



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD
ANIMAL

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

ESTUDIOS SOBRE LA PRESENCIA DE GLIOTOXINA EN AISLADOS DE
Aspergillus fumigatus DE CASOS DE ASPERGILOSIS AVIAR
IDENTIFICADOS POR MEDIO DE CARACTERIZACIÓN MICOLÓGICA Y
BIOLOGÍA MOLECULAR

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

VERÓNICA MONTES DE OCA BASILIO

TUTOR: Ph.D. ROBERTO ARNULFO CERVANTES OLIVARES
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
COMITÉ TUTOR

Dra. GABRIELA GUADALUPE GÓMEZ VERDUZCO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

Dra. AÍDA VERÓNICA RODRÍGUEZ TOVAR
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

MÉXICO, D.F.

ENERO 2015



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.

Resumen

ESTUDIOS SOBRE LA PRESENCIA DE GLIOTOXINA EN AISLADOS DE *Aspergillus fumigatus* DE CASOS DE ASPERGILOSIS AVIAR IDENTIFICADOS POR MEDIO DE CARACTERIZACIÓN MICOLÓGICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

MVZ. Verónica Montes de Oca Basilio

Tutor: Ph.D. Roberto A. Cervantes Olivares

Comité tutorial: Dra. Gabriela Guadalupe Gómez Verduzco

Dra. Aída Verónica Rodríguez Tovar

La aspergilosis afecta a todo tipo de aves, ocasionando considerables pérdidas económicas, el principal agente etiológico involucrado es *Aspergillus fumigatus*, al cual se atribuyen múltiples factores de virulencia, entre ellos gliotoxina, una molécula poco estudiada. Aunque la aspergilosis aviar es una enfermedad endémica en México, no se diagnostica oportunamente, por lo que, el diseño de pruebas diagnósticas basadas en la detección de metabolitos, biosintetizados en etapas iniciales de la enfermedad, como la gliotoxina, serían de utilidad en el diagnóstico temprano de esta afección. Sin embargo, para lograrlo se requiere de estudios que permitan conocer el rol que desempeña este metabolito durante la patogenia de la aspergilosis. Por lo tanto, en esta investigación se realizaron estudios microbiológicos, moleculares, histopatológicos, bioquímicos y químicos, que inician una serie de trabajos sobre la importancia de la gliotoxina. Se muestrearon 73 aves con diferente procedencia, 43 de ellas de una granja localizada en Cuautla, Morelos-México, y 30 del mercado "Sonora", ubicado en la Ciudad de México, Delegación Venustiano Carranza, todas presentaron signos respiratorios y posteriormente murieron. Del total de aves (n=73) se logró el aislamiento en cultivo puro de 20 hongos que afectaron al 30.07% de la población, incluyendo *A. fumigatus* el cual se recuperó en un 9.58% (7/73). La identificación micológica del microorganismo se realizó mediante microcultivos seriados de 24, 48 y 72 h, mientras que la identificación molecular, se efectuó por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), amplificando el fragmento ITS 1 5.1-5.8S-ITS 2 del complejo de ADNr, utilizando iniciadores específicos probados en trabajos previos. La

histopatología se llevó a cabo con las tinciones de hematoxilina-eosina y Gomori-Grocott, se evaluaron las lesiones microscópicas, además de corroborar la presencia del hongo. Finalmente, se determinó la producción de gliotoxina por Cromatografía en Capa Fina (CCF) en los extractos clorofórmicos de cada aislado de *A. fumigatus*, así como del tejido pulmonar infectado. Adicionalmente, se detectó la producción *in vitro* de aflatoxinas totales en los extractos orgánicos de *A. fumigatus*. Se determinó que seis aislados de *A. fumigatus* produjeron la gliotoxina *in vitro*, mientras en un aislado no se detectó la producción del compuesto. Por otra parte, la toxina se detectó de forma preliminar a partir del tejido pulmonar de un ave. En los pulmones de tres pollos se detectaron compuestos diferentes al estándar de gliotoxina. En tres pulmones no se detectaron compuestos. Además, seis aislados de *A. fumigatus* produjeron aflatoxinas, que deben ser caracterizadas mediante la Cromatografía de Líquidos de Alta Presión - Espectrometría de Masas (CLAP-EMs).

Se requiere cuantificar y corroborar la caracterización de la gliotoxina por métodos analíticos más específicos como la CLAP-EMs, además de profundizar los estudios bioquímicos y moleculares para conocer las condiciones que inducen la biosíntesis del compuesto durante la patogenia de la aspergilosis aviar.

Índice

1.	Introducción	1
1.1	Antecedentes	1
1.2	<i>Aspergillus</i>	4
1.3	Mecanismos de patogenicidad y factores de virulencia	6
1.4	Gliotoxina	9
1.4.1	Biosíntesis de gliotoxina	10
1.4.2	Toxicidad de gliotoxina	12
1.4.3	Análisis de gliotoxina	13
1.5	Aspergilosis aviar	14
1.5.1	Patogenia	16
1.5.2	Lesiones	18
1.5.3	Diagnóstico	22
1.5.4	Medidas de prevención y control	24
	Justificación	26
	Planteamiento del problema	27
	Hipótesis	28
	Objetivo general	30
	Objetivos particulares	30
2	Materiales y métodos	32
2.1	Muestreo	32
2.2	Aislamiento micótico	33
2.3	Identificación	35
2.3.1	Identificación micológica de <i>A. fumigatus</i>	36
2.3.2	Identificación molecular de <i>A. fumigatus</i>	36
2.3.2.1	Extracción de ADN	36
2.3.2.2	Cuantificación de ADN	40
2.3.2.3	Amplificación del fragmento ITS (ITS 1 5.1-5.8S -ITS 2) de <i>A. fumigatus</i>	40
3	Histopatología	41
4	Desarrollo del método para la producción y extracción de la gliotoxina de <i>A. fumigatus</i>	41
4.1	Producción de la gliotoxina de <i>A. fumigatus</i>	47
4.2	Extracción clorofórmica de gliotoxina de <i>A. fumigatus</i>	47
4.3	Extracción de gliotoxina de tejido pulmonar	50
4.4	Análisis de gliotoxina	51
5	Determinación de aflatoxinas	52
6	Resultados	55
6.1	Aislamiento e identificación micológica	55
6.2	Identificación molecular	68
6.2.1	Extracción de ADN	68
6.2.2	Reacción en Cadena de la Polimerasa	69
7	Histopatología	70
8	Evaluación de los métodos para la producción y extracción de gliotoxina de <i>A. fumigatus</i>	72
9	Determinación de gliotoxina en aislados de <i>A. fumigatus</i>	78
10	Determinación de gliotoxina en tejido pulmonar	79
11	Determinación de aflatoxinas de <i>A. fumigatus</i>	82
12	Discusión	83
12.1	Aislamiento micológico	83
12.2	Hallazgos a la necropsia	85
12.3	Identificación por métodos micológicos	86

12.4	Identificación molecular de <i>A. fumigatus</i>	87
12.5	Histopatología	88
12.6	Producción y extracción de la gliotoxina de <i>A. fumigatus</i>	90
12.7	Análisis de gliotoxina	92
12.8	Determinación de aflatoxinas de <i>A. fumigatus</i>	97
13	Conclusiones	100
14	Referencias	102
	Anexo I Soluciones y reactivos	108

Lista de cuadros

1.	Reactivos empleados para amplificar el fragmento ITS (ITS 1 5.1-5.8S-ITS 2) de <i>A. fumigatus</i>	41
2.	Extracción de gliotoxina con diferentes concentraciones de cloroformo	45
3.	Extracción clorofórmica de gliotoxina por etapas	46
4.	Hallazgos a la necropsia, examen directo de los tejidos colectados y aislamiento micótico de las aves muestreadas	64
5.	Cuantificación de ADN de <i>A. fumigatus</i>	68
6.	Relación de lesiones microscópicas con la detección de gliotoxina en pulmón	81
7.	Producción <i>in vitro</i> de aflatoxinas a partir de los aislados de <i>A. fumigatus</i>	82

Lista de figuras

1. Características microscópicas de <i>A. fumigatus</i>	5
2. Principales metabolitos biosintetizados por <i>A. fumigatus</i>	8
3. Estructura química de la gliotoxina	10
4. Efectos provocados a nivel celular por gliotoxina ...	13
5. Triada epidemiológica de la aspergilosis aviar	21
6. Procedimiento para el aislamiento de <i>A. fumigatus</i> ...	34
7. Procedimiento para la identificación micológica y molecular de <i>A. fumigatus</i>	35
8. Método para la extracción de ADN de <i>A. fumigatus</i>	39
9. Método para la producción y extracción de gliotoxina	49
10. Cromatoplaça: curva estándar de gliotoxina	52
11. Cromatoplaça: compuestos sugerentes de ser aflatoxinas	53
12. Primoaislamiento de <i>A. fumigatus</i>	55
13. Microcultivos seriados de <i>A. fumigatus</i>	56
14. Gráfica: Distribución porcentual de los aislados micóticos a partir de aves con distinta procedencia	57
15. Gráfica: Distribución porcentual de los aislados micóticos recuperados a partir de aves provenientes del mercado "Sonora"	58
16. Gráfica: Distribución porcentual de los aislados micóticos recuperados a partir de aves provenientes de la granja en Cuautla, Morelos.....	59
17. Lesiones a la necropsia del ave MP49	60
18. Lesiones a la necropsia del pollo MP53	61
19. Lesiones a la necropsia del pollo MP54	62
20. Lesiones a la necropsia del pollo MP56	62
21. Lesiones a la necropsia del pollo MP57	62
22. ADN de los aislados de <i>A. fumigatus</i> en gel de agarosa	69
23. Productos de amplificación del fragmento ITS (ITS 1 5.8S -ITS 2) de <i>A. fumigatus</i> en gel de agarosa	70
24. Lesiones microscópicas del ave MP53	71
25. Cromatoplaça: Extracción clorofórmica de gliotoxina en condiciones estáticas y agitación orbital	73
26. Cromatoplaça: Extracción de gliotoxina con diferentes concentraciones de cloroformo	74
27. Cromatoplaça: Extracción clorofórmica de gliotoxina en dos etapas	75
28. Cromatoplaça: Extracción clorofórmica de gliotoxina en tres etapas	76
29. Cromatoplaça: Extracción clorofórmica de gliotoxina en cuatro etapas	77

30. Cromatoplaca: Producción <i>in vitro</i> de gliotoxina por los aislados de <i>A.fumigatus</i>	78
31. Cromatoplaca: Extracción de gliotoxina de pulmón del ave MP49	80
32. Cromatoplaca: Extracción de gliotoxina de pulmón del ave MP53	80

1. Introducción

1.1 Antecedentes

Según Bennett¹, *Aspergillus* fue de los primeros géneros micóticos en haber sido descrito. De acuerdo a Bonifaz², recibió su nombre a principios del siglo XVIII, en 1729 por el botánico italiano Pier Antonio Micheli, quien señaló la similitud microscópica que presentan estos hongos con un instrumento utilizado para asperjar agua bendita, llamado "aspergillum". Brakhege³ refiere que en 1863, el médico alemán Georg W. Fresenius describió por primera vez la especie *A. fumigatus* a partir de los pulmones de una avutarda (*Otis tarda*). Posteriormente, en 1965 Raper y Fennell⁴ publicaron la monografía "El género *Aspergillus*" donde describen las características fenotípicas de 132 especies subdivididas en 18 grupos, texto que ha sido un pilar en la taxonomía y clasificación de este grupo de microorganismos. Sin embargo, de acuerdo con Giboons y Rokas⁵, el creciente estudio respecto a estos hongos ha permitido profundizar en su morfología, fisiología y biología molecular, descubriendo aspectos filogenéticos que han hecho necesaria su reclasificación. Hasta 2007, Geiser⁶ refiere 250 especies de *Aspergillus*, de estas Klich⁷ indica que 40 han producido infección en humanos, siendo *Aspergillus fumigatus* el principal

agente etiológico involucrado en el desarrollo de la aspergilosis invasiva especialmente en individuos inmunodeprimidos. Por otra parte, Tell⁸ menciona que *A. fumigatus* se reporta en el 95% de los casos de micosis respiratorias en aves, seguido de *A. flavus*. Arn'e y colaboradores⁹, citan además de las mencionadas, otras especies implicadas con menor frecuencia, entre ellas *A. niger*, *A. nidulans* y *A. terreus*.

Debido a la importancia clínica que representa *A. fumigatus* como patógeno oportunista y el papel que juega en la seguridad alimentaria por la producción de micotoxinas, numerosos investigadores han mostrado interés en este microorganismo. Sin embargo, de acuerdo con Richard y colaboradores¹⁰, regularmente no suele considerarse el estudio de otras micotoxinas producidas durante el proceso patogénico de la aspergilosis. No obstante, algunos científicos involucran la presencia de una toxina biosintetizada por *A. fumigatus* con el desarrollo de lesiones necróticas en aves y mamíferos, se trata de gliotoxina, un metabolito secundario reportado en varios tipos de hongos patógenos. Según Davis¹¹, gliotoxina fue la primer molécula Epipolythiodioxopiperazina (ETP) descubierta en 1936 por Weindling y Emerson, se detectó en cultivos de *Trichoderma* spp. Posteriormente, en 1943 el compuesto recibió su nombre, mismo que deriva del hongo ascomiceto

Gliocladium fimbriatum a partir del cual se caracterizó. Warning y Beaver¹², mencionan que después de identificar al compuesto se efectuaron diversos estudios, estos revelaron su acción bactericida y bacteriostática sobre bacterias Gram positivas, desafortunadamente la toxicidad que produjo hacia las células de los mamíferos impidió darle uso quimioterapéutico. Aun así, es objeto de análisis por su actividad antiviral y principalmente por sus propiedades inmunosupresoras. Sin embargo, no se ha logrado dilucidar por completo la función de esta toxina, a pesar de los esfuerzos realizados por la comunidad científica. Las investigaciones llevadas a cabo acerca de la bioactividad de gliotoxina en el desarrollo de la aspergilosis, esencialmente se han hecho en modelos murinos, respecto a las aves el conocimiento referente al tema es limitado. No obstante, destacan algunos trabajos relacionados. Por ejemplo, en 1995 Richard y Debey¹³ analizaron la producción de gliotoxina durante el estado patogénico en guajolotes jóvenes infectados de forma experimental con dos cepas diferentes de *A. fumigatus*, los resultados obtenidos de esta investigación involucran la presencia del compuesto con la formación de lesiones necróticas en los pulmones de las aves estudiadas. En 1996 Richard y su grupo de colaboradores¹⁰, continuaron su trabajo examinando muestras de pulmón provenientes de guajolotes infectados por *A. fumigatus*,

determinaron que todos los aislamientos recuperados produjeron la toxina. Sin embargo, no en todos los tejidos se logró detectar el compuesto. En 1998, Moreno¹⁴ estudio la producción de gliotoxina en 10 cepas de *A. fumigatus* obtenidas de casos de aspergilosis aviar, en su trabajo concluyó que existen cepas altas, bajas y nulas productoras de la toxina. En ese mismo año, Villa¹⁵ llevó a cabo la evaluación de un modelo animal (*Gallus gallus*), determinando la relación entre las lesiones histopatológicas ocasionadas por la infección inducida de *A. fumigatus* con una cepa alta productora y baja productora de gliotoxina.

1.2 *Aspergillus*

El género *Aspergillus* pertenece a la familia Moniliaceae, subclase *Hyphomycetos*, dentro de la subdivisión Deuteromicotina², son hongos filamentosos, hialinos, que presentan reproducción asexual y en algunas especies se ha descrito la fase sexual¹⁶. Los microorganismos que integran este género se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, particularmente en el suelo donde degradan restos orgánicos formando parte del ciclo del carbono y del nitrógeno. Además, pueden desarrollar bajo un amplio rango de condiciones ambientales lo que permite su ubicuidad^{16, 17}.

Aspergillus fumigatus, se clasifica dentro del subgénero *Aspergillus*, sección *Fumigati*². Al estado sexual o teleomorfo se nombró como *Neosartorya fumigata*¹⁸. Debido al amplio arsenal enzimático que posee, puede ser potencialmente patógeno¹⁹.

Microscópicamente, como se muestra en la figura 1, *A. fumigatus* se caracteriza por la producción de conidióforos erguidos con vesícula apical que soporta al esterigma, donde se originan las cadenas de conidias. Los conidióforos pueden presentar una pigmentación amarillo verdoso o verde, son relativamente largos (300-500 μm) y cada uno se origina de un segmento especial de una hifa tabicada, conocido como célula del pié o basal. Sobre la mitad superior de la vesícula, se encuentra una sola serie de fiálides. Las conidias son esféricas por lo general lisas y dispuestas en largas cadenas que tienden a inclinarse hacia un eje central²⁰.

