de resistencia a la infección entre el día 1 al 7 y 14 de edad. Los resultados son comparables con los de O'Meara y Chute (1959) los cuales señalan que pollitos recién nacidos hasta de dos días de edad se infectaban fácilmente con esporas de *A. fumigatus* por contaminación de aire forzado de la incubadora y pollitos mayores de tres días de edad fueron más resistentes a la infección. A medida que las aves maduran el sistema inmunológico también madura haciendo que los animales sean más resistentes a la aspergilosis, (Mosqueda, 1985).

#### **Aislamiento de Afag y Afbg**

Con lo referente al aislamiento de las cepas Afag y Afbg, los resultados no muestran

diferencia estadística significativa ( $P>0.05$ ). Las conidias de ambas cepas permanecen viables en la misma proporción después de 10 días postdesafío, aparentemente la defensa inmunológica de las aves actúan de manera muy semejante en la destrucción de los microorganismos.

#### **Aislamiento de Afag y Afbg, con respecto al día de sacrificio**

Con relación al número de aislamientos y el día de sacrificio, se observó en 38 aves (63.33%) y 25 aves (41.66%) con microorganismos viables en tejido pulmonar a los días 5 y 10 postinoculación respectivamente. Al realizar el análisis resultó significativo ( $P<0.05$ ). Posiblemente sea debido a la acción antifúngica de los fagocitos aunque no muestra ser tan rápida la destrucción del microorganismo por el proceso de fagocitosis (al menos el de ingestión) se lleva a cabo en 15 minutos después del desafío como lo señala Richard (1983), en el estudio con pavos desafiados por aerosoles con conidias de *Aspergillus fumigatus*. Aparentemente la actividad antifúngica es rápida en pulmones de rata: Turner *et al.*, (1975) encontraron que cuando las ratas fueron inoculadas con conidias de *A. fumigatus* vía intravenosa, en primer lugar se concentraron en los pulmones y entonces fueron rápidamente removidas por fagocitosis y por digestión. No hay evidencia de tal actividad antifúngica con *A. fumigatus* en pulmones de pollo en este trabajo. Esta actividad concuerda con los hallazgos de Thurston (1979) en estudios de conejo expuestos a aerosoles con conidias viables de *A. fumigatus*, las cuales fueron recuperadas hasta por 14 días postdesafío, así mismo con los resultados encontrados por Richard (1980) con pavos desafiados por aerosoles de *A. fumigatus* y *A. flavus* los microorganismos permanecieron viables en 60 % de muestras de tejido pulmonar hasta por ocho semanas y 86. 5% en muestra de cerebro e hígado.

Levitz (1985) señala con estudios *in vitro* una resistencia relativa por parte de la conidia a los oxidantes neutrofilicos así como la estimulación subóptima del estallido respiratorio de los neutrófilos (heterófilos en aves). En los macrófagos el fallo para la estimulación del estallido respiratorio ha sido propuesto como un posible mecanismo de sobrevivencia de

patógenos intracelulares Wilson (1980). Sin embargo cuando la conidia llega a ser metabólicamente activa se hincha y aún no germinada, su sensibilidad a los oxidantes neutrofilicos se incrementa, ellos estimulan un gran estallido respiratorio y generan mas factores quimiotácticos desde el suero, después de la ingestión por neutrófilos, la conidia puede germinar y formar la hifa, la cual evade las defensas del hospedero, los polimorfonucleares son capaces de destruir a la conidia germinada y a la hifa por secreción de metabolitos oxidativos y no oxidativos, solo cuando las defensas fagociticas son afectadas profundamente se dan las infecciones invasivas Levitz (1985) y (1986).

### **Frecuencia de aislamiento con relación al grado de lesión**

Con relación al grado de lesión pulmonar y la frecuencia de aislamiento se obtuvieron 63 aves (52.5 %) con aislamiento del microorganismo viable a partir de muestras pulmonares. De este total se aisló el agente en 28 aves (23.33 %) con grado de lesión 4; en 6 aves (5%) con grado de lesión 3; en 2 aves (1.66 %) con grado de lesión 2; en 5 aves (4.16%) con grado de lesión 1 y en 22 aves (18.33%) sin ninguna lesión. Los resultados muestran diferencias estadísticas significativas con ( $P < 0.05$ ). Esto muestra que aves desafiadas con conidias viables de Afbg o Afbg que sufrieron lesiones pulmonares en diferentes grados, los microorganismos permanecieron viables en el tejido pulmonar 10 días después de la inoculación. Así mismo, los resultados muestran que la probabilidad de aislar *A. fumigatus* es mayor cuando el grado de lesión es más severo; se observa que la mayor parte de las muestras donde se logró el aislamiento y cultivo del microorganismo, pertenecieron a los tejidos pulmonares con lesiones granulomatosas típicas del tipo 4, estos hallazgos son comparables con los reportados por Campuzano (1997) en lesiones granulomatosas producidas por *Mycobacterium bovis*. Al parecer la cantidad de esporas que causaron lesiones fue mayor y por ende la probabilidad de aislar el hongo en éstas es mayor.

Por otro lado se teoriza que la germinación de las conidias fue inhibida en las muestras de tejido con grado de lesión cero, y de donde en 22 aves (18.33%) se logro aislar el hongo mostrando que las conidias permanecen viables sin causar daño. Posiblemente las conidias



fueron fagocitadas, pero este evento no las destruyó, esto concuerda con lo informado por Richard en 1980 en muestras de pulmones de pavo.

### **Ganancia de peso diario**

En lo referente a la ganancia de peso diario, en aves desafiadas con conidias de *A. fumigatus*, se observaron diferencias numéricas en ganancia de peso entre las aves desafiadas con las cepas Afag y Afbg en comparación al grupo testigo, en las 3 diferentes edades de desafío. No obstante no se encontró diferencia significativa ( $P>0.05$ ) a los días uno, siete o catorce de edad. Los resultados concuerdan con los de Peden (1992) en un estudio con pavos desafiados con *A. fumigatus* por vía saco aéreo y donde la mortalidad fue menor al 50 %; aunque difiere con resultados en el grupo de pavos con mortalidad superior al 50 % así como con los resultados encontrados por Ghorri (1979), posiblemente esta diferencia sea debida al porcentaje de mortalidad en sus grupos que es superior al 10% de los resultados obtenidos.

### **Ganancia de peso diario con respecto al grado de lesión**

En lo referente a las aves desafiadas al día uno, siete ó 14 de inoculación con conidias de *A. fumigatus* su ganancia de peso diario con respecto al grado de lesión (0, 1, 2) no mostraron diferencia ( $P>0.05$ ). Independientemente del grado de lesión que sufrieron las aves su ganancia de peso diario fue semejante entre ellas, aparentemente el metabolismo del animal se vio comprometido de la misma manera en cualquier grado de lesión que se produjo, por lo tanto sus variaciones fueron semejantes manifestándose con ganancia de peso similar.

### **Promedio de lesión**

Con relación al promedio de lesión por la cepa inoculada y el día de desafío se observó que los microorganismos de ambas cepas se establecieron claramente en los pulmones de las aves desafiadas al día uno, siete ó 14 de edad; mostrando que la cepa Afbg causó un promedio de lesión mayor en el grupo de aves desafiadas al día uno de edad en

comparación con la cepa Afag, resultando este significativo ( $P < 0.05$ ), así mismo el promedio de lesión fue mayor por Afbg en los grupos de aves desafiadas al día 7 y 14 de edad sin embargo los resultados no muestran diferencia significativa ( $P > 0.05$ ). En los resultados se observa que la cepa Afbg produjo más lesión en las 3 diferentes edades, pero la severidad de ésta disminuye a medida que las aves tienen mayor edad.

