

44



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

"PRODUCCION DE ANTIGENO DE *Aspergillus fumigatus* PARA LA DETERMINACION DE LA ASPERGILOSIS EN BOVINOS PRODUCTORES DE LECHE EN LA CUENCA DE TIZAYUCA EN EL ESTADO DE HIDALGO".

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :

RAMON ALBERTO GONZALEZ VALDEZ

ASESOR: DR. TONATIUH A. CRUZ SANCHEZ

CUAUTITLAN IZCALLI, ESTADO DE MEXICO

2002

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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS
U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES-CUAUTITLAN



DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Producción de Antígeno de Aspergillus fumigatus para la
determinación de la Aspergilosis en bovinos productores
de leche en la cuenca de Tizayuca en el Estado de Hidalgo.
que presenta el pasante: Ramón Alberto González Valdez
con número de cuenta: 9460698-2 para obtener el título de :
Médico Veterinario Zootecnista

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

AT E N T A M E N T E

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuatitlán Izcalli, Méx. a 4 de Septiembre de 1 2002

PRESIDENTE MVZ. Gilberto Ochoa Uribe

VOCAL Dr. Tonatiuh A. Cruz Sánchez

SECRETARIO M.C. Alejandro H. Martínez R.

PRIMER SUPLENTE MVZ. Raúl Radillo Rodríguez

SEGUNDO SUPLENTE MVZ. Ma. de Lourdes Jara Ramirez

**“ EL ÉXITO “
ESTA EN ALCANZAR
LO QUE QUIERES,
“ LA FELICIDAD “
EN DISFRUTAR
LO QUE TIENES.**

E.V.O

**Agradecer a mis padres
Francisco y Ma. del Carmen
por haberme guiado por el
camino correcto, siempre los
llevaré en mi corazón.**

**A mis Hermanos Paco,
América y Carmen, por apoyarme
en todo, gracias.**

**A mis sobrinos Marco A.
Alexis y Luis, los quiero mucho.**

**A mis asesores:
Dr. Tonatiuh Cruz S.,
Prof. Amparo Londoño y
M.V.Z. Rafael Pérez G.
Por el tiempo y dedicación
En la realización de este trabajo,
Gracias.**

**A todos los Profesores de la Facultad
De Estudios Superiores Cuautitlán,
Mil gracias.**

**A todos los que me ayudaron y me
Tendieron una mano desinteresada
a través de estos años en mi carrera,
gracias.**

**A mis compañeros y amigos:
Héctor, Rocío, Jerónimo, Enrique,
Octavio, Osvaldo, Carlos
Que me ofrecieron su amistad, gracias.**

**A todos los demás compañeros
Médicos Veterinarios generación
94, gracias amigos.**

**Y sobre todo a la
Universidad Nacional Autónoma de México
Por haber hecho realidad mi sueño, gracias**

INDICE

Contenido	Página
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCION	
- Generalidades (Género <i>Aspergillus</i>)	2
- Características morfológicas	3
- Aspergilosis	4
- Hallazgos clínicos de la aspergilosis	7
- Diagnóstico.....	11
- Tratamiento.....	14
- Dot-ELISA.....	15
III. OBJETIVOS.....	18
IV. MATERIAL Y METODOS	
- Descripción de técnicas.....	19
- Diagrama de trabajo	21
- Ubicación de la zona lechera.....	23
- Prueba Dot-ELISA	24
V. RESULTADOS.....	26
VI. DISCUSIONES.....	30
VII. CONCLUSIONES.....	33
- Apéndice de reactivos.....	35
VIII. BIBLIOGRAFIA.....	36

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS.

Contenido	Pagina
- Principales estructuras morfológicas del género <i>Aspergillus</i> (Fig. 1)	6
- Corte histopatológico de pulmón con tinción Acido Peryódico de Schiff. (Fig.2).....	12
- Técnica Dot-ELISA (Fig. 3)	17
- Calendario de inoculación del antígeno de <i>A. fumigatus</i> (Tabla 1)	16
- Calendario de inoculación del antígeno de <i>A. fumigatus</i> (Tabla 1)	20
- Cepa de <i>A. fumigatus</i> (Fig. 4)	22
- Antígeno de <i>A. Fumigatus</i> (Fig. 5).....	25
- Diagrama de la prueba Dot-ELISA (Fig. 6)	27
- Resultados de la prueba Dot-ELISA (Figs. 7, 8, 9,10)	28

I. RESUMEN.

Los hongos del género *Aspergillus* se encuentran de manera natural en el medio ambiente, por lo que la convivencia y la relación con ellos es constante. Estos hongos tienen la capacidad de colonizar los tejidos de los animales domésticos provocando la enfermedad denominada aspergilosis.

Esta enfermedad es causada por numerosas especies pero especialmente por *A. fumigatus*, este hongo tiene una distribución mundial se encuentra en casi todos los mamíferos y aves domésticas así como en muchas especies salvajes.

La enfermedad en sí es principalmente una infección respiratoria que puede volverse generalizada, sin embargo la predilección por los tejidos varía de una especie animal a otra, pudiendo ocasionar infecciones pulmonares, entéricas, reproductivas o nerviosas.

La infección se debe principalmente a la inhalación de las esporas o al ingerir algún alimento contaminado además de algunos factores predisponentes como ambientes húmedos, exposición a un gran número de microorganismos o deficiencias de inmunes del hospedero, etc. hacen que contribuyan al establecimiento de la infección.

El diagnóstico de esta enfermedad es difícil y complicado se basa en el aislamiento del hongo en el laboratorio y en la observación de las hifas en los tejidos infectados, aunque existen varios inconvenientes, pero a pesar de que se han desarrollado gran cantidad de técnicas inmunológicas para el diagnóstico serológico, en la actualidad no se cuenta con antígenos específicos y estandarizados que puedan ser de utilidad para un acertado diagnóstico de la aspergilosis.

Para la evaluación de la aspergilosis en la Cuenca de Tizayuca se utilizó un antígeno de origen micelial, realizado a partir de resiembra del hongo y metodologías para su proceso, utilizando como control sueros hiperinmunes obtenidos a partir de animales inmunizados con *A. fumigatus*.

La técnica de Dot-ELISA se usó debido a que es una prueba muy sensible y precisa, además de que no requiere de un equipo muy sofisticado y de un entrenamiento técnico la cual puede ser realizada en pocas.

I. INTRODUCCION

Generalidades:

Los hongos son organismos eucariotes tienen un núcleo definido delimitado por una membrana nuclear, presentan mitocondrias y sistema endomembranoso, inmóviles. Pudiendo ser unicelulares (levaduras) o pluricelulares (hongos filamentosos) y reproducir por dos mecanismos: sexual y asexual. La temperatura óptima de crecimiento de los hongos oscila entre los 20-37°C, son altamente afines a los carbohidratos y son acidófilos (con pH óptimo de 5.6). (2,11,14,24,31,43,44,45).

Los hongos poseen diferentes características biológicas:

- * Algunos son altamente infecciosos y/o venenosos, (tanto para el hombre como a los animales y plantas).
- * Se emplean para procesos industriales de fermentación (elaboración de pan, vinos, cervezas y algunos quesos).
- * Para la producción comercial de ácidos orgánicos y de algunas preparaciones vitamínicas.
- * Elaboración de sustancias antimicrobianas o antifúngicas.
- * Se emplean como alimentos.
- * Y otros dañan materia orgánica (tejidos, alimentos, cuero, etc.).(26,43,45,46)

Se clasifican de la siguiente manera:

Reino: Fungi

División: *Myxomycota*

Clases- *Acrasiomycetes-Myxomycetes*

División: *Eumycota*

Subdivisiones: *Mastigomycotina*

Zigomycotina

Ascomycotina

Basidiomycotina

Deuteromycotina

(2,11,31).

Debido a la similitud química y genética entre los hongos y las células animales se dificulta el tratamiento de las enfermedades ocasionadas por estos microorganismos ya que se corre el riesgo de afectar a las células del hospedero.

Los hongos se diferencian entre sí por su morfología, se reproducen por medio de esporas, al germinar dan origen a una estructura tubular llamado tubo germinal, éstos crecen y dan lugar a filamentos ramificados llamados hifas, al continuar el crecimiento las hifas dan lugar a largas cadenas de células formándose los septos transversales estas hifas se le denominan septadas, pero en ocasiones estos septos no se forman y en este caso se llaman hifas no septadas o cenocíticas.

Al continuar creciendo las hifas, éstas se ramifican y forman una extensa red de filamentos a los que se les denomina micelio, pudiendo ser laxo (micelio parenquimatoso) como los hongos filamentosos ó muy compactos (micelio mesenquimatoso) como los hongos carnosos. (2,11,26,31).

Existen dos formas de reproducción en los hongos: la asexual y sexual. En la reproducción asexual o imperfecta (hongos anamorfos) no incluye la unión de núcleos, células u órganos sexuales, y en la reproducción sexual o perfecta (hongos teleomorfos) se caracteriza por la unión de dos núcleos. Existen otros hongos que presentan los dos tipos de reproducción denominándose hongos holomorfos. (2,11,26).