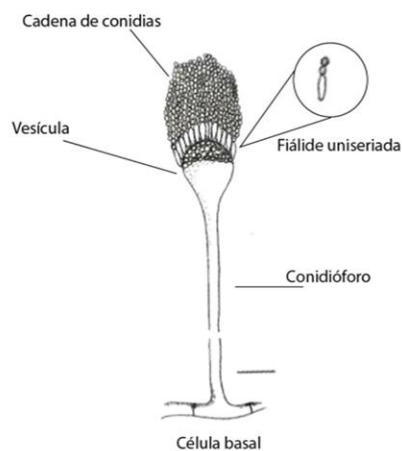


Figura 1. Características microscópicas de *A. fumigatus*. Ilustración tomada de Identifying Fungi. A Clinical Laboratory Handbook.²⁰

En condiciones *in vitro*, *A. fumigatus* se comporta como un microorganismo poco exigente en sus requerimientos nutricionales, desarrollando con rapidez en medios como agar dextrosa Sabouraud (SDA), agar dextrosa papa (PDA) y agar Czapek-Dox (C-Dox A). La temperatura óptima para su crecimiento es de 20 a 45°C, aunque puede desarrollar hasta los 56°C por su termotolerancia. Al inicio de la incubación, las colonias son planas y blancas, al madurar las conidias se tornan verde azulado en especial hacia el centro de la colonia. El desarrollo del hongo se inhibe con cicloheximida¹⁶.

La identificación de la mayoría de los hongos filamentosos se sustenta en criterios morfológicos de las conidias y conidióforos. Sin embargo, en los últimos años se han desarrollado métodos bioquímicos basados en la detección e identificación de metabolitos secundarios producidos por ellos, por ejemplo, las micotoxinas. Además, se han propuesto técnicas a partir de ADN genómico⁶.

1.3 Mecanismos de patogenicidad y factores de virulencia

A. fumigatus cuenta con una gama amplia de mecanismos y sustancias que intervienen en su acción patógena. De acuerdo con Mouyna y Latgé²¹, la pared celular desempeña una importante función durante la infección fúngica, por ser la primer

estructura que hace contacto con el hospedador, es abundante en antígenos y enzimas lo cual ayuda al microorganismo a diseminarse en los tejidos. También, protege al hongo de ambientes hostiles; por ejemplo, contra las reacciones fagocíticas dentro del hospedador. Las conidias son las partículas infecciosas de *A. fumigatus*, tienen la característica de estar cubiertas por una película externa de hidrofobinas llamada capa de varillas, la cual no se encuentra en el micelio. La capa de varillas forma complejos altamente insolubles que aparentemente proporcionan protección al generar una barrera contra moléculas hidrofílicas²¹.

Rementería¹⁹ cita otro mecanismo propuesto en la evasión de la respuesta inmune: la melanina, un pigmento presente en las conidias, el cual protege contra la lisis enzimática y oxidantes, al cubrir de carga negativa a la célula fúngica, dificultando la fagocitosis.

Mouyna y Latgé²¹ mencionan a las adhesinas presentes en las conidias como un mecanismo de patogenicidad que les confiere la capacidad de adherirse específicamente a proteínas del hospedador como aquellas asociadas a la lámina basal en el epitelio pulmonar (fibrinógeno, laminina, fibronectina, colágeno, y proteínas de agentes tenso activos). Es decir, algunos carbohidratos y proteínas propias de los conidios están

implicados en la unión a proteínas del hospedador durante la invasión tisular. Uno de los factores necesarios para que *A. fumigatus* se disemine en los tejidos, es la degradación del sustrato donde se halla, como regularmente es el pulmón y este se encuentra constituido principalmente de dos proteínas estructurales la elastina y el colágeno, el hongo precisa la biosíntesis de elastasas y colagenasas para facilitar su diseminación, sintetizando también ARNasas y fosfolipasas¹⁹.

A. fumigatus produce metabolitos secundarios (toxinas) que secreta en el medio donde se desarrolla, también puede presentarlos en sus conidias y micelios. Entre las sustancias que sintetiza este microorganismo se encuentran: triptoquivalinas, espinulosinas, fumiclavinas A, B y C, ácido kójico, ácido hevólico, fumitremorginas A, B y C, verruculogen, fumigatina y gliotoxina^{14, 22}. La estructura química de estos compuestos se presenta en la figura 2.

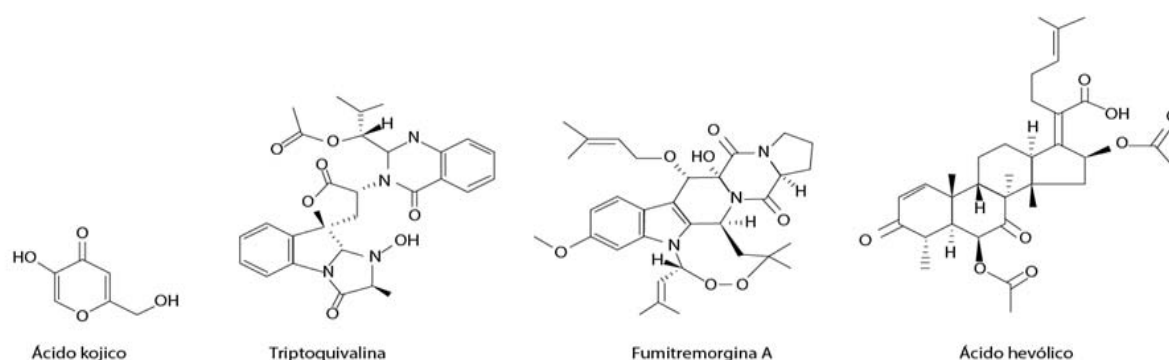


Figura 2. Principales metabolitos biosintetizados por *A. fumigatus*. Ilustración tomada de *Aspergillus Molecular Biology and Genomics*.²²

1.4 Gliotoxina

La gliotoxina es producida por varios hongos incluyendo a *Gliocladium fimbriatum*, *Trichoderma* spp, *Eurotium chevalieri*, algunos aislados de *Penicillium*²³ así como de *Candida albicans*²⁴. En *A. fumigatus*, se considera un factor de virulencia importante debido a la toxicidad que presenta hacia las células de los mamíferos y es posible que facilite el desarrollo de la aspergilosis en su forma invasiva²⁵.

Químicamente, la gliotoxina es una epipolythioxiodiopiperazina (ETP), las moléculas que pertenecen a esta categoría son una clase de dipéptidos cíclicos caracterizados por presentar un puente disulfuro responsable de regular su actividad biológica. En gliotoxina, el puente disulfuro se extiende por un anillo de dicetopiperazina (DKP) y contiene un aminoácido aromático amino-fenilalanina, además de serina¹². En la figura 3 se muestra la estructura química de la toxina. La fórmula química del compuesto corresponde a $C_{13}H_{14}N_2O_4S_2$ y su peso molecular es de 326 Da¹⁴.

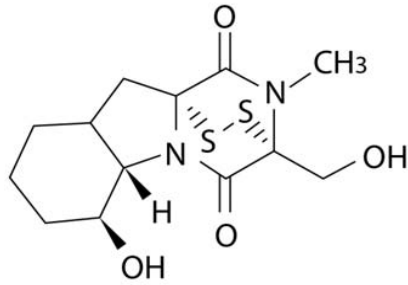


Figura 3. Estructura química de la gliotoxina. El compuesto presenta el puente disulfuro característico de los metabolitos fungales ETP. Figura tomada de *Aspergillus Molecular Biology and Genomics*²²

1.4.1 Biosíntesis de gliotoxina

De acuerdo con Gardiner²⁴, gliotoxina y otras moléculas relacionadas, son codificadas por grupos de genes múltiples, regulados por mecanismos biosintéticos no ribosomales. En *A. fumigatus* el sistema enzimático responsable de la biosíntesis y el metabolismo de gliotoxina es mediado por un grupo de 12 genes (cluster) que incluyen a: *gliZ* (factor de transcripción, dedo de zinc); *gliI* (sintasa de 1-aminociclopropano-1-carboxilato de etilo); *gliJ* (dipeptidasa); *gliC*; *gliF* (dos citocromo P450; monooxigenasas); *gliM* (O-metiltransferasa); *gliG* (glutación-S-transferasa); *gliK* (proteína hipotética transportadora); *gliN* (metiltransferasa); *gliT* (Oxidasa); *gliH* (proteína hipotética conservada) y *gliP* (Péptido no ribosomal)²⁴.

Balibar y Walsh²⁶, refieren al gen *gliP* como el más grande dentro del cluster *gli*, codificando la producción de GLIP, un péptido sintetasa no ribosomal (NRPS) responsable de catalizar los primeros pasos en la biosíntesis de gliotoxina, originando la DKP. Según Kupfhal y colaboradores²⁷, la expresión de *gliP* es esencial para la producción de gliotoxina. Estudios realizados en cepas mutantes de *A. fumigatus* carentes del gen *gliP*, resultaron incapaces de sintetizar la toxina. Otro estudio similar desarrollado por Cramer y colaboradores²⁸, en el que mutaron cepas de *A. fumigatus* e interrumpieron la expresión del gen, estas no produjeron el compuesto.

El gen *gliz*, se ha confirmado como regulador en la transcripción de genes. Conforme a Bok y colaboradores²⁹, en un análisis de funcionalidad sobre *gliz* se demostró que la interrupción de este gen también abolió la biosíntesis de gliotoxina.

Por otra parte, Schrettl y colaboradores³⁰ lograron demostrar que el gen *gliT* es el principal responsable de proteger contra la gliotoxina exógena. Sin embargo, la funcionalidad del resto de genes pertenecientes al cluster *gli* solo se ha hipotetizado²³.

Hasta ahora, se desconocen cuáles son los estímulos que inducen la producción del metabolito. No obstante, la transcripción de

los genes en un ensayo *in vitro* puede ser afectada por diferentes factores: pH, temperatura, composición del medio de cultivo y aereación²³, aunque este último ha demostrado favorecer la producción rápida de la toxina, lo que sugiere su importancia en el desarrollo de infecciones respiratorias causadas por *A. fumigatus*³¹.

1.4.2 Toxicidad de gliotoxina

Según Mullbacher y Eichner³², los efectos tóxicos de la gliotoxina principalmente se han descrito sobre el aparato respiratorio superior en mamíferos, donde la toxina produce ciliostásis, y en células del sistema inmune. Los macrófagos son especialmente susceptibles a la gliotoxina, en estos inhibe la fagocitosis mediante la interacción del metabolito con residuos tiol presentes en la membrana mitocondrial. Mullbacher y colaboradores³³, mencionan que después de realizar un ensayo *in vitro*, determinaron que concentraciones de 0.1-3 μM de gliotoxina inducen apoptosis en macrófagos, células T y timocitos. A diferencia de la necrosis que surge cuando las células son expuestas a concentraciones por encima de 10 μM , aunque el mecanismo que desencadena este proceso sigue siendo objeto de estudio³⁴. La gliotoxina además, puede bloquear la activación de linfocitos T y B^{34, 35}.

Conforme a Gardiner y colaboradores ³⁶, los mecanismos de toxicidad de gliotoxina aún se discuten, se ha hipotetizado que la actividad tóxica de la gliotoxina es mediada por el puente disulfuro, a través de dos mecanismos de acción: 1) Ciclo redox entre la forma oxidada (disulfuro) y reducida (ditiol), conformación que conduce a la generación de especies reactivas (ROS) específicamente iones superóxido y peróxido de hidrógeno, que son perjudiciales para las células del hospedador. 2) La formación de disulfuros mixtos con proteínas que presentan grupos tiol accesibles dispuestos en la membrana mitocondrial. En la figura 4 se observa el efecto de la gliotoxina al ser absorbida por la célula. No obstante, se han propuesto otros mecanismos de toxicidad para esta micotoxina, relacionados con el aumento de los niveles de calcio intracelular, este incremento, es inducido por la interacción de la toxina con un residuo tiol en la membrana plasmática del canal de calcio, que es sensible a redox, por lo que el aumento en el flujo de calcio dentro de la célula, puede ocasionar daño oxidativo. La adición de ditiotreitól o glutatión, impide la entrada de calcio inducida por gliotoxina, pues en la forma reducida no transforma oxidativamente residuos tiol, lo cual promueve la formación de disulfuro mixto, en lugar del ciclo redox ^{35, 36}.

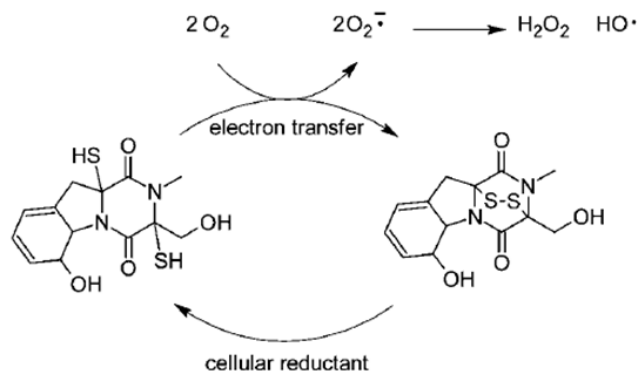


Figura 4. Efectos provocados a nivel celular por gliotoxina. Figura tomada de The epipolythiodioxopiperazine (ETP) class of fungal toxins: distribution, mode of action, functions and biosynthesis.³⁶

1.4.3 Análisis de la gliotoxina

El análisis de moléculas como la gliotoxina se lleva a cabo empleado técnicas analíticas como: Cromatografía de Líquidos de Alta Presión (CLAP), espectrometría de masas, inmunoensayos y Cromatografía en Capa Fina (CCF)¹⁴.

1.5 Aspergilosis aviar

A pesar de que existen numerosas especies de *Aspergillus*, la de mayor importancia en medicina veterinaria es *A. fumigatus*, afecta a mamíferos y aves de todo tipo. La aspergilosis representa pérdidas económicas importantes sobre todo en la producción de pollo de engorda y guajolotes³⁷.

La aspergilosis es la enfermedad infecciosa, no contagiosa, ocasionada por cualquier miembro del género *Aspergillus*.³⁷

A. fumigatus es un patógeno para las aves, que comparadas con

los mamíferos, presentan diferencias notables que las hacen especialmente susceptibles de sufrir la enfermedad⁸, como la existencia de sacos aéreos, donde suelen depositarse las conidias, que no son removidas con eficiencia de estas membranas serosas debido a la escasa irrigación que presentan, y dado que la cantidad de oxígeno en estas estructuras es elevada, provee de las condiciones necesarias para que el hongo forme conidias. Por otra parte, la carencia de epiglotis que limite la entrada de partículas hacia el tracto respiratorio inferior y la ausencia de diafragma, que resulta en un deficiente reflejo de la tos, necesario para expulsar elementos exteriores y microorganismos atrapados en el moco. También, la temperatura corporal elevada de 41°C, favorece el desarrollo del hongo, como se ha mencionado es termotolerante⁸. El principal órgano que se afecta es el pulmón, por lo que a éste padecimiento se le conoce también como neumonía micótica o de las nacedoras³⁷.

En las incubadoras avícolas, la temperatura oscila entre los 37.5-37.7°C, mientras que la humedad va del 60 al 70 %, estas condiciones aunado a un programa de desinfección ineficiente de la cámara de incubación y escaso mantenimiento del sistema de ventilación, propician la proliferación de bacterias y hongos³⁸. El flujo de aire que circula en las incubadoras debe ser estéril, sin embargo, el deterioro de los filtros que

cumplen esta función, permiten el paso de cantidades importantes de conidias, las cuales llegan al huevo, pueden penetrar el cascarón e iniciar la infección micótica *in ovo*³⁸.

Por otra parte, en las grajas, los factores que desencadenan la aspergilosis radican en una escasa ventilación, camas húmedas, hacinamiento, alimento enmohecido, que además de ser la fuente donde se albergan grandes cantidades de conidias, también puede contener micotoxinas cuyo principal efecto es el de producir inmunodepresión y aumentar las posibilidades de que las aves se enfermen³⁷.

La aspergilosis aviar se presenta de dos formas:

- a) Aguda: Afecta especialmente aves jóvenes, con alta morbilidad y mortalidad.
- b) Crónica: La padecen en su mayoría las aves reproductoras o adultas y es esporádica³⁷.

