



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN PARA MICOSIS CAUSADAS
POR *Aspergillus fumigatus* EN ANIMALES.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:

JESUS ARMANDO CAMARILLO TAPIA

ASESORES:

Ph. D. ROBERTO A. CERVANTES OLIVARES
DRA. CAROLINA SEGUNDO ZARAGOZA



MÉXICO DF.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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 Papás, porque ustedes al elegirme, me dieron la oportunidad de vivir.

A ustedes les debo todo lo que ahora soy...

LOS AMO.

**A Caro, porque se que tus regaños son muestra de que me aprecias; perdón por no
hacerte caso antes.**

**A RACO, porque usted me enseñó mucho más que bacterias y HONGOS, me enseñó
un nuevo estilo de vida.**

Me siento afortunado al poder decir que con usted tengo dos Papás.

AGRADECIMIENTOS

A ti Mamá, por todo tu cariño, tu cuidado, tu comprensión, tu tiempo y porque nunca dejaste de creer en mí, apoyándome en todas y cada una de mis decisiones.

A ti Papá, mi primer superhéroe, siempre con tu carácter tan fuerte me enseñaste a nunca desistir de nada. Tú me has dado la mejor de las herencias... un oficio y una profesión.

A Caro, porque siempre estuviste dispuesta a escucharme, a darme consejos, a hacerme ver mis errores y mis aciertos. Gracias por tu amistad, tu paciencia y por enseñarme tantas cosas.

A RACO (mi Mentor), con nada podré pagarle el haberme aceptado como parte de su grupo de trabajo y mostrarme la luz del maravilloso mundo de los hongos. Gracias por todo el apoyo y todas las enseñanzas que me ha dado.

A la Dra Rodríguez (mi nueva jefecita), “fíjese bien doctora”: su amistad es invaluable para mí... y su apoyo con las bacterias, también! Con usted he pasado de los momentos más agradables de mi vida, quedándome claro que MAMÁ “CASI” SIEMPRE GANA!!!

A mis abuelos RITA y JESUS, que aunque no los conocí les agradezco el haberme regalado al mejor Papá del mundo

A mis otros abuelos “QUINTA” y GONZALO siempre tendré el mas bonito recuerdo de ambos. Abuelita, lo prometido es deuda... y ya cumplí!!!

A mis tíos JESUS, RAMONA, GONZALO y CHAVALO y a mis primos LOURDES, RAÚL y FERNANDO, sé que nos cuidan desde arriba, acá abajo todavía los extrañamos.

A mis tíos Manuel, Fidel, Licha y Tere, gracias por todo el apoyo y el cariño que me han brindado. Tío “SANTO” usted sí supo donde colocarme, gracias!!!

A mis primos Toño (el chiapaneco), Mary (my other Mom), Lupe (la negra), Sergio, Paty, Licha, Paola, Lalo, Gonza, Yolotzin (pima), Miriam, Lupe y Beto (ya somos pocos hermanito), que aunque casi no nos vemos, mucho nos apreciamos. A mis sobrinos Toñín, Ivan, Samuel, Lupita, Alan, Polín, Daniel 🧒, Danielita, Priscila, Betito, Raulín y Paquito, que pareciera que somos primos bola de igualados. Los quiero mucho mis niños!!!

A mis compañeros y amigos con los que he compartido momentos padrísimos dentro y fuera del laboratorio de micología: Ceci, Andira y Alejandro, Sara, David, Ale (mi pequeña saltamontes), Esmeralda y José Carlos. Sin olvidar a la Dra. Irma y al Dr. Ramón. Como extraño las importaciones!!!!!!

A los de microbiología: Lupita y Rosy (las secres), Dra. Ivone, Angie, Martita, Marta, Fabi, Luz Olivia, Verito Montes de Oca, Vero Rojas, Griselle, Myrna, Gaby, Beto, Rodrigo, Oscar, Lore, a los profesores, a los de la “cocina” y los que me faltaron; que agradable es formar parte de este gran departamento.

A mis amigos del CCH con los que he formado una familia: Juan, Arely, Roberto, Anabel, Arturo, Juan Carlos, Gabriel y Rutilo. Gracias por su amistad, por compartir momentos tristes y felices, por lo que somos y siempre seremos. Lo logramos Juan, TE QUIERO HERMANITO!!!

A mis amigos de la facultad: Vero, Paty, Daniel, Carlos, Joshua, Aparicio, Johanna, Flor, Cecilia P., Griselle, Rosa, Sandra, Karen, Toño, Alex y los de parranda Alberto, Alma, Deyanira, Abigail, Cristian, Karina, Magda y Angélica. Miriam gracias por tu amistad y por dejarme convivir con la criatura más hermosa de este mundo... María Fernanda, las quiero a las dos.

A mis alumnos que tanto hice sufrir, con los que aprendí muchas cosas y ahora tenemos una bonita amistad: Andrea (la conse), Gaby, Eli, Alberto, Edgar, Sofía, Tania, Pamela, Cristian, Paula, Jesús P., Eduardo, Ivon, Fabiola, Gustavo, Eliseo, Paco, Bety, Monse y Monsiux

A mi jurado: Dra. Nuria de Buen, Dr. Daniel Martínez y Dr. Fausto Reyes, gracias por su interés, compromiso y consejos.

A los animales, que aunque no hablan siempre nos dicen tantas cosas. En especial a: Oso, Rocky, Trotsky, Daisy, Enano, Peluchín, Peque, Wendy, Heidi (la chillona), Borreguita, Duquesa, Brandy (la chipotes) y a mis hijos Tacher, Tayson, Bongo (mi babas) y Jacky (como los extraño!!! Bongo, lamento el no haber podido estar contigo hasta el último momento). Si los quieren conocer se encuentran en la constelación del “canis major”. Nena, Chaparro, Tití, Borrego y Kevin, gracias por el recibimiento que siempre me dan al llegar a casa.

Al ser PUMA por convicción y UNIVERSITARIO de formación no me queda más que agradecer a mi querida FMVZ y amada UNAM el haberme dado la oportunidad de ser parte de su grandiosa historia, al permitirme aprender tantas cosas del maravilloso mundo de la veterinaria y enseñar con gusto a otras generaciones un poquito de lo que he aprendido, de corazón MIL GRACIAS.

“Nunca hay un viento favorable para quien no sabe hacia donde va”

L. Anneo Séneca

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS ESPECIALES:

A TI MARY, PORQUE LLEGASTE EN EL MOMENTO EXACTO EN QUE MI VIDA ERA UN DESASTRE, EL ESPACIO TAN GRANDE QUE HABÍA EN MI CORAZÓN SÓLO TÚ PUDISTE LLENARLO. HICISTE QUE LOS MOTIVOS PARA SEGUIR ADELANTE CON ESTE TRABAJO TOMARAN UN MAYOR AUGE, CONVIRTIÉNDOSE EN UNO DE ELLOS.

GRACIAS POR CREER Y POR SENTIRTE SIEMPRE ORGULLOSA DE MI, POR ALENTARME A SER MEJOR, POR COMPARTIR MIS ALEGRÍAS Y ALIVIAR MIS TRISTEZAS Y ENOJOS.

GRACIAS POR SER MI AMIGA, PERO SOBRE TODO GRACIAS POR EL INMENSO AMOR QUE DÍA A DÍA ME BRINDAS, POR TU ENTREGA, TU HONESTIDAD, TU PACIENCIA, TU CONFIANZA. POR ESTO Y POR TODOS LOS MOMENTOS MÁGICOS QUE HE PASADO CONTIGO... MIL GRACIAS.

TE AMO.

**“UN POCO DE AMOR PUEDE SER COMO UNA GOTTA DE AGUA QUE
DA FUERZA A LA FLOR PARA PONERSE EN PIE OTRA VEZ”**

PHIL BOSMAN

INDICE

	TEMAS	PÁGINA
	Índice de cuadros y figuras	I
	RESUMEN	II
1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Características morfológicas y fisiológicas de <i>Aspergillus fumigatus</i>	1
1.1.1	Morfología	1
1.1.2	Fisiología	2
1.2	Métodos de identificación para <i>A. fumigatus</i>	2
1.2.1	Microbiológicos	2
1.2.2	Serológicos	3
1.2.3	Moleculares	3
1.2.3.1	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	4
1.2.3.1.1	Amplificación de las regiones 18S, ITS1, 5.8S, ITS2 y 28S utilizando la técnica de PCR.	4
1.3	Manifestaciones clínicas de las micosis producidas por <i>A. fumigatus</i> en animales	5
1.3.1	Équidos	6
1.3.2	Bovinos	6
1.3.3	Ovinos y caprinos	7
1.3.4	Aves	7
1.3.5	Delfines	8
1.3.6	Caninos	8
1.4	Métodos de identificación de micosis producidas por <i>A. fumigatus</i>	9
1.4.1	Microbiológicos	9
1.4.2	Serológicos	9
1.4.2.1	Inmunodifusión doble	10
1.4.2.2	Contrainmunolectroforesis	13
1.5	Otras herramientas diagnósticas	14
1.5.1	Histopatología	14
1.5.2	Citología	15
1.5.3	Imagenología	15
	JUSTIFICACIÓN	16
	HIPÓTESIS	17
	OBJETIVOS	17
2	MATERIALES Y MÉTODOS	18
2.1	Cepas control	18
2.2	Muestras clínicas	18
2.3	Aislamiento e identificación	19
2.4	Serología	20
2.4.1	Inmunodifusión doble	20
2.4.2	Contrainmunolectroforesis	21
2.5	Extracción de ADN	22
2.6	Diseño de los iniciadores específicos para <i>A. fumigatus</i>	23
2.7	Implementación de la técnica de PCR para amplificar la región ITS 1-5.8S-ITS 2	24

3	RESULTADOS	26
3.1	Aislamiento e identificación	26
3.2	Serología	28
3.3	PCR	30
4	DISCUSIÓN	32
5	CONCLUSIONES	35
	APENDICE I. MEDIOS, SOLUCIONES Y REACTIVOS	36
	BIBLIOGRAFÍA	39

INDICE DE CUADROS

No.	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
1	Muestras clínicas de animales domésticos	18
2	Muestras clínicas de animales en cautiverio	19
3	Aislamientos de <i>A. fumigatus</i> a partir muestras clínicas de animales domésticos	26
4	Aislamientos de <i>A. fumigatus</i> a partir muestras clínicas de animales en cautiverio	26
5	Resultados de las pruebas de IDD y CIE a partir de animales domésticos	28
6	Resultados de las pruebas de IDD y CIE a partir de animales en cautiverio	28
7	Especificidad de los iniciadores Afu1F-Afu1R	30

INDICE DE FIGURAS

No.	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
1	Principales estructuras de <i>A. fumigatus</i>	2
2	Prueba de Inmunodifusión doble	10
3	Fenómeno de zona	11
4	Líneas de identidad total	12
5	Líneas de identidad parcial	12
6	Líneas de no identidad	13
7	Contrainmunolectroforesis	14
8	Técnica de Inmunodifusión doble	21
9	Técnica de Contrainmunolectroforesis	22
10	Los iniciadores se ensamblan en dirección 5'-3' para amplificar un producto de aproximadamente 350 pb	24
11	Cultivo de <i>A. fumigatus</i> en SDA de 5 días de crecimiento incubado a 30° C	27
12	Cabeza conidial característica de <i>A. fumigatus</i> . Teñido con lactofenol azul de algodón y observado a 400x.	27
13	Inmunodifusión doble	29
14	Contrainmunolectroforesis	29
15	Resultados de la reacción en cadena de la polimerasa para la identificación de <i>A. fumigatus</i> utilizando los iniciadores Afu1F-Afu1R	31

RESUMEN

JESUS ARMANDO CAMARILLO TAPIA. Métodos de identificación para micosis causadas por *Aspergillus fumigatus* en animales.