Existen factores de virulencia en los hongos pero han sido poco estudiados, entre los más conocidos tenemos:

- a) Las enzimas, estas actúan sobre nivel de sustrato específico.
- b) La pared celular del hongo, esto le sirve de protección frente a mecanismos de defensa del hospedero, posee alérgenos y receptores en la superficie de los hongos.
- c) Presentan dimorfismo, que es la capacidad que tienen algunos hongos de pasar de la forma filamentosa a levaduriforme evadiendo las defensas del hospedero.
- d) Tienen toxinas, llamados micotoxinas que tienen diferentes efectos en el hospedero.
- e) Presentan diversos mecanismos patogénicos, de acuerdo al tipo de agente causal. En los hongos productores de micosis lo más importante son el daño a través de exoenzimas y metabolitos diversos, produciendo una reacción inflamatoria en la zona de afección dado por la respuesta al antígeno, produciendo daño tisular o generando alergias al hospedero infectado. (26,43,45,46,48,53).

Los mecanismos de transmisión son muy diversos y numerosos, puede ser por contacto directo, penetración a través de heridas en la piel, inhalación, deglución, por contaminación por el uso de venoclisis y catéteres, sondas gástricas, sondas uretrales, etc., cuando se adquiere la micosis por alguna de estas formas se le denomina de origen exógeno.

Muchos hongos son oportunistas comensales del hombre y animales, tanto para las mucosas externas o del tracto digestivo, respiratorio, reproductivo y nervioso, cuando se desencadenan estas infecciones son llamados factores de oportunismo y en estos casos las infecciones son consideradas de origen endógeno.

Existen circunstancias en que las infecciones fúngicas se vuelvan sistémicas por ejemplo debido a la administración prolongada de antibióticos se provoca una disminución de la resistencia del hospedero, cambiando el balance de la microbiota y esto ocasiona la proliferación de los hongos, también el uso de radiaciones como terapias, en la aplicación de fármacos citotóxicos y en las deficiencias inmunes del hospedero.

Existen algunos factores predisponentes que contribuyen al establecimiento de la infección como producción de un foco necrótico provocado por un traumatismo, ambiente húmedo y la exposición a un gran número de microorganismos.(1,4,8,14,21,26,30,45,49).

Los mecanismos de defensa hacia los hongos son más del tipo de inmunidad celular que humoral, ya que las infecciones fungales son asintomáticas, limitadas y pudiendo ser eliminadas por el hospedero. En la mayoría de los animales y humanos expuestos o infectados por los hongos desarrollan una hipersensibilidad de tipo tardío y que es detectable a nivel de laboratorio por medio de pruebas específicas que detecten al agente.

Las enfermedades causadas por los hongos usualmente no adquieren proporciones epidemiológicas, existen algunas excepciones como la dermatomicosis muy poco frecuentes las aspergilosis, histoplasmosis, criptococosis, coccidioidomicosis. (1,4,9, 21,28).

ASPERGILOSIS

La aspergilosis es definida de acuerdo a los distintos síndromes clínicos producidos por *Aspergillus sp.* El género *Aspergillus* fue descrito por primera vez en 1729 por P.A. Micheli, quien comprobó que la cabeza conidial de este hongo se parecía a un **aspergillum** (instrumento utilizado para dispersar agua bendita). Los primeros casos de aspergilosis reportados fue en pájaros de ornato en el siglo XIX.(9).

Clasificación:

Subdivisión: *Deuteromycotina.*

Subclase: *Hyphomycetidae.*

Orden: *Moniliales.*

Familia: *Moniliaceae.*

Género: *Aspergillus.*

El *Aspergillus ssp.*, es un hongo filamentoso hialino ubicuo, productor de enfermedades causadas por numerosas especies, con una distribución mundial.

Se conocen unas 900 especies de *Aspergillus*, que Rapper y Fennell clasifican en 18 grupos, de los cuales 12 se relacionan, como el *Aspergillus fumigatus* (85%), que es el que esta más difundido, *A. flavus* (5-10%), *A. niger* (2-3%), *A. versicolor*, *A. nidulans*, *A. glaucus*, *A. clavatus*, *A. cervinus*, *A. candidus*, *A. flavipes* y *A. ustus*. Está clasificación se basa en las siguientes características morfológicas del hongo: tamaño y forma de las cabezas conidiales, morfología de los conidióforos, filídes y métulas.

En la siguiente figura se muestra las principales estructuras morfológicas del género *Aspergillus*. Fig. 1.

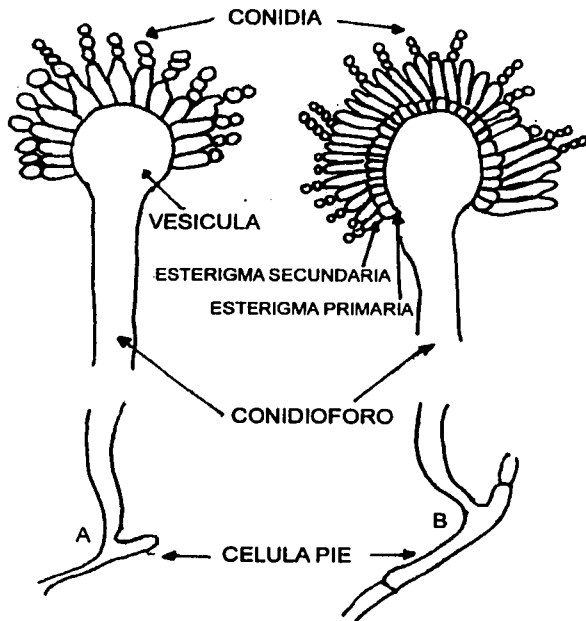


Figura 1. Aspectos morfológicos de un conidióforo de *Aspergillus*.

Las especies del género *Aspergillus* son mohos formados por hifas septadas, que nacen en conidióforos, ramificaciones de hifas que se originan a partir de una célula basal del micelio vegetativo y terminan en una vesícula ensanchada, éstas se encuentran cubiertas por una o varias capas de fialides en forma de botella del cual se originan cadenas conidiales pigmentadas, que dan lugar a las unidades de reproducción asexual. Las conidias comunican a la colonia su color característico. El *Aspergillus fumigatus* es caracterizado como la especie más patógena porque produce hemolisinas y enzimas proteolíticas. (1,2,11,21,26,31,42,45).

La enfermedad causada por *Aspergillus fumigatus* se le ha denominado Neumomicosis o Broncomicosis.(1).

Es un hongo que no tiene una distribución en particular y no tiene un periodo de incubación determinado. Sus características son: posee hifas hialinas de color verde a marrón y nitidamente septadas, conidióforos largos, que terminan en una gran vesícula en forma de clava que produce solo en su mitad superior una única hilera de esterigmas que sostienen cadenas de conidios esféricos de 2 a 3 micras y a medida que crece el conidióforo se va formando la clásica vesícula.

El *Aspergillus fumigatus* es un hongo que se considera oportunista al igual que las otras especies, ya que al penetrar al organismo provoca una baja en las defensas del hospedero.

El hábitat de este hongo está ampliamente difundido, es saprofito, es un componente habitual de la microflora de suelos, vegetales, piensos, en el agua, objetos expuestos a ambos medios y de forma secundaria en la atmósfera, el *A. fumigatus* predomina sobre los microorganismos competitivos por un mal manejo en las materias vegetales fermentadas (ensilados).

Se puede localizar en casi todas las especies de animales domésticos, silvestres y en el hombre, aunque desempeña un papel importante en la descomposición de la materia orgánica.(1,2,4,8,9,19,30,46).

Se trata principalmente de una infección respiratoria que puede hacerse generalizada, sin embargo, la predilección por los tejidos varía entre las distintas especies

La infección por aspergilosis varía, por ejemplo: en las aves de corral las infecciones pulmonares son más frecuentes, en los equinos la micosis se da en la bolsa gular; en los perros se presentan más en los tejidos nasales y paranasales; en terneros, potros cerdos y gatos se observa la infección de forma digestiva; en el hombre respiratoria y en los bovinos suceden infecciones respiratorias, problemas reproductivos y mastitis.(1,4,8,26,30,46).

La transmisión se debe principalmente a la inhalación de las esporas o conidios de los hongos diseminados por el aire o al ingerir algún alimento contaminado sin embargo puede penetrar por traumatismos cutáneos pudiendo en ese momento infectarse el hospedero. (4,8,30).

En las aves tiene lugar la transmisión a través de las incubadoras. En los bovinos las afecciones intrauterinas son consecuencia de la diseminación de infecciones subclínicas pulmonares o intestinales y en la mayoría de las mastitis producidas por la aspergilosis son consecuencia de inoculaciones intramamarias. (1,4,8,19,35).

El *A. fumigatus* es el principal organismo responsable de enfermedades tanto alérgicas, diseminadas, invasivas, en ojos, oídos, cutáneas y por colonización. Este hongo puede presentarse como saprofito de los bronquios o en superficies corporales sin provocar patología, las manifestaciones clínicas que se presentan son aspergilomas invasivos, destrucción de cavidades y cornetes nasales, sinusitis frontal y nasal son los signos de la infección por este agente. (1,4,8,26,30).

En el aspecto clínico, salvo en las aves ya que son más susceptibles, sólo se presentará en animales débiles o inmunodeprimidos. En las otras especies se presentan infecciones pulmonares diseminadas y con frecuencia puede afectar los riñones y al sistema nervioso central.(1,4,8,19,30,47).