1.5.1 Patogenia

Cuando *A. fumigatus* libera sus conidias, estas se esparcen sobre el alimento y diversos fómites, al moverse se crean aerosoles que las diseminan al ambiente, gracias a su tamaño (2-3 μm de diámetro) son aspiradas por las aves, evadiendo los mecanismos de inmunidad inespecíficos del tracto respiratorio superior, como el moco presente en la cavidad nasal y el

epitelio cilíndrico ciliado de la tráquea. Durante la inspiración, las conidias son transportadas por el aire a través de la tráquea hacia los bronquios primarios externos, para dirigirse a los bronquios mediodorsales secundarios en el pulmón, al llegar a los parabronquios se adhieren a proteínas de la lámina basal y se incrustan en las aurículas e infundíbulo en los capilares aéreos, donde son fagocitadas por los macrófagos³⁹. Sin embargo, cuando el número de conidias supera la capacidad para ser eliminadas por las células fagocíticas o el sistema inmune del individuo se encuentra comprometido, las conidias germinan dando origen a las hifas, estas se diseminan por el tejido, presentando tropismo por los vasos sanguíneos, lo que facilita su diseminación hacia otras estructuras anatómicas⁴⁰. Adicionalmente, una porción del aire inspirado por el ave, pasa por el parabronquio neopulmonar para dirigirse hacia los sacos aéreos torácicos y abdominales caudales, por lo que es común el desarrollo de aerosaculitis^{39,41}.

Los signos clínicos de la aspergilosis aguda suelen ser inespecíficos e incluyen disnea, anorexia, letargo, plumas erizadas, vocalizaciones, poliuria, polidipsia, retraso del crecimiento o muerte súbita³⁷.

En la forma crónica de la enfermedad puede presentarse disnea, deshidratación, emaciación, ataxia y opistótonos^{37,41}.

La infección también puede ocurrir *in ovo*, aunque no de manera frecuente. Cuando el hongo ha penetrado el cascarón y la membrana, comienza la germinación de las conidias y alrededor del sexto día post-infección se produce la muerte del embrión, el huevo se rompe y las conidias contenidas son liberadas al ambiente, propiciando la contaminación constante en las incubadoras³⁷. En ocasiones, algunos pollos sobreviven a la infección *in ovo* y logran eclosionar; no obstante, en los primeros días de nacidos muestran disnea, cianosis, pueden presentar oftalmitis y signos nerviosos. La mayoría de los casos concluye en colapso por hipoxia⁴².

1.5.2 Lesiones

Macroscópicamente, es común observar granulomas focales que van desde 1 mm a 1 cm de diámetro, color blanco-amarillento, dispuestos en el parénquima de uno o múltiples órganos, que involucran a las serosas³⁷. Cuando estas lesiones son ocasionadas por *Aspergillus*, se llaman aspergilomas⁴³.

El neopulmón junto con los sacos aéreos torácicos caudales es donde usualmente se localizan las lesiones, estos últimos, pueden presentar en su superficie placas gruesas de exudado caseoso e incluso es frecuente que el hongo forme conidióforos

en este sitio, lo cual se evidencia con la formación de un tapete de consistencia algodonosa, color grisáceo o verdoso sobre la superficie de dichas estructuras⁴¹.

Los aspergilomas se han descrito en tráquea, siringe, esófago, proventrículo, cerebro, hígado, bazo y corazón. Sin embargo, deben diferenciarse de otros microorganismos que también formen nódulos granulomatosos como *Mycobacterium* spp, *Salmonella* spp, y *Escherichia coli*⁹.

Según Cacciuttolo y colaboradores⁴⁴, las lesiones microscópicas producidas por *Aspergillus* spp, pueden presentarse de dos formas: A) nodular profunda o granulomatosa y B) superficial o difusa.

A) La forma nodular profunda, se presenta principalmente en órganos parenquimatosos con baja tensión de oxígeno. Los granulomas son estructuras bien organizadas, se encuentran encapsulados por una gruesa capa fibrosa, se pueden observar células inflamatorias como las gigantes de cuerpo extraño, que van de cantidad moderada a abundante lo que indica la presentación crónica de la enfermedad.

B) La forma difusa se observa con frecuencia en tejidos con una elevada tensión de oxígeno, como los sacos aéreos y pulmones. La principal característica consiste en la presencia de piogranulomas que no presentan una clara delimitación, se

observan elementos fúngicos con la infiltración de macrófagos, heterófilos, y linfocitos. En ocasiones, estas lesiones pueden ser coalescentes, al extenderse, conducen a la obliteración parabronquial con material necrótico, presencia de eritrocitos y células epiteliales exfoliadas. Los elementos fúngicos que se observan, consisten en hifas paralelas, septadas y ramificadas de forma dicotómica, en ocasiones dispuestas en un típico patrón radial^{44, 45}. Además, en los sacos aéreos se pueden observar conidióforos no ramificados⁴⁵.

Es importante diferenciar de otras micosis que producen lesiones tisulares parecidas a las descritas para aspergilosis, como aquellas causadas por *Paecilomyces* spp, *Mucor* spp, y *Rhizopus* spp⁴⁵.

El desarrollo de la aspergilosis aviar está condicionado a factores ambientales, el estado inmunológico del hospedador, así como el conjunto de genes y moléculas que exprese el microorganismo durante la patogenia¹⁹. En la figura 5, se presenta la triada epidemiológica de la aspergilosis.

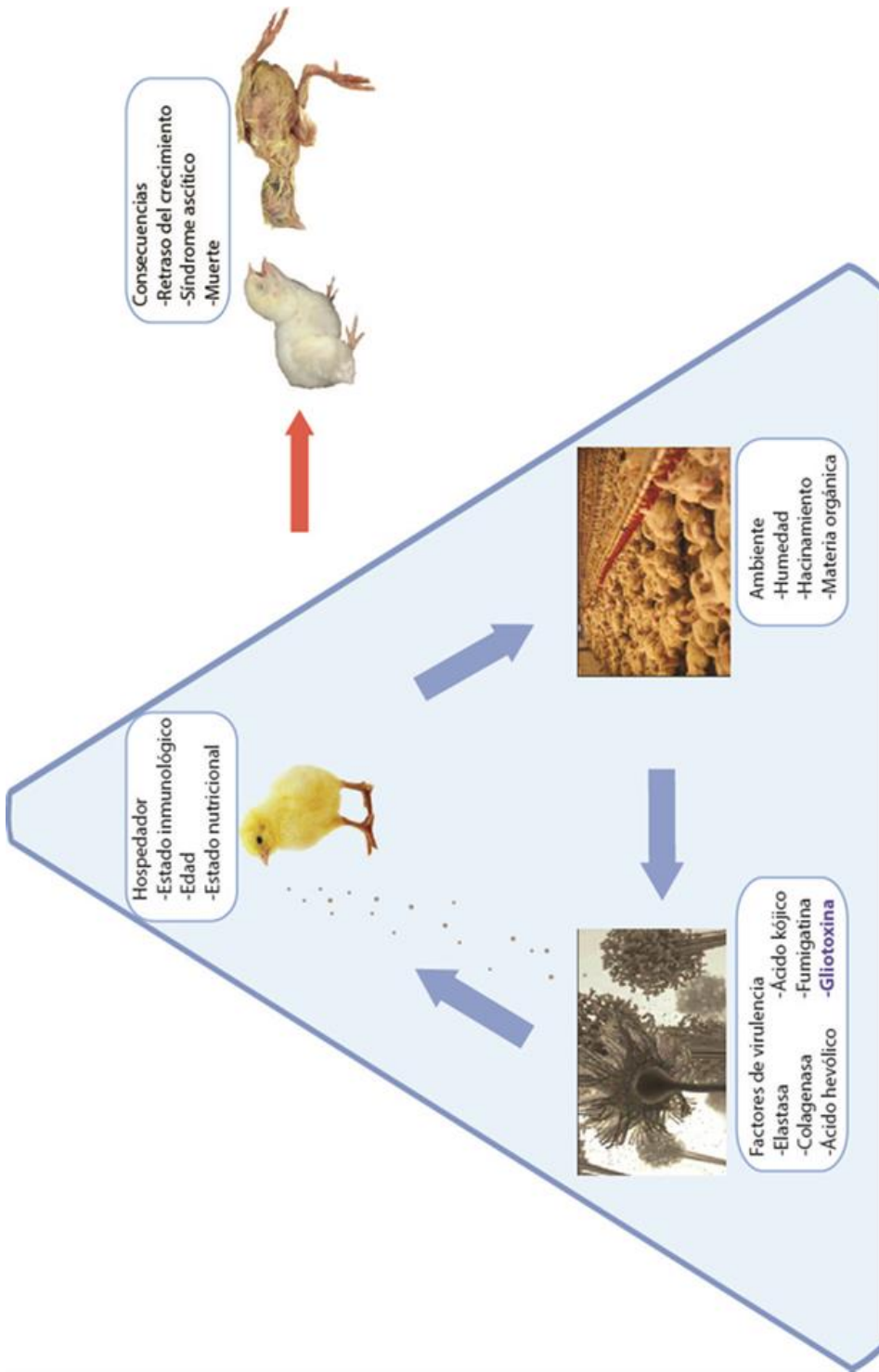


Figura 5. Triada epidemiológica de la aspergilosis aviar. Se muestran los factores intrínsecos y extrínsecos que propician la infección y desarrollo de la enfermedad.

1.5.3 Diagnóstico

El diagnóstico de la aspergilosis aviar, se lleva a cabo mediante el uso de técnicas directas e indirectas³⁷.

Técnicas de diagnóstico directo.

Se sustentan en el aislamiento e identificación del agente etiológico por medio de cultivo micológico, así como la visualización de estructuras micóticas en los tejidos mediante el examen directo de la muestra, usando un agente aclarante como el hidróxido de potasio al 10% adicionado con tinta colorante (Quink Parker)³⁷. El blanco de calcoflúor también es de utilidad, ya que evidencia la presencia de hifas cuando se observa la preparación al microscopio de inunofluorescencia referencia³⁷. La citología a partir de fluidos o lavados es importante para el diagnóstico *ante - mortem* de la enfermedad⁴³.

Técnicas de diagnóstico indirectas.

Se basan en la detección de anticuerpos u otros indicios que manifiesten la presencia del agente etiológico⁴³. El uso de técnicas serológicas, tienen un moderado valor predictivo en el diagnóstico de la aspergilosis aviar³⁷. Por ejemplo, el Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA) indirecto, ha mostrado ser de utilidad en rapaces; sin embargo, es común que se presenten resultados falsos negativos⁴³. En cambio, la

inmunohistoquímica, con el uso de anticuerpos monoclonales o policlonales, es una herramienta de diagnóstico que permite detectar eficientemente antígenos de *A. fumigatus* a partir de lesiones tisulares⁴³. Por otra parte, las técnicas de imagenología como la evaluación radiográfica, muestran la distribución y gravedad de las lesiones micóticas en los pulmones y sacos aéreos⁴⁶, pero su valor diagnóstico es limitado dado que las lesiones solo se observan cuando la enfermedad es de curso crónico, generalmente con un pronóstico reservado⁴³. Con la tomografía computarizada, es posible visualizar lesiones pequeñas e inaparentes en radiografías; debido a que proporciona imágenes detalladas de todo el tracto respiratorio; no obstante, puede ser un estudio costoso y poco accesible en medicina veterinaria⁴³.

Adicionalmente, es posible aplicar técnicas de biología molecular como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para apoyar la caracterización del agente etiológico involucrado⁴⁵.

A pesar de contar con diversas pruebas para el diagnóstico de la aspergilosis, la mayoría limitan su aplicación a las aves de silvestres en cautiverio⁹, debido a que en estas es posible realizar una serie de estudios que permitan complementar el diagnóstico *ante-mortem* de la enfermedad, como el cultivo

micológico a partir de hispado, cuando la infección se desarrolla en tráquea y siringe, citología, hematología, serología, endoscopia y radiología principalmente⁴⁶. En cambio, en las aves de corral, el diagnóstico debe realizarse con miras a la población, a partir de una muestra representativa de la parvada, se lleva a cabo la necropsia de los individuos en busca de lesiones con las características descritas anteriormente, para realizar el cultivo micológico a partir de los tejidos lesionados, así como la observación preliminar de la muestra en busca de hifas septadas^{9,37}. Además de la confirmación del diagnóstico mediante la histopatología⁴⁵.

1.5.4 Medidas de prevención y control

Hasta el momento, no existe tratamiento o inmunógeno eficaz para prevenir la aspergilosis; por lo tanto, efectuar medidas de bioseguridad así como buenas prácticas de producción dentro de las granjas, y especialmente en las incubadoras avícolas, es clave en el control de esta y otras enfermedades fungales³⁷. Establecer programas de limpieza y desinfección en las instalaciones de la planta incubadora, considerando el mantenimiento preventivo de los equipos, principalmente aquellos que intervienen en la filtración de aire, además del reemplazo oportuno de estos, permitirá un control eficaz de los contaminantes microbianos³⁸.

En las granjas, la deposición de residuos en contenedores apropiados alejados de las casetas y la disminución de estrés en la población, reducen significativamente la aparición de brotes por *Aspergillus* spp. También, es importante mantener la calidad del agua, cama y alimento que se ocupe durante el ciclo productivo^{37, 41}.

Tanto en las incubadoras como en las granjas, el monitoreo microbiológico ambiental es necesario para conocer cuál es la microbiota predominante en las instalaciones, y elegir el rol de sanitizantes adecuados con base en un reto microbiano, esta práctica evitará la aparición de resistencia en los microorganismos^{38, 47}.

El uso de detergentes es el primer paso para la eliminación de agentes infecciosos de origen bacteriano y micótico. Generalmente, los detergentes se utilizan con un sistema de aplicación en espuma, permitiendo que el producto actúe de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Posteriormente, se remueve completamente con agua. Entonces, se realiza una desinfección profunda, utilizando productos en estado gaseoso o líquido, estos pueden ser formaldehído o una combinación de aldehídos y cuaternarios de amonio⁴⁷.

Justificación

En México la investigación relacionada con la aspergilosis y la biosíntesis de metabolitos en el proceso patogénico es limitada. Con este trabajo, se inician una serie de estudios microbiológicos, moleculares, histopatológicos, bioquímicos y químicos, que contribuyan al entendimiento de la aspergilosis aviar y la presencia de gliotoxina en infecciones ocasionadas por *A. fumigatus*.

Planteamiento del problema

La aspergilosis es una enfermedad importante en las aves silvestres en cautiverio, así como aquellas destinadas a la producción pecuaria, siendo más susceptibles los guajolotes y el pollo de engorda, se presenta con alta morbilidad y mortalidad. De acuerdo con Arn'e y colaboradores⁹, los brotes por *A. fumigatus* en granjas avícolas pueden ocasionar una mortalidad estimada del 4.5% hasta el 90%, especialmente en individuos entre 3 días y 20 semanas de edad, provocando pérdidas económicas significativas. También, deben considerarse las mermas por la disminución de los parámetros productivos (conversión alimenticia, tasa de crecimiento) en las aves que resistan la enfermedad³⁷. A pesar de tratarse de una enfermedad endémica en nuestro país, regularmente no se diagnostica de forma oportuna, por esta razón, es fundamental el desarrollo de herramientas que orienten su diagnóstico en etapas iniciales de la enfermedad, considerando para ello la biosíntesis de metabolitos durante la patogenia, como la gliotoxina, que se ha relacionado con el desarrollo de lesiones necróticas en pulmones de guajolotes^{10, 13}. De acuerdo con Richard y colaboradores¹⁰, este compuesto se produce al inicio de la infección, por ello, la finalidad de este trabajo consiste en demostrar la presencia de la toxina a partir de aves enfermas con lesiones insipientes producidas por *A. fumigatus*, para

posteriormente diseñar pruebas de diagnóstico que puedan ser aplicables *ante-mortem* a poblaciones o individuos, basadas en la detección de este metabolito.

Hipótesis

Dado que la gliotoxina de *Aspergillus fumigatus* interviene en el desarrollo de la aspergilosis aviar, el compuesto se detectará en etapas iniciales de la infección a partir de los tejidos de aves enfermas.

Objetivo General

Caracterizar *A. fumigatus* a partir de casos de aspergilosis aviar por métodos microbiológicos y moleculares para estudiar la producción de gliotoxina en los aislados; realizar el estudio histopatológico mediante las tinciones de hematoxilina-eosina y Gomori-Grocott para corroborar la presencia del hongo, así como determinar la producción de gliotoxina en los aislados obtenidos y del tejido infectado mediante un método químico para confirmar la presencia de la toxina.

