



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN
Y DE LA SALUD ANIMAL

**“Implementación de la prueba de PCR para el diagnóstico
de aspergilosis en aves de presa”**

TESIS
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
PRESENTA
EDGAR ABUNDIS SANTAMARÍA

TUTOR PRINCIPAL:
DR. ROBERTO ARNULFO CERVANTES OLIVARES

COMITÉ TUTORAL:
DR. GARY GARCÍA ESPINOSA
DR. CARLOS IGNACIO SOTO ZÁRATE



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.

DEDICATORIA

A mis padres que por ellos he podido llegar hasta donde estoy: Humberto Abundis[†] que siempre fue un buen ejemplo, y desde niños nos inculcó el conocimiento y nos enseñó a pensar. A mi mamá Ana Santamaría que la quiero mucho y le agradezco todo lo que ha hecho por nosotros, además, admiro enormemente su fortaleza.

Al Dr. Roberto A. Cervantes Olivares por haberme aceptado para realizar la maestría, por su confianza y sus enseñanzas.

A Caro por ayudarme en este escrito y siempre en el laboratorio, además de brindarme su amistad, lo cual valoro muchísimo.

A Ceci, que desde mi primer día en laboratorio ha estado junto a mí, ya sea en los buenos y malos momentos, gracias por todo chaparrita, te quiero mucho.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Medicina Veterinaria, que después de varios años regresé para continuar con mi formación y al Departamento de Microbiología e Inmunología donde llevé a cabo mi estudio.

A mi comité tutorial: Dr. Gary García y Dr. Carlos Ignacio Soto por sus consejos y apoyo a lo largo de la maestría.

A los miembros de mi jurado: Dra. Dulce Brousset, Dr. Enrique Salas, Dra. Carolina Segundo y Dra. Laura Rosio Castañón por sus revisiones y comentarios a pesar de que los apresuré.

A mis hermanos Elibeth, Humberto, Alejandro y Lizeth que me han apoyado en todo momento y ahora a mis sobrinos Leo, Alhely y Zoé que han traído alegría a la familia, a todos los quiero.

A mis compañeros del laboratorio: Chucho que me ayudó en la biología molecular y David que en cualquier favor que le pedí me ayudó y quienes siempre amenizaron mi estancia en el laboratorio.

Al CONACYT por la beca que me otorgó en el transcurso de mi posgrado.

Al proyecto PAPIIT 209908 por el apoyo financiero en este trabajo.

A Nancy Carpenter y Erika Travis que me ayudaron a conseguir información y material que aquí no podía encontrar.

A los amigos que hice en el departamento de microbiología e inmunología, a todos les agradezco su amistad.

ÍNDICE

Tema	página
Lista de cuadros	I
Lista de figuras	I
RESÚMEN	II
ABSTRACT	III
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Generalidades	1
1.2 Etiología	2
1.3 Presentaciones clínicas de la aspergilosis aviar	3
1.3.1 Aguda	3
1.3.2 Generalizada o invasiva	3
1.3.3 Local	4
1.4 Diagnóstico	4
1.4.1 Hemograma	5
1.4.2 Signos Clínicos	5
1.4.3 Radiología	6
1.4.4 Serología	6
1.4.4.1 ELISA (Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas)	6
1.4.4.2 Inmunodifusión doble	7
1.4.4.3 Contraimmunoelectroforesis	8
1.4.5 Endoscopía	8
1.4.6 Examen directo	8
1.4.7 Cultivo	9
1.4.8 PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)	9
1.5 Tratamiento	11
1.5.1 Itraconazole	11
1.5.2 Voriconazole	11
1.5.3 Anfotericina B	11
1.5.4 Terbinafina	12
1.6 Prevención	13
1.6.1 Vacunación	13

2. HIPÓTESIS	14
3. OBJETIVO GENERAL	15
3.1 Objetivos específicos	15
4. MATERIAL Y MÉTODOS	16
4.1 Muestras clínicas	16
4.2 Obtención de un aislado de <i>A. fumigatus</i>	18
4.3 Colección de muestras sanguíneas	18
4.3.1 Hemograma	19
4.4 Obtención de la muestra con hisopo traqueal	19
4.4.1 Examen directo con KOH al 20% y azul de algodón lactofenol	20
4.4.2 Cultivo	20
4.5 Producción de antígenos de <i>A. fumigatus</i>	21
4.5.1 Obtención de antígeno metabólico	21
4.5.2 Obtención de antígeno somático	22
4.6 Determinación de la concentración proteica de los antígenos obtenidos mediante el método de Bradford	22
4.7 Identificación de proteínas de los antígenos de <i>A. fumigatus</i> mediante gel de poliacrilamida con duodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) al 5%	22
4.8 Contraelectroforesis	23
4.9 Inmunodifusión doble	24
4.10 ELISA indirecto	25
4.11 Extracción de ADN de <i>A. fumigatus</i>	26
4.12 Extracción de ADN de las muestras colectadas con hisopo traqueal y suspendidas en PBS	27
4.13 PCR	28
4.14 Análisis estadístico	29
5. RESULTADOS	30
5.1 Hemograma	30
5.2 Placa radiográfica	30

5.3 Examen directo con KOH al 20% y azul de algodón lactofenol	32
5.4 Cultivo	32
5.5 Determinación de la concentración proteica de los antígenos metabólicos y somáticos de <i>A. fumigatus</i>	33
5.6 Identificación de proteínas de los antígenos de <i>A. fumigatus</i> mediante gel SDS-PAGE al 5%.	33
5.7 Contrainmunolectroforesis e inmunodifusión doble	34
5.8 ELISA indirecto	34
5.9 Extracción de ADN de <i>A. fumigatus</i> de la cepa A20 y aislados clínicos	35
5.10 PCR	36
5.11 Análisis estadístico	37
6. DISCUSIÓN	38
7. CONCLUSIONES	44
8. REFERENCIAS	45
9. ANEXO	52

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Muestras obtenidas de aves de presa en cautiverio	17
Cuadro 2. Resultados de las pruebas realizadas a las muestras colectadas	31
Cuadro 3. Absorbancias resultantes de los controles negativos, control positivo y los índices positivos en la prueba de ELISA indirecta	35

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tinción de azul de algodón lactofenol de la muestra directa de los sacos aéreos de un aguililla de Harris	18
Figura 2. Hisopo de rayón utilizado para obtener las muestras traqueales	20
Figura 3. Toma de muestra con hisopo traqueal a un aguililla cola roja juvenil	20
Figura 4. Patrón utilizado en la contrainmunolectroforesis	24
Figura 5. Patrón utilizado en la inmunodifusión doble	24
Figura 6. Placa radiográfica del aguililla cola roja número 24	30
Figura 7. Cultivo en agar dextrosa Sabouraud a 30°C del aguililla cola roja número 24	32
Figura 8. Gel SDS-PAGE al 5% de los antígenos producidos	33
Figura 9. Contrainmunolectroforesis del suero del aguililla cola roja número 24	34
Figura 10. Inmunodifusión doble con los sueros colectados	34
Figura 11. Gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio de ADN de <i>A. fumigatus</i>	36
Figura 12. Gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio de los productos de PCR	37
Figura 13. Gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio del producto de PCR de la muestra positiva (número 24)	37

RESUMEN

La aspergilosis es una enfermedad de importancia en aves de presa mantenidas en cautiverio y su diagnóstico *ante-mortem* es difícil debido a los signos clínicos inespecíficos, la clave para un pronóstico favorable es su identificación en una etapa inicial, además de ser necesario realizar varias pruebas para llegar a un diagnóstico definitivo. El objetivo del presente estudio fue utilizar la prueba de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para el diagnóstico temprano de aspergilosis en aves de presa. Se colectaron muestras de sangre y de tráquea de 35 aves con una mayor susceptibilidad a la enfermedad o que cursaran con un evento inmunosupresor. Las muestras de sangre sin anticoagulante se utilizaron para las pruebas serológicas y con anticoagulante para el hemograma, este último con la finalidad de detectar animales con leucocitosis, que es común en aves con aspergilosis. Las muestras traqueales se tomaron con hisopos estériles, se transportaron y conservaron en 340 µl de PBS estéril, de esta solución se realizó el examen microscópico directo con azul de algodón lactofenol e hidróxido de potasio (KOH) al 20%, el cultivo en agar dextrosa Sabouraud, la extracción de ADN y la PCR con iniciadores que amplifican las regiones ITS 1 e ITS 2 de *A. fumigatus*. La identificación de los anticuerpos contra *A. fumigatus* se realizó mediante la pruebas de inmunodifusión doble, contraimmunoelectroforesis y ELISA indirecta utilizando los antígenos metabólicos y somáticos del hongo. En una de las aves muestreadas: un aguililla cola roja juvenil (*Buteo jamaicensis*), se tomó una placa radiográfica en donde las lesiones observadas parecían indicar una etapa avanzada de aspergilosis, la cual se confirmó mediante el aislamiento de *A. fumigatus*, la identificación de anticuerpos con la prueba de ELISA indirecta y con la prueba de PCR que amplificó un fragmento de 350 pb. Los resultados obtenidos sugieren que es necesario realizar más estudios en aves que cursen diferentes etapas de la enfermedad.

Palabras clave: *Aspergillus fumigatus*, ITS, PCR, ELISA, contraimmunoelectroforesis, inmunodifusión doble, rapaces.

ABSTRACT

Aspergillosis is an important disease in birds of prey held in captivity, ante-mortem diagnosis is difficult because of the non-specific signs, the key for a good prognosis is the early detection and several tests are needed to get a definite diagnosis. The aim of the present study was the use of the polymerase chain reaction (PCR) for the early diagnosis of aspergillosis in birds of prey. Blood and tracheal samples were collected of 35 birds with increased susceptibility to disease or who may be suffering an immunosuppressive event. Blood samples without anticoagulant were used for serological testing and with anticoagulant for hemogram, the latter in order to detect animals with leukocytosis, which is common in birds with aspergillosis. Tracheal samples were taken with sterile swabs, transported and preserved in 340 µl of sterile PBS, from this solution we performed the direct microscopic examination with lactophenol cotton blue and potassium hydroxide (KOH) 20%, culture in Sabouraud dextrose agar, DNA extraction and PCR with primers that amplify the ITS 1 and ITS 2 regions of *A. fumigatus*. The detection of antibodies against *A. fumigatus* was performed by double immunodiffusion tests, counterimmunoelectrophoresis and indirect ELISA using somatic and metabolic antigens of the fungus. In one of the birds sampled: a juvenile red-tailed hawk (*Buteo jamaicensis*), a radiograph was taken where the lesions appeared to indicate an advanced stage of aspergillosis, which was confirmed by the isolation of *A. fumigatus*, the identification of antibodies with indirect ELISA and PCR test that amplified a fragment of 350 bp. The results suggest the need for more studies on birds with different stages of the disease.

Keywords: *Aspergillus fumigatus*, ITS, PCR, ELISA, counterimmunoelectrophoresis, double immunodiffusion, raptors

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades

La aspergilosis es una enfermedad infecciosa no contagiosa que afecta a humanos, mamíferos y especialmente aves, entre las que destacan las aves de presa, pingüinos, pavos y psitácidos del género *Amazona*.¹⁻⁵ Las aves de presa mantenidas en cautiverio son las más afectadas y se reporta que la enfermedad es responsable de entre el 15 y el 30% de las muertes de estos animales exhibidos en zoológicos; sin embargo, en aves silvestres representa un menor problema.⁶ Existen especies que tienen una mayor susceptibilidad a la enfermedad, entre las que se encuentran: azor norteño (*Accipiter gentilis*), halcón gerifalte (*Falco rusticolus*), búho de las nieves (*Bubo scandiaca*), aguililla ártica (*Buteo lagopus*), aguililla cola roja (*Buteo jamaicensis*) principalmente juveniles, águila real (*Aquila chrysaetos*) y águila calva (*Haliaeetus leucocephalus*) en casos de intoxicación con plomo, mientras que las especies con mayor resistencia a la aspergilosis son: el aguililla de Harris (*Parabuteo unicinctus*) y el halcón de las praderas (*Falco mexicanus*).^{1,7,8,9,10,11} No existen reportes en aves de presa que muestren que el sexo desempeñe un papel en la susceptibilidad a la infección. Se ha encontrado que los meses con mayor número de casos de aspergilosis en aves de presa y pingüinos jóvenes son de junio a septiembre.¹

La aspergilosis es una infección oportunista, que causa daño bajo condiciones de inmunosupresión o debido a la exposición a un gran número de conidios.^{8,11,12} La mala nutrición también es un factor predisponente, así como el estrés, el uso prolongado de antibióticos, la edad (aves jóvenes o de edad avanzada), traumatismos, una enfermedad prolongada, dosis inmunosupresoras de corticosteroides, ambientes polvosos, intoxicación con plomo, cuando las aves son mantenidas en condiciones de poca sanidad (acumulación de comida o heces) o una mala ventilación, así como irritantes de las vías aéreas (vapores de los desinfectantes, el humo del cigarro y el amoníaco).^{1,3,6,9,10,13,14}

Existen diferencias anatómicas y en la inmunidad, que hacen a las aves más susceptibles a este padecimiento cuando son comparadas con los mamíferos como lo es la carencia de epiglotis, ausencia de diafragma y la presencia de heterófilos.^{15,16} Una característica única en la aspergilosis aviar es la presencia de fases reproductivas en los tejidos, habiéndose reportado la fase asexual de *A. fumigatus* y tanto la fase sexual como la asexual de *A. nidulans*, sugiriéndose que esto se debe a la presencia de sacos aéreos que permiten una oxigenación adecuada y a que la temperatura de las aves es mayor a la de los mamíferos.¹⁶

1.2. Etiología

Las especies del género *Aspergillus* consisten en hongos filamentosos, hialinos, formados por hifas con un diámetro que va de 2 a 10µm. Conforme el crecimiento comienza, las hifas se entrelazan para formar un micelio. El micelio se divide en vegetativo y aéreo, en este último se producen los conidióforos.¹⁷ Los conidióforos se originan de una estructura del micelio aéreo llamada célula basal y terminan en un hinchamiento llamado vesícula, a partir de la cual nace en su superficie una hilera de fiálides o una de métulas y sobre éstas una hilera de fiálides productoras de cadenas de conidios. Los conidios de las especies de *Aspergillus* son uni o multinucleados, pero siempre unicelulares, su forma es muy variada y pueden encontrarse redondos, elípticos u ovales, mientras que su superficie es lisa o equinulada. El diámetro de estas estructuras en el caso de *A. fumigatus* es de 2 a 3µm, lo cual es importante ya que este tamaño les permite alcanzar los alveolos pulmonares. Los conidios libres sirven para la diseminación aérea de los hongos.¹⁷⁻²⁰