Los resultados mostraron que la relación existente entre la producción de gliotoxina *in vitro* y la virulencia de la cepa mediante la evaluación de lesiones histopatológicas fue inversamente proporcional, ya que la cepa de *A. fumigatus* baja productora de gliotoxina *in vitro* causó lesiones en 31 aves (51.66%) y la cepa de Afag causó lesión en 15 aves (25 %). Los análisis estadísticos muestran una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ). Los resultados son similares a los encontrados por Land (1989) quien observó que conidias de *A. fumigatus* no productoras de gliotoxina *in vitro* causaron aspergilosis más severa en ratones, posiblemente la gliotoxina no sea el único factor de patogenicidad que favorezca al desarrollo de la enfermedad, aunque sería recomendable conocer la cantidad de gliotoxina presente en tejido dañado ya que la cantidad de gliotoxina producida por el hongo no resultó modificada por la inoculación en las aves y continuó de igual forma después del reaislamiento.

Los mecanismos patogénicos de *A. fumigatus* han sido sujetos de muchas investigaciones durante los últimos años (Bouchara, 1995). Sin embargo el mecanismo molecular por el cual el hongo establece la infección aún no está dilucidado.

Posiblemente el proceso de adherencia al tejido del hospedero, constituye el evento esencial en el establecimiento de la infección, y sea debido a interacciones entre moléculas presentes entre la superficie de los microorganismos y el hospedero (Coulot, 1994). Este mismo autor y Bouchara (1995) han estudiado proteínas y glicoproteínas que pueden actuar como ligandos de esporas de *A. fumigatus* en la superficie celular del hospedero, como por ejemplo el fibrinógeno, el cual se ha encontrado que juega un papel importante en la reacción de inflamación *in vivo* mientras que la laminina actúa como promotor de adherencia de *A. fumigatus in vitro*.

Es factible que existan otros factores como lo señala Peñalver (1996), ya que los filamentos miceliales de *A. fumigatus* muestran proteínas y glicoproteínas de superficie con propiedades hidrofóbicas, sin lugar a dudas éstas interacciones pueden ser importantes en la invasión de tejidos por las formas filamentosas del hongo, después de haber iniciado la colonización por conidias en células del hospedero o en la superficie de mucosas al ocurrir la infección por vía aérea.

Otra idea es la de Moser *et al.*, (1994) quienes sugieren la presencia de la proteasa alcalina no glicosilada de 32 kDa, con actividad elastolítica como factor de virulencia, y lo señalado por Bouchara (1995) quien teoriza que la virulencia posiblemente sea el resultado de la actividad de numerosos factores que incluyen diferentes sistemas de adherencia, varias toxinas y enzimas extracelulares tales como las proteinaceas y fosfolipasas.

Por todo lo anteriormente expuesto se puede visualizar que los factores que favorecen al desarrollo de la aspergilosis no están completamente elucidados, *A. fumigatus* es un importante patógeno respiratorio afectando principalmente a especies avícolas y aunque se tomen medidas de control el riesgo está presente. Por lo que es necesario seguir investigando cuales son los factores que favorecen a la patogenicidad del microorganismo.

#### **Perfil electroforético de los extractos metabólicos y miceliales**

El perfil electroforético de los extractos metabólicos de las diferentes cepas de *A. fumigatus* cultivado en un medio de cultivo con glucosa al 4 %, 1 % de peptona y 10 % de líquido amniótico de equino y durante 3 semanas de crecimiento fue de 46, 42, 40, 38, 35, 28 y 24 kDa.

*A. fischeri* muestra un perfil similar sin embargo difiere en 3 proteínas extras de 31, 26, y 16 kDa. Ambos perfiles presentaron proteínas comunes indicando la relación de género.

La expresión de diferentes proteínas metabólicas y miceliales *in vitro* es altamente dependiente de la composición de nutrientes del medio de cultivo empleado para el desarrollo del microorganismo, la temperatura de crecimiento y el método de extracción. Como se observó en trabajos realizados por Monod *et al.*, (1991) cuando *A. fumigatus* es

cultivado en presencia de colágeno (200  $\mu$ l/ml) como fuente de nitrógeno y carbono, obteniendo en el sobrenadante del medio de cultivo una proteína caracterizada como una proteasa alcalina extracelular de 33 kDa. Por otra parte Latgé *et al.*, (1991) encontraron una proteína de 18 kDa producida por *A. fumigatus* en un medio de cultivo que contenía 2 % de glucosa y 1 % de peptona durante 6 días de crecimiento a 25 °C y en agitación de 100 r.p.m. ambas proteínas reportadas presentan carácter antigénico.

El perfil electroforético presentado en los extractos miceliales entre las diferentes cepas de *A. fumigatus* fue de 91, 72, 69, 63, 57, 50 y 35 kDa mostrando diferencias con el perfil de *A. niger*. El perfil electroforético de *A. fumigatus* comparte únicamente 2 bandas correspondiendo a las bandas de 91 y 63 kDa.

El perfil de *A. fumigatus* en este estudio difiere al reportado por Loudon *et al.*, (1994), compartiendo únicamente 3 bandas las cuales corresponden a las proteínas de 72, 63kDa y posiblemente la proteína de 51 equivalente a la proteína encontrada en nuestro perfil a la 50 kDa. Es posible que las diferencias sean debido al método de extracción el cual no se describe en su trabajo.

Existen diferencias entre los perfiles miceliales de *A. fumigatus*, *A. niger*, y en los perfiles metabólicos de *A. fumigatus* y *A. fischeri*, así como diferencias menores entre las cepas.

## LITERATURA CITADA.

- Ainsworth, G. C. and Austwick, P. K. C.: Fungal diseases of animals. Second edition. *Commonwealth Agricultural Bureaux. Farnham Royal. Slough.* England Great Britain (1973).
- Aloisi, G.: Aspergilosis, una enfermedad ambiental. *Avicultura Profesional* 14:2, 18 – 19 (1996)
- Amitani, R., Taylor, G., Elezis, EN., Llewellyn-Jones, C., Mitchell, J., Kuze, F., Cole, P. J. and Wilson, R. Purification and characterization of factors produced by *Aspergillus fumigatus* which affect human ciliated respiratory epithelium. *Infection and Immunity.* 3266-3271 (1995).
- Bauer, J., Gareis, M., Bott, A. and Gedek, B.: Isolation of mycotoxin (gliotoxin) from a bovine udder infected with *Aspergillus fumigatus*. *J. Med. Vet. Micology.* 27: 45-50 (1989).
- Beckman, B. J., Howe, C.W., Trampel, D.W., DeBey, M.C., Richard, J.L. and Niyo Y.: *Aspergillus fumigatus* keratitis with intraocular invasion in 15-day-old chicks. *Avian Dis.* 660-665 (1994).
- Bonifaz, A.: Micología Médica Básica. *De Francisco Méndez Cervantes.* México D. F. (1991).
- Bose, A. K., Das, K. G., Funke, P. T., Kugajevsky, I., Shukla, O. P., Khanchandani, K. S. and Sahadolnik, R. J.: Biosynthetic studies on gliotoxin using stable isotopes and mass spectral methods. *J. of the American Chemical Society* 90:4 February 1038-1041 (1968).
- Bouchara, J. P., Tronchin, G., Larcher, G. and Chabasse D.: The search for virulence determinants in *Aspergillus fumigatus*. *Trends in Microb.* 3:8 August 327-330 (1995).
- Bradford, M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein. *Analytical Biochemistry* 72: 225-260 (1976).