(Bajo la dirección de: Dr. Roberto A. Cervantes O. y Dra. Carolina Segundo Zaragoza)

Aspergillus fumigatus es un hongo cosmopolita, que se encuentra ampliamente distribuido en el ambiente. Es un hongo filamentoso, septado, hialino y tiene como estructura característica la presencia de una cabeza conidial. Afecta a una amplia variedad de especies animales dentro de los que se encuentran equinos, bovinos, ovinos, caprinos, felinos, caninos, cetáceos, entre otros.

Se trabajaron 154 muestras, de las cuales 108 provenían de animales domésticos y 46 de animales en cautiverio. De las muestras de animales domésticos 63 fueron sueros sanguíneos y 45 muestras para cultivo. De las muestras de animales en cautiverio se obtuvieron 33 sueros y 13 hisopos para realizar el aislamiento. A los sueros se les realizaron las pruebas de IDD y CIE, las muestras restantes se cultivaron en agar dextrosa Sabouraud. Se realizó extracción de ADN a partir de los aislamientos obtenidos y de cepas control. Se realizó una PCR a partir del ADN obtenido utilizando los iniciadores Afu1F y Afu1R (diseñados en el laboratorio de micología de la FMVZ-UNAM), los cuales se ensamblan en las regiones ITS1 e ITS2 y son específicos para *A. fumigatus*.

Del total de muestras para cultivo se obtuvieron 2 aislamientos a partir de perros y 1 a partir de un ave, sospechosos de cursar una micosis producida por *A. fumigatus*.

Del total de los sueros provenientes de animales sospechosos 8 sueros de perros y 20 sueros de delfín resultaron positivos a la presencia de Ac's contra *A. fumigatus* en las pruebas de IDD y CIE.

Se demostró que los iniciadores Afu1F y Afu1R son específicos de especie utilizando una PCR convencional, obteniendo un producto de 354 pares de bases (pb) a partir de los aislamientos obtenidos y las cepas control identificados como *A. fumigatus*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Características morfológicas y fisiológicas de *Aspergillus fumigatus*

El género *Aspergillus* fue descrito por primera vez en 1729 por *Pietro Antonio Micheli*, quien observó que la cabeza conidial de este hongo se parecía a un "aspergillum" (instrumento utilizado para dispersar agua bendita en las iglesias). Este género está integrado por hongos filamentosos que se reproducen de forma asexual y sexual. *A. fumigatus* es un hongo cosmopolita que se encuentra ampliamente distribuidos en el medio ambiente y juega un papel muy importante en el reciclaje del carbono y nitrógeno que se encuentran en el ecosistema. ^{1,2}

1.1.1 Morfología

Macroscópicamente las colonias que son crecidas en agar dextrosa Sabouraud a 30° C son circulares, planas, vellosas o aterciopeladas, blancas al comienzo y toman rápidamente un color verde grisáceo, el dorso es incoloro que, al envejecer, toma tintes amarillos o pardos. ³

Microscópicamente, *A. fumigatus* es un hongo filamentosos con conidióforos cortos (300 x 3-8 µm), de pared lisa, incoloros o ligeramente verdosos, sin tabicar y sin ramificaciones. Nacen de una célula base del micelio, ensanchándose al final en una vesícula amplia y coronada de fiálides (20 a 30 µm de diámetro), estas fiálides (6-8 µm) se presentan en una sola serie que nacen de la zona media de la cúpula vesicular y cubren parcialmente la superficie de la vesícula. Las conidias son verdes, unicelulares, redondas o seudoesféricas (2-3 µm de diámetro) formando cadenas largas que no se ramifican y permanecen unidos formando columnas (200 a 400 µm de longitud).³

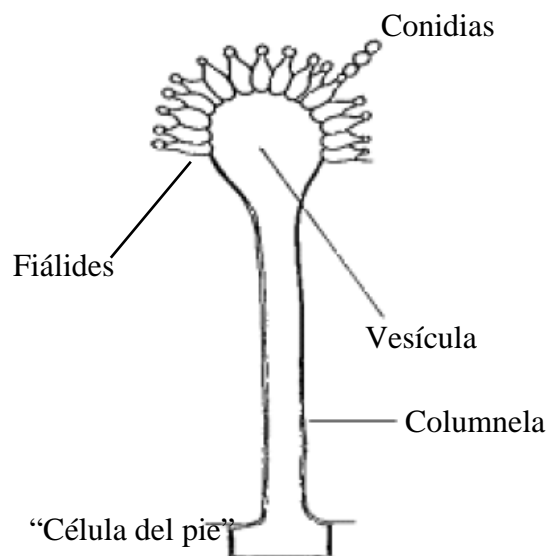


Fig. 1. Principales estructuras de *A. fumigatus*. Tomada de www.siemic.org ⁴

1.1.2 Fisiología

A. fumigatus es un saprofito cosmopolita que se ha aislado prácticamente de cualquier tipo de sustrato, especialmente del suelo y materiales orgánicos en descomposición. La especie puede responder a una variedad de cambios, incluyendo pH, cambios osmóticos y estrés oxidativo, además es termotolerante y puede crecer entre los 12 y los 57° C. Es capaz de crecer en atmósferas que contengan un 100% N y tolera atmósferas con un 10% de CO₂. Este hongo produce un importante número de metabolitos específicos que poseen efectos antibióticos y tóxicos, como esfingofunginas, espinulosina, ferricrocina, festuclavina, filostina, fumagilina, fumiclavina, fumifungina, fumigacina (o ácido helvólico), fumigatina, fomitoxinas, fomitremorgina, fusígeno, gliotoxina, tripacidina, triptoquivalinas, verrucologeno, entre otros.³

1.2 Métodos de identificación para *A. fumigatus*.

1.2.1 Microbiológicos

Para llevar a cabo la identificación de *A. fumigatus* se realiza una descripción macroscópica en donde se toma en cuenta la morfología de la colonia, el tiempo de crecimiento y el pigmento de la

colonia y del medio. Para la identificación microscópica se realiza una tinción con lactofenol azul de algodón y se observan las estructuras de reproducción. Si no se distinguen dichas estructuras, se realiza un sistema de microcultivo mediante la técnica de Ridell, descrita por Granjeno *et al.*⁵ La identificación de *A. fumigatus* basándose en métodos morfológicos requiere de un tiempo de desarrollo adecuado (5 días o más) para evaluar las características, tanto de las colonias como de las estructuras microscópicas.⁶

En ocasiones, el desarrollo de las colonias se presenta de forma atípica, observándose de un color blanco debido a la ausencia de conidiación; por lo que puede confundirse con otro hongo como *Aspergillus (Neosartorya) fisheri*.⁷

1.2.2 Serológicos

Se han utilizado pruebas de ELISA indirecta para el diagnóstico de diversas micosis en animales, sin embargo en el caso de rinitis y aspergilosis sistémica en perros estas pruebas no han resultado útiles dado que se han encontrado reacciones cruzadas entre *Penicillium* spp, *Paecilomyces* spp y *Acremonium* spp con *A. fumigatus*. También se ha utilizado una ELISA comercial para la detección de galactomanano de *Aspergillus* spp en pacientes humanos con aspergilosis invasora. La desventaja de esta prueba es que el galactomanano que detecta se comparte entre los integrantes del género *Aspergillus* y resulta difícil indicar cuál es la especie involucrada en la enfermedad.^{8,9}

1.2.3 Moleculares

La aplicación de técnicas genómicas representa uno de los avances más excitantes en el campo de la micología en los últimos años. La secuenciación de diversos genomas fúngicos, junto con la utilización de técnicas post-genómicas, prometen revolucionar los estudios de patogenia en las infecciones fúngicas. Estos estudios incluyen técnicas de genómica comparativa, enfocados a la identificación de secuencias que contribuyen a la infección, técnicas de genómica funcional y proteómica, enfocadas al análisis global de patrones de expresión de genes y proteínas implicados en la patogenia fúngica.¹⁰

Las técnicas utilizadas para estos fines incluyen: Reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el polimorfismo del ADN aleatoriamente amplificado (RAPD), polimorfismo de longitud en los fragmentos de restricción (RFLP), el análisis de microsátélites, separación electroforética de cromosomas, Southern blot con ADN ribosomal o mitocondrial, entre otras.^{11, 12, 13}

1.2.3.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Desde su desarrollo en 1985, la especificidad, sensibilidad y rapidez de esta técnica ha permitido el desarrollo de varios métodos para la investigación en diferentes microorganismos.

La técnica de PCR consiste en una amplificación exponencial de fragmentos específicos de ADN *in vitro*. Se requiere un template de ADN que contenga la región a amplificar, dos oligonucleótidos o iniciadores que amplifiquen dicha región y una ADN polimerasa termoestable; además de otros elementos necesarios para llevar a cabo la reacción. Los componentes de la PCR son mezclados y sometidos a tres pasos (lo que equivale a 1 ciclo): 1) desnaturalización, se lleva a cabo aproximadamente a 95° C y consiste en la separación de la doble cadena de ADN que utilizamos como template, 2) alineación, la temperatura baja a 55° C y en este paso los iniciadores se alinean en dirección 5´-3´ en cada una de la cadenas separadas con sus complementos y 3) la extensión, la temperatura se eleva aproximadamente a 72° C, donde se inicia la síntesis de la nueva cadena de ADN a partir de donde se ensamblaron los iniciadores. El tiempo entre cada paso varía de 30 segundos a 2 minutos. El número de ciclos puede ser de 30-40, lo que depende del ADN blanco.¹⁴

1.2.3.1.1 Amplificación de las regiones 18S, ITS1, 5.8S, ITS2 y 28S utilizando la técnica de PCR.

Estas regiones se localizan dentro del complejo de genes del ADNr. Todas las células eucariotas tienen este complejo que se repite en el genoma hasta 100 veces. La organización de este complejo en los hongos (dirección 5´-3´) comienza con la región que codifica para el gen 18S, con un tamaño aproximado de 1800 pares de bases (pb), esta región contiene secuencias tanto variables como conservadas; un espaciador transcrito interno (ITS) 1, la región codificadora del gen 5.8S con aproximadamente de 160 pb y es altamente conservado en la mayoría de los grupos de

microorganismos, una segunda región ITS (ITS2) y finalmente una secuencia que codifica para el gen 28S que tiene alrededor de 3400 pb y también contiene regiones conservadas y variables. La homología en las secuencias de los genes del ADNr de los hongos y las diferencias de los espaciadores de transcripción interna (ITS) son las bases para la organización de los hongos dentro de grupos taxonómicos.^{15, 16}

El gen 18S ha sido utilizado debido a que algunos iniciadores universales para hongos están basados en este gen, haciendo posible obtener productos de PCR a partir de muchos hongos para secuenciar, y al evolucionar relativamente más lento que las regiones ITS, lo que lo hace una región conservada, permite desarrollar pruebas para detección de grupos y géneros fungales.^{11, 12} Otros genes dentro de este complejo han sido utilizados para evaluar a los hongos a nivel molecular, estos son el 5.8S y el 28S del ADNr. La región del gen 5.8S es altamente conservado, por lo que no es apropiado para estudios filogenéticos. La región 28S ha permitido hacer comparaciones a diferentes niveles taxonómicos.¹³ La baja variabilidad de estas regiones (18S, 5.8S y 28S) ha llevado a la evaluación de nuevas regiones con el propósito de separar especies de hongos, como es el caso de las regiones ITS1 e ITS2 del ADNr. Aún no se sabe con certeza la función de las regiones ITS1 e ITS2, pero debido a la variabilidad de secuencias que poseen, se han podido utilizar para la separación tanto de géneros como de especies fungales.^{16, 17}