El hongo es ubicuo, saprófito del suelo y crece en materia orgánica a una temperatura superior a 25°C.^{13,20,21} Las especies aisladas del género *Aspergillus* en la aspergilosis aviar son: *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus*, *A. nidulans* y *A. niger*,^{1,3,4,12,14,22,23} pero se ha encontrado que *Aspergillus fumigatus* es aislado en el 95% de los animales con aspergilosis^{6,16} además, se han reportado casos en pingüinos y cigüeñas que cursaron con la enfermedad, donde se encontró que un

individuo podía estar infectado con diferentes cepas de esta especie.^{4,24} *A. fumigatus* produce hemolisinas, enzimas proteolíticas, gliotoxinas y otros factores tóxicos, pero su papel en la patogenia se desconoce.^{20,23,25,26} La gliotoxina es una toxina de la clase de las epipolítodioxopiperazinas (ETP) y ha recibido atención en años recientes ya que se ha demostrado que éste compuesto tiene una potente actividad inmunosupresora *in vitro* e *in vivo*, además de inducir apoptosis en macrófagos pulmonares y algunas otras células de la línea hematopoyética.^{1,20,23,27,28}

1.3. Presentaciones clínicas de las aspergilosis aviar

1.3.1. Aguda

Se presenta principalmente en aves silvestres y psitácidos bajo condiciones de escasa sanidad y ventilación, se debe a la inhalación de un gran número de conidios.^{14,29,30} Existe una colonización masiva y rápida en los pulmones y éstos llegan a estar difusamente infiltrados con gran cantidad de granulomas, produciéndose una severa disnea y muerte. El curso de la enfermedad es de menos de una semana en la mayoría de los casos, pero en ocasiones han muerto animales aparentemente sanos y expuestos a este hongo en 48 horas. Histológicamente, se observan múltiples focos conteniendo hifas y una hemorragia e infiltrado celular heterofílico, mononuclear y multinuclear, además de que el hongo puede ser aislado de muchos tejidos, como el hígado, bazo y sangre. En esta presentación el tratamiento generalmente no es efectivo provocándose una alta mortalidad.^{6,10,13,14}

1.3.2. Generalizada o invasiva

Se presentan granulomas de color amarillo blanquecino en el tejido pulmonar, llegando a invadir los sacos aéreos en casos crónicos, existe una hipertensión pulmonar provocada por los granulomas, además de presentar trombos en los vasos que pueden llegar a causar la necrosis del tejido y también pueden provocar una dilatación del ventrículo derecho del corazón y ascitis. En secciones de tejidos

con buena oxigenación como bronquios y bronquiolos, el organismo llega a esporular. El hongo se puede diseminar a otros órganos como cerebro, huesos o pericardio.^{2,3,7,31}

Cuando se presenta en los sacos aéreos se debe a que un ave inmunosuprimida ha estado expuesta a bajos niveles de conidios y los más afectados resultan ser generalmente los torácicos caudales y los abdominales. Cuando las condiciones de oxigenación son las adecuadas, el hongo puede llegar a producir conidios.^{13,21,23,31}

1.3.3. Local

Puede presentarse como una adherencia micótica sólida o aspergiloma, localizada en las narinas o en las coanas. La lesión es generalmente unilateral y afecta a vasos sanguíneos y cavidad nasal.^{7,14,29} Cuando la tráquea es afectada existe una colonización del hongo en la siringe o en la bifurcación de la tráquea debido a que las turbulencias de aire depositan los conidios en este punto de las vías respiratorias, sumado al estrechamiento de esta región que predispone la acumulación y consecuente bloqueo con detritus celulares y exudado caseoso.^{8,9,13,29} También se reportan casos en donde las lesiones se presentan bajo vendajes que se han mantenido húmedos, sin embargo, las lesiones cutáneas son raras en las aves.^{3,9,32,33} Existe una presentación ocular, donde los tejidos afectados son la conjuntiva, la superficie externa del ojo y por diseminación sanguínea el hongo puede llegar a la parte posterior del ojo.^{3,9,22,32}

1.4. Diagnóstico

La aspergilosis aviar es difícil de diagnosticar, ya que los signos clínicos son inespecíficos.^{34,35} Es importante tomar en cuenta la historia clínica para conocer las condiciones en las que se encuentra el ave, si ha tenido algún factor que le provocara inmunosupresión o una historia de debilidad crónica, pérdida de peso, cambio en la voz o intolerancia al ejercicio, además de considerar la susceptibilidad de las especies a esta enfermedad. La aspergilosis debe

sospechase en casos de animales debilitados que no responden o empeoran con tratamientos de antibacterianos.^{6,7,9,13,30}

A continuación se describen los elementos que son de utilidad para el diagnóstico de la aspergilosis aviar.

1.4.1. Hemograma

Las aves que montan una respuesta inmune apropiada generalmente presentan una severa leucocitosis de 20,000 a 100,000 células/ μ l y la cuenta diferencial usualmente revela una heterofilia con desviación a la izquierda, monocitosis además de linfopenia, aunque estos resultados son utilizados como indicativos y no como diagnósticos.^{6,13,29,30}

1.4.2. Signos clínicos

Los signos clínicos son muy inespecíficos y pueden incluir depresión, poliuria, diarrea, anorexia, cianosis y disnea, donde algunas veces las aves respiran con el pico abierto. Se puede dar el caso que el ave muera de forma repentina sin presentar ningún signo respiratorio.^{8,11,29,30,33}

El tipo de signos respiratorios depende de la extensión y localización de la lesión. Cuando la siringe está involucrada puede presentarse un cambio en la voz, incapacidad para vocalizar o ruidos respiratorios, inclusive, puede haber una severa disnea cuando la lesión es tan grande que obstruye la tráquea o bronquios principales.^{8,29,30,33,36} Si los pulmones o los sacos aéreos están involucrados, se puede observar depresión, disnea, taquipnea o intolerancia al ejercicio. En la aspergilosis pulmonar, los signos clínicos toman de días a semanas en ser visibles, mientras que cuando los sacos aéreos están involucrados, no es raro que las lesiones se desarrollen en el transcurso de varios meses.^{6,13,23,29} Puede presentarse ataxia, tortícolis o pérdida del equilibrio al estar involucrado el sistema nervioso central, cuando los granulomas de sacos aéreos se extienden a la columna vertebral o al plexo sacro se produce una paresis uni o bilateral, si la colonización fungal se limita a las vías respiratorias altas, como los senos

periorbitales y la cavidad nasal, se puede presentar descarga nasal mucosa o mucopurulenta uni o bilateral, además de rinitis.^{1,37}

1.4.3. Radiología

La radiología puede ser una herramienta de gran utilidad en el diagnóstico de la aspergilosis; sin embargo, solo se distinguen cambios radiográficos en casos avanzados de la enfermedad y en este punto, el pronóstico es desfavorable. Las anormalidades radiográficas incluyen un prominente patrón parabronquial, pérdida de la definición de los sacos aéreos, asimetría de éstos y/o densidades focales en los pulmones o sacos aéreos. Los sacos aéreos más afectados son los abdominales y en particular, el abdominal izquierdo.^{6,13,14}

1.4.4. Serología

Se han utilizado las propiedades antigénicas de los diferentes extractos de *A. fumigatus* en las pruebas serológicas para la detección de anticuerpos,²⁰ por ejemplo: el uso de extractos crudos tanto metabólicos como somáticos o miceliales, además de la identificación de antígenos provenientes de partes estructurales específicas de este hongo como lo es el galactomanano que forma parte de la pared celular y ha sido empleado en la prueba de ELISA en humanos y animales (platelia *Aspergillus* EIA, Bio-Rad).

1.4.4.1. ELISA (Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas)

Redig *et al* (1997)²⁵ describen el uso de ELISA indirecta como una guía para el manejo de la aspergilosis en aves de presa utilizando un conjugado anti-halcón y menciona que el anti-pavo no tiene una buena respuesta con los halcones a diferencia de otras especies. Esta prueba fue muy útil para el diagnóstico de la aspergilosis en el Raptor Center de la Universidad de Minnesota, EUA, aunque desde hace unos años ya no se lleva a cabo debido a la carencia del conjugado para realizar la prueba. Graczyk *et al* (1998)³⁸ determinaron el valor de la identificación de anticuerpos, antígeno y la evaluación de parámetros de la sangre en el diagnóstico de la aspergilosis y mencionan que el hallazgo de anticuerpos

contra *Aspergillus* es de mayor utilidad que la identificación del antígeno ya que se obtuvo una mayor sensibilidad y especificidad que con el resto de las pruebas. German *et al* (2002)³⁹ también describen el uso de ELISA indirecta utilizando un conjugado específico para pingüinos. Cray *et al* (2009a)³⁴ describen una modificación en la metodología de la ELISA indirecta utilizando anticuerpos anti-pollo ya que se ha demostrado que tienen una reacción cruzada con los anticuerpos de otras especies de aves, teniendo resultados favorables para el diagnóstico de la aspergilosis, principalmente con los psitácidos.^{36,40}

Le Loch *et al* (2005)⁴¹ utilizaron una prueba comercial (platelia *Aspergillus* EIA; Bio-Rad) para identificar el antígeno galactomanano, que es el principal componente de la pared celular de *Aspergillus* y que ha sido usada ampliamente en humanos, concluyendo que la detección de éste antígeno no debe ser considerado como una prueba de valor diagnóstico en la aspergilosis aviar debido a su baja sensibilidad. Arca-Ruibal *et al* (2006)⁴² también mencionan que esta prueba comercial no es de utilidad para el diagnóstico de aspergilosis en halcones, ya que encontraron una sensibilidad de sólo 12% y una especificidad del 95%; sin embargo, Cray *et al*^{36,43,44} modificaron la metodología usada por Arca-Ruibal utilizando plasma en lugar de suero y obtuvieron una mejor sensibilidad, mencionando que esta prueba si resultó de utilidad para el diagnóstico de la enfermedad en diferentes especies de aves.

1.4.4.2. Inmunodifusión doble

Esta prueba serológica es la más simple de todas y se ha utilizado desde hace muchos años en el diagnóstico de la aspergilosis. Con la inmunodifusión doble (IDD) se logran identificar anticuerpos contra *Aspergillus* teniendo como desventajas el requerir de 24 a 72 h para poder observar las líneas de precipitación entre el antígeno y los anticuerpos así como su baja sensibilidad.^{2,36,37,45}

1.4.4.3. Contrainmunolectroforesis

Esta prueba es más rápida que la inmunodifusión doble, ya que se utiliza una corriente eléctrica para desplazar las fracciones antigénicas de bajo peso molecular del antígeno metabólico y los anticuerpos en direcciones opuestas para formar líneas de precipitación, la contrainmunolectroforesis (CIE) requiere sólo un par de horas para hacer visibles estas líneas y tiene una mayor sensibilidad que la prueba anterior.^{2,39,45}

En los últimos años, para el diagnóstico de la aspergilosis en humanos ha sido utilizada la detección del β -D-glucano que es un componente de la pared celular de la mayoría de los hongos patógenos, incluyendo al género *Aspergillus* y existen pruebas comerciales para la identificación de este componente en el suero o en lavados broncoalveolares mediante un ensayo colorimétrico, aunque aún no hay reportes de su uso en la medicina veterinaria.^{36,46,47,48}

1.4.5. Endoscopia

En casos de aves que presenten una disnea severa, es muy útil la traqueoscopia que pueda revelar alguna lesión obstruyendo la tráquea o la siringe.^{13,30,35} Realizar una laparoscopia permitirá visualizar los sacos aéreos torácicos caudales lo que puede revelar una opacidad difusa o la presencia de placas blancas o amarillas y estas placas pueden estar cubiertas de un moho verde grisáceo. Las muestras se pueden obtener directamente o mediante lavado de los sacos aéreos para su cultivo y citología.¹³

1.4.6. Examen directo

Las muestras obtenidas de tráquea o de sacos aéreos son observadas microscópicamente utilizando preparaciones húmedas con KOH al 20%, azul de algodón lactofenol, blanco de calcoflúor o nuevo azul de metileno, buscando las estructuras micóticas como hifas y conidios, los que tienen un tamaño de 2 a 3 μ m de diámetro.^{7,13,21,49}

1.4.7. Cultivo

El cultivo se realiza de muestras provenientes de lavados broncoalveolares, biopsias, hisopos traqueales o del lavado de los sacos aéreos. Las especies de *Aspergillus* crecen a una temperatura de 25 a 37°C, incluso *A. fumigatus* puede crecer a 45°C en agar dextrosa Sabouraud o agar sangre y son sensibles a la cicloheximida, pero se pueden utilizar antibióticos como el cloranfenicol para evitar contaminación bacteriana. La identificación del hongo se basa en observar a través del microscopio óptico las estructuras micóticas características del género *Aspergillus* como lo son los conidióforos y en el caso de *A. fumigatus* se observa una vesícula globosa con una hilera de fiálides que forman cadenas de conidios, cubriendo tres cuartas partes de la vesícula.^{7,9,13,21}

1.4.8. PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

En humanos, la aspergilosis ha ido en aumento debido al incremento en personas transplantadas y pacientes con SIDA (Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida) en donde existe una inmunosupresión y desde hace casi 20 años, se ha utilizado la PCR para el diagnóstico de esta enfermedad,^{50,51} desde entonces se han descrito diversas técnicas como la PCR en tiempo real,^{52,53,54} PCR anidada^{55,56} y han reportado buenos resultados. También es diverso el método para la toma de muestras y la mayoría de los estudios son efectuados con lavados broncoalveolares,⁵⁶ aunque se ha documentado el uso de sangre para realizar la PCR.^{57,58} Por esta razón en Europa se ha formado una iniciativa para poder estandarizar esta prueba y ser utilizada como método diagnóstico.⁵⁹ Otro aspecto importante a considerar es que muchos de los estudios no solo utilizan un método diagnóstico, sino que combinan tanto la PCR estándar, PCR en tiempo real y pruebas serológicas como la de ELISA para obtener un diagnóstico más acertado.⁶⁰