Objetivos particulares

- Aislar e identificar *A. fumigatus* proveniente de muestras clínicas de aves con aspergilosis por métodos microbiológicos y moleculares, para estudiar la producción de gliotoxina en los aislados recuperados.
- Determinar la producción de gliotoxina en los extractos clorofórmicos obtenidos de cada aislamiento de *A. fumigatus* por Cromatografía en Capa Fina (CCF), para evaluar cualitativamente la biosíntesis *in vitro* del compuesto.
- Realizar la evaluación microscópica de las lesiones inducidas por *A. fumigatus* en los tejidos infectados, mediante las tinciones de hematoxilina-eosina y Gomori-Grocott para corroborar la presencia del hongo.

- Detectar la gliotoxina en los tejidos afectados por *A. fumigatus* mediante CCF, para conocer de forma preliminar si la toxina se produjo durante la infección.

2 Materiales y Métodos

Esta investigación se realizó en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ), de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), en el Departamento de Microbiología e Inmunología (DMeI), Laboratorio de Micología, así como en el Departamento de Patología (FMVZ-UNAM), y en la Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán (FES-C), Campo I, en el Laboratorio de Tecnología de Calidad en Alimentos.

2.1 Muestreo

El muestreo se llevó a cabo en los meses de agosto a noviembre del año 2013, colectando un total de 73 aves, 43 de una granja ubicada en Cuautla, Morelos, México, destinada para la producción de pollo de engorda estirpe Ross-308 y 30 pollos del mercado público "Sonora", ubicado en la Delegación Venustiano Carranza, en el sureste de la Ciudad de México. En este lugar, los pollos fueron comercializados como aves de mala calidad. La edad aproximada de los individuos muestreados, osciló entre los 3 días y 4 semanas, a excepción de un gallo estirpe Plymouth rock barrado, del cual no se conoce con exactitud este dato.

Los pollos alojados en la granja, se encontraban en casetas con temperatura controlada, consumiendo alimento balanceado y

fueron inmunizados con la vacuna del virus atenuado de la bronquitis infecciosa. Además, mostraron una buena condición corporal. Por otra parte, las aves procedentes del mercado "Sonora", se encontraban alojadas en jaulas o cajas de cartón, contiguas a otras aves, principalmente canarios, palomas, patos y codornices, así como distintas especies animales, entre ellas conejos, cuyes y otros roedores. La alimentación de estas aves era restringida y regularmente no tenían agua de bebida. No se conoce su origen ni programa de medicina preventiva.

Todas las aves presentaron signos respiratorios, entre los que destacaron disnea moderada a severa, sibilancias, tos no productiva, y algunas aves mostraron descarga nasal unilateral o bilateral, posteriormente murieron y fueron entregadas para la realización de este trabajo.

2.2 Aislamiento micótico a partir de aves enfermas

Se practicó la necropsia aséptica a 73 aves de las cuales se colectaron los órganos que sugirieron la presencia de micosis (granulomas, hemorragia, textura algodonosa amarillo verdoso). Como se presenta figura 6, a partir de los tejidos afectados se realizó una serie de cortes transversales de aproximadamente 1-2 mm de grosor y se inocularon en tubos con 7 ml de caldo Sabouraud dextrosa (Bioxón® BD) adicionado con 0.05 g/L de

cloranfenicol. Después, se incubaron a 37°C en una estufa bacteriológica (marca: Marconi®, modelo: MA031/1) durante 3 a 5 días¹⁶. Además, de cada muestra se realizó un examen directo con hidróxido de potasio (J.T. Baker®) al 10%, observando la preparación al microscopio (marca: Olympus®, modelo: CX31) con los objetivos de 10X y 40X para localizar hifas septadas ³⁷.

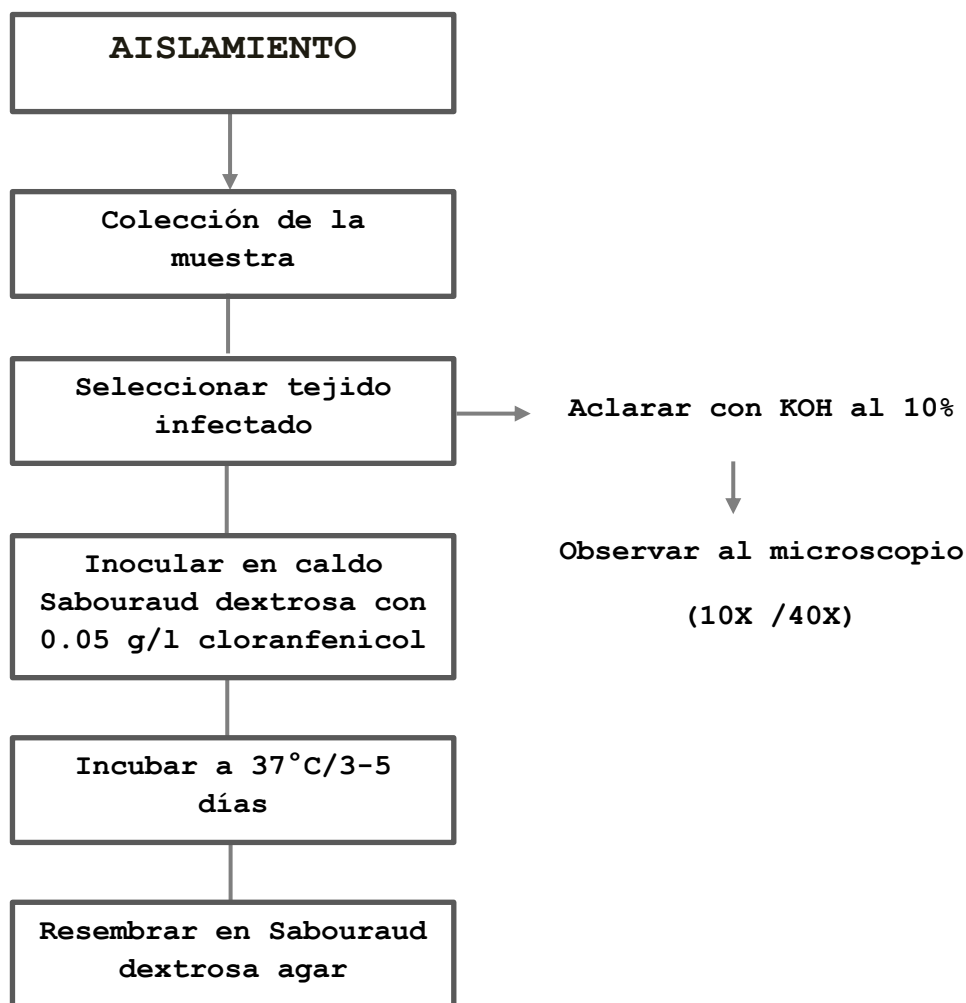


Figura 6. Procedimiento para el aislamiento de *A. fumigatus*.

Una vez detectado el desarrollo fúngico en el caldo, de este se realizó la resiembra en SDA (Bioxón® BD) por la técnica de punto aislado¹⁶, las condiciones de incubación fueron las mismas del primoaislamiento.

2.3 Identificación

La identificación se realizó mediante métodos micológicos y moleculares como se presenta en la figura 7.

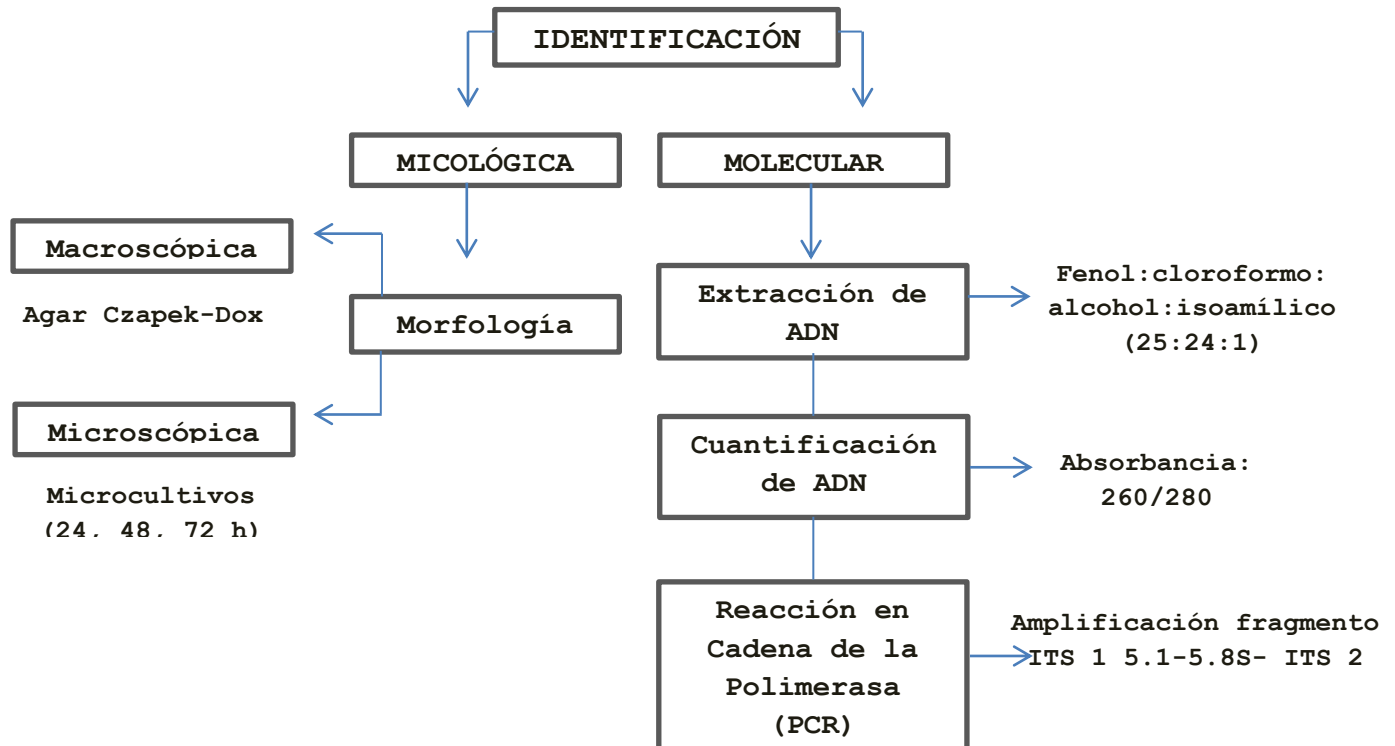


Figura 7. Procedimiento para la identificación micológica y molecular de *A. fumigatus*.

2.3.1 Identificación de *A. fumigatus* por métodos micológicos

La identificación micológica se realizó con base en el manual de identificación de Germain y Summerbell²⁰. Las colonias aisladas se examinaron macro y microscópicamente utilizando la tinción de lactofenol azul de algodón (LAA). Los hongos que presentaron características compatibles con *A. fumigatus*, se sembraron en agar Czapek-Dox (Oxoid®), para describir su morfología colonial en este medio de cultivo. La identificación micológica se obtuvo mediante microcultivos seriados de 24, 48 y 72 horas como sugiere la técnica de Ridell⁴⁸. Se reconocieron los conidióforos, vesícula, y fiálides uniseriadas características de *A. fumigatus*.

Todos los lotes de medio de cultivo utilizados para estos estudios pasaron por la prueba de control de calidad, incubándose durante 48 horas a 30°C.

2.3.2 Identificación molecular de *A. fumigatus* mediante PCR

2.3.2.1 Extracción de ADN

La extracción de ADN genómico, se llevó a cabo con base en una modificación al protocolo propuesto por Mendoza⁴⁹. Las modificaciones consistieron en cambiar la temperatura de

incubación de la biomasa fungal con el amortiguador de lisis y la proteinasa K, originalmente de 65°C a 56°C. También, se realizaron dos extracciones con fenol:cloroformo:alcohol-isoamílico (25:24:1). Además, el ADN se trató con ARNasa, utilizando un amortiguador de tris EDTA (TE) ajustado a pH de 8.0. A continuación se describe detalladamente la metodología para la extracción de ADN.

Se inocularon aproximadamente 3,000,000 conidias/ml en 200 ml de caldo Czapek Dox (Oxoid®) de cada aislamiento fenotípicamente identificado como *A. fumigatus*. Los cultivos se incubaron a 37°C en una estufa bacteriológica (marca: Marconi, modelo: MA032/1), durante 96 horas. Posteriormente, la biomasa obtenida se sometió a tres lavados secuenciales con 5 ml de agua destilada estéril para eliminar las sales del medio de cultivo y fue separada por filtración utilizando papel Whatman® # 1 estéril, se congeló a -20°C hasta el momento de su uso.

Como se muestra en la figura 8 (pág. 39), en un mortero estéril se depositó el micelio, este se maceró con nitrógeno líquido hasta haber obtenido un polvo fino, el cual se transfirió a tubos Eppendorf® de 1.5 ml que fueron llenados hasta la parte cónica. Después, se agregaron 600 µl de amortiguador de lisis y se mezcló con ayuda de un agitador Vortex®. En seguida, se añadieron 10 µl de proteinasa K (Vivantis®) a una concentración

de 200 mg/ml, nuevamente se mezcló en Vortex®. A continuación los tubos se incubaron en baño María (marca: Grant, modelo: GLS Aqua Plus) a 56°C durante 60 minutos. Transcurrido este lapso, se realizaron dos lavados con 500 µl de fenol:cloroformo:alcohol-isoamílico 25:24:1 (Sigma-Aldrich®), en cada lavado se centrifugó (microcentrífuga, marca: Eppendorf®, modelo: 5417R) a 14,000 g durante 15 minutos, recuperando en total 600 µL de la fase acuosa que fue transferida a un tubo Eppendorf® nuevo, donde se añadieron 10 µl de una solución de acetato de sodio (J. T. Baker®) 3M, más 600 µl de etanol absoluto grado biología molecular (IBI Scientific®), el tubo se invirtió suavemente varias veces y se centrifugó a 14,000 g durante 5 minutos. Posteriormente, el etanol se decantó para resuspender la pastilla en 400 µl de solución TE; además, se adicionaron 4 µl de RNAsa (Vivantis®). Posteriormente, se incubaron en baño María a 37°C durante 60 minutos. Después, se agregó 1 ml de etanol al 70% y se centrifugó a 14,000 g durante 1 minuto. El etanol se decantó para permitir que el ADN secase. Finalmente, la pastilla se resuspendió en 30 µl de agua inyectable conservándose a 4°C. El ADN obtenido se evaluó mediante electroforesis (40 amperes/50 min) en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (5 mg/ml)⁵⁰. Posteriormente, se tomó fotografía al gel, en un fotodocumentador (marca: Bio-Doc, modelo: It 220).