El uso de las regiones ITS1 e ITS2 han sido útiles para la identificación de *Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *A. flavus*, *A. nidulans*, *A. terreus*, *A. parasiticus*, *A. penicillinicoides*, *A. versicolor*, *A. wangduanlii*, *A. beijingensis*, *A. qizutongii* y *A. ustus*, así como para la diferenciación de géneros como *Candida*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Trichosporon* y *Cryptococcus*.^{13, 16, 17, 18, 19}

1.3 Manifestaciones clínicas de las micosis producidas por *A. fumigatus* en animales

Las micosis son enfermedades con manifestaciones clínicas diversas producidas por hongos, ejemplos de estas son las ocasionadas por miembros del género *Aspergillus*, y aún cuando han sido descritas más de 180 especies, *A. fumigatus* es la especie que con mayor frecuencia ha sido

reportada como el agente causal de micosis de la bolsa gútural en équidos, aborto en bovinos, mastitis en ovinos y caprinos, aspergilosis en aves, rinitis y aspergilosis diseminada en caninos y bronconeumonía en delfines.²⁰⁻²⁷ En México se ha reportado a *A. fumigatus* como el agente causal de rinitis en perros²⁸. Otras especies reportadas en estas micosis son *A. Níger*, *A. flavus*, *A. terreus* y *A. nidulans*.^{29, 30, 31}

1.3.1 Équidos

Una de las principales enfermedades en caballos producidas por *A. fumigatus* es la micosis de la bolsa gútural, de la que se conocen algunos factores predisponentes como son la mala ventilación en las caballerizas, la alta humedad y cambios en la temperatura. *A. fumigatus* al ser parte de la micota ambiental, puede colonizar regiones del cuerpo con libre circulación de aire, como son los senos paranasales y la bolsa gútural. Por lo tanto la vía de entrada es por la orofaringe durante la expiración y deglución. Anteriormente se creía que la bolsa gútural no tenía una función específica, sin embargo ahora se sabe que ayuda a enfriar la sangre de la arteria carótida interna antes de que llegue al cerebro.^{22,23}

Los signos clínicos más comunes en esta micosis son una epistaxis unilateral intermitente secundaria a la erosión gradual de las paredes de las arterias ocasionada por la formación de placas producidas por *A. fumigatus*. Se presenta una descarga nasal mucopurulenta y deficiencias neuronales, tales como disfagia y parálisis faríngea. La angioinvasión, erosión de los nervios craneales y necrosis del tejido son hallazgos patológicos comunes.^{22,23}

1.3.2 Bovinos

El aborto micótico bovino es una enfermedad que afecta a un pequeño porcentaje de animales dentro de un hato.²³

La infección de la madre ocurre por la exposición repetida a aerosoles, así como por la ingestión de heno, paja u otros alimentos contaminados con esporas. Las vías de infección de la madre al feto son: 1) a través de úlceras abomasales, alcanzando la placenta por la circulación sistémica y 2)

algunas esporas pueden pasar a través de los septos alveolares y de aquí al torrente sanguíneo, o bien teniendo como paso intermedio los canales linfáticos y posteriormente la circulación fetal.²⁵

El aborto se presenta en el último tercio de la gestación y se menciona como posible causa la liberación de sustancias tóxicas durante la germinación de las esporas, causando necrosis coagulativa acompañada de trombosis de los vasos placentarios o bien que la trombosis se produzca como un efecto mecánico debido al tamaño de las esporas, produciendo una interferencia en el suministro de oxígeno y nutrientes al feto.²⁵

1.3.3 Ovinos y caprinos

Las mastitis en estas especies están relacionadas con la errónea aplicación de antibióticos a través de cánulas intramamarias durante el período de secado.²³

Los signos de la enfermedad son pérdida de peso, fiebre, letargia, hipertrofia y endurecimiento de la glándula mamaria y zonas hemorrágicas con producción de exudado purulento. Los nódulos linfáticos regionales se encuentran aumentados de tamaño con un punteo blanquecino a su alrededor.³²

1.3.4 Aves

La aspergilosis aviar es una entidad nosológica en las aves de cría intensiva, relacionada en estos casos con situaciones de estrés y problemas de falta de higiene. Esta enfermedad no plantea excesivos problemas diagnósticos al ser muy característicos los nódulos que aparecen en los sacos aéreos. En cambio, adquiere una gran importancia cuando se trata de aves silvestres en cautiverio, con un elevado valor ecológico en la mayoría de los casos, además de económicos cuando se trata de animales dedicados a la cetrería.²⁰

Los factores predisponentes incluyen predilección de especie, condiciones ambientales (mala ventilación, exposición a toxinas resultando en una irritación de la mucosa y un exceso de humedad), inmunosupresión secundaria a una producción forzada y administración de corticosteroides.²³

La vía de entrada es por inhalación, siendo el tracto respiratorio bajo el lugar de colonización primaria. Los signos usualmente no son específicos (letargia y anorexia) y pueden ser relacionados con enfermedad respiratoria (rinitis, cambios en la vocalización y disnea). Las formas de la enfermedad que han sido reportadas incluyen aspergilomas focales, lesiones multifocales e infecciones diseminadas. Los órganos blancos son pulmones y sacos aéreos, las lesiones incluyen nódulos o placas caseosas y granulomas con áreas de necrosis que pueden ser observados con histopatología.²³

1.3.5 Delfines

La aspergilosis pulmonar es la forma predominante en estos animales. Los factores predisponentes incluyen estrés, mala nutrición, defectos inmunes, administración de corticosteroides, terapia prolongada con antibióticos, anemia, neoplasias e intoxicación.^{23,27}

Hay una predilección de *A. fumigatus* por invadir vasos sanguíneos que pueden provocar una trombosis e infarto de los órganos o tejidos afectados. En casos de aspergilosis diseminada se cree que se origina en el tracto respiratorio bajo y se disemina sistémicamente por vía linfática.²⁷

1.3.6 Caninos

La aspergilosis senonasal canina es una enfermedad que predominantemente afecta a animales de razas mesocefálica o dolicocefálica, jóvenes y activos. Se conocen otros factores predisponentes como son neoplasias, cuerpos extraños y traumatismos.²³

Los signos clínicos son secreción nasal sanguinopurulenta profusa, que alterna con períodos de epistaxis y dolor o molestia en la región facial. Otras manifestaciones son osteomielitis de los senos frontales, secreción mucopurulenta, secreción nasal poco densa, cambios radiográficos ligeros y estornudos. A menudo, en caso de enfermedad crónica, la frecuencia del reflejo de estornudar disminuye. La secreción nasal puede ser difícil de determinar, dado que el animal tiende a lamerse. Otro signo es la ulceración o pérdida de pigmentación del dorso de la nariz o de los pliegues alares.²⁹

La aspergilosis sistémica tiene como factores predisponentes el uso prolongado de antibióticos y administración de corticosteroides, lo que provoca una inmunosupresión. Suele cursar con un cuadro principalmente pulmonar o renal, siendo también frecuente que aparezca afectación de huesos y en diversas partes del organismo, produciéndose en ocasiones diseminación a sistema nervioso central. Existe la presencia de inmunoglobulinas contra el *Aspergillus*, ya que el sistema inmune tiene la capacidad de sintetizar anticuerpos.²⁰

1.4 Métodos de identificación de micosis producidas por *A. fumigatus*.

1.4.1 Microbiológicos

El diagnóstico de aspergilosis en animales debe basarse en la sospecha clínica inicial y en la posterior confirmación microbiológica.

El primer paso para procesar una muestra (hisopo, material de biopsia o tejido) es realizar un examen microscópico directo que facilitará la instauración rápida del tratamiento en caso de ser positivo. Este examen puede realizarse con hidróxido de potasio (KOH) al 20% o blanco de calcofluor para identificar la presencia de estructuras fúngicas.^{8,33}

El cultivo se realiza en agar dextrosa Sabouraud con cloranfenicol (500 mg/L) y se incuba a 30° C. Una vez detectado el crecimiento, debe procederse a la identificación en función de sus características macro y microscópicas.^{8,33} Sin embargo, un cultivo positivo no necesariamente indica enfermedad si el animal no muestra signos, ya que en individuos sanos también se puede aislar *A. fumigatus* debido a que al formar parte de la micota ambiental tiene la capacidad de colonizar las cavidades naturales con libre circulación de aire.²²

1.4.2 Serológicos

El demostrar la presencia de anticuerpos en sangre es considerado un criterio importante en el diagnóstico de aspergilosis. Una ventaja de este método es la alta especificidad y velocidad con la que se puede aplicar un tratamiento adecuado cuando la enfermedad no esta muy avanzada. Otra ventaja es la posibilidad de relacionar los valores obtenidos con la progresión o regresión de la

enfermedad, lo que permite realizar un monitoreo de la evolución del paciente. En medicina veterinaria este tipo de metodologías son sencillas y realizables, ya que en los animales, a diferencia de los humanos, las micosis producidas por *A. fumigatus* se acompañan de un incremento significativo de inmunoglobulinas del tipo IgG.⁹

En medicina humana y veterinaria se han utilizado técnicas serológicas para detectar tanto antígenos como anticuerpos contra *A. fumigatus* tales como el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), ensayo inmunoabsorbente ligado a biotina-avidina (BALISA), radio inmunoensayo, inmunofluorescencia, inmunoblotting, inmunodifusión doble (IDD) y contraelectroforesis (CIE).^{9,34,35}

1.4.2.1 Inmunodifusión doble

La técnica de IDD, también llamada prueba de Ouchterlony, se basa en el principio de que tanto el antígeno (Ag) como los anticuerpos (Ac), al ser solubles, pueden difundirse a través de un medio semisólido y se hace visible una reacción Ag-Ac mediante la formación de una línea de precipitación (Fig. 2).³⁶

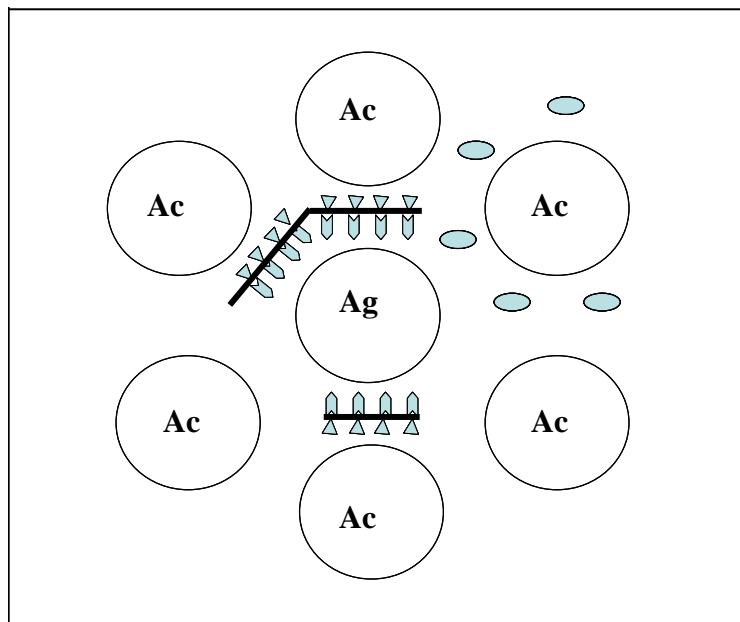


Fig. 2 Prueba de Inmunodifusión doble. Donde Ag= Antígeno y Ac= Anticuerpo. El Ag y los Ac's se difunden a través del medio y se lleva a cabo una reacción Ag-Ac, ésta se hace visible mediante la formación de una línea de precipitación.