En lo que se refiere al uso de la PCR para el diagnóstico de aspergilosis en aves, existen pocos estudios y la mayor parte de ellos son sólo para su identificación post-mortem. Katz *et al* (1996)⁶¹ desarrollaron un método para la identificación de

Aspergillus fumigatus provenientes de aislamientos de avestruces mediante el uso de la PCR, pero esta prueba no fue utilizada como método diagnóstico *ante-mortem*. Dahlhausen *et al* en el 2004⁶² presentaron un reporte preliminar del uso de la PCR en tiempo real para la identificación de especies patógenas del género *Aspergillus* en muestras de aves; sin embargo, no describe con detalle la metodología ni los resultados. Jung *et al* (2009)⁶³ utilizaron la PCR para el análisis de aislamientos obtenidos de la necropsia de buitres euroasiáticos que presentaron una aspergilosis pulmonar severa. Recientemente, Olias *et al* (2011)²⁴ utilizaron cortes de tejido infectado mantenidos a -80°C y teñidos con blanco de calcoflúor para visualizar las hifas y una vez encontradas estas estructuras, realizó una microdissección con láser para separar las hifas y llevar a cabo la PCR. En estos estudios, los iniciadores utilizados amplifican genes como por ejemplo: el de la proteasa alcalina, citocromo *b* mitocondrial, las subunidades ribosomales D1 y D2, así como las regiones ITS1 e ITS 2, estas últimas corresponden a las regiones espaciadoras de transcripción ubicadas entre la región 18S y la 5.8S y la segunda se encuentra entre la región 5.8S y la 28S ribosomales, estos sitios son altamente conservados y varían entre las especies de un género lo que permite su uso en la PCR para la identificación de una especie en particular.⁶⁴

Camarillo (2008)⁶⁵ realizó un estudio para la identificación de *A. fumigatus* a partir de aislados, utilizando iniciadores que amplifican las regiones ITS 1 e ITS 2 en el laboratorio de micología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) donde realizó la PCR con la cepa A20 (aborto 20) de *A. fumigatus*, aislada del feto de un bovino proveniente de la Universidad de Glasgow, Escocia, demostrando que amplifican específicamente las regiones mencionadas de la especie *A. fumigatus* y se obtiene un fragmento de 350 pb.

Por todo lo anterior, es necesario contar con una PCR en aves que tenga una gran sensibilidad y especificidad para llegar a un diagnóstico *ante-mortem* de la aspergilosis y dar el tratamiento adecuado con el fin de tener un pronóstico favorable.

1.5. Tratamiento

El tratamiento de la aspergilosis va a depender del lugar de la lesión, teniendo un mejor resultado cuando las lesiones granulomatosas son removidas y se administra un tratamiento tópico, así como sistémico.^{6,9} La clave para tener un pronóstico favorable es el diagnóstico oportuno, de ahí la importancia de contar con técnicas que permitan alcanzar este objetivo.

Existen diferentes antimicóticos que se usan en medicina veterinaria para combatir esta enfermedad, entre los que se encuentran:

1.5.1. Itraconazole

Este fármaco es considerado como el tratamiento de elección para la aspergilosis y se llega a utilizar en conjunción con otros agentes antimicóticos, sin embargo, se debe tomar en cuenta que si se administra una dosis alta, se puede causar depresión o anorexia y si estos signos continúan a pesar de haber dividido la dosis, su uso debe suspenderse, estos efectos adversos han sido asociados con toxicidad hepática y pueden variar entre las diferentes especies de aves.^{1,9,10,66}

1.5.2. Voriconazole

Di Somma *et al* (2007)⁶⁷ han evaluado su uso en el tratamiento de la aspergilosis en halcones, demostrando que la administración oral de este fármaco brinda buenos resultados con pocos efectos adversos. Schmidt *et al* (2007)⁶⁸ midieron las concentraciones de este fármaco en halcones utilizando dosis determinadas y demostraron que existen diferencias entre las concentraciones del antimicótico en el plasma y la especie de halcón a la que se administró y al igual que Di Somma no encontraron efectos adversos.

1.5.3. Anfotericina B

La anfotericina B se usa en casos severos de la enfermedad debido a su naturaleza fungicida y su mayor velocidad de acción.¹⁰ Puede darse simultáneamente por vía intravenosa y en nebulizaciones, seguida con

itraconazole o 5 fluorocitosina. Se requiere administrar por un largo periodo que puede ser por más de 6 meses. Este fármaco tiene una vida media menor en aves que en mamíferos y ésta puede ser la razón por la que no se reporta nefrotoxicidad en las aves.^{29,66}

1.5.4. Terbinafina

Se ha reportado su uso en la aspergilosis aviar y también en combinación con el itraconazole en casos de aspergilosis en la siringe o del tracto respiratorio inferior.^{5,66} Bechert *et al* (2010)¹¹ han realizado estudios sobre la farmacocinética de la terbinafina en aguilillas cola roja (*Buteo jamaicensis*), proponiendo una dosis determinada para el tratamiento de la aspergilosis en aves de presa.

Otros fármacos utilizados incluyen al ketoconazole que es utilizado junto con otros antimicóticos y tiene una amplia distribución a los tejidos, pero no penetra a los fluidos oculares o cerebrospinales y es más tóxico que el itraconazole o fluconazole.^{13,69} El fluconazole, es altamente hidrosoluble y se absorbe bien en el tracto gastrointestinal además de que logra penetrar al tejido cerebral, fluido ocular y cerebroespinal y es el fármaco de elección cuando se desea la penetración a estos sitios pero es común la resistencia que desarrollan muchos hongos y debe combinarse con itraconazole o anfotericina B.^{1,29,69}

Silvanose *et al* (2006)⁷⁰ han comparado el uso de diversos antimicóticos como el voriconazole, itraconazole y anfotericina B en halcones, concluyendo que se obtuvieron los mejores resultados con el voriconazole, desarrollando una menor resistencia y que la mayoría de las especies del género *Aspergillus* son susceptibles a bajas concentraciones en el plasma, en comparación con los otros antimicóticos. Beernaert *et al* en 2009⁷¹ reportaron la resistencia *in vitro* al itraconazole y voriconazole de 59 cepas de *A. fumigatus* aisladas de aves con aspergilosis, lo cual es importante tomar en cuenta en el tratamiento de la enfermedad ya sea en humanos como en animales.

1.6. Prevención

Se deben reducir los factores que puedan llevar al ave a una inmunosupresión como lo es el estrés o la mala nutrición; es necesario mantenerlas en lugares limpios y ventilados, se recomienda la desinfección diaria con cuaternarios de amonio. Hay que evitar fumar cerca del ave o usar sustancias que puedan irritar el aparato respiratorio. Cuando se está tratando otra enfermedad y se administran antibióticos a largo plazo o son usadas dosis inmunosupresoras de corticosteroides, debemos considerar que puede ocurrir una micosis oportunista profunda, también se han utilizado inmunoestimulantes como el levamisol que se ha sugerido ser adyuvante en infecciones crónicas y en humanos se ha observado una mejoría en los casos de aspergilosis utilizando interferon- γ .^{5,13}

1.6.1. Vacunación

Se han desarrollado varias vacunas, principalmente para pavos, brindando una buena protección contra *A. fumigatus*, también se han aplicado vacunas autógenas que parecen ser efectivas reduciendo la aspergilosis, pero es necesario realizar más estudios para evaluar la efectividad de las mismas.^{6,14,15,30}

2. HIPÓTESIS

Si la prueba de PCR tiene una mayor sensibilidad y especificidad que las pruebas serológicas usadas para el diagnóstico de la aspergilosis en aves de presa, entonces la prueba será capaz de diagnosticar la infección en casos subclínicos y en etapas tempranas.

3. OBJETIVO GENERAL

- Utilizar la técnica de PCR para el diagnóstico de la aspergilosis en aves de presa, comparando los resultados con otros métodos diagnósticos con el fin de obtener información sobre la pertinencia de su uso.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Colectar muestras sanguíneas y de tráquea de las aves susceptibles a la aspergilosis para llevar a cabo las pruebas diagnósticas.
- Aislar e identificar *A. fumigatus* de las muestras de tráquea de las aves seleccionadas.
- Producir antígenos somáticos y metabólicos de un aislado de *A. fumigatus* proveniente de un ave de presa para utilizarlos en las pruebas serológicas.
- Identificar anticuerpos contra *A. fumigatus* en las muestras sanguíneas de las aves mediante las pruebas de contraelectroforesis, Inmunodifusión doble y ELISA indirecta.
- Identificar mediante la prueba de PCR a *A. fumigatus* de los aislados obtenidos y las muestras de tráquea.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Muestras clínicas

Se tomaron un total de 35 muestras de sangre, hisopo traqueal y una placa radiográfica de diferentes especies de aves de presa. Una provenía de una clínica veterinaria, 4 de particulares, 8 del Heroico Colegio Militar y 22 del Centro para la Conservación e Investigación de la Vida Silvestre (CIVS) de la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), ubicado en Los Reyes la Paz, Estado de México. De las especies muestreadas 20 fueron aguilillas cola roja (*Buteo jamaicensis*), de los cuales 5 fueron animales juveniles. También se tomaron muestras de: un aguililla cola blanca adulta (*Buteo albicaudatus*), un águila real adulta (*Aquila chrysaetos*), 3 halcones aplomados (*Falco femoralis*) (uno de ellos juvenil), 3 aguilillas de Swainson adultas (*Buteo swainsoni*), un aguililla ferruginosa adulta (*Buteo regalis*), un aguililla negra juvenil (*Buteogallus anthracinus*), un búho cornudo juvenil (*Bubo virginianus*), un nitidus o aguililla gris juvenil (*Buteo nitidus*), un halcón peregrino juvenil (*Falco peregrinus*) y 2 aguilillas de Harris (*Parabuteo unicinctus*) (una juvenil y una de aproximadamente 14 años) (cuadro 1).

Los criterios de inclusión utilizados para la selección de los animales muestreados fueron: que presentaran algún signo como depresión, anorexia, disnea, cambio en la voz, cianosis o pérdida de peso, que hubieran cursado con algún evento estresante como el transporte, cambio de dueño, aves recién capturadas, así como animales inmunosuprimidos, de edad avanzada o muy jóvenes, también se realizó una prueba de esfuerzo, ejercitándolos y observando si presentaban taquipnea para determinar su tolerancia al ejercicio lo que indicaría su capacidad respiratoria.

Número de muestra	Nombre común	Nombre científico	Sexo	Edad	Lugar de procedencia
1	Halcón aplomado	<i>Falco femoralis</i>	Macho	Adulto	Clínica veterinaria
2	Aguililla negra	<i>Buteogallus anthracinus</i>	Hembra	Juvenil	CIVS
3	Búho cornudo	<i>Bubo virginianus</i>	Hembra	Juvenil	CIVS
4	Aguililla cola roja	<i>Buteo jamaicensis</i>	Macho	Adulto	CIVS
5	Aguililla cola roja	<i>Buteo jamaicensis</i>	Hembra	Juvenil	H. Colegio Militar
6	Águila real	<i>Aquila chrysaetos</i>	Macho	Adulto	H. Colegio Militar
7	Aguililla cola roja	<i>Buteo jamaicensis</i>	Macho	Adulto	H. Colegio Militar
8	Aguililla de Swainsoni	<i>Buteo swainsoni</i>	Hembra	Adulto	H. Colegio Militar
9	Aguililla cola blanca	<i>Buteo albicaudatus</i>	Macho	Adulto	H. Colegio Militar
10	Aguililla cola roja	<i>Buteo jamaicensis</i>	Hembra	Adulto	H. Colegio Militar
11	Aguililla de Swainsoni	<i>Buteo swainsoni</i>	Hembra	Adulto	H. Colegio Militar
12	Aguililla de Swainsoni	<i>Buteo swainsoni</i>	Hembra	Adulto	H. Colegio Militar
13	Aguililla cola roja	<i>Buteo jamaicensis</i>	Hembra	Adulto	CIVS
14	Aguililla cola roja	<i>Buteo jamaicensis</i>	Hembra	Adulto	CIVS
15	Aguililla ferruginosa	<i>Buteo regalis</i>	Hembra	Adulto	CIVS
16	Aguililla gris	<i>Buteo nitidus</i>	Hembra	Juvenil	CIVS
17	Aguililla cola roja	<i>Buteo jamaicensis</i>	Macho	Adulto	CIVS
18	Aguililla cola roja	<i>Buteo jamaicensis</i>	Macho	Adulto	CIVS
19	Aguililla cola roja	<i>Buteo jamaicensis</i>	Macho	Juvenil	CIVS
20	Aguililla cola roja	<i>Buteo jamaicensis</i>	Macho	Adulto	CIVS
21	Aguililla cola roja	<i>Buteo jamaicensis</i>	Hembra	Adulto	CIVS
22	Aguililla cola roja	<i>Buteo jamaicensis</i>	Macho	Adulto	CIVS
23	Aguililla cola roja	<i>Buteo jamaicensis</i>	Macho	Adulto	CIVS
24	Aguililla cola roja	<i>Buteo jamaicensis</i>	Macho	Juvenil	Clínica de aves
25	Aguililla cola roja	<i>Buteo jamaicensis</i>	Macho	Juvenil	CIVS
26	Aguililla cola roja	<i>Buteo jamaicensis</i>	Hembra	Juvenil	CIVS
27	Aguililla cola roja	<i>Buteo jamaicensis</i>	Macho	Adulto	CIVS
28	Halcón aplomado	<i>Falco femoralis</i>	Hembra	Juvenil	CIVS
29	Halcón peregrino	<i>Falco peregrinus</i>	Hembra	Juvenil	CIVS
30	Halcón aplomado	<i>Falco femoralis</i>	Hembra	Adulto	Particular
31	Aguililla de Harris	<i>Parabuteo unicinctus</i>	Macho	Adulto	Particular
32	Aguililla de Harris	<i>Parabuteo unicinctus</i>	Hembra	Juvenil	Particular
33	Aguililla cola roja	<i>Buteo jamaicensis</i>	Macho	Adulto	CIVS
34	Aguililla cola roja	<i>Buteo jamaicensis</i>	Hembra	Adulto	CIVS
35	Aguililla cola roja	<i>Buteo jamaicensis</i>	Hembra	Adulto	CIVS

Cuadro 1. Muestras obtenidas de aves de presa mantenidas en cautiverio.