En los rumiantes la aspergilosis puede transcurrir asintomática, presentar en forma broncopulmonar, causar mastitis, placentitis y abortar del producto. (8,30).

Se estima que un 75% de los abortos micóticos se deben al *A. fumigatus* y del 10 al 25% a hongos del orden mucorales.(43,45,47,48,56).

La patogenia de la aspergilosis en la neumonía micótica puede ser rápidamente fatal, los signos incluyen pirexia, respiración rápida, estertórea, descarga nasal y tos húmeda. Los pulmones están firmes, pesados y no se desinflan. Algunos animales presentan fiebre (40°C) lo que provoca que baje el consumo de alimento, ocasionando deshidrataciones y algunas infecciones secundarias.

En la infección pulmonar subaguda o crónica los bronquiolos y el parénquima próximo se acumula un exudado purulento, este exudado rodea a las colonias de crecimiento micelial, estos llegan a los vasos sanguíneos produciendo trombos y vasculitis. La infección también se puede extender directamente a los espacios con aire próximos, se forman granulomas y estan visibles a simple vista como nódulos blanco-grisáceos de 1 a 10 mm de diámetro, rodeado por un halo rojizo de hiperemia infiltrados por células mononucleares y fibroblastos.

Estos nódulos se desarrollan alrededor de las colonias micóticas, en la colonia de *A. fumigatus* consiste en hifas largas, ramificadas y tabicadas, rodeadas por una reacción inflamatoria de tipo granulomatoso con neutrófilos, macrófagos y restos celulares.

No se observan esporas del hongo en los tejidos infectados, conforme avanza la lesión, los macrófagos y células epiteliales se convierten en una lesión predominante, que después queda encapsulada por la proliferación de tejido conectivo, se pueden observar células gigantes que no es significativa como en otras micosis.

En la mucosa nasal y traqueal se forman colonias de mohos por encima del tejido necrosado, que está rodeado por una zona hemorrágica. (1,4,8,20,30,35,36,37,40,41,43).

La neumonía micótica va de subaguda a crónica, los pulmones contienen granulomas discretos, múltiples, la enfermedad se asemeja visualmente a la tuberculosis. Cuando no hay neumonía, las vacas infectadas generalmente no presentan signos excepto por el aborto. (8,39)

La infección por aspergilosis también ocasiona problemas de mastitis e infecciones oculares. (8,23,30,35,53).

El aborto micótico se presenta sobre todo en animales estabulados, en los países fríos o templados ocurre con más frecuencia en invierno. En general no son más de una o dos hembras del rebaño las que se afectan y abortan.

Esto puede ser a la administración de un pienso de mala calidad o un mal manejo del alimento aunado a la humedad y la estabulación que propicia la aparición de la aspergilosis en vacas preñadas. La aspergilosis puede ocasionar endometritis y dar inicio a problemas de fertilidad ocasionando el síndrome conocido como la vaca repetidora. La presencia de micotoxinas que son metabolitos fúngicos carcinogénicos muy tóxicos que minimizan las funciones inmunológicas, digestivas y hematopoyéticas, alterando las ganancias de peso, la toma del alimento, la eficiencia en la conversión alimenticia, la fertilidad masculina y femenina. En el tracto genital bovino tiene un efecto espermicida, como consecuencia de esto la fertilidad de los bovinos se ve disminuida existiendo pérdidas en las explotaciones lecheras. (8,20,22,26,30,39,41,50).

La aspergilosis pulmonar destaca ostensiblemente el aspecto cuantitativo, para reconocer la enfermedad resulta importante la práctica de la necropsia, aunque la patogenia de la enfermedad no se conoce bien, se cree que el hongo se localiza primero en los pulmones o el aparato digestivo, donde se multiplica, luego invade la placenta por vía hematogena y originar una placentitis.(8,30).

El aborto de origen micótico es consecuencia de la diseminación hematogena a los placentomas y posiblemente se deba a una respuesta a un factor de crecimiento del mismo tejido placentario, existiendo una invasión a los vasos sanguíneos por las hifas produciendo vasculitis y placentitis necrosante.

Las envolturas fetales exhiben revestimientos de color amarillo-gris, los cotiledones aumentan de volumen y aparecen profundizados en forma de cráteres de textura seca y tono de color gris-marrón. En casos graves la placenta tiene un aspecto arrugado y consistencia coriácea.

El hongo puede invadir al feto ocasionando una dermatitis y bronconeumonía, sin embargo, no ofrece por lo general signos de lesiones destacados. La retención de la placenta es común.(4,8,20,22,26,30,34,41,49).

En las infecciones en donde se involucra el órgano reproductor de las vacas se produce el aborto del producto al final del tercer tercio de gestación y si nace vivo el feto muere a las pocas horas de nacido. (1,4,5,8,20,22,30,39,41,48).

En caso de infecciones digestivas en los bovinos, se pueden encontrar afectados el omaso, rúmen, retículo y el abomaso en ese orden. Se observan áreas hemorrágicas desde unos milímetros hasta varios centímetros que pueden confluír alrededor del hongo, especialmente en la periferia de lesiones agudas se encuentra gran infiltración de neutrófilos. (4,8,30).

La identificación y diagnóstico del *Aspergillus fumigatus* es generalmente realizada al animal postmortem, otros estudios se realizan por medio de examen directo o por medios serológicos, aunque la interpretación de los resultados serológicos no resulta fácil, especialmente cuando se trata de muestras individuales de animales que han manifestado la infección hace tiempo y que pueden presentar una tasa de anticuerpos muy baja en el momento en que se realiza el análisis.

Pero al contrario, cuando estas pruebas se aplican a rebaños, es bastante probable que alguno de los animales haya adquirido la infección recientemente, presentando títulos altos fácilmente detectables.

La toma de muestra es importante para el diagnóstico de la aspergilosis, se manejan diversos tipos: expectoración, lavado bronquial, exudados, biopsias y el material se divide en dos partes uno para la observación y el otro para el cultivo, el hecho es de que los abortos bovinos o infecciones secundarias sea difícil, por ello aquí se tiene que establecer un patrón y realizar un diagnóstico diferencial entre otras infecciones.

El procedimiento habitual en un caso clínico que se sospeche de hongos es la observación directa utilizando KOH al 10%, la utilización de una tinción de Gram. o de tinta china, para observar las características hifas septadas, en estas preparaciones se presentan los conidióforos típicos, cubiertos por una vesícula expandida que lleva los conidios.

Las hifas que son separadas por el KOH hacen que las ramificaciones del hongo sean aproximadamente de 45° de abertura. Se realiza la tinción de Azul de Lacto fenol (prueba específica para la identificación de hongos) o en micro cultivo se observa al microscopio la cabeza conidial que tiene forma de hacha, se deben descartar los cultivos que resultaron negativos después de cuatro semanas.

Para el cultivo e identificación del hongo, se siembra la muestra en Agar Dextrosa Sabouraud o Agar Papa Dextrosa, adicionado penicilina y estreptomycinina e incubándose a temperatura ambiente. Al pasar 1-3 días el periodo de incubación la colonia se tornan de color blanco luego se tornan verde azulado a verde oscuro en especial en el centro de la colonia, estas son planas y aterciopeladas, al pasar los días la colonia se vuelve verde grisácea, mientras que sus bordes continúan siendo blancos.(9).

Para la mayor parte de los aspergilos la temperatura de crecimiento óptima es de 37°C. El *A. fumigatus* es una especie muy termo tolerante, puede crecer a temperaturas de 45°C.

Para el diagnóstico histopatológico es conveniente tomar las muestras de los tejidos en un lapso no mayor de 3 días, realizando los cortes y tiñendo las muestras con la técnica de Hematoxilina-Eosina y Ácido Peryódico de Schiff. (fig. 2).

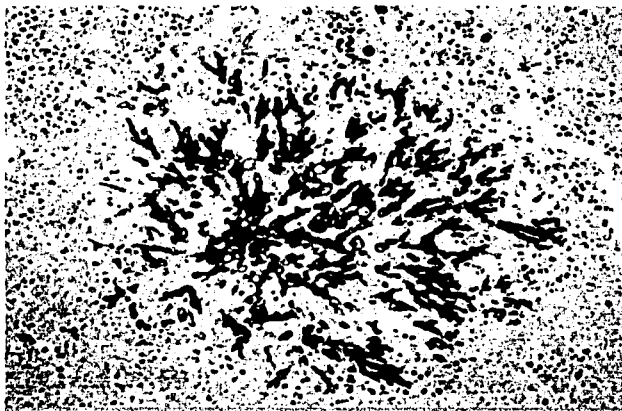


Figura 2.

Otra herramienta que podría ser de gran utilidad en el diagnóstico de la aspergilosis pulmonar son las placas de rayos X. Pero debido a que existen un sin fin de microorganismos responsables de enfermedades a nivel pulmonar, el valor diagnóstico se minimiza considerablemente.(4,8,26,30,40,42,49,56).

Las biopsias son útiles para las úlceras cutáneas y micetomas De ahí que exista la necesidad de contar con otros métodos más adecuados como los serodiagnósticos.(9).