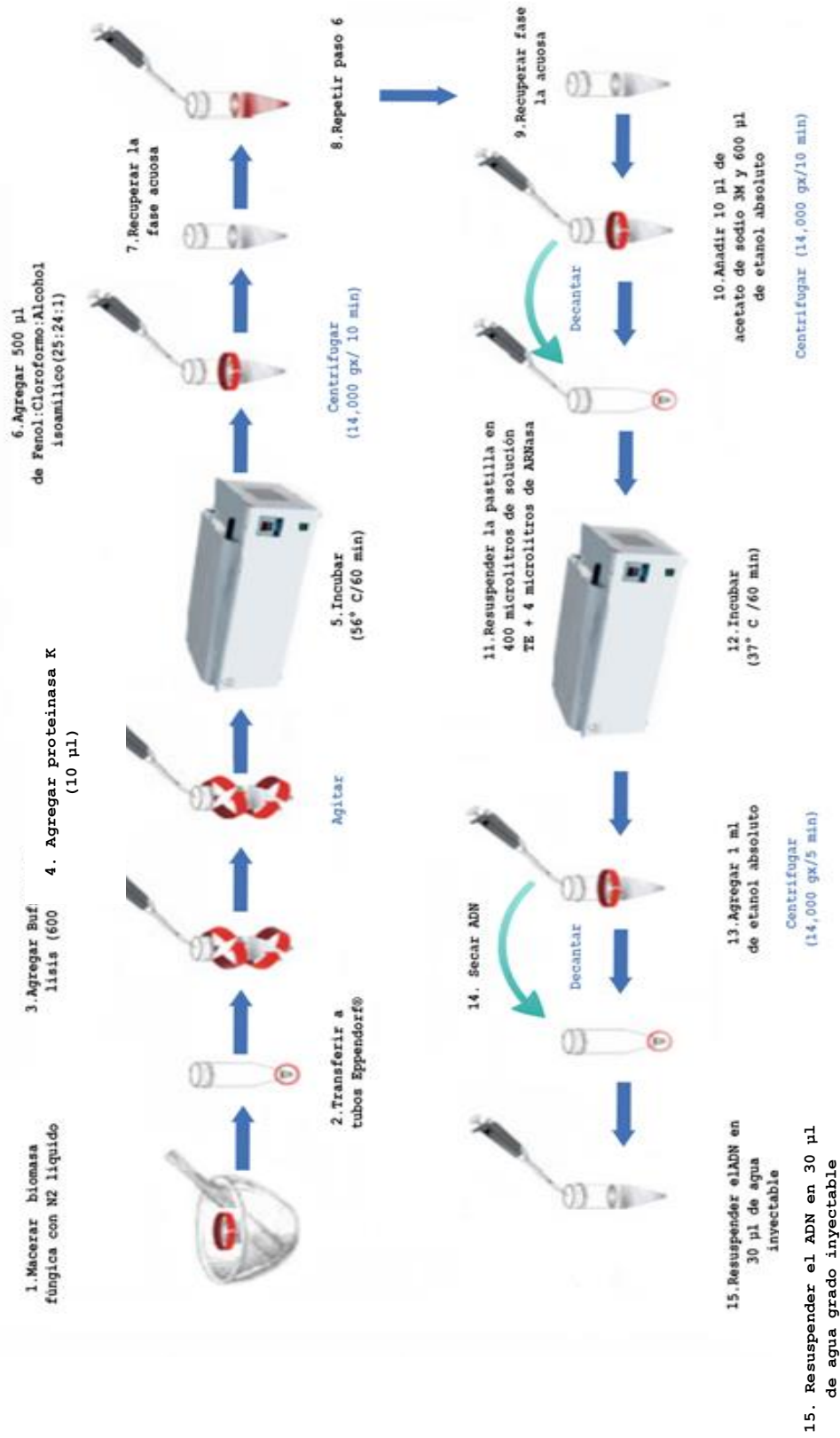


Figura 8. Metodología empleada para la extracción de ADN genómico de *A. fumigatus*.

2.3.2.2 Cuantificación de ADN

Se realizó en un biofotómetro (marca: Eppendorf®, modelo: D- 5000- 3000), utilizando una dilución del ADN 1:100 en agua grado inyectable, las lecturas se llevaron a cabo a una absorbancia de 260/280 nm⁵¹.

2.3.2.3 Amplificación del fragmento ITS (ITS 1 5.1-5.8S-ITS 2) de *A. fumigatus*

Los iniciadores utilizados para la amplificación del fragmento ITS 1 5.1-5.8S-ITS 2 específicos para *A. fumigatus*⁵⁰ fueron:

Región ITS 1: Afu1F 5'-GTA TGC AGT CTG AGT TGA TTA T-3'

Región ITS 2: Afu1R 5'- ATA AAG TTG GGT GTC GGC TG-3'

Como control positivo se utilizó el ADN de la cepa A-20 de *A. fumigatus*, perteneciente al Laboratorio de Micología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ)-UNAM. Como control negativo se utilizó el de ADN de *A. flavus*.

La PCR se realizó en un volumen de 50 µl como se muestra en el cuadro 1.

Reactivo	Volumen (μL)
dNTP's (100 μM)	0.5
Afu-1F (30 pM)	0.5
Afu-1R (30 pM)	0.5
Amortiguador de reacción 10X	5
MgCl ₂ (1.5 U mMol)	2.5
ADN (muestra)	2
TAQ Polimerasa (1 U/ μL)	0.3
Agua grado inyectable Cbp	Volumen final: 50 μL

Cuadro 1. Reactivos empleados para la amplificación del fragmento ITS 1 5.1-5.8S ITS-2 de *A. fumigatus*.

La reacción se llevó a cabo en un termociclador (marca: Techne® modelo: TC-412) bajo las siguientes condiciones:

Una desnaturalización inicial a 95°C por 4 minutos, seguida de 40 ciclos. Cada ciclo consistió en una desnaturalización a 95°C por 30 segundos, una alineación a 60°C por 30 segundos y una extensión a 72°C por 1 minuto. Por último, una extensión final a 72°C por 3 minutos. El producto se evaluó por electroforesis en gel de agarosa al 1% adicionado con bromuro de etidio (5 mg/ml) en amortiguador TAE 1X a 40 amperes, durante 45 minutos⁵⁰. Posteriormente, se documentó el producto amplificado.

3 Histopatología

Se colectaron aproximadamente 0.5-1 cm³ de tejido pulmonar afectado y se fijó en formalina al 10% durante 15 días. Las muestras fueron remitidas al Departamento de Patología de la FMVZ-UNAM, donde se llevó a cabo la histopatología realizando las tinciones de hematoxilina-eosina y Gomori- Grocott.

4 Desarrollo del método para la producción y extracción de la gliotoxina de *A. fumigatus*

Con el objeto de encontrar las mejores condiciones para la extracción de la gliotoxina, se probaron diferentes métodos para su producción:

Para estos ensayos se utilizó la cepa A-20 de *A. fumigatus* conocida como productora de gliotoxina, a continuación se describe la metodología:

A) Cultivo estático¹¹

B) Cultivo en agitación orbital²⁸

Ensayo 1: Extracción clorofórmica de gliotoxina

Preparación del inóculo. En cuatro placas con agar Czapek-Dox (Oxoid®) se inoculó la cepa A-20 de *A. fumigatus* por punto aislado, las placas se incubaron a 37°C durante 5 días. Posteriormente las conidias fueron recuperadas utilizando agua

destilada adicionada con Tween 80 al 1%, y se contaron en cámara de Neubauer²⁸. Se alcanzó una concentración de aproximadamente 3,000,000 conidias/ml.

Cultivo. Se prepararon 2 L de caldo Czapek-Dox (Oxoid®) que fueron divididos en dos lotes:

- **Lote 1:** Se inocularon aproximadamente 3,000,000 conidias/ml por cada 200 ml de medio de cultivo, para un volumen total de 1 L. Después se aplicó agitación orbital (200 rpm) y se incubó a 37°C²⁸ durante 96 horas.
- **Lote 2:** En 5 botellas Roux con 200 ml de Caldo cada una, se inocularon 3,000,000 conidias/ml por botella y se incubaron en posición horizontal a 37°C durante 96 horas. Los cultivos permanecieron estáticos.

Después de la incubación, cada lote de cultivo se filtró por separado con papel filtro Whatman® # 1. El volumen recuperado por lote fue de aproximadamente 800 ml, que se depositaron en matraces estériles y se almacenaron a 4°C hasta el momento de la extracción clorofórmica, de acuerdo con el protocolo reportado por Davis¹¹.

Una vez obtenidos los filtrados de cada lote de cultivo en prueba, se llevó a cabo la extracción del compuesto en embudos de separación con cloroformo grado analítico (J. T. Baker®) a una proporción de 1:1. Se recuperó la fase clorofórmica y fue evaporada a 61.2°C en un rotavapor (marca: Büchi®, modelo: mR-124) hasta sequedad. Finalmente, los extractos secos se resuspendieron con 200 µl de metanol grado HPLC (Sigma- Aldrich®) y se almacenaron a 4°C para su posterior análisis.

Ensayo 2: Extracción de gliotoxina con diferentes proporciones de cloroformo

Cultivo. Se prepararon 2 L de caldo Czapek-Dox (Oxoid®) y fueron envasados en 10 botellas de Roux con 200 ml cada una. Las condiciones fueron las mismas que las mencionadas para el lote 2 hasta la recuperación del filtrado.

Extracción clorofórmica. El filtrado del cultivo se dividió en cinco lotes, para la extracción orgánica de gliotoxina con diferentes proporciones de cloroformo como se muestra en el cuadro 2.

Lote	Filtrado del cultivo (ml)	Cloroformo (ml)
A	200	100
B-1	400	50
B-2	400	50
C-1	200	50
C-2	200	50

Cuadro 2. Extracción de gliotoxina empleado diferentes concentraciones de cloroformo con relación a los lotes de filtrado a probar.

Ensayo 3: Extracción clorofórmica de gliotoxina por etapas

Cultivo. Se realizó a partir de la cepa A-20 de *A. fumigatus*. Se prepararon 2 L de caldo Czapek-Dox (Oxoid®) y fueron envasados en 10 botellas de Roux con 200 ml cada una. Las condiciones fueron las mismas que las mencionadas para el lote 2 hasta la recuperación del filtrado.

Extracción clorofórmica. El filtrado del cultivo se dividió en tres lotes de 400 ml cada uno, para la extracción orgánica de gliotoxina a diferentes proporciones de cloroformo y por etapas como se describe en el cuadro 3.

Lote	Etapa
A	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Con el objeto de conocer si era más eficiente realizar extracciones en etapas, se llevaron a cabo al filtrado del cultivo, 2 extracciones clorofórmicas. En la primera etapa se utilizaron 200 ml de cloroformo y la muestra fue identificada como lote A-1. Para la segunda etapa se utilizaron 50 ml de cloroformo y se identificó la muestra como lote A-2. Cada extracción fue evaporada a sequedad.
B	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Se llevaron a cabo al sobrenadante, 3 extracciones con 50 ml de cloroformo, las muestras de cada etapa se identificaron como lote B-1, lote B-2 y lote B-3. Cada extracción fue evaporada a sequedad.
C	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Se llevaron a cabo 4 extracciones con 50 ml de cloroformo, las muestras de cada etapa se identificaron como lote C-1, lote C-2, lote C-3 y lote C-4. Cada extracción fue evaporada a sequedad.

Cuadro 3. Extracción clorofórmica de gliotoxina por etapas.

Los extractos orgánicos de los lotes A, B y C fueron analizados por CCF y se determinó cuál fue el método más eficiente para la extracción de la gliotoxina.

Con base en los resultados obtenidos de estos ensayos mediante su análisis por CCF (pág.73), se concluyó que la producción de gliotoxina se llevara a cabo empleando caldo Czapek-Dox (Oxoid®), en condiciones estáticas mediante el uso de botellas Roux, y las extracciones subsecuentes de gliotoxina se realizaran en dos etapas utilizando cloroformo a una proporción de 1:8 con el filtrado.

4.1 Producción de la gliotoxina de *A. fumigatus*

Después de caracterizar los aislamientos de *A. fumigatus*, en cada uno se evaluó la producción de gliotoxina.

Como se ha mencionado, los aislados fueron sembrados por separado en placas con agar Czapek-Dox (Oxoid®) e incubados a 37°C durante 5 días. Después del periodo de incubación, las conidias fueron recuperadas. En seguida, se inocularon aproximadamente 3, 000, 000 conidias/ml en cinco botellas de Roux con 200 ml de caldo Czapek-Dox (Oxoid®). Posteriormente, las botellas se incubaron en posición horizontal en una estufa bacteriológica a 37°C durante 4 días.

4.2 Extracción clorofórmica de gliotoxina

La extracción de gliotoxina se realizó con base en el protocolo propuesto por Davis¹¹ modificado.

La modificación al método consistió en reducir el volumen de cloroformo utilizado para extraer la gliotoxina a partir del filtrado de un cultivo, originalmente de una proporción 1:1 se disminuyó el uso del solvente a una proporción de 1:8 con respecto al volumen del filtrado.

Como se muestra en la figura 9 (Pág. 49), después del periodo de incubación, la biomasa se separó por filtración empleando una bomba de vacío, el filtrado del cultivo recuperado se

transfirió a un embudo de separación con capacidad para 2 L donde se llevaron a cabo dos extracciones con cloroformo grado analítico a una proporción de 1:8. El embudo se colocó sobre un soporte de retorta para facilitar la separación de fases de las cuales se obtuvo la inferior (clorofórmica). Posteriormente, cada extracción se evaporó por separado hasta sequedad en el rotavapor (marca: Büchi®, modelo R-124) utilizando un baño María (marca: Büchi®, modelo B-481) ajustado a 61.2°C. El extracto seco, se resuspendió con 200 µl de metanol grado HPLC y fue almacenado en un vial de vidrio ámbar a 4°C hasta su análisis.

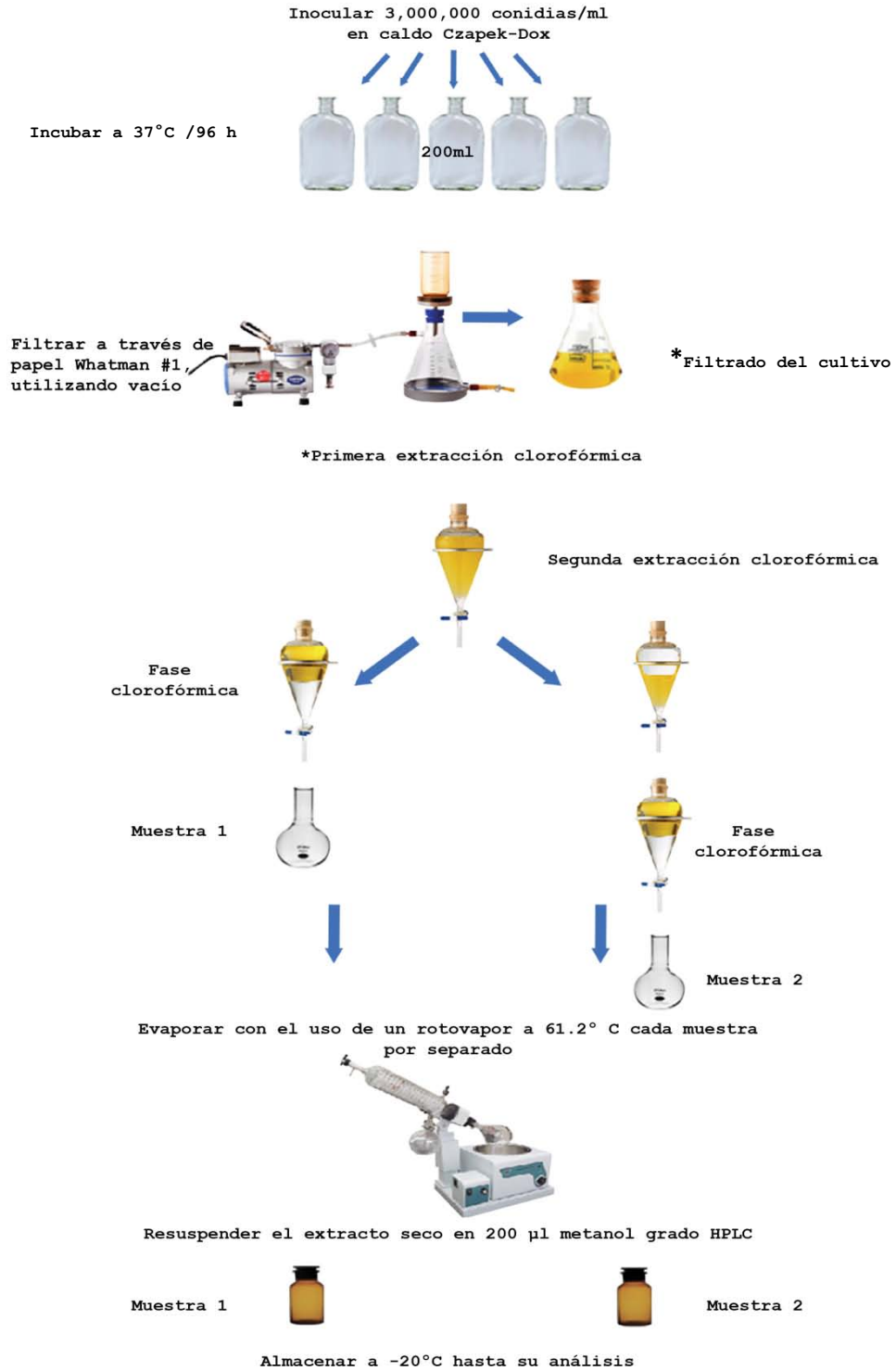


Figura 9. Metodología empleada para la producción y extracción de gliotoxina de *A. fumigatus*.

4.3 Extracción de gliotoxina de tejido pulmonar

El método empleado para la extracción de gliotoxina fue el propuesto por Richard y colaboradores¹⁰.