4.2. Obtención de un aislado de *A. fumigatus*

Se recibió en el laboratorio de micología de la FMVZ, UNAM una muestra de sacos aéreos procedentes de la necropsia de un ejemplar de aguililla de Harris, la muestra se cultivó en agar dextrosa Sabouraud con cloranfenicol, incubándolo a 30° y 37°C, así como un examen directo con la tinción de azul de algodón lactofenol, encontrando hifas septadas (figura 1), a las 72 horas hubo crecimiento de colonias con características macroscópicas compatibles con *Aspergillus fumigatus* y la especie fue confirmada al realizar la tinción de azul de algodón lactofenol, observándose vesículas globosas con fiálides en dos terceras partes de la cabeza conidial. De este aislado se colectaron los conidios para su conservación en viales con solución salina estéril con tween 80 al 1%, producción de antígenos y extracción de ADN (ácido desoxirribonucléico).



Figura 1. Tinción de lactofenol azul de algodón de la muestra directa de sacos aéreos de un aguililla de Harris donde el círculo señala una hifa.

4.3. Colección de muestras sanguíneas

Se colectó sangre de las 35 aves seleccionadas en tubos sin anticoagulante para utilizar el suero en las pruebas serológicas de inmunodifusión doble, contraimmunoelectroforesis y ELISA indirecta, así como con anticoagulante (heparina de litio) que se usó para el hemograma. La contención del ave se realizó sujetando las patas con una mano protegida con guante, pasando un dedo entre

los tarso-metatarsos, con la otra mano se sujetó la cabeza y con el antebrazo y haciendo presión hacia nuestro pecho se tuvo el control de las alas del ave. Para obtener las muestras, la venopunción se realizó en la vena yugular y la vena basílica, recolectándose aproximadamente 3 ml de sangre en las aguilillas cola roja (*Buteo jamaicensis*) (se menciona que es posible colectar hasta el 1% de su peso corporal en sangre en aves sanas),⁷² se almacenaron 2.5 ml en un tubo sin anticoagulante y 0.5 ml en tubos con anticoagulante (microtainer, BD, USA) manteniéndose a 4°C hasta el momento en que fueron procesadas. Cabe mencionar que se siguió el protocolo del Comité Institucional para Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación (CICUAE) para el manejo y obtención de muestras de las aves.

4.3.1. Hemograma

La sangre con anticoagulante colectada de las 35 aves fue enviada al departamento de patología clínica de la FMVZ, UNAM para que se llevara a cabo el hemograma.

4.4. Obtención de muestras con hisopo traqueal

Las muestras se obtuvieron de las 35 aves introduciendo un hisopo estéril de rayón (Pur-Wraps, Puritan, USA) (figura 2) en la tráquea del ave (debido a que la presentación que buscamos identificar es la generalizada, cuando afecta a los pulmones). El hisopo se introdujo en la tráquea durante el proceso inspiratorio cuando la glotis se encuentra abierta tratando de no hacer contacto con la cavidad oral y así evitar la contaminación, además del uso de guantes estériles (figura 3). La muestra del hisopo se suspendió en 340 µl de solución salina de fosfatos (PBS) estéril y se agitó.

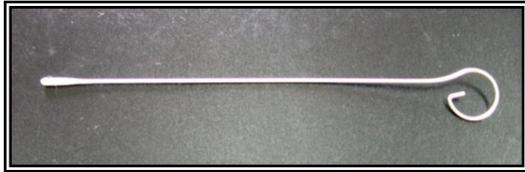


Figura 2. Hisopo de rayón utilizado para obtener las muestras traqueales.



Figura 3. Toma de muestra con hisopo traqueal a un aguililla cola roja juvenil (*Buteo jamaicensis*).

4.4.1. Examen directo con KOH al 20% y azul de algodón lactofenol

Se colocaron 10 μ l de la muestra colectada con el hisopo traqueal suspendida en PBS en un portaobjetos y se agregó una gota de hidróxido de potasio (KOH) al 20% y se protegió con un cubreobjetos. Se realizó el mismo procedimiento con 10 μ l de la misma muestra traqueal en la que se adicionó una gota del colorante azul de algodón lactofenol, se colocó el cubreobjetos y la observación se realizó en el microscopio óptico con los aumentos 10 y 40X para buscar estructuras micóticas.

4.4.3. Cultivo

Se tomaron 20 μ l de la muestra colectada con el hisopo traqueal suspendida en PBS y se cultivaron en agar dextrosa Sabouraud con cloranfenicol, incubándolas a 30°C por un periodo de 7 a 10 días. Los 300 μ l de PBS restantes se almacenaron a -20°C hasta el momento de realizar la PCR.⁷³

Cuando hubo crecimiento de colonias con características fenotípicas compatibles con *A. fumigatus* como el que tuvieran una textura algodonosa, de un color verde-grisáceo y con el reverso de la colonia de un color blanquecino, se realizó la identificación microscópica con la tinción de azul de algodón lactofenol para

observar la presencia de conidióforos con las características ya mencionadas y compararse con los manuales de identificación.

4.5. Producción de antígenos de *Aspergillus fumigatus*

Del aislado de *A. fumigatus* proveniente del aguililla de Harris (*Parabuteo unicinctus*) se procedió a la obtención de los antígenos para realizar las pruebas serológicas.

4.5.1. Obtención de antígeno metabólico

Se cultivó en agar dextrosa Sabouraud y se incubó por una semana a 30°C, se agregaron 10 ml de solución salina estéril con tween 80 al 1% y se removieron los conidios manteniéndolos en viales estériles y se contaron en una cámara de New Bauer.⁷⁴

Los conidios se inocularon en 10 botellas de Roux con 150 ml de caldo Sabouraud (anexo) agregando una concentración de 50×10^6 conidios a cada botella y se incubaron en posición horizontal a 37°C los primeros 3 días y después fueron incubadas a 30°C por 4 semanas.⁷⁴

Posteriormente, el medio fue filtrado a través de papel Whatman número 40 y el filtrado colocado en membranas de diálisis que retienen proteínas con un peso molecular de 12,000 kDa o mayor, estas membranas fueron dializadas en agua corriente por 24 horas. El filtrado fue concentrado aproximadamente 10X mediante el uso de azúcar glass, para después ser filtrado primeramente a través de un pre-filtro y posteriormente esterilizado por filtración a través de un filtro Millipore con membrana de 0.45µm, se adicionó timerosal con una concentración de 1:10,000 y se almacenó a -20°C hasta su uso.⁷⁴

4.5.2. Obtención de antígeno somático

Al micelio que permaneció en las botellas de Roux se le agregaron 150 ml de solución salina de Coca's (anexo), las botellas se almacenaron a 4°C por una semana agitándolas manualmente 3 veces al día, después de este tiempo, la solución fue filtrada, concentrada y esterilizada siguiendo los mismos pasos que con el antígeno metabólico.⁷⁴

4.6. Determinación de la concentración proteica de los antígenos obtenidos mediante el método de Bradford

Para obtener la curva tipo, se realizaron soluciones de 0.5 a 10 mg de albúmina, las soluciones se colocaron en una microplaca, además de las muestras de las que se tomaron 5 µl de cada una, se adicionaron 5 µl de regulador de tris acetato y 200 µl de reactivo de Bradford (anexo). Se incubó durante 5 minutos para después realizar la lectura en un lector de ELISA (Biotek Instruments EL.800, USA) a una longitud de onda de 595 nm.⁷⁵

4.7. Identificación de proteínas de los antígenos de *A. fumigatus* mediante gel de poliacrilamida con duodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) al 5%.

Los antígenos metabólico y somático fueron sometidos a electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) al 5% con una concentración de proteínas de 20 µg/ml, para visualizar las fracciones antigénicas correspondientes. El antígeno crudo fue solubilizado en una solución reguladora de corrida 2X (anexo) a 100°C/5 min. Con una fuente de poder Amersham Bioscience EPS 301 y una cámara Miniprotean III Cell, Bio-Rad, se llevó a cabo la electroforesis para geles de 0.75 mm bajo las siguientes condiciones: 10 mA/50 V/1.5 h/ 4°C. Después de este tiempo el gel fue teñido con azul de Coomassie durante 2 hrs y posteriormente se sumergió en la solución decolorante para poder observar las bandas que corresponden a las fracciones antigénicas y notar las diferencias entre el antígeno metabólico y el somático.⁷⁶

4.8. Contrainmunolectroforesis

Se utilizaron dos portaobjetos colocados sobre una placa de plástico a los que se les vertieron 5 ml de agarosa con amortiguador veronal pH 8.2 a cada uno, una vez solidificados se mantuvieron a 4°C por 10 minutos para tener una mejor consistencia, en cada portaobjetos se hicieron pozos paralelos de 3 mm de diámetro, dejando una separación entre pozos de 5 mm entre cada par (figura 4) Los pozos de la izquierda se llenaron con 20 µl del antígeno metabólico con una concentración de 80 µg/ml y los pozos de la derecha con 20 µl de suero, en uno de estos pozos se colocó el control positivo (suero hiperinmune de conejo contra *A. fumigatus* proporcionado por el laboratorio de micología, FMVZ, UNAM), y en el resto de los pozos los sueros problema. El antígeno metabólico se colocó hacia el cátodo (polo negativo) y los anticuerpos hacia el ánodo (polo positivo) ya que al aplicar la corriente eléctrica el antígeno migra hacia el ánodo y los anticuerpos hacia el cátodo, lo que hará que se forme una precipitación al encontrarse y reaccionar ambos elementos. La placa con los portaobjetos fue colocada en una cámara de electroforesis horizontal que contenía 500 ml de amortiguador veronal en cada compartimento, se colocó un trozo de tela haciendo contacto entre la agarosa y el líquido para cerrar el circuito, con una fuente de poder (Amersham Bioscience EPS 301) se aplicó una corriente de 100 V/8 mA durante 90 minutos. Después se dejó enfriar la placa a 4°C por 15 minutos, se separaron los portaobjetos y se lavaron con PBS por 24 hrs, se cambió el PBS por agua destilada permaneciendo por 24 hrs. Las laminillas se secaron a 46° C de 6 a 8 h y se tiñeron con el colorante negro de amido al 0.1% por 6 minutos, se agregó solución decolorante (anexo) para observar las líneas de precipitación.⁷⁴

4.9. Inmunodifusión doble

En una caja de Petri de 90x15 mm se agregaron 11 ml de agar purificado con solución salina de fosfatos (anexo) y se dejó solidificar a 4°C por 5 minutos. Se perforó un pozo central y 6 pozos alrededor de 5 mm de diámetro cada uno teniendo una separación entre el pozo central y los demás de 2 mm. El pozo central fue llenado con el antígeno somático de *A. fumigatus* con una concentración de 80 µg/ml, en los pozo 1 y 4 se colocó el control positivo (suero hiperinmune de conejo contra *A. fumigatus*), en los pozos 2 y 5 el control negativo (agua destilada estéril) y en los pozos 3 y 6 los sueros problema (figura 5), en cada pozo se colocaron 30 µl de cada uno de los controles, sueros y antígeno. La caja se mantuvo en cámara húmeda a temperatura ambiente y fue revisada además de rellenados los pozos a las 24, 48 y 72 horas para observar las líneas de precipitación. En el pozo 1 y 4 (controles positivos) se deben formar las líneas de precipitación entre el pozo del suero y el antígeno, los pozos 2 y 5 no presentan algún cambio y dependiendo del suero problema colocado en los pozos 3 y 6 se nota la ausencia o presencia de líneas de precipitación, después de este proceso, el agar se retiró de la caja de Petri, fue lavado con PBS por 24 hrs. y después con agua destilada por 24 hrs, se secó a 46°C de 6 a 8 h y fue teñido con el colorante negro de amido al 0.1% por 6 minutos, se agregó solución decolorante (anexo) para observar las líneas de precipitación.⁷⁴

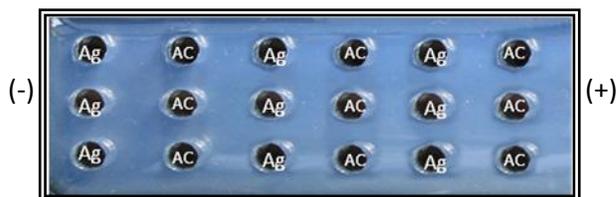


Figura 4. Patrón utilizado en la contraelectroforesis, el antígeno es colocado hacia el cátodo y los sueros hacia el ánodo.

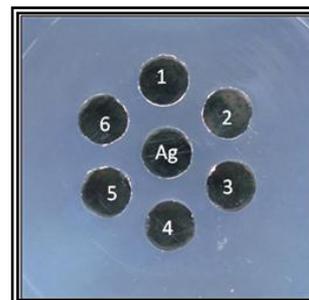


Figura 5. Patrón utilizado en la inmunodifusión doble, en los pozos 1 y 4 se colocan los controles positivos, pozos 2 y 5 control negativo, pozos 3 y 6 sueros problema y en el pozo central el antígeno.

4.10. ELISA indirecto

Se siguió la metodología descrita por la Universidad de Miami, Miller School of Medicine, quienes utilizan un conjugado anti-pollo, ya que se ha demostrado que existe una reacción cruzada con otras especies de aves.⁴⁰

1. El antígeno somático de *A. fumigatus* se diluyó en una solución amortiguadora de carbonatos con pH de 9.6⁷⁷ para obtener una concentración de 1 µg/ml y en una microplaca de 96 pozos (Nunc, USA) se colocaron 50 µl en cada pozo, la placa se mantuvo a 4°C toda la noche.
2. Se lavó 5 veces con PBS y Tween 20 (Research organics, USA) al 0.05% secando el exceso y se bloqueó adicionando 50 µl de leche descremada al 5% (BD Difco, USA), dejándola a temperatura ambiente por 2 horas.
3. La placa se lavó 5 veces con PBS y Tween 20 al 0.05% y se secó el exceso.
4. La placa se mantuvo a 4°C hasta su uso.
5. El suero se diluyó con PBS (1:2) y se colocaron 50 µl en cada pozo, incubándose a 37°C por 30 minutos.
6. Se repitió el paso número 3.
7. Se adicionaron 50 µl del conjugado anti-pollo diluido en PBS (1:300) [anti-chicken IgY (whole molecule)- peroxidase, antibody produced in rabbit, Sigma Aldrich, Israel] y se incubó a 37°C por 30 minutos.
8. Se repitió el paso número 3, se agregaron 50 µl del sustrato 2,2'-azino-bis (3-etilbenzthiazolin-6- ácido sulfónico) (Sigma, USA) por 10 minutos.
9. La reacción se detuvo adicionando 50 µl de ácido sulfúrico 2N en cada pozo.