- Campuzano, G. J.: Comparación de diferentes pruebas anatomopatológicas y microbiológicas empleadas en el diagnóstico de la tuberculosis bovina. Tesis de Maestría. Patología animal. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. México. D. F., (1997).
- Cervantes, O. R. A.: Studies on antigens of *Aspergillus*: Their use in Veterinary Mycology. Ph. D. Thesis, *Faculty of Veterinary Medicine*. University of Glasgow Scotland (1983).
- Coligan, J.E., Kruisbeek, A. M., Margulies D.E., Shevach, E. M. and Strober, W.: Current Protocols in Immunology., U.S.A. *Published by John Wiley & Sons, Inc. 1: 4.1-8.4.20* (1994).
- Coulout, P., Bouchara, J.P., Renier, G., Annaix, V., Planchenault, C., Tronchin, G. and Chabasse, D.: Specific interaction of *Aspergillus fumigatus* with fibrinogen and its role in cell adhesion. *Infection and Immunity, June. 2169-2177* (1994).
- Chute, H. L. y Richard, J. L.: Infecciones micóticas. En: Enfermedades de las Aves. Editado por: Calnek, B. W., 399-410. *Manual Moderno*. México. D. F., (1995).
- Dawson-Sannders and Trapp R.: Bioestadística Médica. *El Manual Moderno*. México D. F., (1993).
- Dyar, P. M. Fletcher, O. J. and Page R. K. Aspergillosis in turkeys associated with use of contaminated litter. *Avian Dis.*28: 1. 250-255 (1984)
- Eichner, R. D., Salami, A., Wood, P. R. and Mullbacher, A.: The effect of gliotoxin upon macrophage function. *J. Immunopharmacology. 8: 7. 789-797* (1986).
- Frame, R. and Carlton, W.W., Acute toxicity of gliotoxin in hamsters. *Toxicology Letters 40: 269-273* (1988).
- Ghori, H. M. and Edgar, S. A.: Comparative susceptibility and effect of mild *A. fumigatus* infection on three strains of chickens. *Poultry Sci. 58: 14-17* (1979).
- Gordon, R. F.; Jordan, F.T.: Enfermedades de las Aves 2ª. ed. *Manual Moderno*. México D.F., (1985).
- Hamet, N., Seigle-Murandi, F., and Steiman R.: Contribution to the prophylaxis of

chicks aspergillosis: study of the contamination of a hatchery by *Aspergillus fumigatus*. *J. Vet. Med.* B 38: 529-537 (1991).

- Heffess, C. S., Mullich, F. G.: Métodos Histotecnológicos. *Registro de Patología de los Estados Unidos de América (ARP) e Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (AFIP)*. Washington, D. C. (1995).
- Henrici, A. T. An endotoxin from *Aspergillus fumigatus*. *J. Immunol.*, 36: 319-338 (1939)
- Herrera. T. y Ulloa, M.: El Reino de los Hongos. Micología Básica Aplicada. *Universidad Nacional Autónoma de México, Fondo de Cultura Económica*. México D.F., (1990).
- Hofstad, M. S.; Barnes, H. J.; Calneck, B. W.; Reid, W. M.; Yoder, H. W. Diseases Poultry. Eight edition. Second printing. *Science Press*, Epharata, Pa. U.S.A. (1988).
- Jubb, K.V.F., Kennedy, P. C. and Palmer, N.: Pathology of Domestic Animals. fourth edition. *Academic Press Inc*. New York (1985).
- Julian, R. J. and Goryo, M.: Pulmonary aspergillosis causing right ventricular failure and ascites in meat-type chickens. *Avian Patholog.* 19: 643-654 (1990).
- Jungerman, F. P., Schwartzman, M. R.: Micología Médica Veterinaria. *Continental, S.A*. México. D.F., (1977).
- Kunkle, R. A. and Rimler, R. B.: Pathology of acute aspergillosis in turkeys. *Avian Diseases* 40: 875-886 (1996).
- Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 227: 680-685 (1970).
- Land, C. J., Sostaric, B., Fuchs, R., Lundstrom, H., and Hult, K.: Intratracheal exposure of rats to *Aspergillus fumigatus* spores isolated from sawmills in Sweden. *Applied and Environmental Microbiology*, Nov: 2856-2860 (1989).
- Latgé, J. P., Moutaouakil, M., Debeaupuis, J. P., Boucjara, J. P., Haynes, K. and Prévost, M. C. The 18- Kilodalton antigen secreted by *Aspergillus fumigatus* *Infec. And Immun. Aug.* 2586-2594 (1991).

- Levitz, S. M., and Diamond, R. D.: Mechanisms of resistance of *Aspergillus fumigatus* conidia to killing by neutrophils in vitro. *J. Infect. Dis.* 152:33-42 (1985).
- Levitz, S. M., Selsted, M. E., Ganz, T., Lehrer, R. I. and Diamond, R. D.: In vitro killing of spores and hyphae of *Aspergillus fumigatus* and *Rhizopus oryzae* by rabbit neutrophil cationic peptides. *J. Infect. Dis.* 154:3, 483- 489 (1986).
- Loudon, K. W., Coke. A. P., Burnie, J. P. Lucas, G: S. and Liu Yin., J. A. Invasive aspergillosis: clusters and sources? *J. Medical Vet. Mycol.*: 32, 217-224 (1994)
- Monod, M., Togni, L., Rahalison L and Frenk E.: Isolation and characterisation an extracellular alkaline proteasa of *Aspergillus fumigatus*. *J. Med. Microbiol.* 35:23-28 (1991).
- Morrissey, J. H.: Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: A modifíc procedure with enhanced uniform sensitivity. *Analytical Biochemistry* 117: 307-310 (1981).
- Moser, M., Menz. G., Blaser, K., and Cramer, R.: Recombinant expressiom and antigen propeties of a 32 kilodalton extacellular alkaline protease representing a posible virulence factor from *Aspergillus fumigatus*. *Infection and Inmunity*, Mar. 936-942 (1994)
- Mosqueda, T. A. y Lucio, M. B.: Enfermedades Comunes de las Aves Domésticas. Departamento de Producción Animal: Aves. FMVZ UNAM. México D. F., (1985).
- Mullbacher, A. and Eichner, R.D.: Immunosuppression *in vitro* by a metabolite of a human pathogenic fungus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 8:1. 3835-3837 (1984).
- Mullbacher, A., Waring, P. and Eichner, R. D.: Identification of an agent in cultures of *Aspergillus fumigatus* displaying anti-phagocytic and immunomodulating activity *in vitro*. *J. Gen. Microb.* 131: 1251-1258 (1985).
- O'Meara, D. C., and Chute H. L: Aspergillosis experimentally produced in hatching chicks. *Avian Dis.* 3: 404-406 (1959).
- Paris, S., Boisvieux-Ulrich, E., Crestani, B., Houcine, O., Taramelli, D., Lombardi, L. *et al.*, Internalization of *Aspergillus fumigatus* conidia by epitelial and endotelial cell. *Infection and Immunity.* 1510-1514 (1997).