Para el diagnóstico serológico las técnicas a realizar son de gran importancia en el reconocimiento y monitoreo de las enfermedades micóticas. Desde hace mucho tiempo los laboratorios han ido incrementando su desarrollo y aplicación. Estas pruebas se basan en la detección de la respuesta humoral del hospedero hacia la infección micótica o en la detección de algunas sustancias producidas por el hongo.

Las pruebas confiables para el diagnóstico del *A. fumigatus* son la Precipitación en tubo capilar, Inmunodifusión simple y doble, Contraelectroforesis (para detectar anticuerpos), Radioinmunoanálisis y Enzimoimmunoanálisis (ELISA) para detectar antígenos circulantes en pacientes inmunocomprometidos con aspergilosis invasiva.

Estas técnicas son muy utilizadas para el análisis semicuantitativo y sirven para obtener la concentración del antígeno o para conocer el título precipitante de un antisuero. Aunque cada técnica tiene su ventaja y desventaja.

Otra técnica que ha tomado mucho auge son los Inmunoensayos enzimáticos (ELISA), en el cual se usan anticuerpos o antígenos marcados o conjugados con enzimas, las que posteriormente se hacen reaccionar con sus sustratos específicos coloreados que al unirse a la enzima produce una coloración proporcional a la cantidad de antígeno o anticuerpo presente en la muestra problema. Existen estudios que indican que el método de ELISA es altamente sensible en comparación a las otras pruebas. (3,7,13,15,16,17,26,27,28,32,33).

Para poder establecer la etiología de la enfermedad causada por éste organismo patógeno oportunista, se requiere que el diagnóstico del laboratorio siga un protocolo estándar, con el cual se pueda demostrar la presencia de los elementos fúngicos en los tejidos, órganos y líquidos corporales.

El protocolo dentro del laboratorio clínico para la detección, cultivo e identificación se basa en la demostración directa de células micóticas en los tejidos y líquidos, el aislamiento del hongo en cultivo puro a partir de muestras múltiples y la identificación por procedimientos convencionales (observación directa en KOH, histopatología y serología).

Para el tratamiento sólo se emplea la cirugía o su caso para la aspergilosis nasal y en la queratomycosis el uso de ketoconazol, nistatina, anfotericina B, tiabendazol o la eliminación del animal. (8,9,30).

Tanto los factores limitantes para el diagnóstico etiológico de los abortos causados por el *A. fumigatus*, los ganaderos, como los veterinarios clínicos o los mismos laboratorios, tienen que ser muy concientes de las graves pérdidas económicas que ocasiona este agente a las explotaciones lecheras.

Por esta razón, la determinación del agente infeccioso en la mayoría de los casos esta por encima de las posibilidades de los laboratorios de diagnóstico y por tanto se carece de una experiencia directa al respecto.

En general, será la valoración conjunta de todos los datos obtenidos y análisis realizados, lo que permitirá establecer un diagnóstico confiable o al menos descartar otra patología.

Dot- ELISA.

El análisis inmunoenzimático (AIE) recientemente descrito en el campo biomédico, parece tener un gran potencial para ser utilizado a gran escala para el diagnóstico en la clínica veterinaria. (3,24)

Actualmente existen dos pruebas para este tipo de análisis:

- a) El AIE heterogéneo, en donde el antígeno o el anticuerpo conjugado con la enzima es separado del complejo enzima-antígeno-anticuerpo, antes de medir la actividad enzimática.
- b) El AIE homogéneo, el cual la actividad enzimática del antígeno marcado es medida de presencia del complejo antígeno-anticuerpo.

En ambos casos es posible medir antígenos o anticuerpos, el procedimiento y lectura se pueden realizar sin equipo especializado o bien puede llevarse a una compleja automatización. (3,18,28).

El análisis de la enzima ligada a un inmunoabsorbente inerte (ELISA) o Enzyme Linked Immunosorbent Assay, corresponde a un AIE heterogéneo o sea, que el antígeno o anticuerpo se fija a un soporte inerte, se hace reaccionar con el antígeno o anticuerpo correspondiente, que estará marcado con una enzima (conjugado), se lava y se mide la capacidad de hidrólisis de la enzima sobre su sustrato. Generalmente se determina el grado de transformación de un sustrato incoloro a un producto coloreado, el cual se observa a simple vista o medirse con un espectrofotómetro.

Uno de los métodos más usuales en la ELISA es el indirecto, donde el antígeno es fijado o inmovilizado en un soporte de fase sólida, se incuba con el suero que contiene el anticuerpo, se lava y se añade el conjugado (Antiglobulina conjugada con la enzima), de tal manera que reaccione contra el anticuerpo del complejo antígeno (anticuerpo primario), este se lava y se adiciona el sustrato, se mide la cantidad de sustrato degradado. (17,27,37).

El ensayo de ELISA fué introducido como método de diagnóstico muy sensible para el diagnóstico de muchas enfermedades.

Una alternativa de la fase sólida para la técnica de ELISA es el papel de Nitrocelulosa (NC), el cual tiene características de adsorción superior a otros soportes tales como el vidrio y poliestireno. Se ha reportado que la NC se usa en técnicas de Inmunotrasferencia (Inmunoblotting) cuantitativas. (3,18,28).

El papel de NC se ha usado en la técnica de ELISA para la detección y análisis de una variedad de proteínas, incluyendo inmunoglobulinas aplicadas en pequeñas cantidades, el uso de papel de NC va de diferentes formas y tamaños para la detección inmunológica de algunos patógenos humanos y de animales. Por esta razón la técnica de Dot-ELISA se usa para la detección de diversos antígenos usando como reactivos anticuerpos marcados con enzimas. (3,18,24,28,32,37).

La técnica Dot-ELISA cuenta con algunas ventajas, entre ellas es que no requiere un equipo muy sofisticado, se utiliza poca cantidad de reactivos, no requiere entrenamiento técnico, puede ser desempeñada en 4-5 hrs. por personas con poca experiencia y los reactivos son bastantes estables.

El Dot-ELISA consiste en colocar sobre membranas de NC pequeñas gotas de solución de Ag, de manera que se limita la zona de interacción a una pequeña área, luego de evaporar el diluyente, los sitios de unión de la membrana que no fijaron Ag deben ser bloqueados por incubación con una proteína inerte, no relacionada con el sistema de análisis, luego se realiza sobre las membranas una reacción inmunoenzimática, posteriormente en la última etapa se utiliza un conjugado que catalice una reacción con producción de una sustancia insoluble en el solvente utilizado. De esta forma, en la zona de sembrado de Ag se produce una coloración debida al precipitado del producto formado, la cual contrasta con el fondo del blanco de la membrana en donde no hay Ag.

La positividad de las reacciones es determinada generalmente a simple vista, aunque para algunos casos puede ser útil un reflectómetro para la cuantificación de los resultados. (3,18,24,28,32,37).

TECNICA DOT-ELISA
(Fig. 3)

1.- Inmovilización del Ag al papel de NC (fase Sólida).

2.- Bloqueo y lavado.

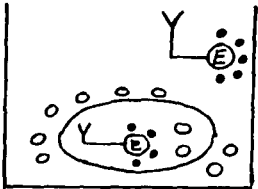
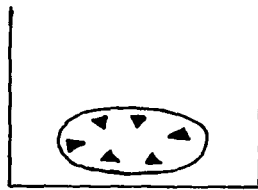
3.- Incubación con la muestra que se sospecha tiene anticuerpos en contra del Ag.

4.- Lavado para la eliminación de anticuerpos no absorbidos.

5.- Incubación con el conjugado antiglobulina-enzima.

6.- Lavado para la eliminación del exceso de conjugado.

7.- Incubación con el sustrato enzimático y detección del producto.



Grado de hidrólisis-cantidad de anticuerpo presente en la muestra.

II. OBJETIVOS.

A) Producir antígeno y antisuero de *Aspergillus fumigatus* para el uso en el diagnóstico de la aspergilosis en bovinos.

B) Determinación y detección de anticuerpos de *Aspergillus fumigatus* en sueros de bovinos productores de leche de la cuenca de Tizayuca en el Estado de Hidalgo, a través de la prueba de Dot-ELISA.