10. La placa fue leída en un lector de ELISA (Biotek EL800, USA) con una longitud de onda de 405 nm.³⁴

Se corrieron al mismo tiempo las muestras positivas y negativas (incluyendo un control positivo que correspondió al suero de un pingüino africano (*Spheniscus demersus*) proveniente de la Universidad de Miami), la absorbancia de los negativos fue promediada. La absorbancia de las muestras problema se dividió entre el promedio de las muestras negativas para producir un índice que se ha utilizado para determinar si un ave está enferma y que ha sido elegido como aves negativas las que presentan un índice <1.4 y las aves positivas son las que presentan un índice ≥ 1.4 .³⁴

4.11. Extracción de ADN de *A. fumigatus*.

Se cultivó el aislado de *Aspergillus fumigatus* proveniente la muestra de sacos aéreos del aguililla de Harris (*Parabuteo unicinctus*), el aislado del aguililla cola roja (*Buteo jamaicensis*) número 24, además de la cepa A20; cada una fue inoculada en 50 ml de caldo dextrosa Sabouraud por 48h, manteniéndolo en agitación a 150 revoluciones por minuto a 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 nitrógeno líquido para enfriarlo. Posteriormente, se colocó la masa fúngica y se adicionó más nitrógeno líquido y se maceró hasta obtener un polvo blanco. El polvo se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 ml hasta llegar a la primer marca (0.1 ml), se añadieron 600 μ l de solución de lisis (anexo) y se agitó fuertemente hasta obtener una mezcla homogénea, se adicionaron 10 μ l de proteinasa K a una concentración final de 200 μ g/ml y la mezcla se incubó en baño María durante 30 min a 65°C. Transcurrido este tiempo, se añadieron 600 μ l de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y se agitó firmemente hasta que se obtuvo una mezcla de aspecto lechoso. Se centrifugó a 14,000 g por 15 min. Terminada la centrifugación, se transfirieron 400 μ l de la fase acuosa de la superficie a otro tubo Eppendorf y se añadieron 40 μ l de acetato de amonio 3M y 880 μ l de etanol

absoluto frío y se incubó a -20°C durante 20 minutos. Después de esto, el tubo se centrifugó a $14,000\text{ g por }5\text{ min}$ para que se formara una pastilla en el fondo, el etanol absoluto se decantó y se adicionó 1 ml de etanol al 70% centrifugando a $15,000\text{ g por }5\text{ min}$, nuevamente se decantó el etanol y el ADN se dejó secar a temperatura ambiente. La pastilla se suspendió en $50\text{ }\mu\text{l}$ de agua estéril. Se adicionaron $16\text{ }\mu\text{l}$ de ARNasa a una concentración de $10\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y se incubó a 37°C por 20 min . El ADN obtenido fue visualizado por electroforesis ($80\text{ V}/80\text{ mA}$ y 45 min) en un gel de agarosa al 1% adicionado con bromuro de etidio (5 mg/ml) para observar su calidad con un transiluminador de luz UV (Lab-net, TM26, USA), cada pozo del gel fue llenado con $7\text{ }\mu\text{l}$ de ADN más $1\text{ }\mu\text{l}$ de colorante de carga. La concentración del ADN se determinó en un biofotómetro Eppendorf y se almacenó a -20°C hasta su uso.⁷⁸

4.12. Extracción de ADN de las muestras colectadas con el hisopo traqueal y suspendidas en PBS

Con los $300\text{ }\mu\text{l}$ de la muestra traqueal suspendida en PBS restantes, en un tubo Eppendorf se llevó a cabo la extracción de ADN agregando $20\text{ }\mu\text{l}$ de proteinasa K, seguido de $200\text{ }\mu\text{l}$ de amortiguador de lisis (anexo) y la suspensión se incubó en baño María a 65°C por 60 minutos .⁵⁰ Después se agregó un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico ($25:24:1$), agitando firmemente hasta obtener una mezcla de aspecto lechoso. Se centrifugó a $14,000\text{ g por }15\text{ min}$, terminada la centrifugación se formaron las tres fases, se transfirió la fase acuosa a otro tubo Eppendorf, añadiendo 0.1 volumen de acetato de amonio 3M y 2 volúmenes de etanol absoluto frío, se agitó el tubo invirtiéndolo suavemente y se incubó a -20°C por 20 minutos . Se centrifugó a $14,000\text{ g por }5\text{ min}$, transcurrido este tiempo, se decantó el etanol absoluto y se adicionó 1 ml de etanol al 70% , agitando suavemente. Se decantó el etanol dejando secar el ADN a temperatura ambiente. El ADN fue suspendido en $10\text{ }\mu\text{l}$ de agua estéril, agregando $8\text{ }\mu\text{l}$ de ARNasa a una concentración de $10\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$ e incubando a 37°C por 40 minutos . La concentración del ADN se determinó en un biofotómetro Eppendorf, almacenándose a -20°C hasta su uso.⁷⁸

4.13. PCR

Se realizó la prueba de PCR con ADN de *A. fumigatus* de la cepa A20, los aislados del aguililla de Harris (*Parabuteo unicinctus*), aguililla cola roja juvenil (*Buteo jamaicensis*) número 24 y con las muestras de hisopos traqueales de aves de presa, utilizando los iniciadores con los que cuenta el laboratorio de micología de la FMVZ de la UNAM, los cuales amplifican las regiones ITS1 e ITS2 de *A. fumigatus*, con los que se obtiene un producto de 350 pares de bases y que a continuación se describen:

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

Para la región ITS 2 es el Afu1R 5'-ATAAAGTTGGGTGTCGGCTG- 3' ⁶⁵

La PCR se realizó en un volumen de 50 µl, con 5 µl de amortiguador de reacción 10x, 1.5 mMol de MgCl₂, 100 µM de DNTP's de cada uno, 1.5U de *Taq* polimerasa, 30 pM de cada iniciador y 20 ng de ADN de la cepa A20 (control positivo), aguililla de Harris, aguililla cola roja número 24 y el resto de las muestras traqueales, se alicuotó a 50 µl de volumen final con agua destilada estéril. Las condiciones del termociclador para la PCR fueron: 40 ciclos comenzando con una desnaturalización inicial del ADN a 95°C por 4.5 minutos. Cada ciclo consistió de una desnaturalización a 95°C por 30 segundos, una alineación a 50°C por 30 segundos y una amplificación a 72°C por un minuto. Se terminó con una extensión final a 72°C por 3 minutos^{63,65} El producto se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1% adicionado con bromuro de etidio en amortiguador TAE (tris acetato EDTA) 1x a 80 V/80 mA durante 45 min para poder visualizarlo en un transiluminador de luz UV (Lab-net, TM26, USA).

4.14 Análisis estadístico

Para conocer la frecuencia de la aspergilosis en las aves muestreadas que son mantenidas en cautiverio se realizó una estadística descriptiva debido a la cantidad de muestras procesadas y a que sólo se obtuvo una muestra positiva. La frecuencia resultó de dividir el número de animales positivos entre el total de aves muestreadas.

Por otro lado, con las pruebas realizadas se determinó la sensibilidad y especificidad utilizando las siguientes fórmulas:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{VP}{VP+FN}$$

$$\text{Especificidad} = \frac{VN}{VN+FP}$$

VP= verdaderos positivos

FN= falsos negativos

VN=verdaderos negativos

FP=falsos positivos

5. RESULTADOS

5.1. Hemograma

En esta prueba, de las 35 muestras se encontró que 5 mostraron leucocitosis, teniendo en cuenta que el valor normal de un ave de presa es de 13,000 células/ μ l. Las muestras correspondían a un aguililla cola blanca adulta (*Buteo albicaudatus*) (muestra número 9) con un resultado de 21,100 células/ μ l, un aguililla cola roja adulta (*Buteo jamaicensis*) (muestra número 13) que obtuvo 26,800 células/ μ l, un aguililla cola roja juvenil (muestra 19) con un resultado de 21,100 células/ μ l, un aguililla cola roja adulto marcada como la muestra 20 con un valor de 29,700 células/ μ l y un aguililla cola roja adulto (muestra número 21) con un resultado de 23,800 células/ μ l. (cuadro 2)

5.2. Placa radiográfica

Se tomaron placas radiográficas del aguililla cola roja marcada como la muestra número 24, ya que presentaba una fractura en el húmero izquierdo, ahí se observaron lesiones radio opacas en los pulmones que sugerían una posible infección por aspergilosis (figura 6). Esta ave requirió de especial atención ya que podía ser un caso positivo.



Figura 6. Placa radiográfica del aguililla cola roja (*Buteo jamaicensis*) número 24 donde en el círculo se aprecian zonas radio opacas en los pulmones sugerentes a aspergilosis.

Prueba Núm. de muestra	PCR	ELISA indirecto	Contrainmuno- electroforesis	Inmunodifusión doble	Cultivo	Hemograma
1	-	-	-	-	-	Normal
2	-	-	-	-	-	Normal
3	-	-	-	-	-	Normal
4	-	-	-	-	-	Normal
5	-	-	-	-	-	Normal
6	-	-	-	-	-	Normal
7	-	-	-	-	-	Normal
8	-	-	-	-	-	Normal
9	-	-	-	-	-	Leucocitosis
10	-	-	-	-	-	Normal
11	-	-	-	-	-	Normal
12	-	-	-	-	-	Normal
13	-	-	-	-	-	Leucocitosis
14	-	-	-	-	-	Normal
15	-	-	-	-	-	Normal
16	-	-	-	-	-	Normal
17	-	-	-	-	-	Normal
18	-	-	-	-	-	Normal
19	-	-	-	-	-	Leucocitosis
20	-	-	-	-	-	Leucocitosis
21	-	█	-	-	-	Leucocitosis
22	-	-	-	-	-	Normal
23	-	-	-	-	-	Normal
24	█	█	-	-	+	Normal
25	-	-	-	-	-	Normal
26	-	-	-	-	-	Normal
27	-	-	-	-	-	Normal
28	-	-	-	-	-	Normal
29	-	-	-	-	-	Normal
30	-	-	-	-	-	Normal
31	-	-	-	-	-	Normal
32	-	-	-	-	-	Normal
33	-	-	-	-	-	Normal
34	-	-	-	-	-	Normal
35	-	-	-	-	-	Normal

Cuadro 2. Resultados de las pruebas realizadas a las muestras colectadas. Se aprecian resultados positivos en la prueba de ELISA indirecta en las muestras 21 y 24 y un resultado positivo en PCR y cultivo con la número 24.

5.3. Examen directo con KOH al 20% y azul de algodón lactofenol

De las 35 muestras estudiadas, en ninguna se observó alguna estructura micótica.

5.4. Cultivo

Con relación al cultivo, en la muestra número 24 se obtuvo crecimiento de colonias fenotípicamente compatibles con *A. fumigatus*, es decir, con una coloración verde-grisácea, textura algodonosa y reverso blanquecino, estas colonias se observaron a las 72 h después de su cultivo (figura 7). Se llevó a cabo la tinción de azul de algodón lactofenol de estos crecimientos para corroborar que se trataba de la especie mencionada, pudiendo observarse con el microscopio óptico con el aumento 40X, conidióforos con una vesícula globosa que presentaba una hilera de fiálides que la cubrían en dos terceras partes, comparados en manuales de identificación, confirmándose que la morfología microscópica correspondió a *A. fumigatus*. De este aislado se colectaron conidios para conservarlos en viales con solución salina estéril y tween 80 al 1%.

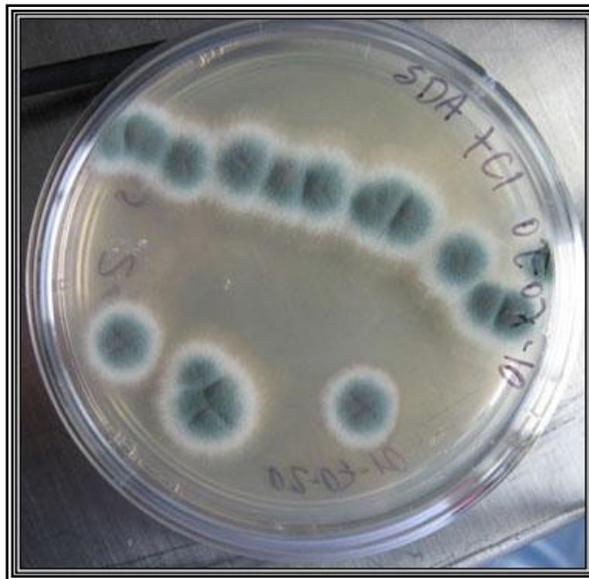


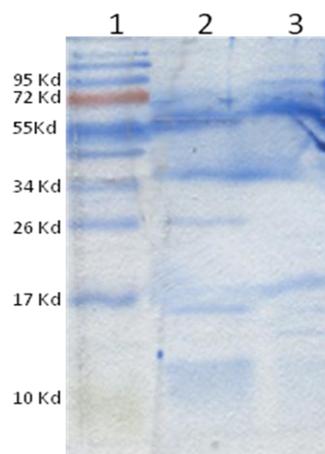
Figura 7. Cultivo a las 72 h en agar dextrosa Sabouraud a 30°C de la muestra proveniente de un aguililla cola roja juvenil (*Buteo jamaicensis*) (muestra número 24), observándose el crecimiento de colonias de *A. fumigatus*.

5.5. Determinación de la concentración proteica de los antígenos metabólicos y somáticos de *A. fumigatus*.

La concentración proteica del antígeno metabólico, determinada por el método de Bradford fue de 154 µg/ml y el antígeno somático tuvo una concentración de 209 µg/ml, conociendo éste dato, se realizaron diluciones para saber la concentración más adecuada con la que se formaban líneas de precipitación en la contraelectroforesis, así como en la inmunodifusión doble, observando que donde se formaban estas líneas con más claridad fue con la concentración de 80 µg/ml.