- Patgiri, G. P.: Systemic mycoses. In: Companion Bird Medicine. Edited by: Burr, E. W., *Iowa State University Press*, Ames Iowa U.S.A. 102-103 (1987).
- Peden, W. M. and Keith, R. R.: Pathogenicity differences of multiple isolates of *Aspergillus fumigatus* in turkeys. *Avian Dis.* 36: 537-542 (1992).
- Peñalver, M. C., Casanova, M., Martínez, J. P. y Gil, L.: Cell wall protein and glycoprotein constituents of *Aspergillus fumigatus* that bind to polystyrene may be responsible for the cell surface hydrophobicity of the mycelium. *Microbiology* 142: 1597-1604 (1996).
- Piechura, J. M., Randall, S. R. and Lauren, J. D.: Electrophoretic and serological analyses of cytoplasmic antigens from *Aspergillus fumigatus* during growth of conidia to mature mycelia. *J. Med. Vet. Mycology* 25: 234-254 (1987).
- Quintana, J. A.: Avitecnia: manejo de las aves domésticas más comunes 2a. ed. *Editorial Trillas*. México D. F., (1991).
- Raper, K. B.; and Fennell, D. I.: The genus *Aspergillus*. *Williams and Wilkins Co.*, Baltimore (1965).
- Richard, J. L., Cutlip, R. C., Thurston, J. R., and Songer, J.: Response of turkey poults to aerosolized spores of *Aspergillus fumigatus* and aflatoxigenic and nonaflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus* *Avian Dis.* 25:1 53-67 (1980)
- Richard, J. L., Thurston, J. R.: Rapid hematogenous dissemination of *Aspergillus fumigatus* and *A. flavus* spores in turkeys: subcutaneous inoculation with several vaccine preparations followed by aerosol challenge exposure. *Am. J. Vet. Res.* 43: 488-492 (1983).
- Richard, J. L., Thurston, J. R., Peden, W. P. and Pinello, C.: Recent studies on aspergillosis in turkey poults. *Mycopathologia* 87: 3-11 (1984).
- Richard, W. J. and Hancock, J. G.: Mechanism of gliotoxin action and factors mediating gliotoxin sensitivity. *J. Gen. Microb.* 134:2067-2075 (1988).
- Richard, J. L. and Debey, M. C.: Production of gliotoxin during the pathogenic state in turkey poults by *Aspergillus fumigatus* Fresenius. *Mycopathologia*.129: 111-115

(1995).

- Richard, J. L., Dvorak, T. J. and Ross P. F. Natural occurrence of gliotoxin in turkey infected with *Aspergillus fumigatus*, Fresenius. *Mycopathologia* 134: 167-170 (1996).
- Ridell, C.: Avian Histopatology. *American Association of Avian Pathologists*. Pennsylvania U.S. A. (1987).
- Rippon, J. W.: Tratado de Micología. 3a. ed. *Interamericana Mc. Graw Hill*. México, D. F., (1990).
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T.: Molecular Cloning a Laboratory Manual. Second edition. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. U.S.A. (1989).
- Schaffner, A., Douglas, H. and Braude, A.: Selective protection against conidia by mononuclear and against mycelia by polymorphonuclear phagocytes in resistance to *Aspergillus*: observations on these two lines of defense in vivo and in vitro with human and mouse phagocytes. *J. Clin. Invest.* 69: 617-631 (1982).
- Sarfati, J., Jensen. H. E. and Latgé, P. J.: Route of infections in bovine aspergilosis. *J. Med. and Vet. Mycol.* 34: 379-383 (1996).
- Singh, J. and Malhotra F. C.: Sequential gross and histopathological studies on aspergillosis in chicks. *Indian J. Anim. Sci.* 49:7. 562-568 (1979).
- Singh, N., Grewel, G. S., Brar, R. S., Singh, B., Dhaliwal, A. S. and Jand, S.K.: Outbreak of mycotic tracheitis in domestic fowl. *Mycoses* 36: 65-67 (1993).
- Smith, H. A., Jones, T. C.: Patología Veterinaria. *UTEHA*. México. D.F., (1987).
- Sutton, P., Newcombe, N. R., Waring, P. and Mullbacher, A.: *In vivo* immunosuppressive activity of gliotoxin, a metabolite produced human pathogenic fungi. *Infection and Immunity*. 1192-1198 (1994).
- Thurston, R., Cysewski, S. J. and Richard, J. L. Exposure of rabbits to spores of *Aspergillus fumigatus* or *Penicillium* sp.: survival of fungi and microscopic changes in the respiratory and gastrointestinal tracts. *Am. J. Vet. Res.* 40:10, 1443-1449 (1979).
- Turner, K. J., Papdimitriou, J., Hackshaw, R. and Wetherall. Experimenta aspergillosis in normal rats infected intravenously. *J. Retic. Soc.* 17: 300-311 (1975).

- Trigo, T. F. J.: Patología Sistémica Veterinaria. 2a. ed. *Interamericana Mc Graw. Hill* México, D.F., (1992).
- Vartivarian, S. E.: Virulence propietes and nonimmune pathogenetic mechanisms of fungi. *Clin. Infect. Dis.* 14 (Suppl 1): S30-6 (1992).
- Wilson, C. B., Tsai, V., Remington, J. S.: Failure to trigger the oxidative metabolic burst by normal macrophages: possible mechanism for survival of intracellular pathogens. *J. Exp. Med.* 151 : 328-346 (1980).

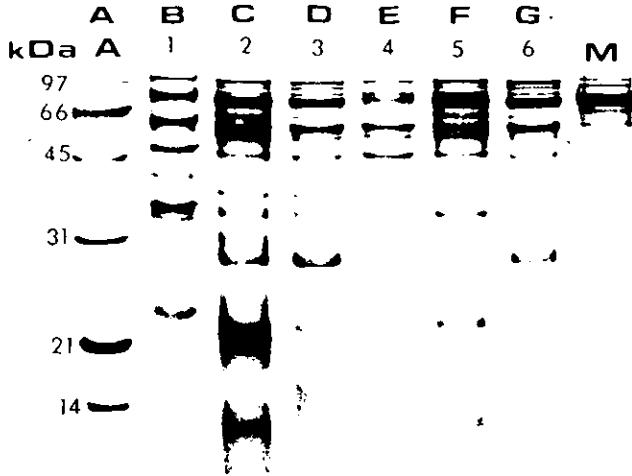


Fig. 1. Línea A, marcador de peso molecular, líneas 1-6 extractos metabólicos de las diferentes cepas de *Aspergillus fumigatus*, línea M, medio de cultivo.