Líneas de identidad total, corresponden a las bandas de precipitación de dos pozos contiguos, en donde las dos bandas se continúan en el punto de convergencia para formar una sola línea, interpretándose como que el Ag y el Ac que se unieron son iguales para formar la banda de precipitación (Figura 4).³⁶

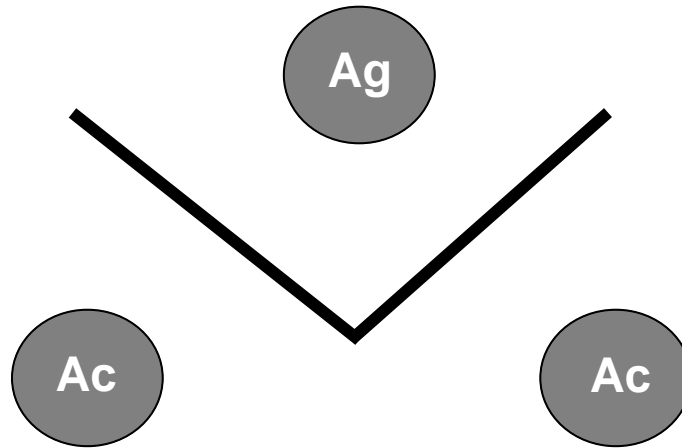


Fig 4. Líneas de identidad total. Donde Ag=Antígeno y Ac= Anticuerpo.

Líneas de identidad parcial, corresponden a las bandas de precipitación de dos pozos contiguos, en donde una de las bandas toca a la otra banda que continúa en el punto de convergencia, a la porción que continúa se la llama spur o espolón. Lo que debe interpretarse como que el Ac de una de las líneas de precipitación es muy parecido al Ac de la otra línea (Figura 5).³⁶

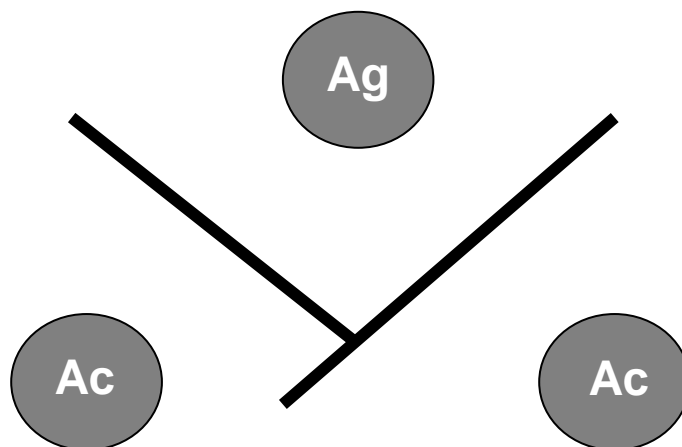


Fig 5. Líneas de identidad parcial. Donde Ag=Antígeno y Ac= Anticuerpo.

Líneas de no identidad, corresponden a las bandas de precipitación de dos pozos contiguos, en donde las dos líneas se continúan cruzándose en el punto de convergencia. Esto se interpreta como que las dos líneas de precipitación corresponden a reacciones Ag-Ac diferentes (Figura 6).³⁶

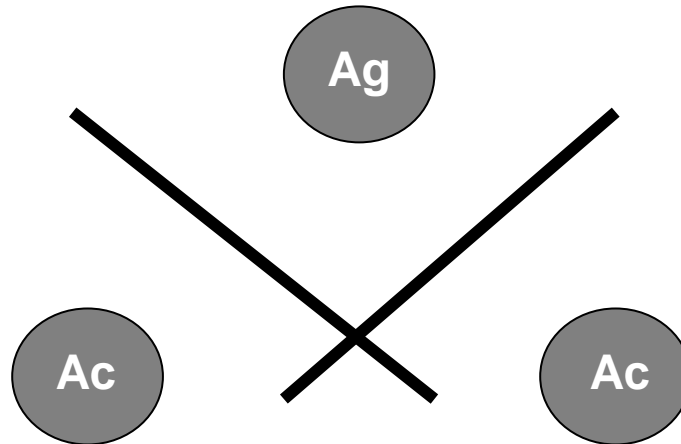


Fig 6. Líneas de no identidad. Donde Ag=Antígeno y Ac= Anticuerpo.

De igual forma la presencia de más de un línea de precipitación indica la existencia de reacciones Ag-Ac diferentes.³⁷

Esta prueba se ha realizado en medicina humana y medicina veterinaria en especies como perros y delfines para detectar Ac contra *A. fumigatus*.^{26, 30, 31, 34, 38}

1.4.2.2 Contrainmunolectroforesis

La técnica de CIE se basa en el mismo principio que la técnica de IDD, con la diferencia que el Ag y el Ac son aproximados rápidamente por medio de electroforesis (Fig. 7). La electroforesis es un procedimiento en donde se forma un circuito eléctrico con dos electrodos en una cámara conectados a una fuente de poder. La cámara contiene amortiguador veronal (solución alta en sales), que completa el circuito. Cuando se aplica un voltaje constante al sistema, se crea una corriente de paso de tal forma que los iones cargados negativamente migran en dirección al electrodo positivo y los iones cargados positivamente migran hacia el electrodo negativo. Así, el Ag migra hacia el polo negativo y los Ac hacia el polo positivo. La ventaja de la CIE es que es más rápida que la IDD. La

técnica de CIE también ha sido utilizada en medicina humana y medicina veterinaria para detectar Ac contra *A. fumigatus*.^{39,40}

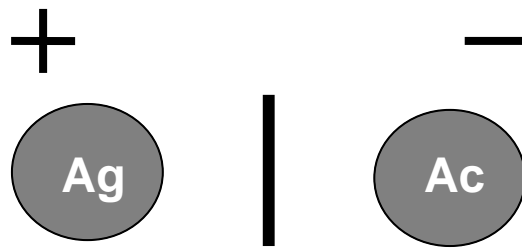


Fig. 7 Contrainmunolectroforesis. Donde Ag=Antígeno y Ac= Anticuerpo.

1.5 Otras herramientas diagnósticas

1.5.1 Histopatología

El diagnóstico histopatológico se realiza en tejidos generalmente fijados en formol al 10%, por lo que cuando se observan los hongos no existe la posibilidad de realizar un cultivo. En estos casos el empleo de anticuerpos específicos para ciertos hongos sobre cortes histológicos resulta de gran utilidad para la confirmación del diagnóstico (inmunohistoquímica).^{41,42}

En las lesiones tisulares, *A. fumigatus* aparece en forma de hifas de paredes paralelas, septadas y ramificadas de forma dicotómica, que se tiñen débilmente con la técnica de H-E (Hematoxilina-Eosina) y son positivas con las técnicas de PAS (Ácido peryódico de Schiff) o Gomori-Grocott. Además, en los tejidos donde existe una elevada tensión de oxígeno, pueden observarse conidióforos no ramificados similares a los que crecen en los medios de cultivo.⁴²

Histopatológicamente, una aspergilosis sistémica se caracteriza por la formación de lesiones nodulares, donde el centro está constituido por una zona de necrosis, en la que se pueden distinguir los elementos fúngicos, en ocasiones dispuestos en un típico patrón radial. Estas áreas de necrosis están rodeadas por una reacción inflamatoria muy variable dependiendo del curso de la infección. Así, en los cursos agudos esta reacción es muy escasa y está constituida principalmente por neutrófilos y macrófagos, acompañada por la invasión de vasos sanguíneos que da lugar a vasculitis y trombosis. En cambio, en las formas crónicas el infiltrado inflamatorio es muy abundante y está

formado por células gigantes, macrófagos, linfocitos, células plasmáticas y tejido conectivo fibroso. En estas formas crónicas los elementos fúngicos pueden adoptar formas menos típicas, presentando dilataciones terminales o formaciones bulbosas, dando en ocasiones la apariencia de pseudo hifas.⁴²

1.5.2 Citología

La imagen citológica de las micosis es particular para cada hongo. Para la identificación precisa de las estructuras micóticas es necesario tomar la muestra con un raspado, hisopado o haciendo una aspiración citológica con aguja delgada (ACAD) y realizar tinciones especiales como PAS, Gomori-Grocott, ect., ya que con estas tinciones la pared del hongo se tiñe intensamente y se aprecia como filamentos ramificados aproximadamente en 45°, gruesos y septados. Por otro lado si se realizan las tinciones de rutina (Papanicolaou, Giemsa, Diff-Quik) únicamente se pueden observar fantasmas de hifas o esporas.⁴³

1.5.3 Imagenología

El diagnóstico por imagen es un componente importante en la evaluación de animales que presentan signos de aspergilosis. En el caso de perros se ha utilizado la radiología, la tomografía computarizada y la rinoscopía.^{21, 29, 44} En el caso de delfines y otros cetáceos la broncoscopía es la técnica más utilizada.^{27, 45}

JUSTIFICACIÓN

En México, los trabajos realizados en el área de la micología veterinaria son aún pocos, en especial los problemas micóticos causados por *A. fumigatus*. Utilizar métodos de identificación fenotípica para detectar a animales con aspergilosis requieren de un mayor tiempo para conocer a la especie involucrada, por lo tanto es importante contar con métodos alternativos de identificación que nos den resultados más rápidos y certeros como son la serología y la biología molecular. Por lo que en este estudio se propuso adicionar a la identificación tradicional, la detección de anticuerpos contra *A. fumigatus* por medio de las técnicas de IDD y CIE y la confirmación de la especie involucrada mediante la técnica de PCR a partir de los aislamientos obtenidos a partir de diversas muestras clínicas de animales sospechosos de cursar una micosis producida por *A. fumigatus*.

HIPÓTESIS

Al realizar en conjunto las técnicas de aislamiento, Inmunodifusión doble (IDD) y Contrainmunolectroforesis (CIE) se identificarán animales que cursen con una micosis producida por *A. fumigatus* a partir de animales domésticos y animales en cautiverio sospechosos de aspergilosis. Además la amplificación de la región ITS1-5.8S-ITS2 por medio de la técnica de Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permitirá confirmar la identificación morfológica de *A. fumigatus*.

OBJETIVOS

- Aislar e identificar morfológicamente *A. fumigatus* de animales sospechosos de aspergilosis a partir de hisopos, material de biopsias y tejidos de perros, delfines, aves, gatos y caballos.
- Detectar anticuerpos específicos contra *A. fumigatus* realizando las pruebas de Inmunodifusión doble (IDD) y Contrainmunolectroforesis (CIE) en suero sanguíneo de perros, delfines, aves y caballos sospechosos de aspergilosis.
- Implementar la técnica de PCR para identificar *A. fumigatus*, utilizando iniciadores específicos de especie que amplifican la región ITS1-5.8S-ITS2 a partir de cepas control y de aislamientos clínicos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Cepas control

Las cepas que se utilizaron fueron *A. flavus* (ATCC 9643), *A. niger* (ATCC 6275), *A. fumigatus* A-20 (Micoteca de la Universidad de Glasgow), *Penicillium notatum* (Instituto Pasteur. París, Francia), así como *A. terreus*, *A. nidulans*, *A. parasiticus* (cepario del laboratorio de micología de la FMVZ-UNAM) y *Candida glabrata* (caso clínico).

2.2 Muestras clínicas

Se utilizaron 154 muestras, de las cuales 108 fueron de animales domésticos (Cuadro 1) y 46 de animales en cautiverio (Cuadro 2). De las muestras de animales domésticos 63 fueron sueros sanguíneos, 37 hisopos nasales, 3 lavados traqueobronquiales, 4 materiales de biopsia y 1 linfonodo. Dentro de estas muestras se incluyeron 5 sueros sanguíneos y 5 hisopos de perros clínicamente sanos. De las muestras de animales en cautiverio se obtuvieron 33 sueros y 13 hisopos (diez de espiráculo de delfín y dos de exudado nasal y uno pulmonar de ave). Estas muestras fueron proporcionadas por el laboratorio de micología a través del servicio de diagnóstico que ofrece el departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ-UNAM.

CUADRO 1. Muestras clínicas de animales domésticos.