IV. MATERIAL Y METODOS

Descripción de las técnicas:

Metodologías.

a) Producción del medio de cultivo para *A. fumigatus*:

- 1.- Sembrar la cepa en Agar Dextrosa Sabouraud en las cajas petri incubando de 2 a 5 días.
- 2.- Una vez que se observa crecimiento, se prepara el medio papa-zanahoria al 20% (se prepara un kilo de papa y un kilo de zanahoria en 8 litros de agua destilada, posteriormente se retira del fuego y se macera el sobrante.
- 3.- Se filtra en una manta de cielo hasta obtener suficiente cantidad de pulpa (aprox. 4 litros).
- 4.- Posteriormente se le agrega 240 g. de caldo Dextrosa-Sabouraud y aforarlo hasta obtener 10 litros.
- 5.- Luego colocar 50 ml. del medio en botellas de cultivo.
- 6.- Esterilizar a 15 libras a 121°C por 15 minutos, dejar las botellas a temperatura ambiente para su posterior utilización.(9).

b) Antígeno de *A. fumigatus*:

- 1.- Se siembran las botellas con el medio que se preparo con anterioridad con la cepa del *A. fumigatus* obtenida de la resiembra de cada caja de microcultivo.
- 2.- Se incubará de 12 a 15 días a temperatura ambiente, observando su evolución y desarrollo.
- 3.- Al término de estos días se procederá a la recolección y cosecha del hongo, de una forma estéril se recolecta el cultivo de cada caja con una pinza sacando el hongo y colocándose en un frasco limpio y estéril, se cubre con acetona pura y se deja secar a la estufa 24 hrs. a una temperatura de 35°C.
- 4.- Una vez seca la solución, se pesa, se macera y se coloca en una solución de coca a una proporción de 10 ml por cada gramo de hongo obtenido (Solución de coca: Cloruro de sodio 9 g., Bicarbonato de sodio 2.5 g., fenol 4 g.)
- 5.- Una vez realizado esto, se filtra y se recolecta en un matraz. Se deja reposar 24hrs. y se vuelve a filtrar.
- 6.- Lo recolectado se coloca en viales estériles de color ámbar aproximadamente 5 ml. y se deja enfriar, posteriormente se hace una Cuantificación de Proteínas de Bradford, y se liofiza el líquido obtenido.(9).

c) Cuantificación rápida y sensible de proteínas por el método de Bradford.

Método con Azul de Coomassie G-250.

Reactivo solución de Azul de Brillante de Coomassie G-250.

Disolver 100 mg en 50 ml de etanol al 95%, agregar H_3PO_4 al 85% v/v a ypt.

Método micro.

1) Colocar 0.1 ml en un tubo de ensayo la solución de Proteína de Bradford contenido en 1 a 10 microgramos.

2) Agregar 1 ml del reactivo de Bradford.

3) Mezclar y hacer la lectura con el espectrofotómetro a 595 nm.

4) Para hacer la lectura se usan recipientes de 1 ml.

5) Usar 0.1 ml de agua deionizada como lectura "blanco", se utiliza el reactivo de Bradford (hacer esto por triplicado), hacer la lectura en menos de 1 h.(10).

d) Producción del antisuero contra el *A. fumigatus*:

1.- Se utilizan 6 conejos, de los cuales 4 conejos se le inoculara el antígeno, se colocarán en cada jaula 3 conejos, dos serán los controles negativos y 4 los controles positivos. El calendario de inoculación será de la siguiente manera:

(Tabla No.1).

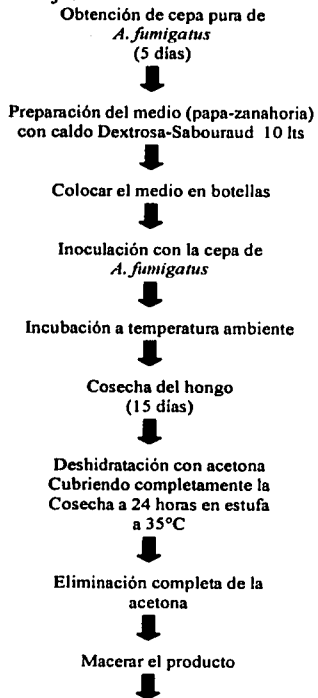
DIA	DOSES	TTA	ANTI GENO+ ADYUVANTE
0	2 ml	S.C.	<i>A. fumigatus</i> +Adyuvante de Freud
15	2 ml	S.C.	<i>A. fumigatus</i> +Adyuvante de Freud
21	2 ml	S.C.	<i>A. fumigatus</i> +Adyuvante de Freud
30	2 ml	S.C.	<i>A. fumigatus</i> + Adyuvante de Freud
35			Sangrado y sacrificado

2.- Después del día 35 se sangraran y sacrificaran los 6 conejos, los cuales se depositarán en 6 tubos de ensayo 5 ml de sangre de cada uno de los conejos

3.- Posteriormente se procede a la separación del suero mediante centrifugación a 2500 r.p.m. por 10 minutos.

4.- Separado el suero se depositarán en tubos de ensayo, se etiquetará y congelara para su posterior utilización en las pruebas serológicas.(28,37).

Diagrama general de trabajo:



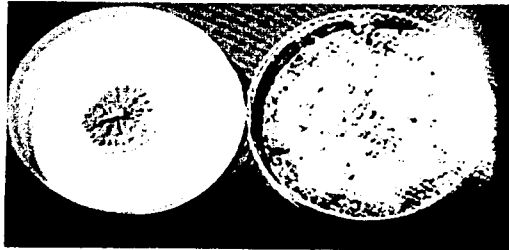
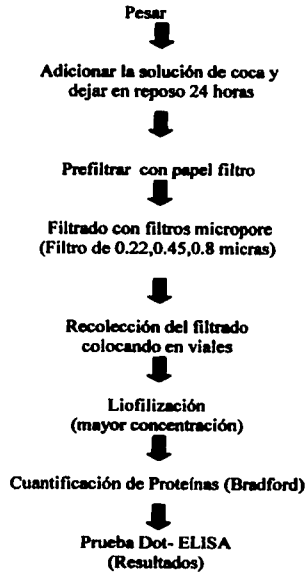


Figura 4. Cultivo de *Aspergillus fumigatus*.

Material:

- Se tomarán muestras de 100 animales bovinos productores de leche de la raza Holstein en etapa reproductiva de la Cuenca de Tizayuca, en el Estado de Hidalgo.
- 100 tubos vacutainers.
- Hielera, etiquetas y pluma indeleble.
- 100 tubos eppendorf.
- Centrifuga.
- Antígeno de *A. fumigatus*.
- Antisuero de conejo.
- Prueba de Dot-ELISA.

Aspectos geográficos de la zona donde se obtuvieron los sueros de los bovinos sospechosos de aborto.

Hidalgo, capital Pachuca, municipio de Tizayuca.

Hidalgo colinda al Norte con San Luis Potosí, Querétaro y Veracruz, al Este con Veracruz y Puebla, al Sur con Puebla, Tlaxcala y Edo. de México y al Oeste con Edo. de México y Querétaro.

Coordenadas geográficas extremas: al Norte 21° 24', al Sur 19°36' de latitud Norte, al Este 97°53' al Oeste 99°53' de longitud Oeste.

El estado de Hidalgo representa el 1.1% de superficie del territorio del país.

Tizayuca:

El porcentaje de territorio: Municipio de Tizayuca 0.37 % de superficie.

Colinda al Norte con el Edo. de México y el Municipio de Tolcayuca y al este con el Municipio de Tolcayuca y el Edo. de México, al Sur con el Edo. de México, al Oeste con el Edo. de México.

Se encuentra ubicado en el territorio nacional a latitud Norte 19°50', latitud Oeste 98°59' con una altitud (msnm) 2260.

Presenta un clima semiseco-semifrio.

Estación metereológica con el manantial (19° 51').

Temperatura anual media 14.5°C.

Precipitación anual promedio en milímetros 531.4

Agricultura: se siembra principalmente frijol, chile, maíz, alfalfa, trigo. Pastos: estrella africana, pangola, zacatón, zacate naranjita, uña de gato. Bosque: ocote rojo, encino hoja acha, mirra, oyamel, encino manzanilla.

Ganadería: principalmente Ganado bovino productor de leche y ovinos de doble propósito. La alimentación esta basada principalmente en dietas integrales como: concentrados (marcas comerciales y no comerciales), alfalfa achicalada, ensilado de maíz, paja de avena y secuestradores de micotoxinas.

Las muestras principalmente fueron tomadas de la cuenca de Tizayuca (zona productora de leche) de los ranchos 186 y 196 respectivamente.(44).

Prueba Dot-ELISA:

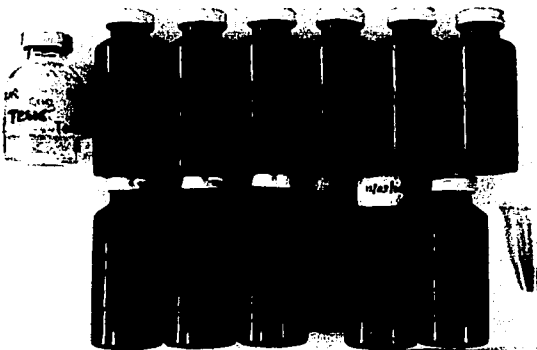
Material:

- Solución Amortiguadora salina-fosfato 0.15 M pH 7.2 (PBS)1 litro.
- Membranas de nitrocelulosa.
- Solución de Proteína A. peroxidasa diluida.
- Solución Reveladora (alfa-cloronaftol) 30 mg.
- Metanol 10 ml.
- Leche descremada al 5-10%.
- Tubos eppendorf y puntas estériles
- Placas
- Matraz Erlenmeyer 1000 ml.
- Pipetas de 1, 5 y 10 ml.
- Agitador Northeast Auto Rock Slide Rotation.
- Estufa.
- Sueros de bovino sospechoso de aspergilosis.
- Sueros control positivo (conejo).
- Sueros control negativo (conejo).
- Antígeno de *A. fumigatus* (223 microgramos/ml).

Metodología:

- 1.- Preparar la solución amortiguadora (PBS) y esterilizarla a 120°C por 15 min. a 15 libras, dejando enfriar.
- 2.- Colocar la membrana de nitrocelulosa impregnando con el antígeno, (200 microlitros del antígeno en cada pocito una vez reconstituido).