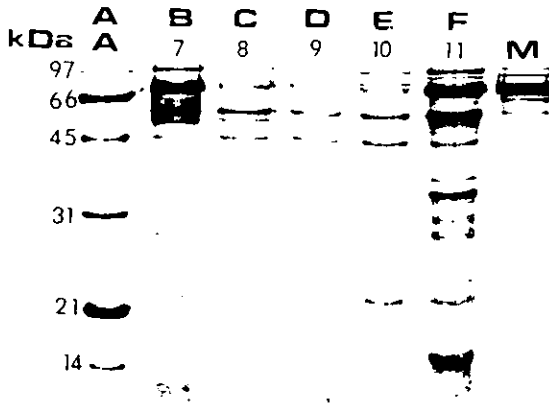


Fig. 2. Línea A, marcador de peso molecular, líneas 7-10, extractos metabólicos de las diferentes cepas de *Aspergillus fumigatus*, línea 11 - *fischeri*; línea M, medio de cultivo

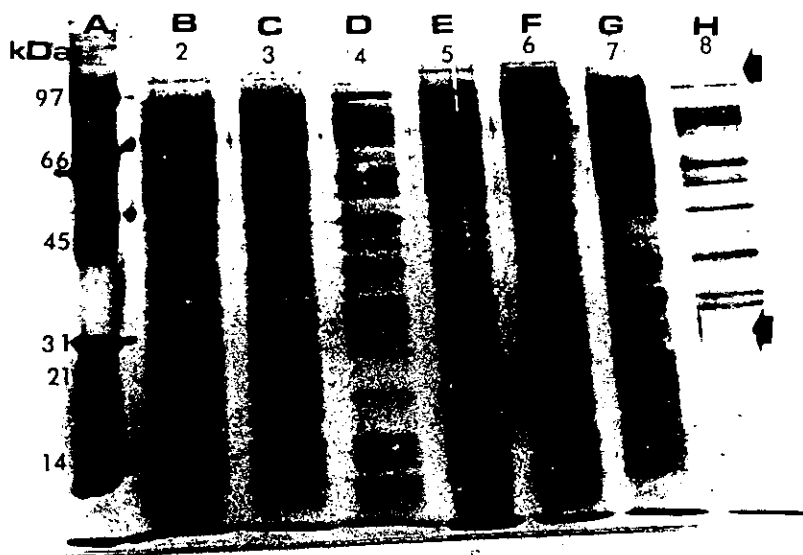


Fig. 3. Línea, marcador de peso molecular, líneas 2-8 extractos miceliales de las diferentes cepas de *Aspergillus fumigatus*, las flechas indican el rango de comparación.

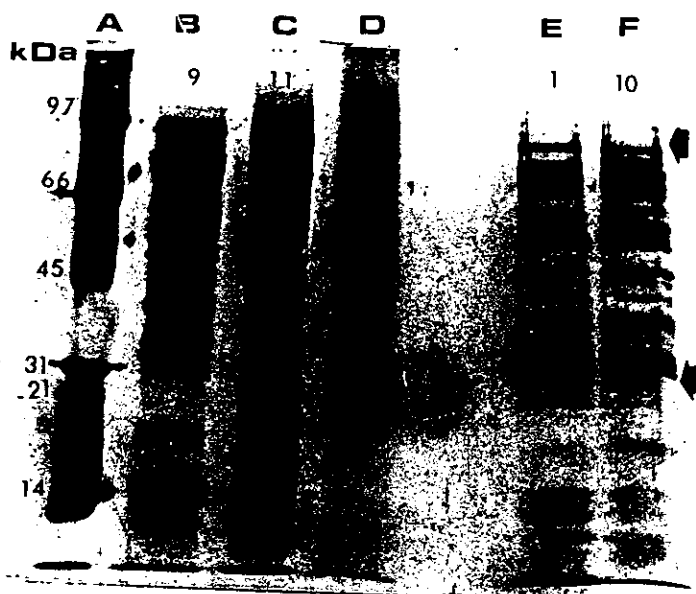


Fig. 4. Línea A, marcador de peso molecular; líneas 9, 11, 1, 10, extractos miceliales de las diferentes cepas de *Aspergillus fumigatus*, línea D, extracto micelial de *A. niger*; las flechas indican el rango de comparación.

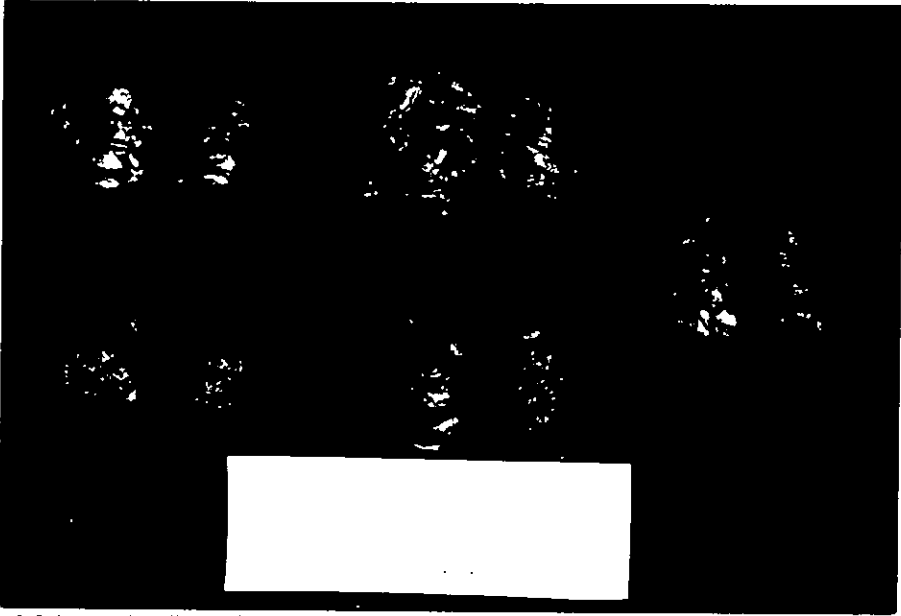


Fig.5. Pulmones de pollo desafiados a los 7 días de edad con *A. fumigatus* baja productora de gliotoxina *in vitro*, con nodulaciones granulomatosas con distribución caudo ventral (flechas).

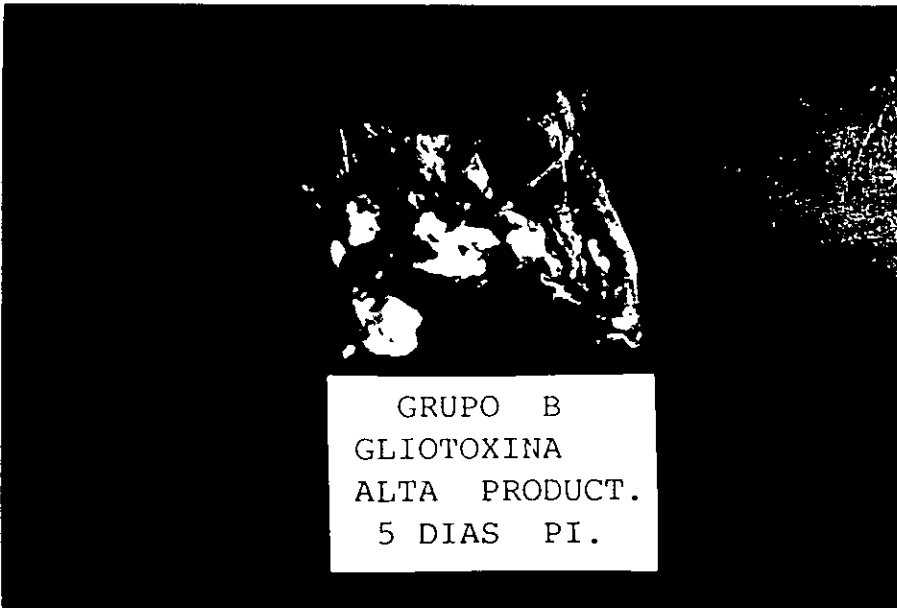


Fig. 6. Porción engrosada de la pared costal izquierda en pollo desafiado a los 7 días de edad. El engrosamiento es debido a la inflamación granulomatosa en serosa