Especie animal	MUESTRAS CLÍNICAS					TOTAL DE MUESTRAS
	SUEROS	HISOPOS	LAVADOS	TEJIDO	MATERIAL DE BIOPSIA	
PERROS	28*	34*	3	1	4	70
CABALLOS	35	2	-	-	-	37
GATOS	-	1	-	-	-	1
TOTAL DE MUESTRAS	63	37	3	1	4	108

* Incluidos 5 sueros sanguíneos y 5 hisopos de perros clínicamente sanos, tomados para ser utilizados como controles negativos.

CUADRO 2. Muestras clínicas de animales en cautiverio.

Especie animal	MUESTRAS CLÍNICAS		TOTAL DE MUESTRAS
	SUEROS	HISOPOS	
DELFINES	30	10	40
AVES	3	3	6
TOTAL DE MUESTRAS	33	13	46

2.3 Aislamiento e identificación.

Se trabajaron 58 muestras para el aislamiento, de las cuales 45 eran de animales domésticos, entre las cuales incluían: 37 hisopos, 3 lavados traqueobronquiales, 1 linfonodo y 4 materiales de biopsia. Las 13 muestras restantes eran hisopos de animales en cautiverio. Estas muestras se sembraron en agar dextrosa Sabouraud con cloranfenicol (500 mg/L) por el método de aislamiento en cultivo puro y se incubaron a 30° C durante 5 días, a las 48hrs de incubación se observó crecimiento en 3 de ellas, se les realizó un tinción con lactofenol azul de algodón para observar la morfología microscópica, al mismo tiempo se realizó un subcultivo por la técnica de punto aislado para observar la morfología colonial característica de *A. fumigatus*, además se realizaron sistemas de microcultivo seriados por medio de la técnica de Ridell, para permitir el completo desarrollo de las estructuras micóticas y facilitar su correcta identificación. La identificación se realizó con base en lo descrito en manuales de micología.³⁷

2.4. Serología

Se trabajaron con 96 sueros sanguíneos para realizarles las pruebas de IDD y CIE, de los cuales 63 fueron de animales domésticos y 33 de animales en cautiverio (Cuadros 1 y 2). Para ambas pruebas se utilizó un antígeno metabólico de *A. fumigatus* cepa A-20 proporcionado por el laboratorio de micología, como control positivo suero de perro con presencia de anticuerpos contra *A. fumigatus* y como control negativo agua destilada estéril.

2.4.1 Inmunodifusión doble

En una caja Petri de 90x15 mm se vaciaron 11ml de agar purificado con solución salina de fosfatos (PBS). Se dejó solidificar y refrigerar durante 5 minutos a 4° C. Por cada caja se hicieron 3 patrones con un pozo al centro y seis alrededor con 5 mm de diámetro cada uno, la separación de cada pozo externo al pozo central fue de 2 mm. Los pozos fueron llenados con el antígeno al centro, el control positivo, el control negativo y los sueros problema alrededor (30 µl por pozo) (Fig. 8). Por cada patrón se trabajaron 4 sueros problema, por lo tanto se realizaron 24 patrones evaluando los 96 sueros problema. Las cajas fueron colocadas en una cámara húmeda y se incubaron a temperatura ambiente durante 24, 48 y hasta 72 horas para observar la formación de bandas de precipitación. Para teñir y observar mejor las líneas de precipitación el agar se retiró de la caja de Petri y se lavó en solución salina fisiológica (SSF) por 24h. Posteriormente la solución se cambió por SSF nueva y se dejó 24h. Después, la SSF fue reemplazada por agua destilada y se dejó por 48h, estos lavados se realizaron para evitar la formación de bandas que se puedan interpretar como falsos positivos. Por último el agar fue puesto a secar a 37° C y se tiñó con solución del colorante negro de Amido.^{39, 46}

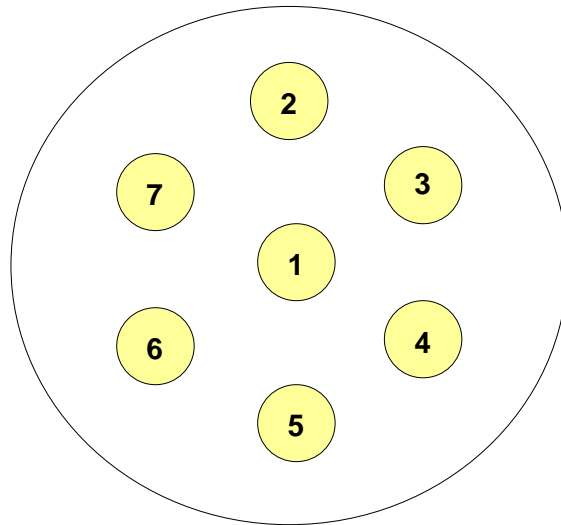


Fig. 8 Técnica de Inmunodifusión doble donde 1= Antígeno metabólico A-20, 2= control positivo, 3= control negativo, 4-7= sueros problema.

2.4.2 Contrainmunolectroforesis

En una placa de plástico de 20.5 cm x 7.5 cm, que es parte de la cámara de electroforesis, se fijaron siete portaobjetos, posteriormente se cubrieron con 40 ml de agarosa con amortiguador Veronal, se dejó solidificar y refrigerar a 4° C durante 10 minutos para obtener una firmeza adecuada. En cada portaobjetos se hicieron perforaciones paralelas en el agar de 4 mm de diámetro y con una separación de 5 mm entre cada par. Los pozos fueron llenados con 20 µl de antígeno y 20 µl de suero (Fig. 9). La placa fue colocada dentro de la cámara de electroforesis, la cual contenía 500 ml de amortiguador Veronal por cada compartimento, se colocó el antígeno hacia el polo positivo y los sueros hacia el polo negativo. Fue colocado un fragmento de tela tipo pellón entre la agarosa y el amortiguador para completar el circuito. Se aplicó una corriente de 200 mA durante 50 minutos. La placa fue enfriada a 4° C por 15 minutos para observar las líneas de precipitación. Los portaobjetos se retiraron (individualmente) del soporte de plástico y se lavaron en solución salina fisiológica (SSF) por 24h. Posteriormente la solución se cambió por SSF nueva y se dejó 24h. Después, la SSF fue reemplazada por agua destilada y se dejaron las placas por 48h, estos lavados se realizaron para

evitar la formación de bandas que se puedan interpretar como falsos positivos. Por último las placas se secaron a 37° C y se tiñeron con solución del colorante negro de Amido.^{39, 46}

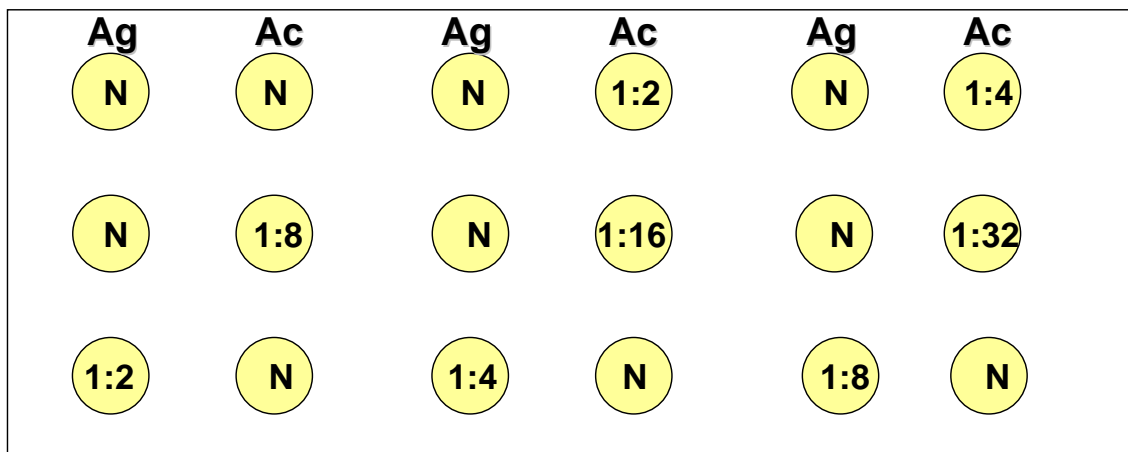


Fig. 9 Técnica de Contrainmunolectroforesis. Ag= Antígeno metabólico A- 20, Ac= Sueros problema, N= Neto, 1:2-1:32= diluciones del Ag o del suero.

2.5 Extracción de ADN

La obtención de ADN de *Aspergillus fumigatus* (cepa A-20) y 3 aislamientos identificados como *A. fumigatus* (dos de perro y uno de ave), una cepa de *A. niger* (ATCC 6275), una de *A. flavus* (ATCC 9643), una de *A. terreus*, una de *A. nidulans*, una de *A. parasiticus* (cepario del laboratorio de micología de la FMVZ-UNAM) y una de *Penicillium notatum* (Instituto Pasteur) se hizo con base en la técnica descrita por Mendoza.⁴⁷ Cada hongo se cultivó en 50ml de caldo Sabouraud dextrosa de 24-48h, manteniéndolo en agitación a 150 revoluciones por minuto y a una temperatura de 35° C. Se separó la masa fúngica utilizando un embudo Buchner y papel filtro estéril. Una vez separada la biomasa fúngica, se secó entre hojas de papel filtro estéril. En un mortero estéril fue vaciado un poco de nitrógeno líquido para enfriarlo. Posteriormente, se colocó la masa fúngica y se adicionó más nitrógeno líquido y se maceró hasta obtener un polvo blanquecino. El polvo se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 ml hasta llenar la parte cónica, se añadieron 600 µl de solución de lisis y se agitó firmemente hasta obtener una mezcla homogénea. Posteriormente se adicionaron 10 µl de

proteinasas K a una concentración final de 200 µg/ml. La mezcla se incubó en baño María durante 30 min a 65° C. Posteriormente se añadieron 600 µl de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y se agitó firmemente hasta que se obtuvo una mezcla de aspecto lechoso. Se centrifugó a 15000 xg/15 min. Terminada la centrifugación, se transfirieron 400 µl de la fase acuosa de la superficie a otro tubo Eppendorf y se añadieron 40 µl de acetato de amonio 3M y 880 µl de etanol absoluto frío y se incubó a -20° C durante 20 minutos. Posteriormente el tubo se centrifugó a 15000 xg/5 min para que se formara una pastilla en el fondo, el etanol absoluto se decantó y se adicionó 1ml de etanol al 70% centrifugando a 15000 xg/5 min, nuevamente se decantó el etanol y el ADN se dejó secar a temperatura ambiente (10 minutos aproximadamente). La pastilla se resuspendió en 50 µl de agua bidestilada. Se adicionaron 16 µl de ARNasa a una concentración de 10 µg/µl y se incubó a 37° C por 20 min.

El ADN obtenido fue visualizado por electroforesis (80 Voltios, 80 amperes y 50 min.) en un gel de agarosa al 1% adicionado con bromuro de etidio (5 mg/ml) para observar su calidad. Cada pozo del gel fue llenado con 8µl de ADN más 1µl de colorante de carga. La concentración del ADN se determinó en un biofotómetro NanoDrop® para luego almacenarse a 4° C hasta su uso.

2.6 Diseño de los iniciadores específicos para *A. fumigatus*.

Para el diseño de los iniciadores específicos para *A. fumigatus* se utilizaron las regiones ITS 1 e ITS 2 que se localizan dentro del complejo de genes del ADNr. Estas regiones fueron elegidas debido a la variabilidad que hay en sus secuencias. ^{16-18, 48}

Utilizando las secuencias de las regiones ITS 1 e ITS 2 de *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. flavus*, *A. nidulans*, *A. terreus*, *A. parasiticus*, *A. clavatus*, *A. ochraceus*, *A. ustus* y *A. candidus* (EF634383, EF634379, EU664480, EF567976, EF567983, EF661568, EF670001, EU021609, EF652492 y AY373842 respectivamente) descritas en el GENBANK, se realizó una comparación de dichas secuencias. De esta forma se pudo observar que hay lugares de estas regiones que son muy parecidas por pertenecer al mismo género, sin embargo hubo otros sitios en donde había diferencias,

los cuales se consideraron para diseñar a los iniciadores que en una PCR convencional sólo amplifiquen a *A. fumigatus*.