- 3.- Incubar a 30-37°C de 30 minutos a 1 hr.
- 4.- Bloquear con leche descremada (5-10%) en PBS, y en agitación por 2 hrs. Después lavar 3 veces para quitar el exceso, con una duración de 10 minutos en cada lavado.
- 5.- Agregar los sueros (dilución de 1:20) sospechosos de aspergilosis, al igual que los controles positivos y negativos e incubar mínimo 4 hrs. a temperatura ambiente.
- 6.- Después de este tiempo lavar en PBS 3 veces por 10 minutos.
- 7.- Colocar la membrana en Solución de Proteína A. peroxidasa (diluida) y mantener en agitación 2 hrs., después de este tiempo lavar 3 veces en PBS por 10 minutos.
- 8.- Revelar con el Sustrato alfa-cloronaftol 10 minutos, lavar y secar.
- 9.- Leer los resultados.



Ag. DE *A. Fumigatus*

Figura 5. Antígeno de *Aspergillus fumigatus*

V. RESULTADOS.

De las 100 muestras que se obtuvieron de los dos ranchos de Tizayuca, solamente se presentaron 4 casos de muestras positivas a anticuerpos contra *A. fumigatus*.

Aunque ningún animal presentaba algún signo o sintomatología a la enfermedad, algunas vacas presentaban problemas reproductivos, esto debido a que algunos animales eran positivos a brucela. A estos animales que eran positivos a brucela se les separaba y se les ordeñaba aparte, tratando de evitar reinfecciones por esta bacteria.

En estos ranchos se lleva un estricto control de la higiene tanto en la alimentación, en su calendario de vacunación, desparasitación, en la ordeña, en la entrada de personal y transporte que lleva el alimento.

Para una interpretación final de un resultado se necesitan observar ciertos aspectos clínicos:

Hacer una encuesta o anamnesis sobre de que tipo es la explotación (tamaño, orientación productiva, alojamientos, etc.); preguntar si se han hecho cambios recientes en la alimentación o administración de piensos, la presencia de abortos si son esporádicos o enzoóticos o no los hay.

Si los hay observar la manifestación clínica, el tiempo de gestación y otros síntomas (respiratorios, nerviosos, digestivos, etc.), si la lesiones se presentan en cotiledones y si se observan hemorragias o coloraciones diferentes, si hay lesión al feto.

Y hacer el análisis en el cual comprende el aislamiento y detección de los agentes patógenos basándonos en las sintomatologías con ayuda del laboratorio.

En el cuadro No. 1 se observa el diagrama de como se utilizó la técnica de Dot-ELISA. para las muestras de los sueros de los bovinos y ver la positividad de las reacciones (Ag-Ac), y presenciar los anticuerpos contra *A. fumigatus* en dichos sueros.

Las muestras fueron tomadas al azar entre los dos ranchos, teniendo en cuenta que las vacas muestreadas eran de diferentes edades y etapas productivas.

Al determinar proteínas en el concentrado de antígeno de *A. Fumigatus* nos dio un total de 0.267 microgramos por ml, el cual nos permitió apreciar que en este medio existen proteínas pero en menor cantidad que otros antígenos de otros laboratorios que practican con regularidad diagnósticos más precisos.



Figura 6. Esquema de resultados de la prueba de Dot-ELISA.

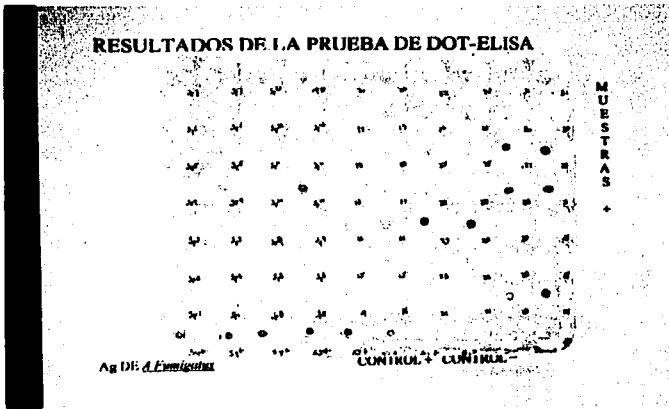


Figura 7. Placa de ELISA con los resultados positivos y negativos.

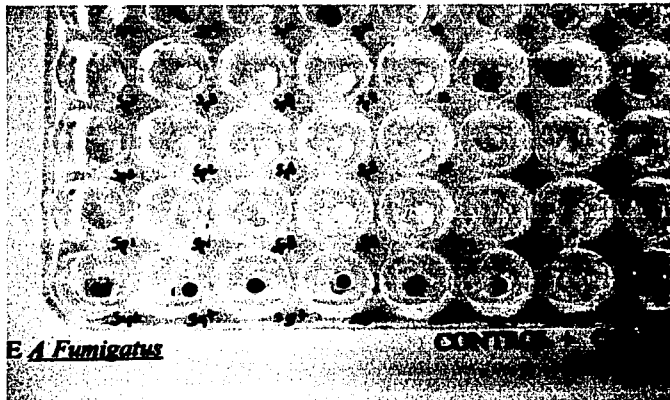


Figura 8. Pocitos de los controles positivos.

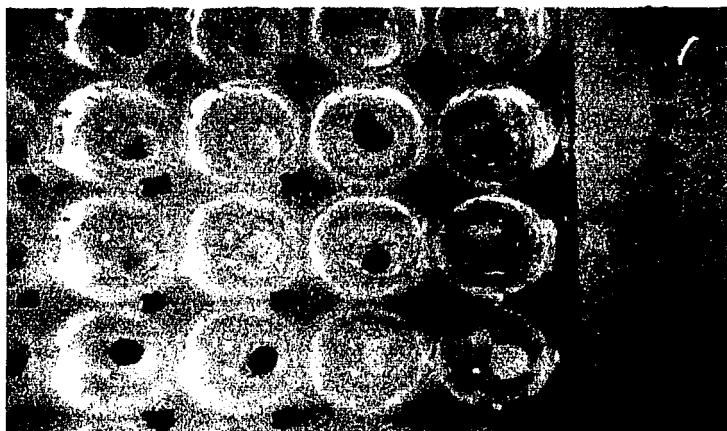


Figura 9. Acercamiento a los sueros positivos.

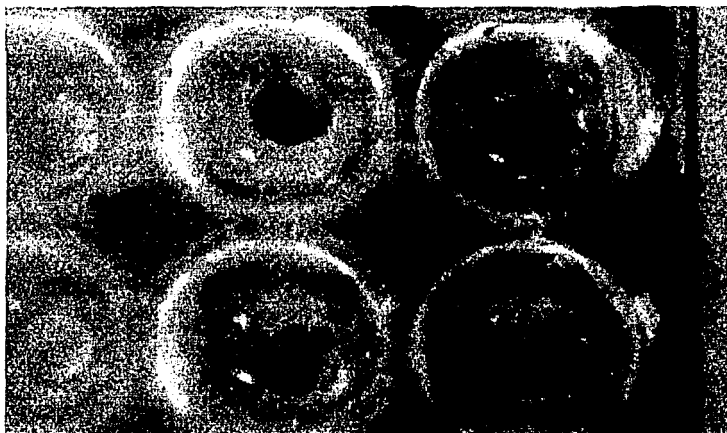


Figura 10. Pocitos con suero con reacción positiva al antígeno de *A. fumigatus*.

VI. DISCUSION.

Como se demuestra en los resultados obtenidos en este trabajo se encontró que 4 animales salieron positivos a la aspergilosis de los ranchos muestreados. Pero no existen reportes que indican que esta enfermedad sea de mucha importancia en comparación a otras enfermedades reproductivas como en el caso de Brucelosis, IBR, BVD, Leptospirosis, etc.

Algunos autores difieren mucho en la detección de la aspergilosis, ya que la identificación de este agente patógeno se relaciona con muchas enfermedades que producen infecciones tanto respiratorias, digestivas, nerviosas o reproductivas y dificultan su análisis en el laboratorio. (12,15,16,20,26).

Hay autores que reportan casos de aborto en ganado bovino por la aspergilosis, pero no rebasa la expectativa a comparación con otras etiologías abortivas (bacterianas, virales, parasitarias, nutricionales, etc.). Muchos concuerdan que el porcentaje de abortos producido por hongos es de 10 a 15 % y de esto un 2 a 3 % de incidencia por el género *A. fumigatus*. (5,20,22,34,35,38,39).

Existen diferencias de porcentaje de abortos producido por la aspergilosis en los diferentes países que manejan ganado bovino productor de leche, esto se debe a factores ambientales (mayor incidencia de frío y humedad) y factores en el manejo del alimento que se les proporciona a los animales.

Por ejemplo en algunos países europeos la presencia de la aspergilosis se observa más afectando los órganos respiratorios y reproductivos (abortos), en comparación con países asiáticos que los problemas se dan más digestivos, nerviosos y reproductivos o en algunos países americanos que la incidencia es más respiratoria y reproductiva, aunque no existen muchos datos al respecto. Por lo regular la aspergilosis se presenta más en las estaciones de otoño-invierno, aunque puede presentarse en la primavera-verano pero con una baja incidencia.(4,5,8,17,22,29,38,39,43,48).