Fig. 7. Vista lateral de la pared costal izquierda en pollo desafiado a los 7 días edad con *A. fumigatus* baja productora de gliotoxina, con inflamación granulomatosa en serosa



Fig. 8. Placas de *Aspergillus fumigatus* en tejido subcutáneo al nivel de la cara interna del muslo y parte de la pierna en ave de 14 días de edad desafiada con la cepa de *A. fumigatus* alta productora de gliotoxina *in vitro*

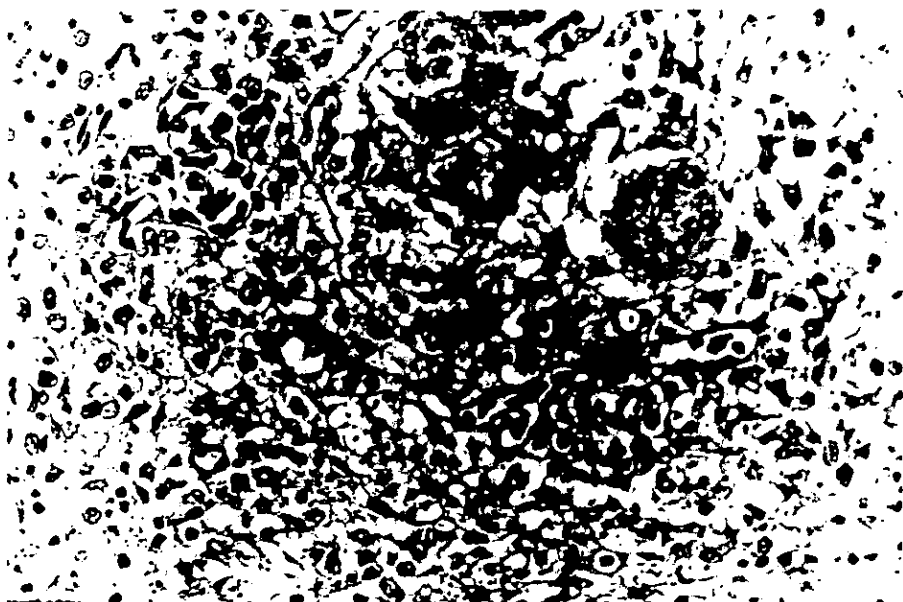


Fig. 9. Lesión tipo 1. Foco con abundantes macrófagos y células epiteloideas, algunos macrófagos han iniciado la formación de células gigantes. HE 400X

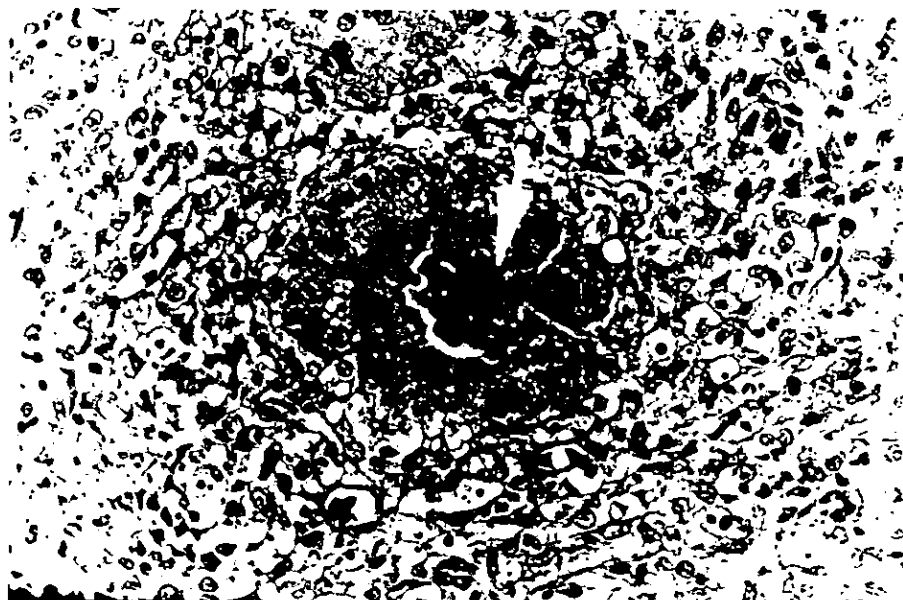


Fig. 10. Lesión granulomatosa tipo 2. Presencia de granulomas discretos sin la presencia de hifas de *Aspergillus fumigatus*. HE 400X.





Fig. 11. Lesión granulomatosa tipo 3. Granuloma con área de necrosis central y presencia de hifas de *A. fumigatus*, reacción inflamatoria y fibrosis. HE 400X

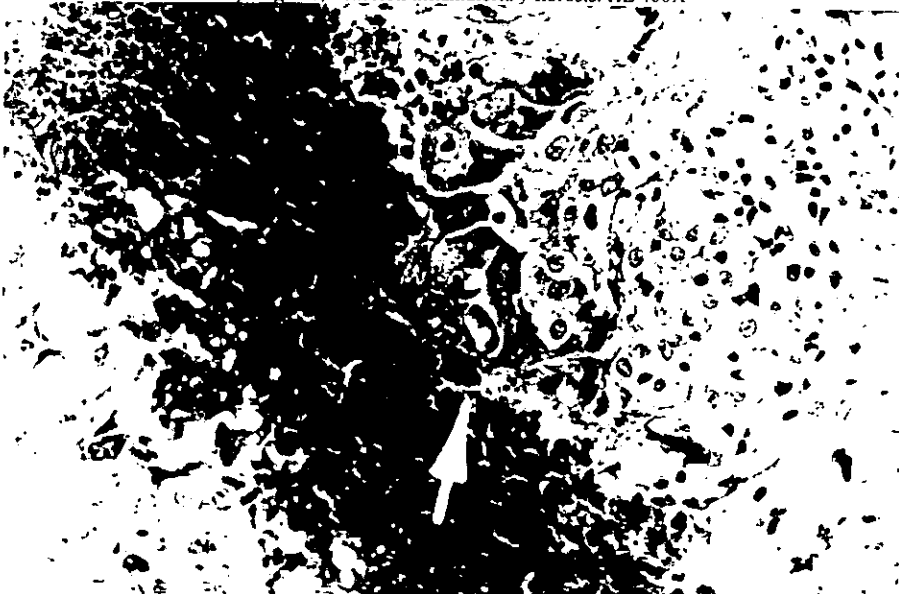


Fig. 12 . Lesión tipo 4. Coalescencia de lesiones granulomatosas, con reacción inflamatoria y fibrosis severa, abarcando más del 50% del tejido, con o sin la presencia de hifas. HE 400X.