Los iniciadores son los siguientes:

Para la región ITS 1 es el Afu1F 5'-GTATGCAGTCTGAGTTGATTAT- 3'

Para la región ITS 2 es el Afu1R 5'-ATAAAGTTGGGTGTCGGCTG- 3'

2.7 Implementación de la técnica de PCR para amplificar la región ITS 1-5.8S-ITS 2.

Los iniciadores utilizados para la amplificación de este fragmento fueron el Afu1F y Afu1R, los cuales flanquean el fragmento ITS1-5.8S-ITS2 y son específicos de *A. fumigatus* (Fig. 10).

Los hongos utilizados para realizar ésta técnica fueron como control positivo *A. fumigatus* A-20 (Micoteca de la Universidad de Glasgow), como controles negativos *A. flavus* (ATCC 9643), *A. niger* (ATCC 6275), *A. terreus*, *A. nidulans*, *A. parasiticus* (cepario del laboratorio de micología de la FMVZ-UNAM), *Penicillium notatum* (Instituto Pasteur. París, Francia) y *Candida glabrata* (caso clínico), además de los tres aislamientos clínicos que se identificaron morfológicamente como *A. fumigatus*.

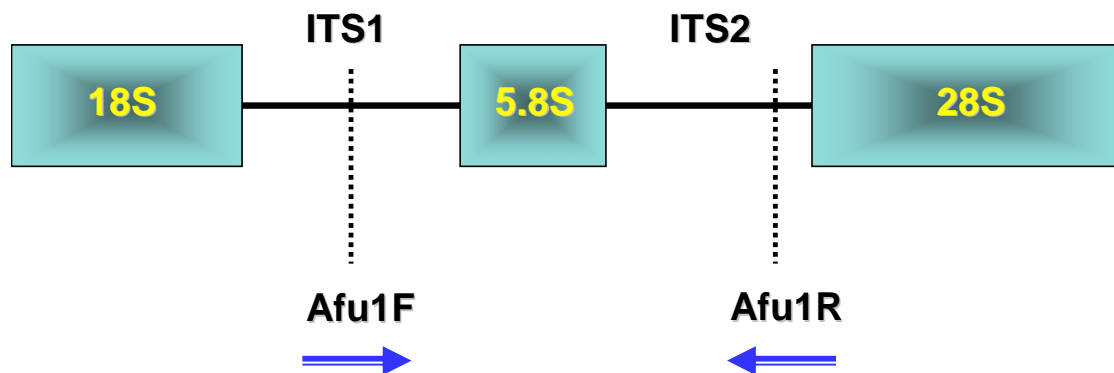


Fig. 10 Los iniciadores se ensamblan en dirección 5'-3' para amplificar un producto de aproximadamente 350 pb.

La PCR se realizó en un volumen de 50 µl, la cual contenía 5 µl de amortiguador de reacción 10x, 1.5 mMol de MgCl₂, 100µM de DNTP's (dinucleótidos trifosfatados) de cada uno, 1.5U de *Taq* polimerasa, 30 pM de cada iniciador y 20 ng de ADN, se alicuotó a 50 µl de volumen final con

agua inyectable. La reacción consistió de una desnaturalización inicial a 95° C por 4 minutos, seguida de 40 ciclos. Cada ciclo consistió en una desnaturalización a 95° C por 30 segundos, una alineación a 60° C por 30 segundos y una extensión a 72° C por 1 minuto. Por último una extensión final a 72° C por 3 minutos. El producto se observó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1% adicionado con bromuro de etidio en amortiguador TAE 1X a 80 volts, 80 Amperes durante 45 minutos.

3. RESULTADOS

3.1 Aislamiento e identificación.

Del total de muestras (58) se obtuvieron dos aislamientos a partir de perros (Cuadro 3) y un aislamiento a partir de un ave, sospechosos de cursar micosis por *A. fumigatus* (Cuadro 4).

Los aislamientos fueron identificados morfológicamente como *A. fumigatus*³⁷ (Figuras 11 y 12).

CUADRO 3. Aislamientos de *A. fumigatus* a partir de muestras clínicas de animales domésticos

ESPECIE	MUESTRA	ESTADO CLÍNICO	No. DE MUESTRAS	POSITIVOS	NEGATIVOS
PERRO	HISOPO	SANOS	5	0	5
		SOSPECHOSOS		29	1
	LAVADO		3	0	3
	MATERIAL DE BIOPSIA		4	1	3
	TEJIDO		1	0	1
CABALLO	HISOPO		2	0	2
GATO	HISOPO	1	0	1	
TOTAL			45	2	43

CUADRO 4. Aislamientos de *A. fumigatus* a partir de muestras clínicas de animales en cautiverio

ESPECIE	MUESTRA	ESTADO CLÍNICO	No. DE MUESTRAS	POSITIVOS	NEGATIVOS
DELFIN	HISOPO	SOSPECHOSOS	10	0	10
AVE	HISOPO		3	1	2
TOTAL			13	1	12



Fig 11. Cultivo de *A. fumigatus* en SDA de 5 días de crecimiento incubado a 30° C

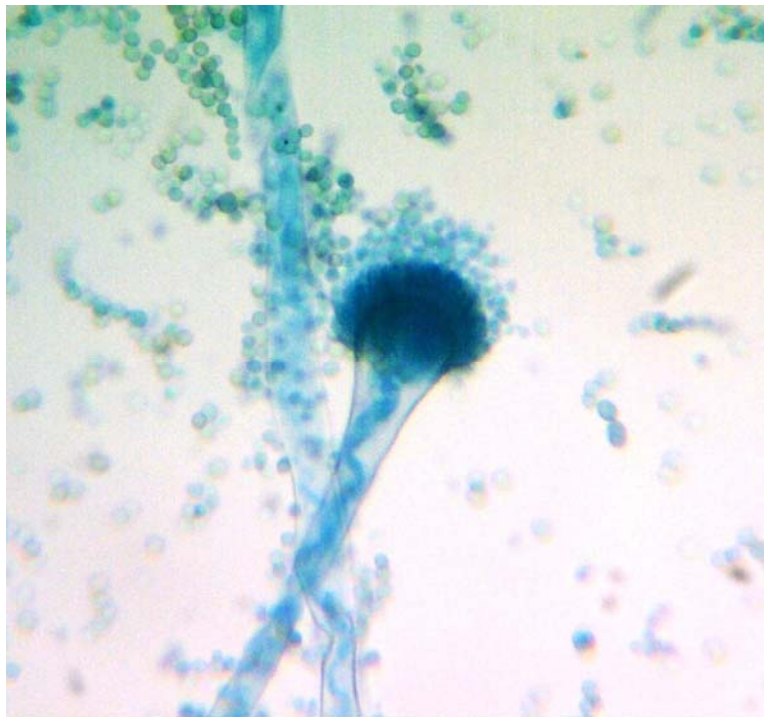


Fig 12. Cabeza conidial de *A. fumigatus*. Teñido con lactofenol azul de algodón y observado a 40x.

3.2 Serología

De los 63 sueros provenientes de animales domésticos, 8 sueros de perros sospechosos resultaron positivos a la presencia de Ac contra *A. fumigatus* y de los 33 sueros de animales en cautiverio 20 sueros de delfín resultaron positivos a la presencia de Ac contra *A. fumigatus* en las pruebas de IDD y CIE (Cuadro 5 y 6, Figuras 13 y 14).

CUADRO 5. Resultados de las pruebas de IDD y CIE a partir de animales domésticos.

ESPECIE	ESTADO CLÍNICO	No. DE SUEROS	POSITIVOS	NEGATIVOS
PERRO	SANOS	5	0	5
	SOSPECHOSOS	23	8	15
CABALLO		35	0	35
TOTAL		63	8	55

CUADRO 6. Resultados de las pruebas de IDD y CIE a partir de animales en cautiverio.

ESPECIE	ESTADO CLÍNICO	No. DE SUEROS	POSITIVOS	NEGATIVOS
DELFIN	SOSPECHOSOS	30	20	10
AVE		3	0	3
TOTAL		33	20	13

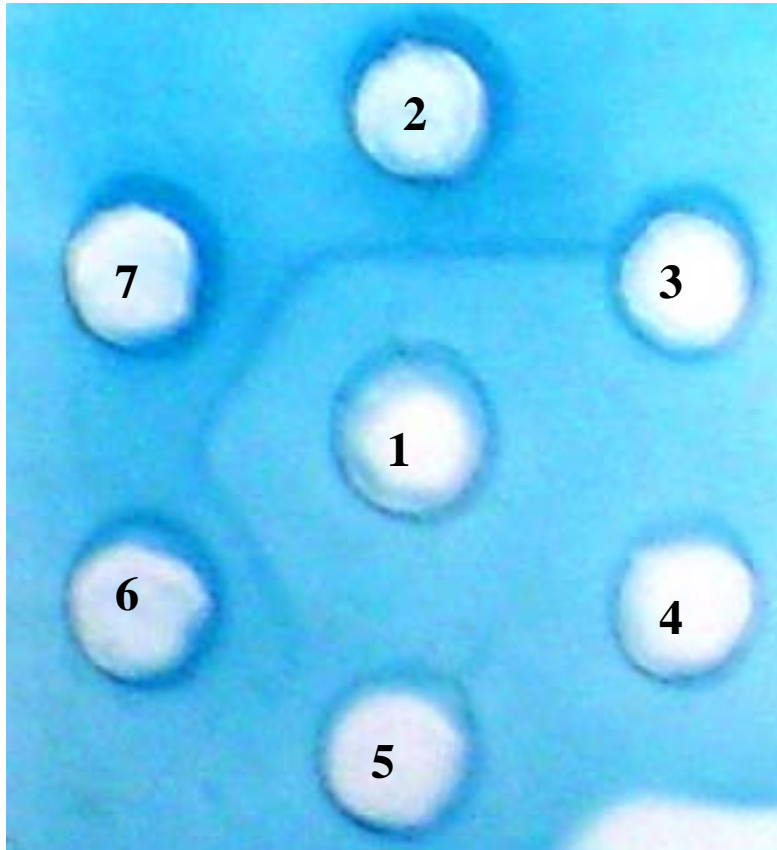


Fig 13. Inmunodifusión doble. Donde 1= antígeno metabólico A-20 y 2= control positivo, 3= control negativo, 4-7= sueros problema. Se aprecian bandas de precipitación que indican la presencia de Ac contra *A. fumigatus*.

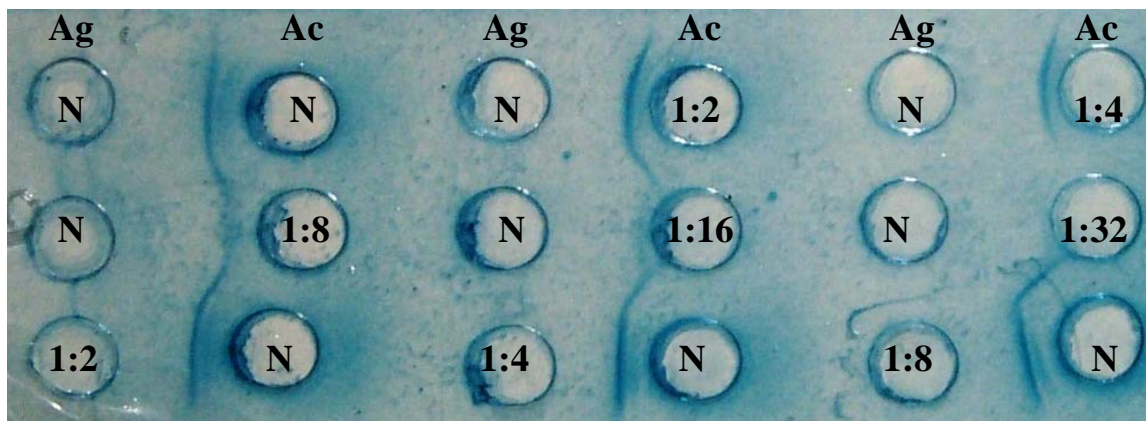


Fig 14. Contrainmunolectroforesis. Donde Ag= antígeno metabólico A-20, Ac= suero problema, N= neto, 1:2-1:32= diluciones del Ag y del suero. Presencia de bandas de precipitación hasta la dilución 1:4 del suero problema.