5.6. Identificación de proteínas de los antígenos de *A. fumigatus*, mediante gel SDS-PAGE.

Se visualizaron las fracciones de los antígenos producidos mediante geles SDS-PAGE al 5%, distinguiéndose bandas de diferentes pesos moleculares, el antígeno metabólico presentó 6 bandas de 13, 16, 18, 30, 37 y 60 kDa en comparación con el somático en el que se observaron 3 bandas de 20, 37 y 60 kDa (figura 8). Estas bandas representan las diferentes fracciones antigénicas de antígenos crudos y se ha descrito que las bandas con mayor antigenicidad son las que tienen un peso molecular de 37, 40, 55, 60 y 90 kDa.^{38,79}



5.7 Contrainmunolectroforesis e inmunodifusión doble

Se llevó a cabo la CIE e IDD a las 35 muestras colectadas donde sólo se observaron las líneas en los controles positivos y en ninguna de las aves se observaron líneas de precipitación (cuadro 2) (figuras 9 y 10).

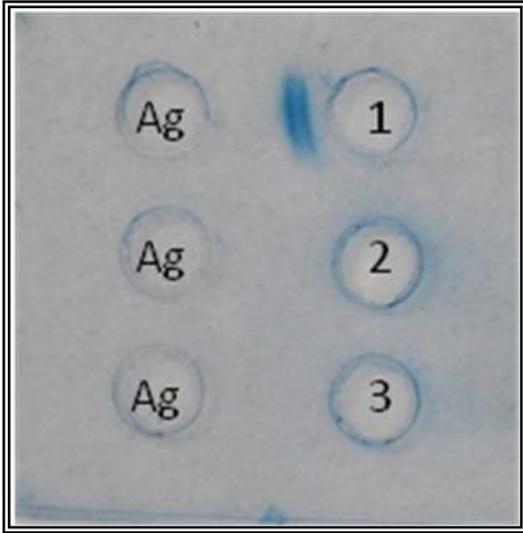


Figura 9. Contrainmunolectroforesis del suero del aguililla cola roja 24 (*Buteo jamaicensis*), Pozo 1: control positivo, pozo 2: suero del aguililla cola roja número 24 y pozo 3: suero de un aguililla cola roja (muestra 25), observándose sólo líneas de precipitación en el control positivo. Laminilla teñida con negro de amido al 0.1%.

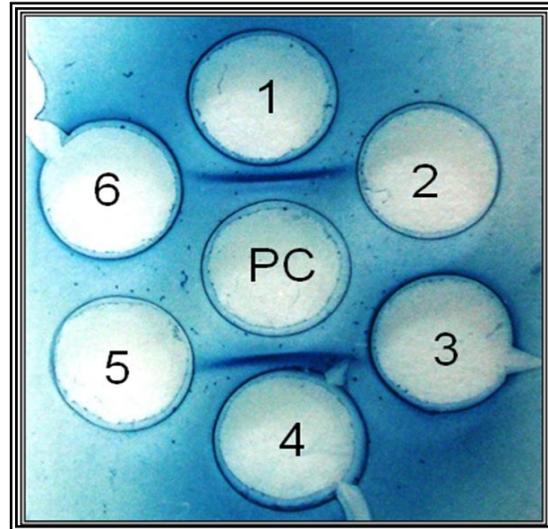


Figura 10. Inmunodifusión doble de los sueros colectados, En el pozo central (PC) se colocó el antígeno somático. Pozo 1 y 4 el control positivo; pozos 2 y 5 el control negativo; pozo 3 suero del aguililla cola roja número 24 y pozo 6: suero de un aguililla cola roja (muestra número 25). Gel teñido con negro de amido al 0.1%.

5.8. ELISA indirecto

Se realizó esta ELISA con los 35 sueros de las aves muestreadas, además de un control positivo de un suero de pingüino africano (*Spheniscus demersus*) que se utilizó como referencia y. Las absorbancias obtenidas de las aves sin leucocitosis y negativas en el resto de las pruebas fueron utilizadas como controles negativos, el suero de pingüino fue considerado como el control positivo y que serviría como referencia para interpretar los resultados, además de incluir a la muestra positiva

del aguililla cola roja lo que fue demostrado con el cultivo, placa radiográfica y PCR.

El valor promedio obtenido de los controles negativos fue de 0.169, este valor fue el que se utilizó para determinar el índice. En el caso del pingüino, se dividió su absorbancia (0.287) entre el promedio de los controles negativos (0.169) y el resultado fue 1.7, este suero fue utilizado como referencia para tener un valor en el cual basarse, los demás resultados pueden observarse en el cuadro 3.

Muestra	Absorbancia	Índice
27	0.159	Control negativo
17	0.168	Control negativo
12	0.154	Control negativo
11	0.198	Control negativo
Pingüino	0.287	1.7
24	0.370	2.19
21	0.304	1.8

Cuadro 3. Absorbancias resultantes de los controles negativos, el control positivo y los índices positivos en la prueba de ELISA indirecta.

5.9. Extracción de ADN de *A. fumigatus* de la cepa A20 y de los aislados clínicos

Se extrajo ADN de la cepa A20 que se empleó como control positivo en la PCR, del aislado obtenido del aguililla de Harris (*Parabuteo unicinctus*) utilizada para la producción de antígenos, además del aislado del aguililla cola roja (*Buteo jamaicensis*) número 24, el producto obtenido fue de buena calidad consiguiendo una concentración de 114 µg/ml para la primera, de 82 µg/ml para la segunda y de 86 µg/ml en la tercera, (figura 11) con este ADN se llevó a cabo la PCR con los iniciadores disponibles en el laboratorio de micología de la FMVZ, UNAM.

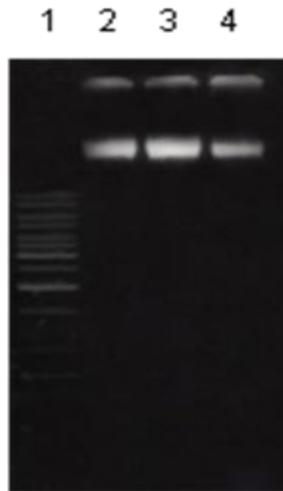


Figura 11. Gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio de las muestras de ADN de *A. fumigatus*. Carril 1: marcador de peso molecular de 1 kb (GeneRuler, Fermentas). Carril 2: la cepa A20. Carril 3: aislado del aguililla de Harris (*Parabuteo unicinctus*). Carril 4: aislado de la muestra número 24.

5.10. PCR

La PCR fue realizada con el ADN del aislado del aguililla de Harris, de la cepa A20 de *A. fumigatus* y del aislado del aguililla cola roja (*Buteo jamaicensis*) número 24, obteniendo amplificados de 350 pb en las tres (figura 12), lo que demuestra que genotípicamente corresponden a la especie descrita.

También se llevó a cabo la PCR a partir del ADN de las muestras colectadas con el hisopo traqueal, en todas las pruebas se utilizaron controles positivos (cepa A20) y negativos (agua destilada estéril). La banda que distingue a *A. fumigatus* se logró observar en la muestra número 24 (cuadro 2) (figura 13) en comparación con la ausencia de fragmento en la muestra 19 la cual presentó leucocitosis.

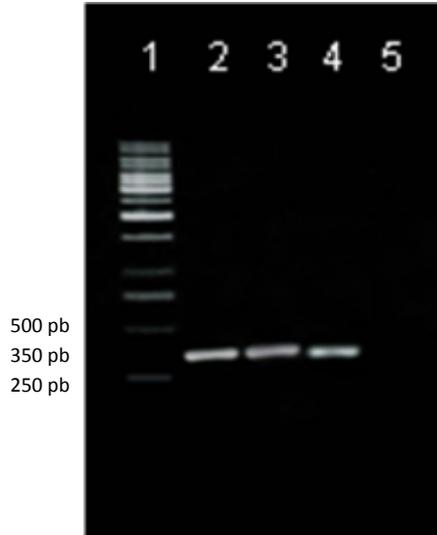


Figura 12. Gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio de los productos de PCR. Carril 1: marcador de peso molecular de 1 kb. Carril 2: ADN de *A. fumigatus* cepa A20. Carril 3: aguililla de Harris. Carril 4: muestra número 24. Carril 5: control negativo.

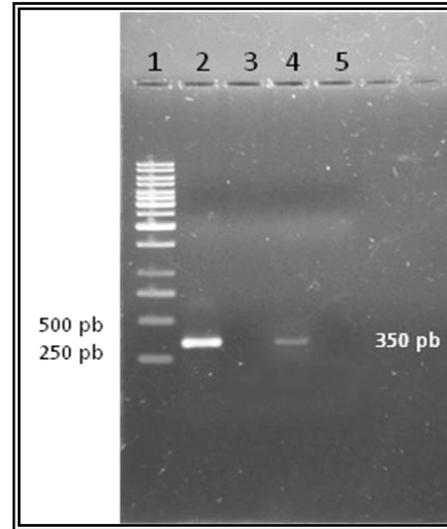


Figura 13. Gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio del producto de PCR de la muestra positiva (número 24). Carril 1: marcador de 1kb. Carril 2: control positivo *A. fumigatus* A20. Carril 3: control negativo. Carril 4: amplificado de la muestra de un aguililla cola roja (número 24). Carril 5: muestra de un aguililla cola roja (número 19).

5.11 Análisis estadístico

Al realizar este análisis se encontró una frecuencia de la aspergilosis del 5.5% en aves de presa mantenidas en cautiverio, cabe mencionar que las muestras se colectaron en un lapso de dos años y los dos casos positivos se presentaron en los meses de junio y julio que de acuerdo a la literatura es el tiempo con mayor frecuencia de la enfermedad.

La sensibilidad y especificidad obtenidas en la PCR fue del 100%. ELISA indirecto tuvo una sensibilidad del 50% y una especificidad del 97%.

6. DISCUSIÓN

La aspergilosis es una enfermedad de relevancia en aves de presa mantenidas en cautiverio, ya que se ha reportado que alrededor del 30% de las muertes de estas aves mantenidas en zoológicos son debidas a esta micosis.⁶ En México se desconoce el impacto que tiene esta infección en las rapaces cautivas, en el presente estudio se encontró una frecuencia de la enfermedad del 5.5% que es una cifra alta considerando los criterios de inclusión de las aves seleccionadas.

En este estudio se encontró un caso avanzado de aspergilosis en un aguililla cola roja juvenil (*Buteo jamaicensis*) (muestra número 24), en la cual se observó en la placa radiográfica zonas radio opacas en los pulmones, la literatura considera a esta especie de aves como una de las más susceptibles a la enfermedad; no se reportó que el ave tuviera signos clínicos, y en las pruebas serológicas sólo fue posible la identificación de anticuerpos contra *A. fumigatus* con la técnica de ELISA indirecta y en esta ave el resultado en el hemograma fue normal. Con relación a la PCR se obtuvo un amplificado de 350 pb concordando con el patrón del control positivo (cepa A20).

El 57.14% (20/35) de los animales muestreados fueron aguilillas cola roja (*Buteo jamaicensis*), poniéndose especial atención a esta especie que además de su susceptibilidad a la aspergilosis, es un ave común en México. Por lo que se refiere a la edad de las aves, el 31.4% (11/35) de las muestras colectadas correspondió a animales juveniles y el 68.6% (24/35) a animales adultos de los que en la mayoría se desconocía la edad exacta. Como se ha mencionado, la edad es uno de los factores para la presentación de la aspergilosis, siendo los más afectados los animales jóvenes y viejos.

Otro caso positivo a aspergilosis, fue la muestra de sacos aéreos remitidos al diagnóstico micológico del departamento, que provenían de un aguililla de Harris (*Parabuteo unicinctus*) macho, adulto de 6 años, en este caso no se reportaron

signos clínicos, el ave presentaba una fractura en la tibia izquierda y heridas en otras partes del cuerpo causadas por mordidas de un perro. La presentación de la infección en esta ave, fue de interés debido a que se ha reportado como una de las especies con mayor resistencia a la aspergilosis; sin embargo, factores como la dieta, la localización de la percha y el estrés al que fue sometido el animal pudieron generar una inmunosupresión que favoreció el desarrollo de la micosis. Este hallazgo influyó para que se colectaran dos muestras más de aguilillas de Harris, una de un macho de aproximadamente 14 años y una hembra juvenil sin antecedentes de aspergilosis pero con la intención de saber si la edad podría influir de forma más directa en la presentación de la aspergilosis, los resultados obtenidos en las diferentes pruebas demostraron que estas aves no padecían de aspergilosis.

Por otro lado, entre las 35 muestras, una provenía de un halcón peregrino juvenil (*Falco peregrinus*), especie que se encuentra en peligro de extinción, de ahí la importancia de conocer su estado de salud. Otra de las muestras interesantes fue la de un búho cornudo juvenil (*Bubo virginianus*), del cual la información con relación a la presentación de la aspergilosis es escasa. Los resultados de las pruebas realizadas fueron negativos en estas aves.

En el hemograma se encontraron cinco de las 35 muestras con leucocitosis. Una de ellas, la muestra marcada con el número 21 proveniente de un aguililla cola roja adulta, en la prueba de ELISA indirecta se detectaron anticuerpos contra *A. fumigatus*, el cultivo fue negativo y no se logró la amplificación del fragmento de 350 pb en la PCR. En este caso la identificación de anticuerpos pudo deberse a una infección previa o a una exposición constante al agente³⁴ ya que no presentaba signos clínicos sugestivos de la enfermedad. Es probable que los cinco animales que presentaron leucocitosis, hayan cursado con un proceso bacteriano o viral.

Como se ha mencionado las placas radiográficas son de gran valor diagnóstico, permitiendo observar lesiones en los pulmones y en los sacos aéreos, aunque una de las desventajas es que detectan la aspergilosis en una etapa avanzada. Este examen se realizó para el ave marcada con el número 24, en la Clínica de Aves de la FMVZ. En cuanto a los otros animales, los lugares donde son mantenidos no cuentan con el equipo necesario para realizar este examen y la movilización de los animales es complicado debido a los permisos que se deben tramitar para transportarlos a otros sitios. En la muestra número 24 se observaron zonas radio opacas en los pulmones lo que sugería una aspergilosis avanzada aunque la tuberculosis también puede provocar este tipo de lesiones; sin embargo, los resultados obtenidos en la prueba de PCR, el aislamiento del hongo y la identificación de anticuerpos contra *A. fumigatus* con la técnica de ELISA indirecta confirmaron la presentación de la enfermedad.