CUADRO 1. GRUPOS, DÍA DE INOCULACIÓN, NÚMERO DE AVES INOCULADAS CON LAS CEPAS DE *A. fumigatus*<sup>1</sup> ALTA Y BAJA PRODUCTORAS DE GLIOTOXINA, GRUPO TESTIGO Y TOTAL DE AVES DESAFIADAS POR GRUPO.

GRUPOS	INOCULACIÓN (DIAS)	# AVES CON Afag <sup>a</sup>	# AVES CON Afbg <sup>b</sup>	TESTIGO <sup>c</sup>	TOTAL DE AVES
A	1	20	20	10	50
B	7	20	20	10	50
C	14	20	20	10	50
TOTAL		60	60	30	150

<sup>1</sup>(5x10<sup>6</sup> conidias / ave por vía intra saco aéreo).

<sup>a</sup>Número de aves inoculadas con la cepa de *A. fumigatus* alta productora de gliotoxina.

<sup>b</sup>Número de aves inoculadas con la cepa de *A. fumigatus* baja productora de gliotoxina.

<sup>c</sup>Grupo testigo, inoculado con 0.2 ml de solución salina fisiológica.

CUADRO 2. NÚMERO DE AVES SACRIFICADAS A LOS 5 Y 10 DÍAS POSTINOCULACIÓN.

DESAFIO (DIAS DE EDAD)	SACRIFICIO DÍA 5			SACRIFICIO DÍA 10	
	# AVES CON Afbg <sup>a</sup>	# AVES CON Afbg <sup>b</sup>	TESTIGO <sup>c</sup>	# AVES CON Afbg	# AVES CON Afbg
1	10	10	5	10	5
7	10	10	5	10	5
14	10	10	5	10	5

<sup>a</sup> Aves desafiadas con la cepa de *A. fumigatus* alta productora de gliotoxina (Afbg) y sacrificadas a los días 5 y 10 postinoculación.

<sup>b</sup> Aves desafiadas con la cepa de *A. fumigatus* baja productora de gliotoxina (Afbg) y sacrificadas a los días 5 y 10 postinoculación.

<sup>c</sup> Grupo testigo inoculado con 0.2 ml de solución salina fisiológica, sacrificado en los 5 y 10 días postinoculación.

CUADRO 3. FRECUENCIA DE LAS LESIONES PRODUCIDAS POR LAS CEPAS DE *A. fumigatus* ALTA Y BAJA PRODUCTORAS DE GLIOTOXINA

GRADO DE LESIÓN	NÚMERO DE AVES	Afag <sup>a</sup>	Afbg <sup>b</sup>
0	74	45a	29a
1	7	3c	4c
2	3	0c	3c
3	7	1c	6c
4	29	11b	18b

Valores en la misma columna con diferente literal son diferentes estadísticamente ( $P < 0.05$ ).

<sup>a</sup>Cepa de *A. fumigatus* alta productora de gliotoxina (Afag).

<sup>b</sup>Cepa de *A. fumigatus* baja productora de gliotoxina (Afbg).

0 = Ausencia de infiltrado celular inflamatorio.

1 = Infiltración focal o difusa leve de células mononucleares.

2 = Presencia de granulomas discretos sin la presencia de hifas de *A. fumigatus*.

3 = Granulomas con áreas de necrosis central y presencia de hifas de *A. fumigatus*, y fibrosis de discreta a moderada.

4 = Coalescencia de lesiones granulomatosas, fibrosis severa, abarcando más del 50 % de tejido, con o sin presencia de hifas.

CUADRO 4. CALIFICACIONES PROMEDIO DE LESIÓN EN LAS AVES INOCULADAS AL DÍA UNO, 7, Y 14 DE EDAD CON LAS CEPAS DE *A. fumigatus* ALTA Y BAJA PRODUCTORAS DE GLIOTOXINA

CEPA INOCULADA	INOCULACIÓN EN DÍAS		
	1	7	14
<sup>a</sup> Aflag	0.85a	1.05a	0.6a
<sup>b</sup> Afbg	2.55b	1.25a	1.2a

Valores dentro de la misma columna con diferente literal son diferentes estadísticamente ( $P < 0.05$ ).

<sup>a</sup> Lesión causada por la cepa de *A. fumigatus* alta productora de gliotoxina

<sup>b</sup> Lesión causada por la cepa de *A. fumigatus* baja productora de gliotoxina

CUADRO 5. \*FRECUENCIA DE AISLAMIENTO DE *A. fumigatus* A PARTIR DE TEJIDO PULMONAR EN AVES INOCULADAS CON Afag o Afbg EN DIFERENTES EDADES.

	EDAD DE INOCULACIÓN (DÍAS)		
	1	7	14
AISLAMIENTO NEGATIVO	13/40a	21/40a	23/40a
AISLAMIENTO POSITIVO	27/40b	19/40a	17 /40a

Valores en la misma columna con diferente literal son diferentes estadísticamente ( $P < 0.05$ ).

Numerador: número de aislamiento positivo o negativo/denominador: número de animales inoculados

\*No se observó aislamiento en el grupo testigo

**CUADRO 6. \*FRECUENCIA DE AISLAMIENTO DE *A. fumigatus* EN LOS MUESTREOS A 5 Y 10 DÍAS POSTINOCULACIÓN.**

	DÍAS POSINOCULACIÓN	
	5	10
AISLAMIENTO NEGATIVO	22/60a	35/60b
AISLAMIENTO POSITIVO	38/60a	25/60b

número de aislamiento positivo o negativo/ número de animales inoculados  
 Valores en el mismo renglón con diferente literal son diferentes estadísticamente  
 (P < 0. 05).

\*No se observó aislamiento en el grupo testigo

CUADRO 7. FRECUENCIA DE AISLAMIENTO DE *A. fumigatus* EN TEJIDO PULMONAR DE AVES INOCULADAS CON Afag<sup>a</sup> o Afbg<sup>b</sup>.

	Afag <sup>a</sup>	Afbg <sup>b</sup>	Total
SIN AISLAMIENTO	30a	27a	57
AISLAMIENTO	30a	33a	63

Valores en el mismo renglón con diferente literal son diferentes estadísticamente (P < 0. 05).

<sup>a</sup>Cepa de *A. fumigatus* alta productora de gliotoxina *in vitro*.

<sup>b</sup>Cepa de *A. fumigatus* baja productora de gliotoxina *in vitro*

\*No se observó aislamiento en el grupo testigo



CUADRO 8. FRECUENCIA DE AISLAMIENTO DE *A. fumigatus* EN TEJIDO PULMONAR DE AVES, CON RESPECTO A LA SEVERIDAD DE LA LESIÓN HISTOLÓGICA.

GRADO DE LESIÓN	NÚMERO DE AVES	AISLAMIENTO POSITIVO	AISLAMIENTO NEGATIVO
0	74	22 a	52a
1	7	5 b	2 b
2	3	2 b	1b
3	7	6 b	1b
4	29	28 a	1b
TOTAL	120	63	57

Valores en la misma columna con diferente literal son diferentes estadísticamente ( $P < 0.05$ ).

0 = Sin lesión.

1 = Infiltración focal o difusa leve de células mononucleares.

2 = Presencia de granulomas discretos sin la presencia de hifas de *A. fumigatus*.

3 = Granulomas con áreas de necrosis central y presencia de hifas de *A. fumigatus*, y fibrosis de discreta a moderada.

4 = Coalescencia de lesiones granulomatosas, fibrosis severa, abarcando más del 50 % de tejido, con o sin presencia de hifas.