Aunque la incidencia de la enfermedad se da más en forma respiratoria como se reporta en ciertos artículos y algunos autores solo realizaban los estudios a aquellos animales que tenían algún tipo de neumonía de origen micótico muestreando aquellos que presentaban la sintomatología clásica de la aspergilosis (bronconeumonía invasiva) basándose en el diagnóstico de la observación macroscópica (lesiones aparentes) y microscópica (observando al agente en cuestión).(7,16,17,33,35,37,40,43).

Se revisaron ciertos artículos donde describen algunos estudios que por medio de las enzimas en pacientes inmunocomprometidos se han detectado antígenos de *A. fumigatus* en aquellos que presentaban aspergilosis broncopulmonar alérgica, pero la incidencia es baja. (6,7,12).

Muchos autores describen varias formas de producir antígenos de *A. fumigatus* para ensayos experimentales, a partir de animales colocados bajo un estricto control ambiental inmunizándolos con fracciones miceliales extraídos del hongo para producir antígenos estándar, aunque cada uno difiere en la manera de producirlo, por eso no existe en el mercado un medio estandarizado para su posible uso para el diagnóstico de esta enfermedad. (6,12,15,26,28,40).

Se ha reportado en la literatura que existen varias técnicas tanto indirectas (aglutinación, fijación del complemento, inmunodifusiones, etc.) y directas (observación macro y microscópica, aislamiento, técnicas enzimáticas, etc.) para la identificación y el análisis del agente infeccioso, pero la que más a dado resultado son las pruebas enzimáticas (ELISA), que es la más específica, efectiva y sensitiva, aunque su costo se eleva por los reactivos que se utilizan.

Como se sabe que la técnica Dot-ELISA es efectiva y segura para el diagnóstico de la aspergilosis descrito este trabajo experimental, pareciendo tener un gran potencial para ser utilizado en el campo biomédico a gran escala en la clínica veterinaria. (3,7,13,18,27,31,33,36,43,47).

Es importante señalar que la mayoría de los casos reportados en la literatura, artículos y otros medios impresos sólo se refieren a casos aislados de la aspergilosis y que se manifiestan en vacas en cualquier etapa reproductiva y solamente presentando los signos clásicos, por ello no es de suma importancia por la baja frecuencia que se presenta la enfermedad en un hato lechero.

El hecho que se presentaran 4 muestras positivas en los dos ranchos, demuestra que existe la presencia de la enfermedad y que no había sido detectada hasta ahora, pudiendo ser que no se le prestaba mucha atención o falta de interés por los ganaderos a estas enfermedades producidas por hongos.

Aunque es necesario considerar que puede haber resultados falsos-positivos debido a que el suero contiene anticuerpos antimicóticos con reacción cruzada, proteína C reactiva o precipitinas. Los progresos están limitados por la carencia de antígenos estandarizados y confiables.(24,28,42).

Solamente se conocen dos agentes que hacen reacción cruzada con el *A. Fumigatus*, pero que se han descubierto en el hombre el *Histoplasmona capsulatum* y *Blastomyces dermatitidis*, aun en nuestros días en la practica de la Medicina Veterinaria no se ha podido conocer los agentes infecciosos que hacen reacción cruzada con este organismo micótico, aunque es necesario considerar la posible reacción cruzada con otros antígenos micóticos o con las otras especies de *Aspergillus* y así poder establecer la especificidad y la sensibilidad de la prueba que se utilizo en este trabajo experimental. Esta prueba se monto para uso diagnóstico en la práctica de la Medicina Veterinaria.(9,24,26,28,29,42).

VII. CONCLUSIONES.

Los sueros provenientes de bovinos productores de leche de dos ranchos muestreados de la Cuenca de Tizayuca en el Estado de Hidalgo, se pudo detectar la presencia de anticuerpos contra la aspergilosis bovina utilizando la prueba Dot-ELISA.

Esto sugiere la presencia del género *Aspergillus*, y es en parte algo importante porque no existen datos sobre la enfermedad en la Cuenca de Tizayuca, los estudios para detectarla fué en animales que no presentaban los signos clásicos de la enfermedad y por ello se complico la identificación del agente, aunque da a entender que existen algunos factores que hacen que la enfermedad no se presente como tal, sino por afecciones secundarias afectando así al hospedero.

Llegando a ciertas cuestiones que la aspergilosis que se presenta son producto de acontecimientos producidos semanas o meses y que de tal forma que la causa no puede ser detectada en el momento que llega a producirse.

Esto nos da a entender que hay una elevada presencia de este hongo y por consecuencia una contaminación en los lugares donde colocan los alimentos (silos, pesebres, etc.). Datos obtenidos del personal que trabaja en los ranchos existe un aproximado de 20,000 cabezas de ganado lechero en la Cuenca de Tizayuca y que continuamente se van rotando los animales, nos daría una incidencia de 800 vacas que pueden tener la sintomatología de la aspergilosis, pero no manifestarla, siendo positivas y tenerla toda su vida reproductiva sin darse cuenta el ganadero y/o el médico clínico.

Dado esto estaríamos hablando de un porcentaje elevado y si no se toman las medidas correctivas la incidencia por esta enfermedad pudiera aumentar y los productores tendrían cuantiosas pérdidas.

A veces no se dispone de un laboratorio de diagnóstico que haga estas pruebas específicas o no se tienen un control para tomar las muestras y se pierdan en el proceso o no se le tiene el interés, además en Medicina Veterinaria se desconoce actualmente los antígenos que hacen reacción cruzada con el *Aspergillus*.

Queda patente que existe una complejidad en el estudio de los hongos y que muchos médicos clínicos no saben dar con exactitud un diagnóstico, esto se tiene que dar con la valoración en conjunto, lo que nos permitirá establecer ciertos parámetros sobre estos organismos poco estudiados.

En la parte económica de la prueba no se cuantificó el costo por que se utilizaron los recursos existente que se tenían en ese momento y además por ser un proyecto experimental.

Por otra parte al haber detectado anticuerpos contra los antígenos de *A. fumigatus*, se demostró que la técnica enzimática de Dot-ELISA es muy sensible para la detección de la reacción Ag-Ac circulantes, por ello sería la prueba de elección para el diagnóstico de la aspegilosis.

En consecuencia resulta de gran importancia el trabajo en conjunto de los ganaderos, médicos clínicos, gobierno y laboratorios, y acercarnos a la solución de este problema que no sabemos que magnitud tiene a nivel de los ranchos lecheros en todo México.

Es por ello que se recomienda seguir con las investigaciones sobre las enfermedades producidas por los hongos, ya que existen pocos trabajos experimentales sobre todo en Veterinaria sobre esto agentes patógenos pocos comunes.

APENDICE DE REACTIVOS

Solución de Coca:

- a) Cloruro de sodio (NaCl) 9g.
- b) Bicarbonato de sodio 2.5 g.
- c) Fenol 4g.

Solución Amortiguadora PBS (0.15 M ph 7.2):

- a) Cloruro de sodio (NaCl) 8g.
- b) Cloruro de potasio (KCl) 0.2g.
- c) Fosfato de sodio dibásico anhidro 1.15g.
- d) Fosfato de potasio monobásico anhidro 0.2g.
- e) Agua destilada c.b.p. 1000 ml.

Solución reveladora:

- a) Alfa-cloronaftol 30 mg (A).
- b) Metanol 10 ml.
- c) PBS 50 ml (B).
- d) H2O2 0.05 ml (B).

Utilizar 25 ml de PBS y 0.025 ml de H2O2 que es la solución B y se le agrega 5 ml de la solución A.

VII. BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Acha N. Pedro (1990). Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. O.P. de la Salud, Organización Panamericana. 3ra ed., pags. 218-221.
- 2.- Alexopoulos C., J.; Bald H., C.; Develoryas T. (1989). Morfología de las plantas y los hongos. Ed. Ortega, Barcelona, España, pags. 678-648, 745, 763, 796-800.
- 3.- Barcenas M.,G.; Rodriguez P., C. (1990). Diagnóstico de *Actinobacillus pleuropneumiae* en cerdos utilizando el método de Dot-ELISA. Tesis FESC UNAM. Cuautitlán Izcalli, pags.17-39.
- 4.- Beer J. (1992). Enfermedades infecciosas de los animales domésticos. Ed. Acribia, Zaragoza, España, pags. 125-129.
- 5.- Black A. (1996). Animal health laboratory network, bovine abortion cases. MAF Quality Management, New Zeland, Suveillance-Wellinton, pags 4,8,9,24. Journal Veterinary Australia.
- 6.- Blanco J.,L.; García M.,E.; Kurup V.,P. (1997). Immunoreactivity of antigen extracts of *Aspergillus fumigatus* isolated from different sources. Department of Medicine, Allergy-Immunology Division, Medical College of Wisconsin, Milwaukee, USA. Revista Iberoamericana de Micología. pags. 60-62. Journal article.
- 7.- Blanco J.,L.; Guedeja M., J.; Caballero J.; García M., E. (1998). Aspergilosis: mecanismos de patogenicidad implicados y aproximación al diagnóstico de laboratorio. Departamento de Patología Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, 28040, Madrid, España. Revista Iberoamericana de Micología, pags. 1,10-15. Journal article.
- 8.- Blood D.,C. Henderson O.,M.; Arndel J., H.; Gay C.,C. (1996). Medicina Veterinaria. Ed. Interamericana, México D.F. 8ta. ed., pag. 1030.
- 9.- Bonifaz A. (1994). Micología Medica Basica. Ed. Mendez Editores. Universidad Nacional Autonoma de México. México D.F. pags. 333-347.