Por lo que se refiere al cultivo, se logró el aislamiento de *A. fumigatus* en la muestra número 24. Al respecto, Bauck (1994)⁷ y Beernaert *et al* (2010)⁸⁰ indican que el aislamiento del hongo no es definitivo para confirmar la infección, ya que mencionan que puede existir una contaminación de la muestra debido a que el hongo es ubicuo y cuando no es posible aislarlo, esto no significa la ausencia de enfermedad. Además, en este estudio en el cultivo de las muestras traqueales se obtuvieron aislados de hongos saprófitos no relacionados a procesos infecciosos en las aves y su aislamiento pudo deberse a que diariamente son inhaladas esporas de diferentes hongos por las aves, pero que al no ser patógenos, no representan ningún riesgo para el animal.

Con relación a las pruebas serológicas realizadas, en la CIE e IDD no se logró la detección de anticuerpos contra este hongo en las aves muestreadas, lo cual puede deberse a una baja producción de éstos y a que las pruebas no son lo suficientemente sensibles para detectar bajos niveles de anticuerpos en estos animales.² Existen reportes del uso de estas pruebas en mamíferos y la información en aves es escasa, por lo que en este estudio se decidió llevarlas a

cabo y de acuerdo a los resultados negativos no se recomienda su uso para el diagnóstico de la aspergilosis aviar.

En este estudio con la prueba de ELISA indirecta, la cual se sabe que es más sensible y específica que la CIE e IDD, se logró la detección de anticuerpos contra *A. fumigatus* en dos de los animales muestreados, como se ha mencionado, una de ellas es la muestra 24 con un índice igual a 2.19 y la muestra 21 con un índice de 1.8. La identificación de anticuerpos en la muestra 24, así como los resultados de las demás pruebas utilizadas, indican que este animal cursaba con una infección activa. Sin embargo, en la muestra 21 es posible que los anticuerpos detectados hayan sido por una exposición ambiental al hongo, ya que los resultados de las demás pruebas fueron negativas.

Redig *et al* (1997)²⁵ y Cray *et al* (2009a)³⁴ señalan que la ELISA indirecta es una de las pruebas serológicas que ha sido de utilidad en el diagnóstico de aspergilosis aviar y este tipo de ensayos logran detectar anticuerpos contra *A. fumigatus* desde la segunda semana postinfección.^{80,81} La metodología aquí descrita ha sido probada por Cray *et al* (2009a)³⁴ con diferentes especies aviares, quienes han hecho estudios en aves de presa, psitácidos, aves de zoológico y aves acuáticas, concluyendo que los mejores resultados fueron obtenidos con los psitácidos debido a que generan una menor cantidad de anticuerpos y los que son detectados representan una infección por este hongo.

En México los psitácidos son de las principales aves de compañía y las más susceptibles a la aspergilosis, estas aves también son conservadas en cautiverio en las Unidades de Conservación, Manejo y Aprovechamiento Sustentable de la Vida Silvestre (UMAS), además de ser exhibidas en los zoológicos. De acuerdo a Cray *et al* (2009a),³⁴ los títulos de anticuerpos detectados en este tipo de aves son de valor diagnóstico, por lo tanto la implementación de la técnica de ELISA indirecta en nuestro país sería útil debido a la relativa facilidad en la obtención del suero sanguíneo, en contraste con otras pruebas que utilizan para su diagnóstico muestras traqueales como son el aislamiento y la PCR, pruebas necesarias en

otras aves para confirmar una aspergilosis. En los psitácidos la obtención de este tipo de muestras clínicas es más complicado debido a las diferencias anatómicas en la cavidad oral, la fuerza que ejercen para evitar que se les abra el pico y al introducir del hisopo es difícil evitar el contacto con la cavidad oral o con la glotis que lo pudieran contaminar.

En cuanto a los ensayos moleculares, en este estudio fue posible la detección del fragmento de 350 pb de los aislados de *A. fumigatus* de la cepa de referencia A20, del aguililla de Harris y del ave número 24, lo cual concuerda con lo reportado por Camarillo (2008)⁶⁵ quien obtuvo el mismo fragmento de aislados de *A. fumigatus*.

Cuando se realizó la prueba utilizando las muestras de tráquea, al igual que con los aislados se logró la detección del fragmento de 350 pb en la muestra 24. Este resultado indica que es posible la identificación de ADN de *A. fumigatus* a partir de muestras de tráquea. Sin embargo, esto sólo se observó en una de las 35 muestras trabajadas, por lo que sería conveniente realizar este ensayo incrementando el número de muestras y los casos positivos a aspergilosis tanto al aislamiento como a la detección de anticuerpos.

Entre los escasos reportes sobre el uso de la PCR para el diagnóstico de aspergilosis en aves se encuentra el de Dahlhausen *et al* (2004)⁶² quienes se enfocan en la identificación del agente a partir de muestras clínicas y sólo mencionan el uso de la PCR en tiempo real como método diagnóstico sin describir la técnica ni los resultados.

Por lo anterior y debido a la escasez de información sobre el uso de la PCR en aves, sería conveniente realizar más estudios siguiendo la metodología aquí presentada con el incremento en número y tipo de muestras clínicas, por ejemplo mediante lavados traqueales; sin embargo, considerando la naturaleza de las aves el contar con una muestra clínica idónea puede tener algunos inconvenientes. Otra opción de PCR que podría ser utilizada es la PCR en tiempo real, que se ha reportado en humanos de utilidad en el diagnóstico de aspergilosis.

Con relación a la época del año en que se incrementa la frecuencia de aspergilosis aviar y de acuerdo a lo reportado por Joseph (2000)¹ quien encuentra un mayor número de casos de aspergilosis en las aves en los meses de junio a septiembre, es consistente con los dos casos positivos a esta micosis encontrados en el presente estudio, ya que las muestras fueron obtenidas en los meses de junio y julio, lo que también coincide con la época de muda de estas aves, y que corresponde al periodo en el que las plumas de las aves son reemplazadas por nuevas y se ha mencionado que en esta época es cuando el ave es más vulnerable, ya que se ven mermadas sus habilidades en el vuelo, además de requerir un alto gasto de proteínas, energía y otros nutrientes en la producción de las plumas nuevas, sometiéndose a un estrés fisiológico. Algunos cetreros no utilizan a sus aves en la cacería y las dejan descansar durante este periodo para evitar que algunas de sus plumas nuevas se dañen. Por otro lado, los dos casos encontrados correspondieron a aguillitas machos, hasta el momento se desconoce de algún reporte que relacione la presencia de la enfermedad con el sexo del animal.

La realización en conjunto de las pruebas llevadas a cabo en este trabajo, podrían ser útiles para dar un diagnóstico temprano y acertado de la aspergilosis aviar y con ello iniciar el tratamiento adecuado logrando un mejor pronóstico de la enfermedad y así evitar la muerte de las aves y por lo tanto, contribuir en la conservación de las aves que son mantenidas en cautiverio que en alguno de los casos corresponde a aves amenazadas o en peligro de extinción.

7. CONCLUSIONES

El uso de la PCR fue útil en el diagnóstico de la aspergilosis en aves de presa al identificar a *A. fumigatus* en el caso positivo confirmado con las demás pruebas.

Se logró identificar anticuerpos contra *A. fumigatus* en aves de presa mediante ELISA indirecta.

Para lograr un diagnóstico acertado de la aspergilosis aviar es necesario contar con una historia clínica detallada, realizar el aislamiento y pruebas como el hemograma, radiología, endoscopía, PCR y ELISA.

El diagnóstico temprano y acertado de la aspergilosis ayuda a establecer el tratamiento adecuado de la enfermedad, logrando un pronóstico favorable.

Para comparar la sensibilidad y especificidad de la PCR y ELISA indirecto, es necesario incrementar el número de muestras de individuos infectados y en diferentes etapas de la enfermedad.

8. REFERENCIAS

1. Joseph V. Aspergillosis in raptors. *Sem Avian Exotic Pet Med.* 2000; 9 (2): 66-74.
2. Phalen DN. The use of serologic assays in avian medicine. *Sem Avian Exotic Pet Med.* 2001; 10 (2): 77-89.
3. Friend. M. Aspergillosis IN: Friend M, Franson J, editors. *Field manual of wildlife diseases: general field procedures and diseases of birds.* US Geological Survey, 1999.
4. Álvarez-Pérez S, Mateos A, Domínguez L, Martínez-Nevado E, Blanco JL, García ME. Polyclonal *Aspergillus fumigatus* infection in captive penguins. *Vet Microbiol.* 2010; 144: 444-449.
5. Kearns KS. Avian aspergilosis, In: Kearns KS, Loudis B, editors. *Recent advances in avian infectious diseases.* USA. IVIS, 2003.
6. Heidenreich M. *Birds of prey: medicine and management.* Malden MA: Blackwell Science, 1997.
7. Bauck L. Mycoses. In: Ritchie BW, Harrison GJ, Harrison LR, editors. *Avian medicine: principles and application.* Lake Worth: Wingers Publishing, 1994.
8. Forbes NA. Rapaces. In: Beynon PH, Cooper JE, editors. *Manual de animales exóticos.* España: Harcourt Brace, 1999.
9. Redig PT. Fungal diseases-Aspergillosis. In: Samour J, editor. *Avian medicine.* 2nd ed; London: Mosby, 2008.
10. Orosz SE. Overview of aspergillosis: Pathogenesis and treatment options. *Sem Avian Exotic Pet Med.* 2000; 9 (2): 59-65.
11. Bechert U, Christensen JM, Poppenga R, Fahmy SA, Redig P. Pharmacokinetics of terbinafine after single oral dose administration in red-tailed hawks (*Buteo jamaicensis*). *J Avian Med Surg.* 2010; 24 (2): 122-130.
12. Beernaert LA, Pasmans F, Haesebrouck F, Martel A. Modelling *Aspergillus fumigatus* infections in racing pigeons (*Columba livia domestica*). *Avian Pathol.* 2008; 37 (5): 545-549.
13. Oglesbee BL. Mycotic Diseases. In: Altman RB, Clubb SL, Dorrestein GM, Quesenberry K, editors. *Avian medicine and surgery.* Philadelphia: Saunders, 1997.
14. Roskopf W, Woerpel R. *Diseases of cage and aviary birds.* 3rd ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 1997.

15. Mendoza L, Vilela R. Respuesta inmune contra hongos. In: Gutiérrez Pabello JA. Inmunología veterinaria. El Manual Moderno; México, 2010.
16. Tell LA. Aspergillosis in mammals and birds: impact on veterinary medicine. Med Mycol Supplement I. 2005; 43: S71-S73.
17. Carter GR. Bacteriología y micología veterinarias. 2ª ed. México: El Manual Moderno, 1994.
18. Herrera T, Ulloa M. El reino de los hongos, micología básica y aplicada. 2ª ed. México: Fondo de Cultura Económica, 1998.
19. Kwon-Chung KJ. *Aspergillus*: diagnosis and description of the genus. In: Bossche HV, Mackenzie DW, Cauwenbergh G, editors. *Aspergillus* and aspergillosis. New York: Plenum Press, 1988.
20. Latge JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. Clin Microbiol Rev. 1999; 12 (2): 310-350.
21. Quinn PJ, Carter ME, Markey BK, Carter GR. Clinical veterinary microbiology. London: Wolfe, 1994.
22. Martin MP, Bouck KP, Helm J, Dykstra MJ, Wages DP, Barnes HJ. Disseminated *Aspergillus flavus* infection in broiler breeder pullets. Avian Dis. 2007; 51: 626-631.
23. Yokota T, Shibahara T, Wada Y, Hiraki R, Ishikawa Y, Kadota K. *Aspergillus fumigatus* infection in an Ostrich (*Struthio camelus*). J Vet Med Sci. 2004; 66 (2): 201-204.
24. Olias P, Jacobsen ID, Gruber AD. Fungal species identification from avian lung specimens by single hypha laser microdissection and PCR product sequencing. Med Mycol. 2011; 49: 56-61.
25. Redig PT, Orosz S, Cray C. The ELISA as a management guide for aspergillosis in raptors. Proc Assoc Avian Vet. 1997; 99-104.
26. Frisvad JC, Rank C, Nielsen KF, Larsen TO. Metabolomics of *Aspergillus fumigatus*. Med Mycol Supplement I. 2009; 47: S53-S71.
27. Kwon-Chung KJ, Sugui JA. What do we know about the role of gliotoxin in the pathobiology of *Aspergillus fumigatus*? Med Mycol Supplement I. 2009; 47: S97-S103.
28. Moreno-Ramos C, Valdés-Martínez SE, Cervantes-Olivares RA. Evaluación de la producción de gliotoxina en 10 cepas de *Aspergillus fumigatus* obtenidas de aislamientos clínicos. Téc Pecu Méx. 2002; 40 (2): 139-148.

29. Aguilar RF, Redig PT. Diagnosis and treatment of avian aspergillosis. In: Bonagura JD, Kirk R, editors. Current Veterinary Therapy, Small Animal Practice XII. Philadelphia: Saunders, 1995.
30. Redig PT. Avian Aspergillosis. In: Fowler ME, editor. Zoo and wild animal medicine: current therapy 3. Philadelphia: Saunders, 1993.
31. Richard JL. Aspergillosis. In: Calnek BW, editor. Diseases of poultry. 10th ed. Iowa State University Press, 1997.
32. Abrams GA, Paul-Murphy J, Ramer JC, Murphy CJ. *Aspergillus* blepharitis and dermatitis in a peregrine falcon-gyr Falcon hybrid (*Falco peregrinus* x *Falco rusticolus*), J Avian Med Surg. 2001; 15 (2): 114-120.
33. Atkinson R, Brojer C. Unusual presentations of aspergillosis in wild birds. Proc Assoc Avian Vet. 1998; 177-181.
34. Cray C, Watson T, Arheart K. Serosurvey and diagnostic application of antibody titers to *Aspergillus* in avian species. Avian Dis. 2009a; 53: 491-494.
35. Ivey ES. Serological and plasma protein electrophoretic findings in 7 psittacine birds with aspergillosis. J Avian Med Surg. 2000; 14 (2): 103-106.
36. Cray C. Infectious and zoonotic disease testing in pet birds. Clin Lab Med. 2011; 31: 71-85.
37. Jones MP, Orosz S. The diagnosis of Aspergillosis in birds. Sem Avian Exotic Pet Med. 2000; 9 (3): 52-58.
38. Graczyk TK, Cranfield MR, Klein PN. Value of antigen and antibody detection, and blood evaluation parameters in diagnosis of avian invasive aspergillosis. Mycopathologia. 1998; 140: 121-127.
39. German AC, Shankland GS, Edwards J, Flach EJ. Development of an Indirect ELISA for the detection of serum antibodies to *Aspergillus fumigatus* in captive penguins. Vet Rec. 2002; 150 (16): 513-518.
40. Cray C, Villar D. Cross-reactivity of anti-chicken IgY antibody with immunoglobulins of exotic avian species. Vet Clin Pathol. 2008; 37 (3): 328-331.
41. Le Loch G, Deville M, Risi E, Bretagne S, Gillot J. Evaluation of the serological test platelia *Aspergillus* for the diagnosis of aspergillosis. Proc Eur Assoc Avian Vet. 2005: 260-266.