CUADRO 9. GANANCIA DIARIA DE PESO (g) EN LAS AVES INOCULADAS CON LAS CEPAS DE *A. fumigatus* ALTA Y BAJA PRODUCTORA DE GLOIOTOXINA Y GRUPO TESTIGO EN LAS 3 DIFERENTES EDADES (1, 7, 14 DÍAS DE EDAD).

TRATAMIENTO	EDAD DE INOCULACIÓN (DÍAS)		
	1	7	14
TESTIGO <sup>a</sup>	18.10 ± 1.89a	23.50 ± 3.02a	32.72 ± 4.71a
Afag <sup>b</sup>	15.35 ± 1.36a	21.71 ± 2.14a	29.57 ± 3.33a
Afng <sup>c</sup>	13.10 ± 1.3a	26.33 ± 2.14a	29.13 ± 3.33a

Medias dentro de la misma columna con distinta literal son diferentes estadísticamente ( $P < 0.05$ )

<sup>a</sup> Aves inoculadas con 0.2 ml de solución salina fisiológica

<sup>b</sup> Aves inoculadas con  $5 \times 10^6$  conidias de *A. fumigatus* alta productora de gliotoxina contenidas en 0.2 ml de solución salina fisiológica.

<sup>c</sup> Aves inoculadas con  $5 \times 10^6$  conidias de *A. fumigatus* baja productora de gliotoxina contenidas en 0.2 ml de solución salina fisiológica.

Cuadro 10. GANANCIA DE PESO DIARIO (g) DE LAS AVES INOCULADAS AL DÍA 1, 7, 14, DE ACUERDO AL GRADO DE LESIÓN.

Grado de lesión	EDAD DE INOCULACIÓN (DÍAS)		
	1	7	14
0	16.00 ± 1.10a	23.58 ± 1.65a	30.13 ± 2.39a
1	16.58 ± 3.03a	24.69 ± 4.89a	25.54 ± 10.56a
2	12.73 ± 1.51a	24.68 ± 2.95a	30.54 ± 4.98a

Medias dentro de la misma columna con distinta literal son diferentes estadísticamente (P < 0.05).

Fig. 13. Número de animales lesionados con las cepas de *A. fumigatus* alta y baja productoras de gliotoxina

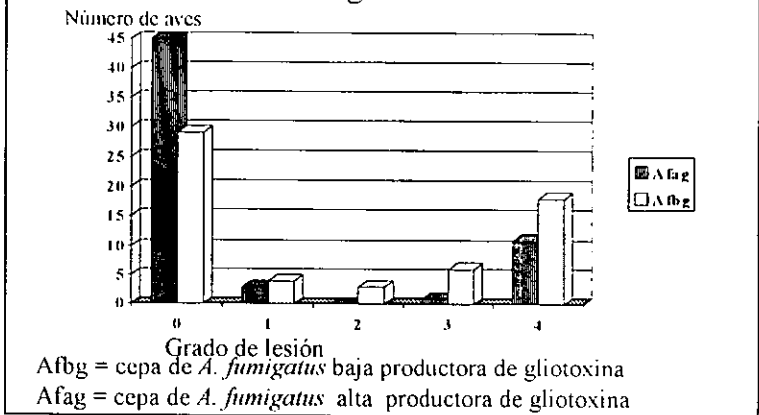


Fig. 14. Promedio de lesiones histopatológicas pulmonares en aves inoculadas con *A. fumigatus* a 1, 7 y 14 días de edad

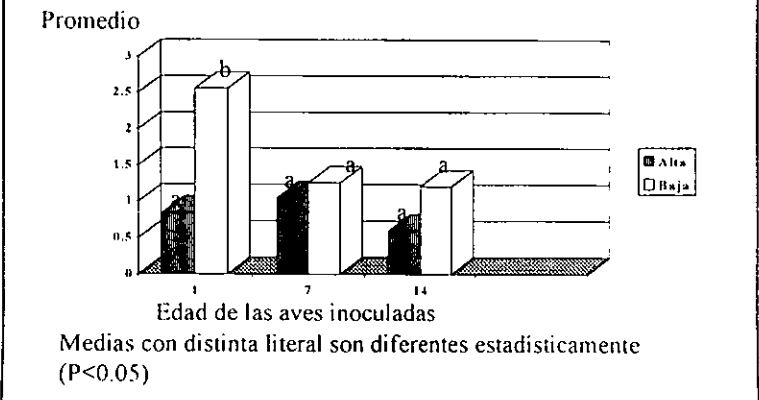


Fig. 15. Frecuencia de aislamiento de *A. fumigatus* con respecto al grado de lesión en aves de 1, 7, 14 días de edad a los 5 y 10 días postinoculación.

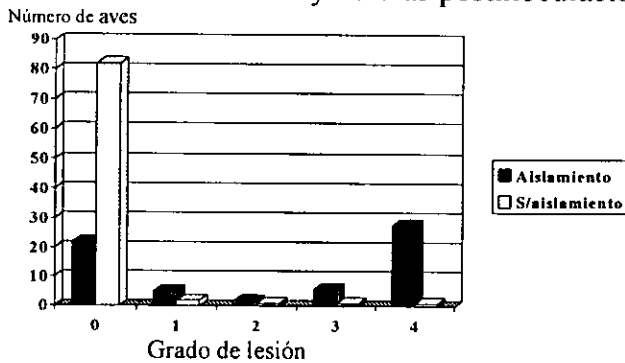
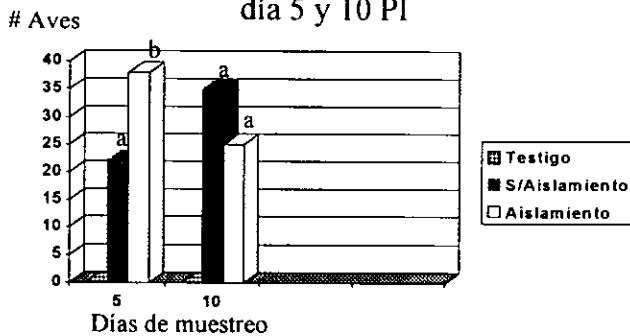
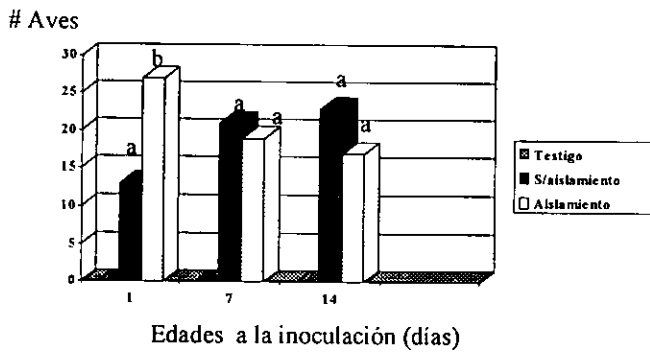


Fig. 16. Aislamiento de *A. fumigatus* de tejido pulmonar en aves en los muestreos al día 5 y 10 PI



Literales distintas denotan diferencia significativa ( $P < 0.05$ )

Fig. 17. Aislamiento de *A. fumigatus* en aves inoculadas a los días 1, 7, 14 de edad



Literales distintas denotan diferencia significativa ( $P < 0.05$ )