3.3 PCR

La especificidad de los iniciadores Afu1F y Afu1R se demostró realizando una PCR con el ADN de los aislamientos obtenidos a partir de los animales sospechosos de aspergilosis y con el ADN de las cepas que se utilizaron como controles. Se obtuvo un producto de 354 pares de bases (pb) a partir del ADN de los hongos identificados como *A. fumigatus* A-20 (cepa control), negro, nene (perros) y quetzal (ave). No hubo amplificación alguna con el ADN de los demás hongos a los que se les realizó la PCR (Cuadro 7, Figura 15).

Cuadro 7. Especificidad de los iniciadores Afu1F-Afu1R.

Especie	Identificación	Fragmento esperado en PCR
<i>A. fumigatus</i>	A-20	+
	Negro	+
	Nene	+
	Quetzal	+
<i>A. flavus</i>	ATCC 9643	-
<i>A. niger</i>	ATCC 6275	-
<i>A. nidulans</i>	Lab. Micología	-
<i>A. parasiticus</i>	Lab. Micología	-
<i>A. terreus</i>	Lab. Micología	-
<i>P. notatum</i>	Instituto Pasteur	-
<i>C. glabrata</i>	Caso clínico	-

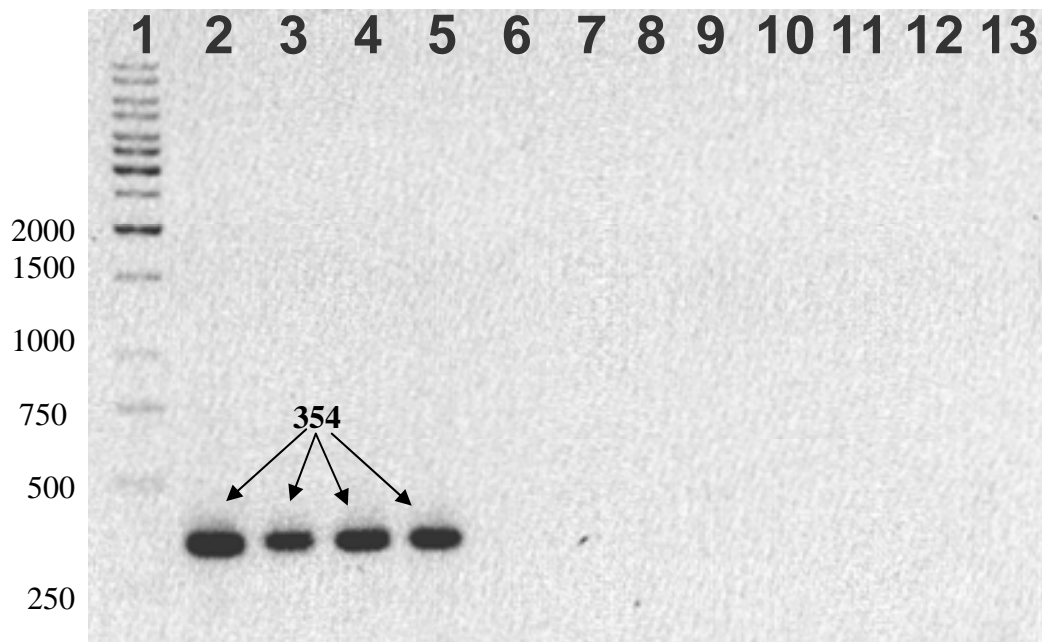


Fig 15. Resultados de la Reacción en cadena de la polimerasa para la identificación de *A. fumigatus* utilizando los iniciadores Afu1F-Afu1R. Donde: Carril 1= Marcador de 1 Kb, carril 2= control positivo (*A. fumigatus* A-20), carril 3= *A. fumigatus* “negro”, carril 4= *A. fumigatus* “nene”, carril 5= *A. fumigatus* “quetzal”, carril 6= *A. flavus*, carril 7= *A. niger*, carril 8= *A. nidulans*, carril 9= *A. parasiticus*, carril 10= *A. terreus*, carril 11= *P. notatum*, carril 12= *C. glabrata* y carril 13= control negativo (agua destilada estéril).

4 DISCUSIÓN

La identificación de micosis y de hongos filamentosos involucrados puede ser por la obtención de un aislamiento y la descripción de las características morfológicas, detectando anticuerpos con la ayuda de técnicas serológicas, como son la IDD y la CIE y recientemente utilizando técnicas moleculares como es el caso de la PCR.

En este trabajo se utilizaron las cuatro metodologías mencionadas anteriormente, las tres primeras con el fin de identificar *A. fumigatus* a partir de muestras clínicas de animales sospechosos de cursar una micosis producida por dicho hongo y la última con el fin de corroborar, por biología molecular, a los hongos identificados como *A. fumigatus*.

En algunos de estos animales la historia clínica era compatible con alguna micosis producida por *A. fumigatus*, sin embargo, el bajo número de aislamientos se puede atribuir a diversos factores tales como: 1) que el clínico pudo confundir la signología de una infección bacteriana con una aspergilosis, 2) que el animal no respondiera al tratamiento con antibacterianos y por lo tanto el clínico pudo sospechar de una micosis sin antes saber que microorganismo estaba involucrado y a qué quimioterapéuticos era susceptible, 3) así como una mala toma de la muestra por parte del clínico que la colectó, esto se debe a que los sitios anatómicos de preferencia por parte de *A. fumigatus* son un poco difíciles de acceder. Por lo tanto se recomienda el uso de la endoscopia para la toma de muestras, como en el caso de “negro” en donde el clínico tomó una biopsia con la ayuda del endoscopio y de esa muestra se pudo obtener un aislamiento, reforzando esta idea Reidarson *et al* ²⁶ tomaron una muestra a partir de una lesión endobronquial en un delfín con la ayuda de un endoscopio y de la cual obtuvieron un aislamiento identificado como *A. fumigatus*.

Como resultado interesante de los 96 sueros que se utilizaron para este trabajo 28 resultaron positivos tanto con la técnica de IDD como con la técnica de CIE. Este aparentemente bajo número de sueros positivos podría deberse a que las muestras fueron obtenidas por conveniencia, por lo tanto no se tenía un diagnóstico previo de aspergilosis, como lo hecho por Dee ⁴⁰ quién trabajó con 9 sueros tomados de pacientes diagnosticados con aspergilosis por los signos clínicos y por cultivo,

en donde 8 resultaron positivos y uno negativo por medio de las pruebas de IDD y CIE. Además trabajó con 9 sueros de pacientes que cursaban con otras micosis, 6 sueros de personas con infección respiratoria bacteriana y 7 sueros de personas sanas y todos los sueros fueron negativos con ambas pruebas. En el presente trabajo sólo dos perros fueron positivos al aislamiento y a la presencia de Ac contra *A. fumigatus* con las pruebas de IDD y CIE, por lo tanto estos resultados coinciden con los obtenidos por Dee⁴⁰, Reidarson *et al*,²⁶ Joseph *et al*²⁷ y Day y Penhale³⁵ quienes al realizar las pruebas de IDD y CIE obtuvieron bandas de precipitación a partir de suero de animales positivos al aislamiento de *A. fumigatus* y, en el caso de Day y Penhale,³⁵ de *A. terreus*. Otro factor que podría haber intervenido es, como menciona Tenorio,⁴⁹ no todos los Ac reaccionan con el antígeno de una sola cepa, por lo tanto él y sus colaboradores recomiendan en su trabajo combinar antígenos de diferentes cepas.

Reidarson *et al*²⁶ y Joseph *et al*²⁷ utilizaron con éxito la técnica de IDD para detectar Ac contra *A. fumigatus* en delfines, los cuales fueron positivos al aislamiento. En el presente estudio de los 30 sueros de delfín el 66% resultaron positivos con las pruebas de IDD y CIE, sin embargo no existió una correlación con el aislamiento debido a la falta de muestras para cultivo.

Por otro lado, en este trabajo se corroboró por PCR la identificación morfológica de *A. fumigatus* aislados a partir de muestras clínicas de animales sospechosos de aspergilosis, utilizando las regiones ITS del complejo ADNr, obteniendo buenos resultados, tal como lo realizado por Henry, Iwen y Hinrichs¹⁷ quienes por medio de PCR y utilizando las regiones ITS identificaron diferentes especies de *Aspergillus*.

Investigadores como Melchers *et al*⁵⁰ realizaron una PCR para identificar *Aspergillus* spp utilizando iniciadores que se ensamblaban en las regiones V7 y V9 del gen 18S del ADNr, sin embargo se dieron cuenta que al utilizar este gen conservador la secuencia obtenida se confundía con *Penicillium marniffei* y *Paecilomyces variotti* y solamente utilizando enzimas de restricción podrían diferenciar *Aspergillus* spp de estos dos hongos. Hinrikson *et al*¹⁵ compararon las regiones

D1-D2 del gen ADNr 28S con las regiones ITS1 e ITS2 de *Aspergillus* spp, reportando que las regiones ITS tienen una mayor variabilidad en su secuencia. En 2007 Iwen, Hinrich y Rupp ¹⁶ publicaron un artículo en donde explican la función de las regiones ITS1 e ITS2, así como una recopilación de trabajos en donde utilizan las regiones ITS como blancos moleculares para la identificación de hongos patógenos en animales. Con base en estos trabajos se decidió utilizar las regiones ITS para diseñar los iniciadores específicos para *A. fumigatus*, en donde también se hizo una comparación de las secuencias de estas regiones y se pudo corroborar que existe una alta variabilidad en las secuencias.

Así, el tiempo para identificar *A. fumigatus* con la metodología propuesta en este trabajo es menor que en los trabajos realizados por Henry, Iwen y Hinrichs ¹⁷ quienes realizaron un PCR utilizando los iniciadores ITS1 e ITS4 para amplificar las regiones ITS1-5.8S-ITS2 con el fin de identificar especies de *Aspergillus* haciendo una comparación de las secuencias de los productos obtenidos. En 2001 Zhao ¹⁹ utilizó una PCR anidada y trabajó con las regiones 18S e ITS1 para identificar *A. fumigatus* a partir de cultivo puro. Por otro lado Sugita en 2004 ¹⁸ implementó una PCR anidada donde utilizó los iniciadores específicos de género ASAP 1 y ASAP 2 ensamblándose en las regiones 18S y 5.8S respectivamente y para hacer la PCR anidada utilizó las regiones 18S e ITS1 con el fin de identificar a *A. fumigatus*, *A. niger* y *A. flavus*. En el presente estudio sólo fue necesario utilizar una PCR convencional, así como el uso de los iniciadores Afu1F y Afu1R que son específicos para identificar a *A. fumigatus*, para obtener el producto esperado.

5 CONCLUSIONES

Debido al bajo número de muestras y a que las mismas fueron obtenidas por conveniencia, no se pudo hacer una correlación del aislamiento con las pruebas serológicas.

Tomando en cuenta que dos perros fueron positivos al aislamiento y a la presencia de bandas de precipitación con las pruebas de IDD y CIE y que los animales que fueron negativos al aislamiento también fueron negativos a la presencia de bandas, se puede concluir que las pruebas serológicas pueden ser aplicables para establecer un diagnóstico de aspergilosis.