42. Arca-Ruibal B, Wernery U, Zachariah R, Bailey TA, Di Somma A, Silvanose C, McKinney. Assessment of a commercial sandwich ELISA in the diagnosis of aspergillosis in falcons. *Vet Rec.* 2006; 158: 442-444.
43. Cray C, Watson T, Rodríguez M, Arheart K. Application of galactomannan analysis and protein electrophoresis in the diagnosis of aspergillosis in avian species. *J Zoo Wild Med.* 2009b; 40: 64-70.
44. Cray C, Reaville D, Romagnano A, Stevenson R, Rolfe V, Griffin C, Clubb S. Galactomannan assay and plasma protein electrophoresis findings in psittacine birds with aspergillosis. *J Avian Med and Surg.* 2009c; 23 (2): 125-135.
45. Dee TH. Detection of *Aspergillus fumigatus* serum precipitins by counterimmunoelectrophoresis. *J Clin Microbiol.* 1975; 5 (6): 482-485.
46. Ahmad S, Khan ZU, Theyyathel AM. Diagnostic value of DNA, (1,3) β -D-glucan, and galactomannan detection in serum and bronchoalveolar lavage of mice experimentally infected with *Aspergillus terreus*. *Diagn Micr Infec Dis.* 2007; 59 (2): 165-171.
47. Marty FM, Koo S. Role of (1,3)- β -D-Glucan in the diagnosis of invasive aspergillosis. *Med Supplement I.* 2009; 47: S233-S240.
48. Karageorgopoulos DE, Vouloumanou EK, Ntziora F, Michalopoulos A, Rafailidis PI, Falagas ME. β -D-Glucan assay for the diagnosis of invasive fungal infections: A meta-analysis. *Clin Infect Dis.* 2011; 52 (6): 750-770.
49. Pérez J, Carrasco L. Diagnóstico histopatológico de micosis en patología veterinaria. *Rev Iberoam Micol.* 2000; 17: 18-22.
50. Tang CM, Holden DW, Aufauvre-Brown A, Cohen J. The detection of *Aspergillus* spp. by the Polymerase Chain Reaction and its evaluation in bronchoalveolar lavage fluid. *Am Rev Respir Dis.* 1993; 148: 1313-1317.
51. Spreadbury C, Holden D, Aufauvre-Brown A, Brainbridge B, Cohen J. Detection of *Aspergillus fumigatus* by Polymerase Chain Reaction. *J Clin Microbiol.* 1993; 31 (3): 615-621.
52. Suarez F, Lortholary O, Buland S, Rubio MT, Ghez D, Mahé V, Quesne G, Poirée S, Buzyn A, Varet B, Berche P, Bougnoux E. Detection of circulating *Aspergillus fumigatus* DNA by Real-Time PCR assay of large serum volumes improves early diagnosis of invasive aspergillosis in high-risk adult patients under hematologic surveillance. *J Clin Microbiol.* 2008; 46 (11): 3772-3777.

53. Klingspor L, Loeffler J. *Aspergillus* PCR formidable challenges and progress. *Med Mycol Supplement I*. 2009; 47: S241-S247.
54. Fréal E, Decrucq K, Botterel F, Bouchindhomme B, Camus D, Dei-Cas E, Costa JM, Yakoub-Agha I, Bretagne S, Delhaes L. Diagnosis of invasive aspergillosis using bronchoalveolar lavage in haematology patients: influence of bronchoalveolar lavage human DNA content on real-time PCR performance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2009; 28: 223-232.
55. Zhao J, Kong F, Li R, Wang X, Wan Z, Wang D. Identification of *Aspergillus fumigatus* and related species by nested PCR targeting ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer regions. *J Clin Microbiol*. 2001; 39 (6): 2261-2266.
56. Hayette MP, Vaira D, Susin F, Boland P, Christiaens G, Melin P, De Mol P. Detection of *Aspergillus* species DNA by PCR in bronchoalveolar lavage fluid. *J Clin Microbiol*. 2001; 39 (6): 2338-2340.
57. Del Palacio A, Cuétara MS, Pontón J. El diagnóstico de laboratorio de la aspergilosis invasora. *Rev Iberoam Micol*. 2003; 20: 90-98.
58. White PL, Barnes RA. *Aspergillus* PCR – Platforms, strengths and weaknesses. *Med Mycol*. 2006; 44: 191-198.
59. White PL, Bretagne S, Klingspor L, Melchers WJG, McCulloch E, Schulz B, Finnstrom N, Mengoli C, Barnes RA, Donnelly P, Loeffler J. *Aspergillus* PCR: One step closer to standardization. *J Clin Microbiol*. 2010; 48 (4): 1231-1240.
60. Sanguinetti M, Posteraro B, Pagano L, Pagliari G, Fianchi L, Mele L, La Sorda M, Franco A, Fadda G. Comparison of Real-Time PCR, conventional PCR and galactomannan antigen detection by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay using bronchoalveolar lavage fluid samples from hematology patients for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *J Clin Microbiol*. 2003; 41 (8): 3922-3925.
61. Katz ME, Love SC, Gill HS, Cheetham. Development of a method for the identification, using the Polymerase Chain Reaction, of *Aspergillus fumigatus* isolated from ostriches. *Aust Vet J*. 1996; 74 (1): 50-54.
62. Dahlhausen B, Abbott R, Van Overloop P. Rapid detection of pathogenic *Aspergillus* species in avian samples by Real time PCR assay: a preliminary report. *Proc Assoc Avian Vet*. 2004: 37-40.

63. Jung K, Kim K, Lee H, Kim JT. *Aspergillus fumigatus* infection in two wild Eurasian black vultures (*Aegypius monachus*) with carbofuran insecticide poisoning: A case report. *Vet J.* 2009; 179: 307-312.
64. Henry T, Iwen PC, Hinrichs SH. Identification of *Aspergillus* Species Using Internal Transcribed Spacer Regions 1 and 2. *J Clin Microbiol*, 2000; 38 (4): 1510-1515.
65. Camarillo-Tapia JA. Métodos de identificación para micosis causadas por *Aspergillus fumigatus* en animales. Tesis de licenciatura. FMVZ. UNAM. México, 2008.
66. Orosz SE, Antifungal drug therapy in avian species. *Vet Clin Exot Anim.* 2003; 6: 337-350.
67. Di Somma A, Bailey T, Silvanose C, García-Martínez C. The use of voriconazole for the treatment of aspergillosis in falcons (*Falco* species). *J Avian Med and Surg.* 2007; 21 (4): 307-316.
68. Schmidt V, Demiraj F, Di Somma A, Bailey T, Ungemach FR, Krautwald-Junghanns ME. Plasma concentrations of voriconazole in falcons. *Vet Rec.* 2007; 161: 265-268.
69. Coles BH. *Avian medicine and surgery.* 2nd ed. Malden MA: Blackwell Science, 1997.
70. Silvanose CD, Bailey T, Di Somma A. Susceptibility of fungi isolated from the respiratory tract of falcons to amphotericin B, itraconazole and voriconazole. *Vet Rec.* 2006; 159: 282-284.
71. Beernaert LA, Pasmans F, Van Waeyenberghe L, Dorrestein GM, Verstappen F, Vercammen F, Haesebrouck F, Martel A. Avian *Aspergillus fumigatus* strains resistant to both Itraconazole and Voriconazole. *Antimicrob Agents Ch.* 2009; 53 (5): 2199-2201.
72. Samour J, Howlett JC. In: Samour J, editor. *Avian medicine.* 2nd ed; London: Mosby, 2008.
73. García M, Ikuta N, Levisohn S, Kleven SH. Evaluation and comparison of various PCR methods for detection of *Mycoplasma gallisepticum* infection in chickens. *Avian Dis.* 2005, 49: 125-132.
74. 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.

75. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.
76. García-Latorre E, Domínguez LML, Cancino DM, Quezada PF, Moreno LC, López SR, Reyes ME. Manual del curso de prácticas de Inmunología Molecular. IPN. ENCB. México 1998.
77. Correa D, Mandujano A, Medina Y. editores. Manual de técnicas modernas en inmunología teoría y práctica. México: Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, SSA. 2000.
78. Mendoza L. Extracción de ADN de hongos filamentosos. Curso de micología molecular. Manual de procedimientos. Medical technology program, 2002, July 01 to July12, Michigan, USA. Michigan State University.
79. López-Medrano R, Ovejero MC, Calera JA, Puente P, Leal F. *Aspergillus fumigatus* antigens. *Microbiology*. 1995; 141: 2699-2704.
80. Beernaert LA, Pasmans F, Van Waeyenberghe, Haesebrouck F, Martel A. *Aspergillus* infections in birds: a review. *Avian Pathol*. 2010; 39 (5): 325-331.
81. Martínez-Quesada J, Nieto-Cadenazzi J, Torres-Rodríguez JM. Humoral immunoresponse of pigeons to *Aspergillus fumigatus* antigens. *Mycopathologia*. 1993; 124: 131-137.

9. ANEXO

SOLUCIONES EMPLEADAS:

Solución de fosfatos (PB) 10x

Fosfato de sodio monobásico monohidratado 2.62 g

Fosfato de sodio dibásico anhidro 11.5 g

Disolver en 200 ml de agua destilada caliente.

Aforar con agua destilada a 1000 ml.

Solución salina de fosfatos (PBS) pH 7.2

En 200 ml de agua destilada se agregan 100 ml de solución PB 10x.

Se adicionan 8.75 g de cloruro de sodio

Disolver las sales y ajustar pH a 7.2

Aforar con agua destilada a 1000 ml.

Caldo Sabouraud

Glucosa 40 g

Peptona 10 g

Agua destilada 1000 ml

Se disuelven los ingredientes y se esteriliza la solución a 121°C, 15 min, 15 libras.

Solución salina de Coca's

Cloruro de sodio	5.0 g
Bicarbonato de sodio	2.75 g
Cristales de fenol	4.0 g
Agua destilada	1000 ml

Se disuelven los ingredientes y se esteriliza la solución a 121°C, 15 min, 15 libras.

Regulador tris acetato 0.05 M, pH 7.5

Tris base	6.05 g
Ácido acético glacial	1.42 ml

Se ajusta el pH a 7.5 y se afora a 1000 ml con agua destilada.

Reactivo de Bradford

Colorante azul brillante de Coomassie G-250	100 mg
Etanol al 95%	50 ml
Ácido fosfórico al 85%	100 ml

La solución se afora a 1000 ml con agua destilada y se mantiene a 4°C.

Geles SDS-PAGE al 5%

- **Regulador Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8**

Tris hidroximetilaminometano	18.17 g
Agua destilada	50 ml

Se ajusta el pH con HCl 1N y se afora a 100 ml con agua destilada.

- **Regulador Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8**

Tris hidroximenilaminometano	6.057 g
------------------------------	---------

Agua destilada	40 ml
----------------	-------

Se ajusta el pH con ácido clorhídrico 1N y se afora a 100 ml con agua destilada.

- **Solución SDS (duodecil sulfato de sodio) al 10%**

Duodecil sulfato de sodio	10 g
---------------------------	------

Se afora a 100 ml con agua destilada.

- **Solución de monómeros al 30.8 % de concentración total**

Acrilamida	30 g
------------	------

Bis acrilamida	0.8 g
----------------	-------

Se afora a 100 ml con agua destilada y se conserva en un frasco oscuro.

- **Persulfato de amonio al 10 %**

Persulfato de amonio	0.1 g
----------------------	-------

Agua destilada	1 ml
----------------	------

La solución se prepara al momento de su uso.

- **Regulador de corrida 2X**

Solución Tris- HCl pH 6.8	1.25 ml
---------------------------	---------

Duodecil sulfato de sodio 10 %	2 ml
--------------------------------	------

Glicerol	1 ml
----------	------

Azul de bromofenol 0.2 %	250 μ l
--------------------------	-------------

2-mercaptoetanol	500 μ l
------------------	-------------

- **Amortiguador de corrida para electroforesis de geles SDS-PAGE**

Tris hidroximenilaminometano	3 g
Glicina	14.4 g
Duodecil sulfato de sodio	1 g
Agua destilada	1 L

Amortiguador veronal

Ácido dietil barbitúrico	3.32 g
Dietil barbiturato de sodio	25.52 g
Agua destilada	2000 ml
Azida de sodio	2.0 g

El ácido dietil barbitúrico se disuelve en 200 ml de agua destilada estéril caliente, se agrega el dietil barbiturato de sodio, una vez disueltos se adiciona agua destilada para aforar a 2000 ml, se añade la azida de sodio.

Agarosa para contrainmunolectroforesis

Amortiguador veronal	100 ml
Agua destilada	100 ml
Agarosa	2.0 g

Agar purificado para inmunodifusión doble

Agar purificado	1.5 g
Solución salina de fosfatos	50 ml
Agua destilada	50 ml
Azida de sodio	0.15 g

Negro de amido al 0.1%

Negro de amido	0.1 g
Metanol	50 ml
Ácido acético glacial	10 ml
Agua destilada	40 ml

Solución decolorante

Metanol	500 ml
Ácido acético glacial	100 ml
Agua destilada	400 ml

Amortiguador de carbonatos pH 9.6

Carbonato de sodio	3.18 g
Bicarbonato de sodio	5.86 g
Disolver los carbonatos en 800 ml de agua destilada	
Ajustar el pH a 9.6	

Aforar con agua destilada a 1000 ml.

El amortiguador se almacena a 4°C.

PBS - Tween 20 al 0.05%

A 1000 ml de PBS pH 7.2 agregar 500 µl de tween 20 y mezclar hasta que se disuelva.

Amortiguador de lisis

Tris ácido clorhídrico	200 mM
Cloruro de sodio	0.5 M
Ácido etilen diamino tetra acético	10 mM
Duodecil sulfato de sodio	1 %