Utilizando una hoja de bisturí, se tomó una porción del tejido infectado (0.6 a 0.9 g), se depositó en un mortero al cual se adicionaron 5 ml de agua destilada. Posteriormente, la muestra se trituró con un pistilo para transferirla a un matraz Erlenmeyer® donde se agregaron 20 ml de ácido clorhídrico (J. T. Baker®) 6 N, se mezcló durante 30 minutos. A continuación, la mezcla se depositó en un embudo de separación donde se realizó una extracción con 200 ml de cloroformo grado analítico para disolver la gliotoxina si estuviera presente. Después, se recuperó la fase clorofórmica y se agregó sulfato de sodio (J. T. Baker®) para secuestrar el agua que se encontrara en la muestra. Por último, se filtró con papel Whatman® # 1. El líquido recuperado se evaporó hasta sequedad. Posteriormente, el extracto seco se resuspendió en 100 µl de metanol grado HPLC y se almacenó a 4°C hasta el momento de su análisis.

Además, el método se probó mediante la adición de 10 µl de la gliotoxina de referencia (50 ng/ml) a un pulmón de pollo sano para conocer si el compuesto era recuperado con eficiencia por medio del método de extracción descrito. Al mismo tiempo, se

aplicó este protocolo a otra porción de pulmón sano sin que llevase el estándar interno.

4.4 Análisis de gliotoxina

Para detectar el compuesto se llevó a cabo un ensayo de CCF. Primero, se estandarizó la prueba realizando una curva estándar con la gliotoxina de referencia. Se utilizó la gliotoxina de *Gliocladium fimbriatum* (Sigma Aldrich®-G9893) a una concentración de 50 ng/ml⁵². Posteriormente, como se observa en la figura 10 (pág. 52), en una cromatoplaca de gel de sílice respaldado en aluminio (Merck® 60-F254) se inyectaron diferentes volúmenes del estándar: 1, 2, 4, 6, 8 y 10 µl. Después, las muestras se analizaron por triplicado en una cromatoplaca donde se inyectó el estándar (10 µl) y 10 µl de cada muestra. El sistema de solventes de la fase móvil fue una mezcla de diclorometano:metanol (97:30, 5% v/v de ácido acético). Finalmente, la cromatoplaca se observó bajo luz UV a 254 nm para revelar el compuesto.

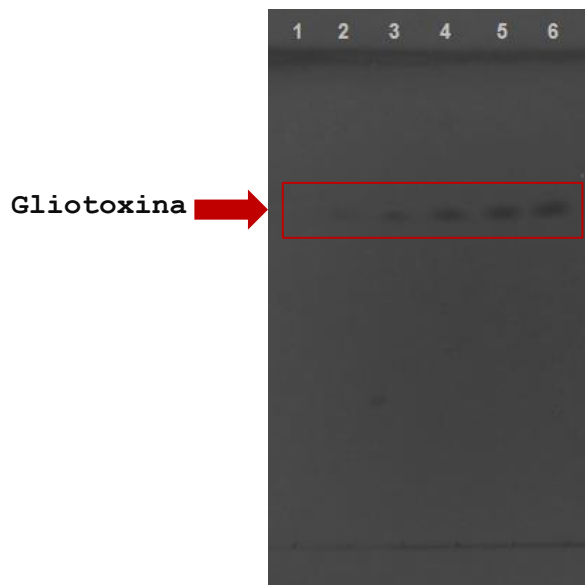


Figura 10. Cromatografía en Capa Fina. En la cromatoplaaca se muestra la curva estándar de gliotoxina a una concentración de 50ng/ml. Carril 1 = Gliotoxina de referencia 1 μ l, carril 2 = 2 μ l, Carril 3 = 4 μ l, carril 4 = 6 μ l, carril 5 = 8 μ l, carril 6= 10 μ l.

5 Determinación de aflatoxinas

La cepa A-20 de *A. fumigatus* se utilizó como control positivo para diferentes estudios en este trabajo. En el análisis químico por CCF realizado al extracto orgánico de esta cepa, además de detectar la presencia de gliotoxina, como se presenta en la figura 11, se visualizaron otros compuestos, entre estos se encontró uno que presentó fluorescencia azul cuando la cromatoplaaca se expuso a luz UV con una longitud de onda larga de 365 nm. Se sugirió entonces que este compuesto podía ser aflatoxina, por ello, se analizó el extracto orgánico en un fluorómetro (Vicam IV®) mediante el uso de columnas de inmunoafinidad Aflatest®.

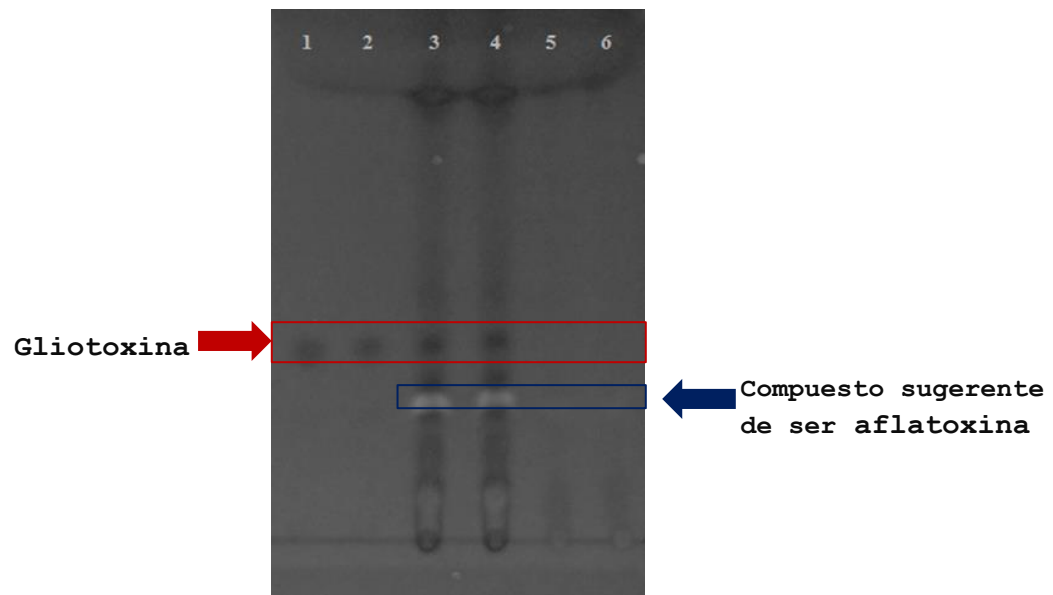


Figura 11. Cromatografía en Capa Fina. En la cromatoplaaca se muestra la presencia de la gliotoxina, así como de otro compuesto fluorescente que puede ser aflatoxina. En el carril 1 y 2 se observa el estándar de gliotoxina (50 ng/ml). Carril 3 y 4= extracción clorofórmica primera etapa, Carril 5 y 6= Extracción clorofórmica segunda etapa.

El procedimiento de columnas de inmunoafinidad Aflatest® utiliza una solución de metanol/agua para extraer las aflatoxinas de la muestra, esta solución se preparó a una proporción de 80:20. Posteriormente, el extracto seco se resuspendió en 200 µl de metanol grado HPLC y se adicionó 1 ml de la solución de extracción (80:20 metanol/agua). Después, la muestra se pasó por un filtro de microfibra de vidrio # 691, el volumen recuperado se inyectó en la columna de inmunoafinidad Aflatest®. A continuación, se eluyó con 1 ml de metanol grado HPLC para recuperar las aflatoxinas. Posteriormente, al eluato se agregó 1 ml de solución reveladora Aflatest® y se mezcló con

un agitador Vórtex®. Después, el fluorómetro se calibró de acuerdo con las instrucciones del fabricante, enseguida se realizó la lectura por duplicado para detectar y cuantificar las aflatoxinas totales presentes en la muestra.

Conforme a los resultados obtenidos, la cepa A-20 de *A. fumigatus* es productora de aflatoxinas, se detectaron a una concentración de 48 ppb. Debido a este hallazgo, se realizó la extracción de aflatoxinas a todos los aislados de *A. fumigatus* obtenidos en el presente estudio para conocer si estos también producían la toxina.

6 Resultados

6.1 Aislamiento e identificación micológica

Los aislados se obtuvieron principalmente de tráquea, pulmón y sacos aéreos, todos en cultivo puro. En la figura 12 se presenta un cultivo primario de 72 h en caldo Sabouraud dextrosa a partir de tejido pulmonar.



Figura 12. Primoaislamiento de 72 horas en caldo dextrosa Sabouraud a partir de tejido pulmonar de la muestra MP49.

Como se observa en la figura 13, la caracterización micológica de *A. fumigatus* se realizó mediante microcultivos seriados.



Figura 13. Microcultivos seriados en agar Czapek-Dox a partir del aislamiento MP49. A) Formación de hifas septadas después de 24 horas de crecimiento. B) Presencia de vesícula y fiálides después 48 horas. C) Conidióforo característico de *A. fumigatus* formado a las 72 horas.

Se logró aislar y caracterizar a 20 hongos presentes en el 27.39% del total de las 73 aves muestreadas con distinta procedencia. En el cuadro 4 (Págs.64-67) se muestran los aislamientos recuperados.

Como se muestra en la figura 14, del total de la población muestreada (n=73) Se obtuvieron 7 aislamientos de *A. fumigatus* que corresponde al 9.58% de los individuos afectados, seguido de *Aspergillus flavus* que fue recuperado de 4 aves representando el 5.47%, mientras que *Rhizopus oryzae* y *Geotrichum spp*, se aislaron en dos ocasiones ocupando el 2.73% de la población. Finalmente, *Candida albicans* y *Aspergillus terreus* se aislaron una vez, cada uno representa 1.36% de las aves afectadas.

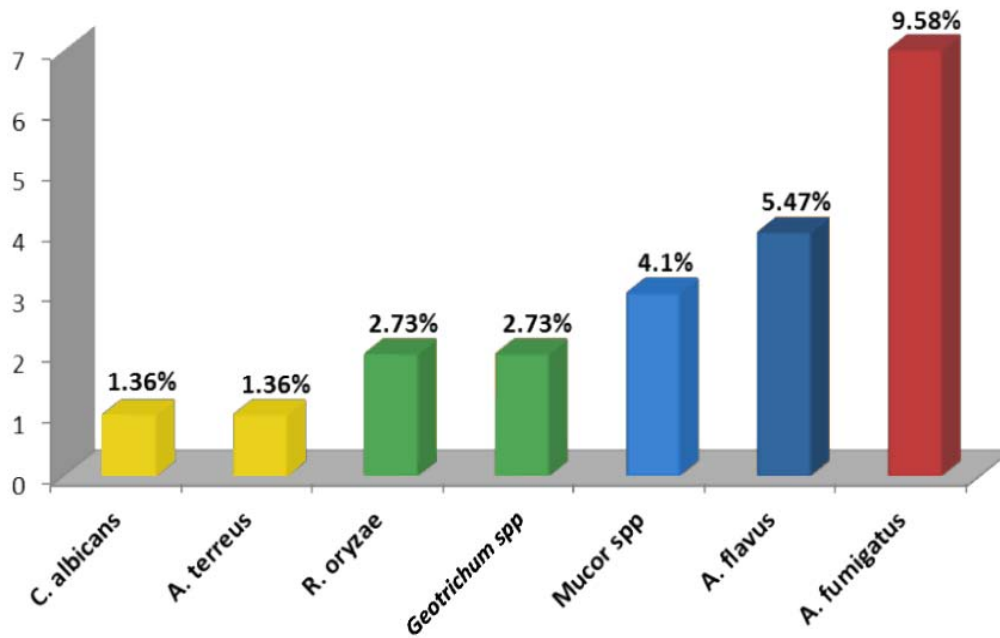


Figura 14. La gráfica presenta la distribución porcentual de los aislamientos micóticos recuperados a partir de aves con diferente procedencia (n=73).

Por otra parte, como se observa en la figura 15 se obtuvieron 10 aislamientos micóticos a partir de aves provenientes del Mercado "Sonora" (n=30), que representaron el 13.69% de la población total muestreada (n=73). *A. fumigatus* se recuperó en 7 ocasiones y ocupó el 23.33% de los individuos afectados (n=30). Mientras, *A. terreus*, *Mucor spp* y *Geotrichum spp* fueron aislados en una ocasión, representando cada uno el de 3.33%.

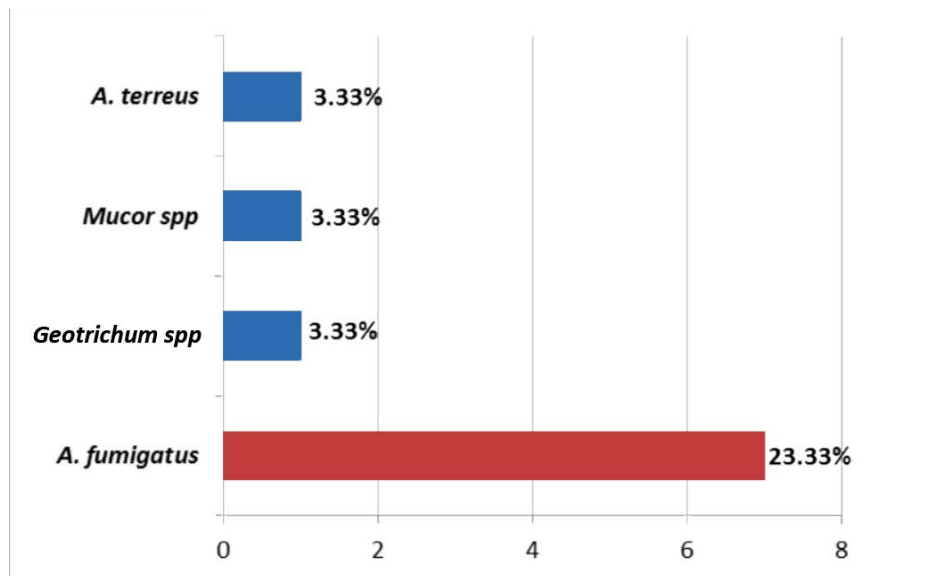


Figura 15. La gráfica muestra la distribución porcentual de los aislamientos micóticos recuperados a partir de aves provenientes del Mercado "Sonora" (n=30).

De acuerdo con la figura 16 de las aves muestreadas en la granja de Cuautla, Morelos, México (n=43), se obtuvieron 10 aislamientos que representaron el 13.69% de la población total muestreada (n=73). *A. flavus* se recuperó de 4 aves y corresponde al 9.3% de los individuos. Mientras que *Mucor spp* y *R. oryzae* representan el 4.6%. Finalmente, *C. albicans* y *Geotrichum spp* fueron recuperados en una ocasión y ocupan el 2.3% de la población.

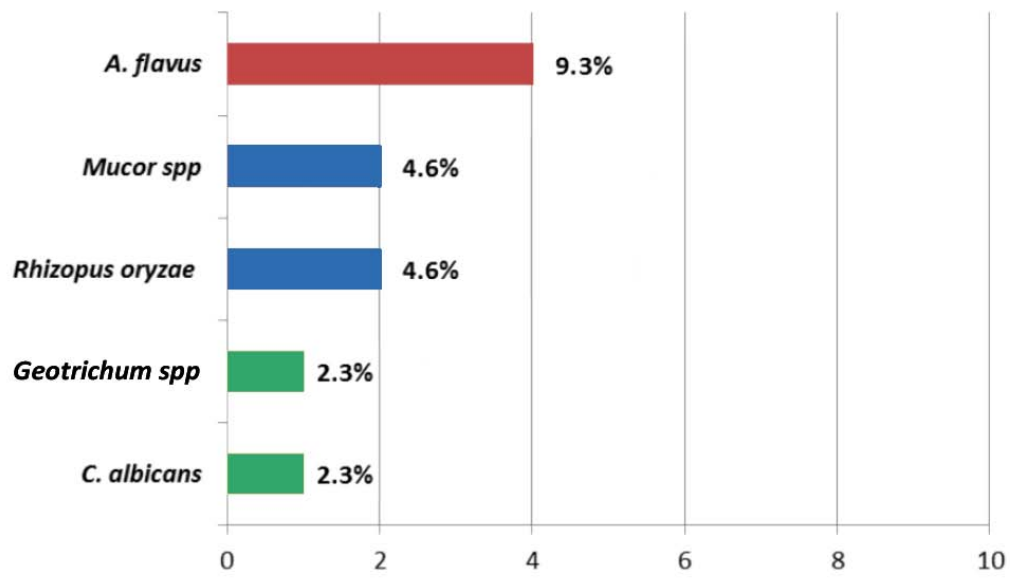


Figura 16. La gráfica muestra la distribución porcentual de los aislamientos micóticos recuperados a partir de aves provenientes una granja en Cuautla, Morelos, México (n=43).

Con respecto a la edad de las aves positivas al aislamiento de *A. fumigatus*, el 85.7% (6/7) fueron pollos de aproximadamente 1-8 días de edad, mientras el 14.2% (1/7) correspondió a un gallo del cual no se conoce este dato.