La técnica de PCR con los iniciadores Afu1F y Afu1R permitió corroborar la identificación de *A. fumigatus* obtenidos a partir de los aislamientos y de la cepa control.

APÉNDICE I. MEDIOS, SOLUCIONES Y REACTIVOS.

MEDIOS DE CULTIVO PARA EL CRECIMIENTO DE HONGOS

- **Agar dextrosa Sabouraud con cloranfenicol**

Agar bacteriológico	15g
Peptona bacteriológica	20g
Dextrosa	40g
Cloranfenicol	500mg
Agua destilada	1000mL

- **Caldo Sabouraud dextrosa con cloranfenicol**

Peptona bacteriológica	20g
Dextrosa	40g
Cloranfenicol	500mg
Agua destilada	1000ml

SOLUCIONES PARA LAS PRUEBAS DE INMUNODIFUSIÓN DOBLE Y CONTRAINMUNOELECTROFORESIS

- **Agar para IDD**

Agar purificado	15gr
Solución salina de fosfatos	500ml
Agua destilada	500ml
Azida de sodio	1.5gr

- **Amortiguador Veronal (Ajustar a un pH de 8.2)**

B-2 Barbitol buffer	1 tubo del producto comercial
Azida de sodio	1.5g
Agua deionizada	1500ml

- **Agarosa con amortiguador Veronal**

Amortiguador veronal	500ml
Agua deionizada	500ml
Agarosa	10g

- **Solución salina de fosfatos**

Cloruro de sodio	8g
Fosfato de hidrógeno potásico	1.3g
Fosfato dihidrogenado potásico	0.34g
Agua deionizada	1000ml

- **Colorante negro de amido**

Negro de Amido	1g
Metano-Ácido acético glacial-Agua	1000ml

SOLUCIONES PARA EXTRAER DE ADN DE HONGOS FILAMENTOSOS

- **Solución de lisis**

Na ₂ (SO ₃)	0.1M
Tris-Cl pH 7.5	0.1M
EDTA	0.05M
SDS	1% (p/v)
Agua destilada	1000ml

- **Fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) (compuesto comercial)**

- **Acetato de amonio 7.5M**

Acetato de amonio	578.1g
Agua destilada	1000ml

- **Etanol absoluto**

- **Etanol al 70%**

Etanol absoluto 700ml

Agua destilada 300ml

BIBLIOGRAFÍA

1. Latge JP. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews* Apr. 1999; 310–350.
2. Abarca ML. Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. *Rev Iberoam Micol* 2000; 17: 79-84.
3. Doctorfungus.org [página de internet] Europa: Mycoses Study Group (MSG) [Update 1/7/2007; citado 31/08/2007] Disponible en: http://www.doctorfungus.org/thefungi/Aspergillus_spp.htm.
4. Sociedad Española de enfermedades infecciosas y microbiología clínica [página de internet] España: SEIMIC [Update 2006] Citado 26/04/08 Disponible en http://www.seimic.org/control/revi_Mico/asperguillus.htm.
5. Granjeno CE, García VZ, Cervantes OR A. y Guzmán CRE. Prevalencia de dermatomicosis en perros en el área urbana de Cuernavaca, Morelos, México *Vet Mex* 2000; 31:(2) 161-164.
6. Cano J y Soler M. Epidemiología molecular aplicada a la detección de brotes de aspergilosis nosocomial. *Rev Iberoam Micol* 2000; 17:97-99.
7. McClenny. Laboratory detection and identification of *Aspergillus* species by microscopic observation and culture: the traditional approach. *Med Mycol Suppl* 2005; 43:125-128.
8. Blanco JL y García ME. Presente y futuro del diagnóstico inmunológico de las micosis animales. *Rev Iberoam Micol* 2000; 17: 23-28.
9. Kurup VP. and Kumar A. Immunodiagnosis of Aspergillosis. *Clin Microbiol Rev.* Oct. 1991: 439-456.
10. Stephen PS, Thomas DP. and López-Ribot JL. Use of genome information for the study of the pathogenesis of fungal infections and the development of diagnostic tools. *Rev Iberoam Micol* 2005; 22: 238-241.
11. Blanco JL, Guedeja-Marrón J, Caballero J y García ME. Aspergilosis: mecanismos de patogenicidad implicados y aproximación al diagnóstico de laboratorio. *Rev Iberoam Micol* 1998; 15:10-15.
12. Cano J y Soler M. Epidemiología molecular aplicada a la detección de brotes de aspergilosis nosocomial. *Rev Iberoam Micol* 2000; 17:97-99.
13. Healy M., Reece K, Walton D, Huong J, Shah K, and Kontoyiannis DP. Identification to the Species Level and Differentiation between Strains of *Aspergillus* Clinical Isolates by Automated Repetitive-Sequence-Based PCR. *J Clin Microbiol* Sept. 2004; 42(9):4016–4024.
14. Bridge PD, Arora DK, Reddy CA and Elander RP. Applications of PCR in mycology. CAB INTERNATIONAL. UK 1998.
15. Hinrikson HP, Hurst SF, De Aguirre L and Morrison CJ. Molecular methods for the identification of *Aspergillus* species. *Med Mycol* 2005; 43(1):129-137.

16. Iwen PC, Hinrichs SH and Rupp ME. Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens. *Med Mycol*, 2007; 40(1):87–109.
17. Henry T, Iwen PC and Hinrichs SH. Identification of *Aspergillus* Species Using Internal Transcribed Spacer Regions 1 and 2. *J Clin Microbiol* Apr. 2000: 1510–1515.
18. Sugita C, Makimura K, Uchida K, Yamaguchi H and Nagai A. PCR identification system for the genus *Aspergillus* and three major pathogenic species: *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger*. *Med Mycol* October. 2004; 42: 433-437.
19. Zhao J, Fanrong K, Ruoyu L, Xiaohong W, Zhe W, and Duanli W. Identification of *Aspergillus fumigatus* and Related Species by Nested PCR Targeting Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer Regions. *J Clin Microbiol* June 2001; 39; 6:2261–2266.
20. García ME y Blanco JL. Principales enfermedades fúngicas que afectan a los animales domésticos. *Rev Iberoam Micol* 2000; 17: 2-7.
21. Benitah N. Canine Nasal Aspergillosis. *Clin Tech Small Anim Pract* 2006; 21:82-88.
22. Guida N, Mesplet M, Di Gennaro E, Digilio P y Moras EV. Presencia de *Aspergillus fumigatus* en la cavidad nasofaríngea de equinos *Rev Iberoam Micol* 2005; 22: 160-162.
23. Tell LA. Aspergillosis in mammals and birds: impact on veterinary medicine. *Med Mycol Suppl* 2005. 42 71-73.
24. Sarfati J, Jensen HE and Latgé JP. Route of infections in bovine aspergillosis. *J Med Vet Mycol* 1996. 34, 379-383.
25. Hitos F, Pérez HA y Pérez MJ. Aborto bovino asociado a *Aspergillus fumigatus* (informe de siete casos). *Vet Mex* 1981; 12:13-18.
26. Reidarson TH, Harrell JH, Rinaldi MG, McBain J. Bronchoscopic and serologic diagnosis of *Aspergillus fumigatus* pulmonary infection in a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *J Zoo Wildl Med*. 1998 Dec;29(4):451-455.
27. Joseph BE, Cornell LH, Simpson JG, Migaki G and Griner L. Pulmonary aspergillosis in three species of dolphin. *Zoo Biol* 1986;5(3):301 – 308.
28. Cervantes ORA, Trigo FJ., De Buen N, García AC. Aspergilosis nasal canina: informe de un caso. *Vet Mex*. 1985; 16.
29. Cartagena JC, Engel J, Mora E, Madorrán C, Torrent V. Rinoscopia aplicada al diagnóstico de aspergilosis nasal. *Rev Argos Marzo* 2001; 26:42-43.
30. Kim SH, Yong HC, Yonn JH, Youn HY, Yoshioka N, Kano R, *et al.* *Aspergillus niger* pulmonary infection in a dog. *J Vet Med Sci* 2003; 65(10):1139-1140.
31. Day MJ, Eger CE, Shaw SE and Penhale WJ. Immunologic study of systemic aspergillosis in German shepherd dogs. *Vet Immunol Immunopathol* August 1985; 9(4):335-347.

32. Las Heras A, López I, Payá MJ, Mazzucchelli F, Peña L, García LA y Fernández-Garayzábal JF. Mastitis clínicas atípicas: Descripción de un caso producido por *Aspergillus fumigatus* Prod Ov Cap 1998; XXIII: 407-410.
33. Pemán J. Diagnóstico de la aspergilosis invasiva. Rev Iberoam Micol 2000; 17:90-92.
34. Kurup VP. and Kumar A. Immunodiagnosis of Aspergillosis. Clin Microbiol Rev. Oct. 1991: 439-456.
35. Day MJ and Penhale WJ. Humoral immunity in disseminated *Aspergillus terreus* infection in the dog. Vet Microbiol 1988; 16:283-294.
36. Barret JT. Inmunología. Inmunoquímica e inmunobiología. Edit. Interamericana S. A. de C. V. 4^{ta} edición. México, 1985.
37. Larone Davise H. Medically important fungi: A guide to identification. ASM Press. 3rd edition. USA, 1995.
38. Coleman RM and Kaufman L. Use of the immunodiffusion test in the serodiagnosis of Aspergillosis. Appl Microbiol Feb. 1972; 23(2):301-308.
39. Cervantes-Olivares RA. Studies on antigens of *Aspergillus*: Their use in veterinary mycology. Ph.D. Thesis. University of Glasgow, Department of Veterinary Pathology. Scotland. 1983.
40. Dee TH. Detection of *Aspergillus fumigatus* serum precipitins by counterimmunoelectrophoresis. J Clin Microbiol Dec. 1975; 482-485.
41. Peeters D, Day MJ and Clercx C. An Immunohistochemical Study of Canine Nasal Aspergillosis. J Comp Path 2005; 132:283-288.
42. Pérez J y Carrasco L. Diagnóstico histopatológico de micosis en patología veterinaria. Rev Iberoam Micol 2000; 17:18-22.
43. De Buen N. Citología diagnóstica veterinaria. Edit. El Manual Moderno. México, 2001.
44. Knotek Z., Fichtel T, Kohout P, Benák J. Diseases of the nasal cavity in the dog. Aetiology, symptomatology, diagnostics. Acta Vet Brno 2001; 70: 73-82.
45. Tsang KW, Reimi K, Natalie R, Queeny Y, Wayne H, and Wah KL. Bronchoscopy of Cetaceans J Wildl Dis 2002; 38; 1:224-227.
46. Segundo-Zaragoza C. Manual teórico-práctico de micología para la carrera de Q.F.B. Tesis de licenciatura Q.F.B. UNAM. FES- Cuautitlán. México, 1991.
47. Mendoza L. Extracción de ADN de hongos filamentosos. Curso de micología molecular. Manual de procedimientos. Medical technology program, 2002, Julio 01 to julio12 Michigan USA. Michigan State University.
48. Hinrikson HP, Hurst SF, Lott TJ, Warnock DW, and Morrison CJ. Assessment of Ribosomal Large-Subunit D1-D2, Internal Transcribed Spacer 1 and Internal Transcribed Spacer 2 Regions as Targets for Molecular Identification of Medically Important *Aspergillus* Species. J Clin Microbiol May 2005, 43(5): 2092-2103.

49. Tenorio V, Vázquez A, Cervantes RA y Trigo FJ. Producción de un antígeno de *Aspergillus* para la prueba de inmunodifusión en gel. Tec Pec 1979; 61-65.
50. Melchers WJG, Verweij PE., Van Den Hurk P, Van Belkum A, De Pauw BE., Hoogkamp-Korstanje JA and Mets JFGM. General Primer-Mediated PCR for Detection of *Aspergillus* species. J Clin Microbiol July 1994; 32; 7:1710-1717.