- 10.- Bradford M. Marion (1976). A rapid and sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Reproduction Research Laboratories, Department of Biochemistry, University of Georgia, Athens, Georgia 30602. January 29, 1976, pags. 248-254.*
- 11.- Bridge C., P.; Frisvad C., J.; Arora K., D. (1998). *Chemical Fungal Taxonomy*. Ed. Marcel Dekker Inc. New York-Basel-Hong Kong, pags., 129,131-134.
- 12.- Calera J. A. y colaboradores (1997). *Aspergillus fumigatus* antigens. Departamento de Microbiología y Genética, Instituto de Microbiología-Bioquímica de la Universidad de Salamanca, España, pags. 2699-2704. *Journal of Veterinary Medicine Series*.
- 13.- Contreras P., C. (2000). Pruebas de laboratorio de Microbiología Médica. Manual de Procedimientos de Dx en Micología Médica. " Dr. Antonio González Ochoa". O.P.S. INDRE 2000, pags. 53-55.
- 14.- Cole T., G. (1992). *The fungal spore and disease initiation in plants and animals*. Plenum Press N., pags. 461-477.
- 15.- Fernández A., M., C.; Traviezo R., F.; Martínez M., G. (1995). Evaluación de antígenos y antisueros para la utilización en el serodiagnóstico de aspergilosis. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. Diciembre 1995. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Koun", pags. 125-130.
- 16.- Fussel R. (1996). *Diagnosis of fungal infections*. Institut für Medizinische Mikrobiologie, Universität Giessen, 35392, Giessen, Germany, May 4, 1996, pags., 2,13-15. *Journal article*.
- 17.- García M., E.; Espinoza A., B., I. (1999). Diagnóstico de aborto de aspergilosis bovino por la detección de anticuerpos anti-*Aspergillus fumigatus* en suero fetal. IV Simposium Anual Avedila Lugo 25-26 Noviembre 1999, pags. 57-68.
- 18.- Hung L., S.; Martínez M., G.(1992). Evaluación de un ELISA para la detección de anticuerpos anti-*Aspergillus fumigatus*. *revista Cubana Medicina Tropical*. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Koun", pags. 215-219.

- 19.- Jawetz E.(2000). Microbiología Médica. Ed. El Manual Moderno, 16 ed., pag. 304.
- 20.- Jensen H.,E. y colaboradores. (1996). Route of infeccions in bovine aspergilosis. Laboratoire des *Aspergillus*, Institut Pasteur, 750515, Paris, France, Journal of Medical and Veterinary Mycology, pags.379-383.
- 21.- Junnean W. M.; Friedman H.,B.,M. (1995).Infeccions agents and pathogenesis (Fungal Infeccions and Inmmune responses). Plenum Press N. Y. and London, pags. 75-94.
- 22.- Keller B. y colaboradores.(1997). Abortion in cattle-micobiological findings. Landesuntersuchugsamt fur das Gesundheitswesen Nordbayern Heimerichstr 31, 90419, Nurnberg, Germany, pags. 661-668. Journal Veterinary Record.
- 23.- Khosravi A.,R.; Farahnegad Z. (1994). Identification and comparison of fungal agents in the milk of normal cows and cases with chronic and acute mastitis Tehran Farms. Department of Mycology, faculty of Veterinary Medicine, Tehran University, Iran, pags. 22-25. Journal of the Faculty of Veterinary Medicine.
- 24.- Koneman W.E. (2001). Diagnóstico Microbiológico, texto y atlas color. Ed. Médica Panamericana, 5ta ed. Marzo 2001, pags. 955-1031.
- 25.- Kozakiewicz Z. (1990). *Aspergillus* species on storeo products. International Mycological Institute, pags. 161-170.
- 26.- Legaspi M., E. (2001). Manual de Micología Médica Veterinaria. Tesis, FESC, UNAM, Cuautitlán Izcalli, Edo. de México, pags. 1, 13, 25-28.
- 27.- Lopéz M., R.; Ovejero M., C.; Calera J., A.; Puente P. (1995). *Aspergillus fumigatus* antigens. Departamento de Microbiología y Génética, Instituto de Microbiología-Bioquímica, Universidad de Salamanca, Salamanca, España, pags.,2699-2704. Revista Iberoamericana de Micología.
- 28.- Margni R. (1990). Inmunología e Inmunoquímica. Ed. Panamericana, México D.F., 4ta ed., pags. 571-586.
- 29.- Mendoza E., M., V. (1988). Producción de exudados micoticos en algunas especies del genero *Aspergillus* y su posible uso como antígenos. Tesis, FESC, UNAM, Cuautitlán Izcalli, Edo de México, pags.12-28.
- 30.- Merk C. (2000). Manual Merk de Veterinaria (Infecciones Fungales sistémicas-aspergilosis). Ed. Inc. Centrum, USA, 5ta ed., pags., 512-514.

31.- Moore L., E. (1990). Fundamentals of the fungi. Ed. Prentice Hall, Englewood Cliffs, N. Jersey 07632, 3ra ed., pags. 433,437-438.

32.- Morrilla G., A., Bautista R., C. (1986). Manual de Inmunología. Ed. Diana, México D.F., pags. 52-79.

33.- Orduña Y., G. (1986). Determinación de anticuerpos contra *Aspergillus fumigatus* en sueros de la población canina del Distrito Federal. Tesis, FESC, UNAM, Cuautitlán Izcalli, Edo de México, pags. 23-32.

34.- Pérez J., Mozor E., Chacón F., Lara M. (1996). Disseminated aspergilosis in a bovine and Immunohistochemical study. Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparada. Facultad de Veterinaria, Cordoba, España, pags. 191-196. Revista Iberoamericana de Patología.

35.- Podstatzky L.; Winter P.(1999). Mastitis caused by *Aspergillus fumigatus* in a cow: case report. Medizinischen Universitätsklinik für Klautiere den Institut Für Pathologie und Gerichtliche Veterinarmedizin, Viena, Austria, pags.274-279. Wiener Tierarztl Monatsschrift.

36.- Puslerla N.; Ossent P.; Braun U. (1996). A case of acute disseminated mycotic pneumonia in a cow. Klinik für Wiederkauer und Pferdemedizin der Universität Zurich, Winterthurestrasse 260, CH-8057 Zurich, Switzerland, pags., 189-194. Journal article.

37.- Sussdorf D.H., Cremer N.S., Garvey J.S.(1988). Methods in Immunology. Ed. The Benjamin/Cummings, Publishing Company, Advance Book Program, Reading, Massachusetts, U.S.A. 13 ed., pags. 48-73.

38.- Tegtmeier C.; Uttenthal A.; Friis N.,F.(1999). Pathological and Microbiological studies on Pneumonic lungs from Danish calves. Journal of Veterinary Medicine Series B. Copenhagen V., Denmark, pags. 693-700.

39.- Thorton R. (1995). Bovine abortion diagnoses. Batchelar Animal Health Laboratory, New Zealand, Surveillance-Wellington, pags.,4,21-22. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.

40.- Trigo T., J. (1998). Patología Sistémica Veterinaria. Ed. McGraw-Hill, México D.F., 3ra ed., pag. 75.

41.- Weber A.; Roth M.; Ewringmann T. (1997). abortion in cattle. Landesuntersuchungsamat fur das Gesundheitswesen Nordbayern Heimerischstr 31, 90419, Nuremberg, germany, pags., 661-667. Journal Mikrobiologische article.

42.- Zinsser H. (1998). Microbiología. Ed. Panamericana, 4ta reimpresión Marzo de 1998, 20va ed., pags. 1526-1531.

Paginas de Internet.

43.-<http://www.clinicasubiza.com/data/enfermedades/aspergilosisbroncopulmonaralergica>

44.- <http://www.inegi.gob.mx>.

45.- <http://www.Fungusweb.utmb.edu/mycology/glossary.html>.

46.- <http://www.latinsalud.com/inicio.htm/Temas/aspergilosis.htm>.

47.- <http://www.micol/fciennedu.uy/atlas/Deuteromycetes.htm>.

48.- <http://www.perspective.com/nature/fungi/index.html>.

49.- <http://www.seimc.es/revista/castellano/feb1999/casfeb3.htm>.

50.- <http://www.colvet.es/Burgos/aborto.htm>.

51.- http://www.seimc.es/control/revi_Mico/dermatof.htm.

52.- <http://www.ssa.gob.mx/indre/derma.htm>.

53.- <http://www.ucmp.berkeley.edu/fungi/fungi.html>.

54.- <http://www.vcm.es/info/micol/congreso.htm>.

55.- <http://www.vcm.es/info/micol/publivet.htm>.

56.- <http://www.seimc.org/control/revi-mico/pdf/aspergillus.pdf>.