6.2.1 Hallazgos a la necropsia

Como se muestra en el cuadro 4 (págs. 84-87), las lesiones macroscópicas halladas en los individuos de los cuales se obtuvieron aislamientos micóticos, se localizaron principalmente en tráquea, pulmones y sacos aéreos.

Del ave identificada como MP1 se observó abundante exudado color blanco sobre el interior y exterior de la tráquea. Las

aves MP9 y MP49, presentaron traqueítis y neumonía hemorrágica generalizada severa. En la figura 17 se señalan las lesiones en pulmón del ave MP49.

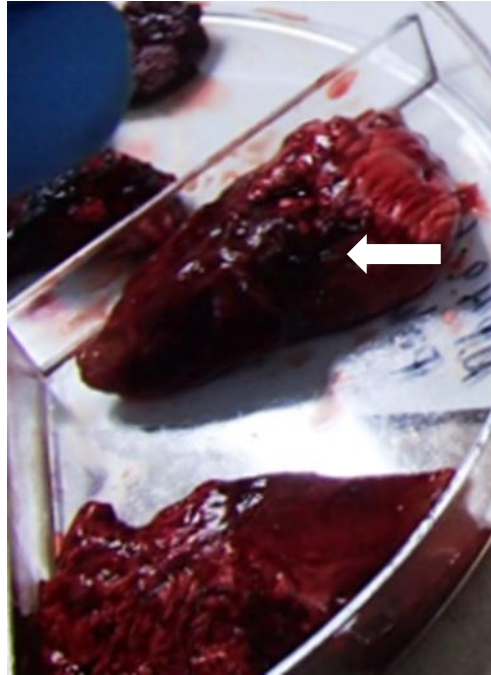


Figura 17. Pulmones del ave identificada como MP49. La flecha señala un fragmento de pulmón, donde se observa neumonía hemorrágica severa, generalizada, de curso agudo.

El pollo identificado como MP19, mostró traqueítis serosa, además de contener abundante líquido en el celoma, pericarditis severa así como neumonía granulomatosa de distribución difusa con granulomas de aproximadamente 1-2 mm de diámetro color amarillo. Los pollos MP22 y MP2 mostraron neumonía hemorrágica severa de curso agudo y neumonía con exudado purulento en cantidad moderada respectivamente. Ambos, presentaron pericarditis y acúmulo de abundante líquido seroso en el

celoma. Además, el Pollo MP27 presentó una placa gruesa de material color gris claro, de consistencia semiblanda, que no involucraba a las serosas y cubría en su totalidad al corazón e hígado. El ave MP52, también mostró neumonía con exudado purulento en cantidad abundante. Las aves MP28, MP31, MP36, MP42, y MP73, únicamente mostraron congestión pulmonar, mientras los pollos MP55 y MP62, presentaron neumonía hemorrágica severa y congestión. En las aves MP53, MP54, MP56 Y MP57, como se indica en las figuras 18, 19, 20, 21 se observaron piogranulomas de aproximadamente 1-2 mm de diámetro de distribución difusa sobre pulmones y sacos aéreos.

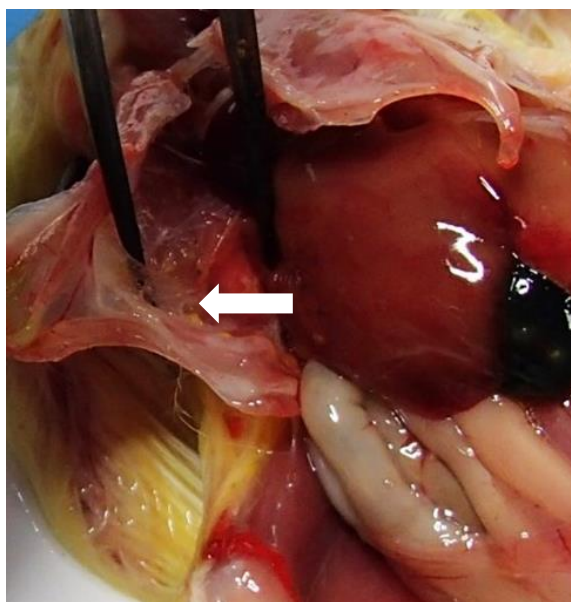


Figura 18. Saco aéreo torácico caudal derecho, del pollo identificado como MP53 de aproximadamente 3 días de edad. La flecha señala la presencia de piogranulomas multifocales de 1-2 mm de diámetro, de distribución difusa sobre la superficie del saco aéreo.

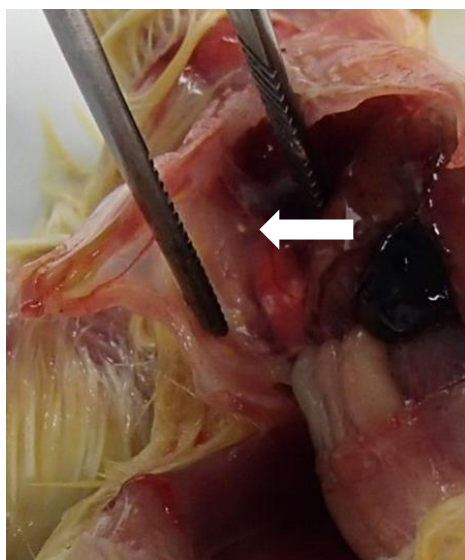


Figura 19. Saco aéreo torácico caudal derecho, en un pollo identificado como MP54 de aproximadamente 5 días de edad. La flecha señala la presencia de un piogranuloma de 1-2 mm de diámetro sobre el saco aéreo.

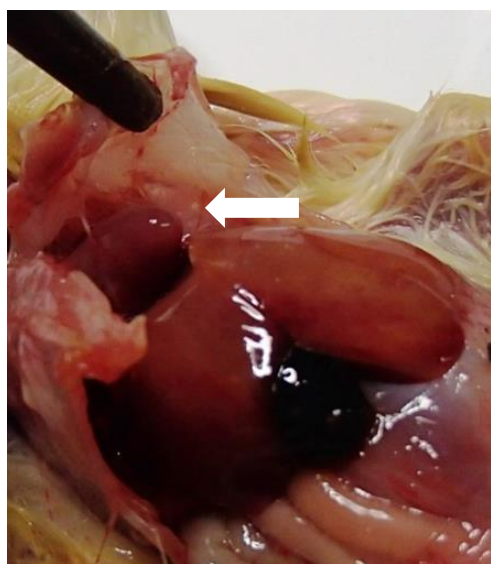


Figura 20. Saco aéreo torácico caudal izquierdo del pollo identificado como MP56 de aproximadamente 5 días de edad. La flecha señala la presencia de un piogranuloma sobre la superficie engrosada del saco aéreo.

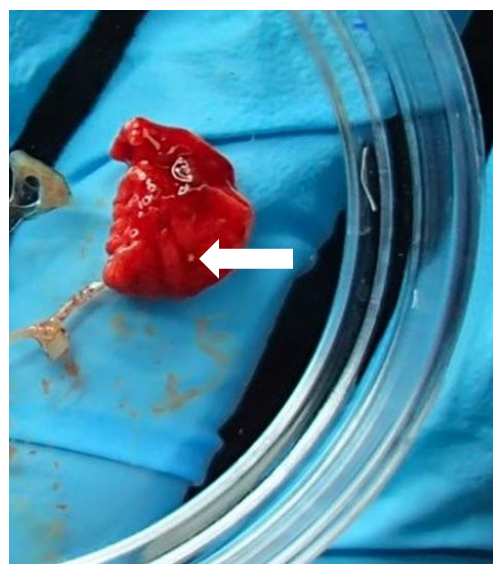


Figura 21. Pulmón izquierdo del pollo identificado como MP57, de aproximadamente 5 días de edad. La flecha señala la presencia de un piogranuloma sobre la superficie dorsal del órgano.

Las lesiones macroscópicas observadas con mayor frecuencia en las aves afectadas por *A. fumigatus*, fueron piogranulomas en sacos aéreos y pulmones, presentándose en un 57.1% (4/7) de los individuos, el 42.8% (3/7) mostraron neumonía hemorrágica severa de curso agudo y congestión pulmonar.

Identificación	Procedencia	Necropsia	Organos colectados	KOH al 10%	Aislamiento
MP1	Cuautla	Placa de exudado color blanco sobre la tráquea	Tráquea/Pulmón	Se observaron estructuras levaduriformes	<i>C. albicans</i>
MP5	Cuautla	Congestión en pulmones	Pulmón	Negativo	<i>A. flavus</i>
MP9	Cuautla	Traqueítis hemorrágica generalizada, moderada	Tráquea/Pulmón	Negativo	<i>R. oryzae</i>
MP19	Cuautla	Traqueítis serosa. Abundante líquido seroso dentro del celoma. Pericarditis severa y Neumonía granulomatosa severa de distribución difusa, granulomas de aproximadamente 1-2 mm de diámetro, color amarillo	Tráquea/pulmón	Negativo	<i>Geotrichum spp</i>
MP22	Cuautla	Neumonía hemorrágica moderada, pericarditis y abundante líquido en el celoma	Pulmón	Negativo	<i>A. flavus</i>

Cuadro 4. Hallazgos a la necropsia, examen directo de los tejidos colectados y aislamiento micótico de las aves muestreadas.

Identificación	Procedencia	Necropsia	Organos colectados	KOH al 10%	Aislamiento
MP27	Cuautla	Neumonía exudativa moderada. Pericarditis, Abundante líquido en el celoma. Corazón, e hígado presentaron una gruesa placa de color amarillo que se desprendía fácilmente.	Pulmón/Sacos aéreos caudales/corazón/hígado	Negativo	<i>Mucor spp</i>
MP28	Cuautla	Congestión en pulmones	Pulmón	Negativo	<i>A. flavus</i>
MP31	Cuautla	Congestión en pulmones	Pulmón	Negativo	<i>A. flavus</i>
MP36	Cuautla	Congestión en pulmones	Pulmón	Negativo	<i>R. oryzae</i>
MP42	Cuautla	Congestión en pulmones	Pulmón	Negativo	<i>Mucor spp</i>
MP49	Mercado "Sonora"	Traqueítis hemorrágica generalizada severa Y neumonía hemorrágica	Tráquea/Pulmón	Se observó la presencia de hifas	<i>A. fumigatus</i>
MP52	Mercado "Sonora"	Neumonía con exudado purulento	Pulmón	Negativo	<i>Mucor spp</i>

Cuadro 4. Hallazgos a la necropsia, examen directo de los tejidos colectados y aislamiento micótico de las aves muestreadas.

Identificación	Procedencia	Necropsia	Organos colectados	KOH al 10%	Aislamiento
MP53	Mercado "Sonora"	Piogranulomas de aproximadamente 1-2 mm de diámetro color amarillo de distribución difusa sobre los sacos aéreos caudales y el pulmón derecho	Pulmón	Se observó la presencia de hifas	<i>A. fumigatus</i>
MP54	Mercado "Sonora"	Piogranuloma localizado de aproximadamente 1-2 mm de diámetro de color amarillo sobre el saco aéreo torácico caudal derecho. Pulmones congestionados.	Pulmón	Se observó la presencia de hifas	<i>A. fumigatus</i>
MP55	Mercado "Sonora"	Neumonía hemorrágica y congestión pulmonar	Pulmón	Negativo	<i>A. fumigatus</i>

Cuadro 4. Hallazgos a la necropsia, examen directo de los tejidos colectados y aislamiento micótico de las aves muestreadas.

Identificación	Procedencia	Necropsia	Órganos colectados	KOH al 10%	Aislamiento
MP56	Mercado "Sonora"	Piogranuloma focal de aproximadamente 1-2 mm de diámetro de color amarillo sobre el saco aéreo torácico caudal izquierdo. Pulmones congestionados y presencia de piogranuloma de aproximadamente 1 mm de diámetro sobre el pulmón derecho	Pulmón	Se observó la presencia de hifas	<i>A. fumigatus</i>
MP57	Mercado "Sonora"	Hemorragia y congestión en pulmones. Presencia de piogranuloma localizado en la parte media del pulmón derecho	Pulmón	Tejido insuficiente	<i>A. fumigatus</i>
MP60	Mercado "Sonora"	Congestión en pulmones	Pulmón	Negativo	<i>A. terreus</i>
MP62	Mercado "Sonora"	Neumonía hemorrágica y congestión pulmonar	Pulmón	Tejido insuficiente	<i>A. fumigatus</i>
MP73	Mercado "Sonora"	Congestión en pulmones	Pulmón	Negativo	<i>Geotrichum spp</i>

Cuadro 4. Hallazgos a la necropsia, examen directo de los tejidos colectados y aislamiento micótico de las aves muestreadas.

6.2 Identificación molecular

6.2.1 Extracción de ADN

Se cuantificó el ADN obtenido por cada extracción realizada a los aislados de *A. fumigatus*. En el cuadro 5, se reportan los resultados.

Muestra	ADN (ng/μl)
MP49	240
Mp53	180
MP54	100
MP55	120
MP56	250
MP57	120
MP62	150
<i>A. fumigatus</i> (Cepa A-20)	170
<i>A. flavus</i>	180

Cuadro 5. Cuantificación de ADN de los aislados de *A. fumigatus*, control positivo (*A. fumigatus* cepa A-20) y negativo (*A. flavus*).

En la figura 22, se observa el ADN en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio.

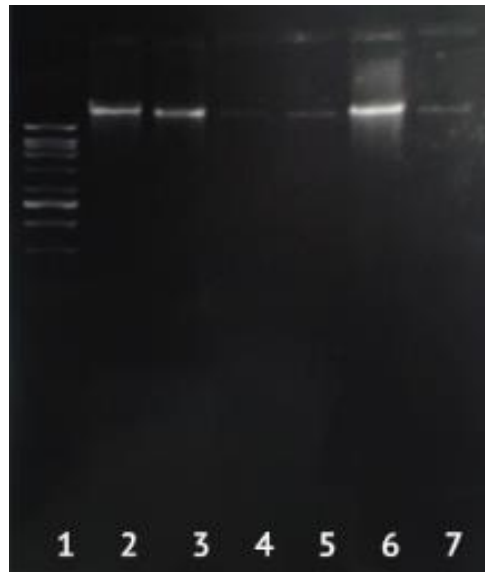


Figura 22. Resultados de la extracción de ADN en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Carril 1: Mpm 1 kb, Carril 2: MP49, carril 3 MP53, Carril 4: MP54, Carril 5: MP55, Carril 6: MP56, carril 7: MP57.

6.2.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para confirmar la identificación de *A. fumigatus* se realizó la técnica de PCR utilizando los iniciadores específicos Aful F y Aful R.

Con el ADN genómico obtenido a partir de los aislados identificados fenotípicamente como *A. fumigatus* y de la cepa control positivo (*A. fumigatus* A-20) se obtuvo un producto de aproximadamente 350 pares de bases (pb). No se detectó amplificación con el ADN de *A. flavus* utilizado como control negativo. Como se presenta en la figura 23, los productos de PCR se evaluaron en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

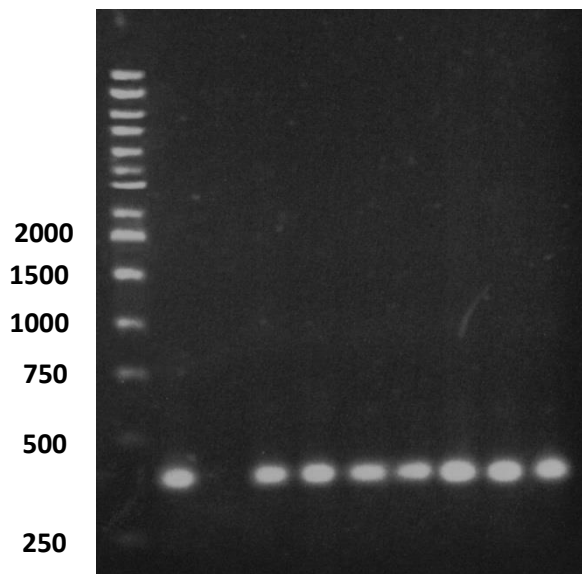


Figura 23. Resultados de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la identificación molecular de *A. fumigatus* utilizando los iniciadores Aful F-Aful R. Se muestra: Carril 1: Marcador de peso molecular 1kb, carril 2: Control positivo (*A. fumigatus* A-20), carril 3: Control negativo (*A. flavus*); carril 4= MP49, carril 5: MP53, carril 6: MP54, carril 7: MP55, carril 8: MP56, carril 9: MP57-ID, carril 10: MP62.

7 Histopatología

Los cortes histológicos de pulmón provenientes de aves positivas al aislamiento de *A. fumigatus* fueron teñidos con hematoxilina-eosina, al examinarlos se hallaron lesiones microscópicas relacionadas con micosis. La muestra de pulmón identificada como MP49, presentó neumonía hemorrágica generalizada, severa, de curso agudo con focos de necrosis. Posteriormente, con la tinción de Gomori-Grocott se evidenciaron numerosas hifas en el parénquima pulmonar. Como se observa en la figura 24, el pulmón del ave MP53, presentó

escasos macrófagos y heterófilos, con zonas de necrosis, así como numerosas hifas diseminándose por el tejido que resultaron positivas a la tinción de Gomori-Grocott.

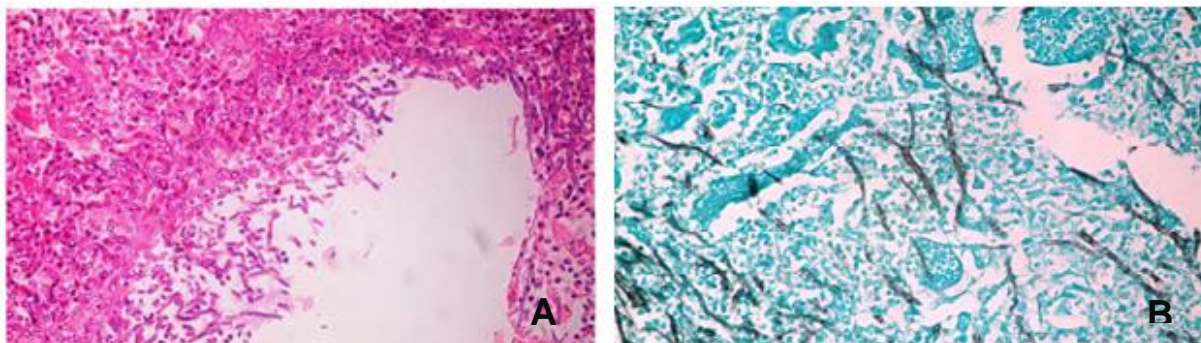


Figura 24. A) Corte transversal de pulmón del pollo identificado como MP53. Se observa la diseminación masiva de hifas septadas y ramificadas de forma dicotómica por el parénquima pulmonar, así como necrosis y algunos heterófilos. Tinción de Hematoxilina- eosina (40X). B) Se evidencia la presencia de abundantes hifas distribuidas radialmente en el pulmón. Tinción de Gomori-Grocott (40X).

La muestra MP54 presentó macrófagos, necrosis e hifas dicotómicas difundiendo a lo largo del tejido. Mientras las muestras de pulmón MP55, MP56, MP57 y MP62, teñidas con hematoxilina-eosina, presentaron neumonía hemorrágica generalizada, moderada, de curso agudo con la presencia de macrófagos y heterófilos en cantidad moderada. Sin embargo, con la tinción de Gomori-Grocott no se encontraron estructuras micóticas.

Se seleccionaron para la histopatología, las muestras MP27 y MP52 de pulmón, de las cuales se aisló *Mucor* spp y la muestra

MP28 de pulmón de la que se obtuvo el aislamiento de *A. flavus*. Las lesiones microscópicas halladas en las muestras MP27 y MP52 consistieron en neumonía exudativa con la presencia de macrófagos, fibrina y bacterias en cantidad abundante. La muestra MP28 sólo presentó congestión.

8 Evaluación de los métodos para la producción y extracción de la gliotoxina de *A. fumigatus*

Los métodos empleados para la producción y extracción de gliotoxina fueron evaluados mediante CCF obteniendo los siguientes resultados:

Ensayo 1: Extracción clorofórmica de gliotoxina

Como se presenta en la figura 25 la producción de gliotoxina fue más eficiente en condiciones estáticas.

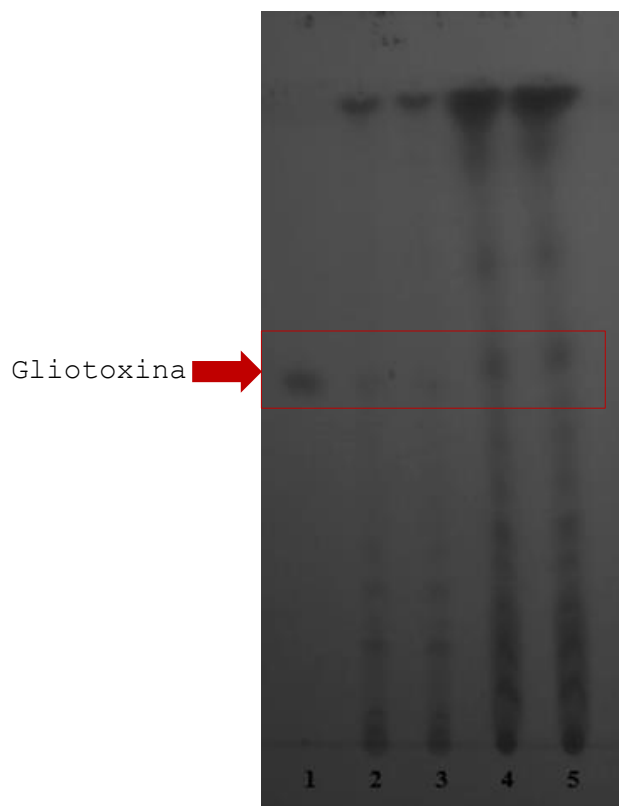


Figura 25. Cromatografía en Capa Fina. En la cromatoplaaca se observa la extracción clorofórmica de gliotoxina. Carril 1= Estándar de gliotoxina (50 ng/ml). Carril 2 y 3= Extracción clorofórmica de gliotoxina en una etapa bajo condiciones de agitación orbital. Carril 4 y 5= Extracción clorofórmica de gliotoxina en una etapa bajo condiciones estáticas. Proporción de cloroformo/cultivo filtrado 1:1. La cromatoplaaca se inyectó con 10 µl tanto el estándar como las muestras.

Ensayo 2: Extracción de gliotoxina con diferentes proporciones de cloroformo

Como se muestra en la figura 26, en todos los lotes estudiados se logró recuperar la gliotoxina, no obstante, su extracción fue más eficiente en los lotes B-1 y B-2 empleando una

proporción de cloroformo de 1:8 con respecto al filtrado del cultivo.

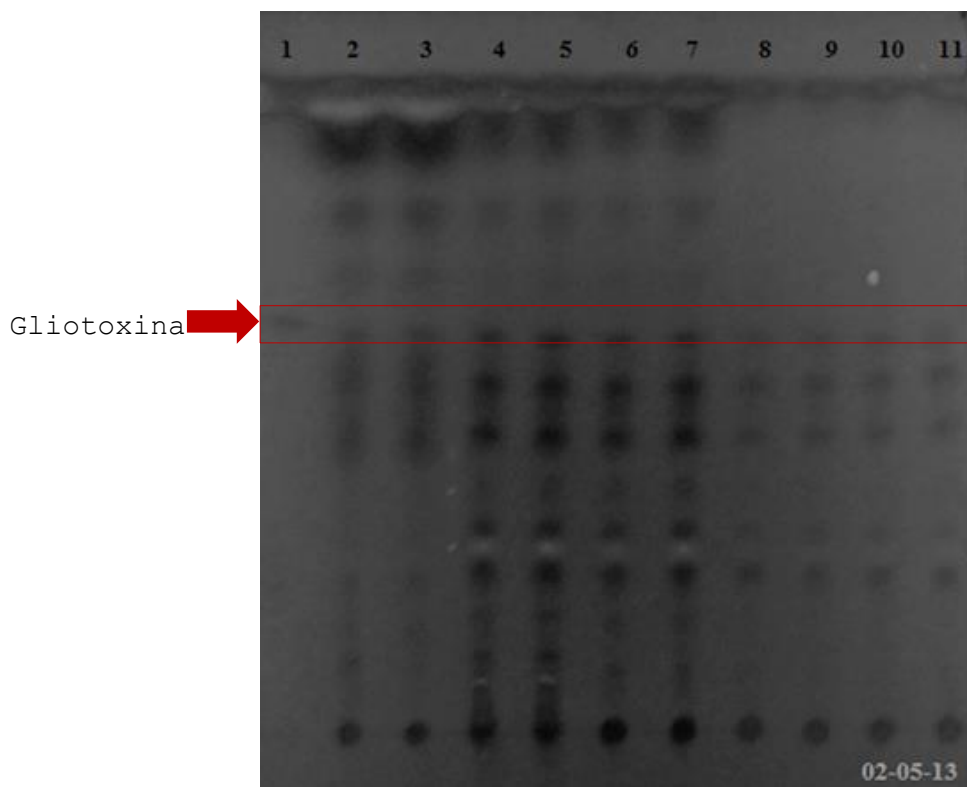


Figura 26. Cromatografía en Capa Fina. En la cromatoplaca se observa la extracción de gliotoxina a diferentes concentraciones de cloroformo. Carril 1= Estándar de gliotoxina (50 ng/ml), carriles 2 y 3= Lote A (100/200)* se visualiza una banda intensa a la altura del estándar. Carriles 4 y 5= Lote B-1 (50/400)*. Se observan bandas intensas a la altura del estándar, carriles 6 y 7 = Lote B-2 (50/400)*. Puede observarse las bandas a la altura del estándar, carriles 8 y 9 = Lote C-1 (50/200)*, Se observan bandas de menor intensidad a la altura del estándar. Carriles 10 y 11= Lote C-2 (50/200)*. Se observan bandas semejantes a las del Lote C-1, también a la altura del estándar. * Relación en ml de cloroformo/filtrado del cultivo. La cromatoplaca se inyectó con 10 μ l, tanto el estándar como las muestras.

Ensayo 3: Extracción clorofórmica de gliotoxina por etapas

Como se observa en la figura 27, realizando la extracción del compuesto en dos etapas de la forma antes descrita para el lote A, fue posible extraer la mayor cantidad de gliotoxina durante la primer etapa, aparentemente en la segunda etapa no se recuperó el compuesto.

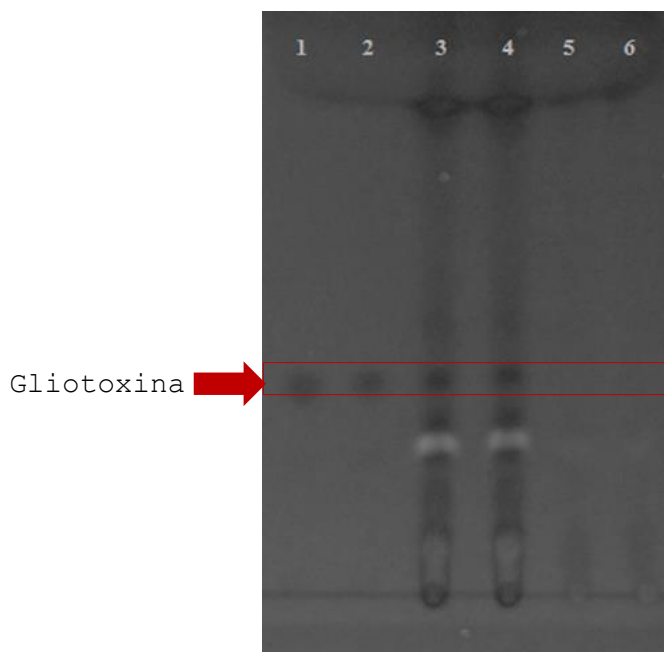


Figura 27. Cromatografía en Capa Fina. Cromatoplaca, carriles 1 y 2= Estándar de gliotoxina (50 ng/ml). Primera etapa de la extracción clorofórmica (200 ml/400ml)*, carriles 3 y 4 = Lote A-1, se observan compuestos a la altura de la gliotoxina de referencia. Segunda etapa de la extracción clorofórmica (50 ml/400ml)*, carriles 5 y 6 = Lote A-2, no se visualizan bandas que sugieran la presencia de gliotoxina.*Proporción cloroformo/filtrado del cultivo). La cromatoplaca se inyectó con 10 μ l, tanto el estándar como las muestras.

Como se presenta en la figura 28, llevando a cabo la extracción de gliotoxina en tres etapas, de la forma anteriormente citada para el lote B, en la primera y segunda etapa clorofórmica se recuperó la gliotoxina, mientras para la tercera etapa no se logró detectar el compuesto.

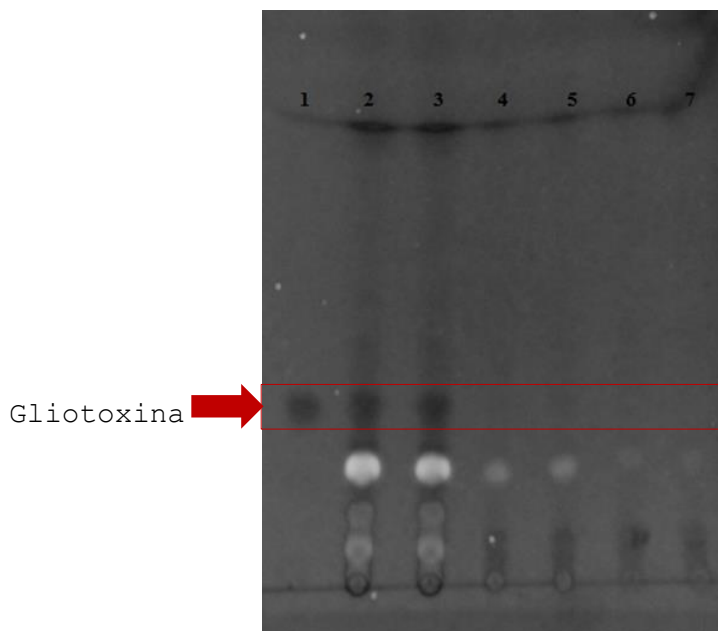


Figura 28 Cromatografía en Capa Fina. En la cromatoplaaca se observa en el carril 1= Estándar de gliotoxina (50ng/ml). Primera etapa de la extracción clorofórmica. Carriles 2 y 3 = Lote B-1, se observan bandas a la altura del estándar de gliotoxina. Segunda etapa de la extracción clorofórmica. Carriles 4 y 5= Lote B-2, se visualizan bandas muy tenues a la altura del estándar de gliotoxina. Tercera etapa de la extracción clorofórmica. Carriles 6 y 7= Lote B-3, no se visualizan bandas que sugieran la presencia de gliotoxina. Cada etapa se extrajo con 50 ml de cloroformo por cada 400 ml de filtrado del cultivo. La cromatoplaaca se inyectó con 10 μ l, tanto el estándar como las muestras.

Finalmente, de acuerdo con la figura 29 la extracción clorofórmica de gliotoxina en cuatro etapas como se describe para el lote C, se extrajo el compuesto en la primera y segunda etapa, mientras en la tercera etapa se detectó con dificultad, para la cuarta etapa no se detectó.

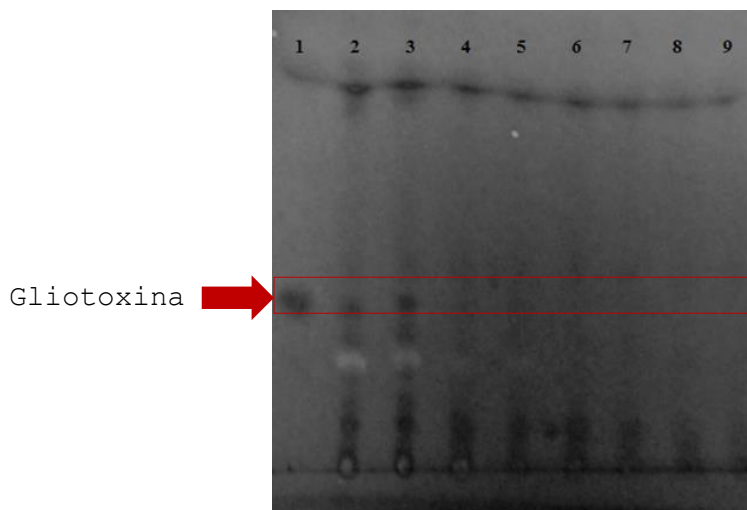


Figura 29. Cromatografía en Capa Fina. En la cromatoplaaca se observa en el carril 1= Estándar de gliotoxina (50ng/ml). Primera etapa de la extracción clorofórmica. Carriles 2 y 3 = Lote B-1, se observan bandas a la altura del estándar de gliotoxina. Segunda etapa de la extracción clorofórmica. Carriles 4 y 5= Lote B-2, se visualizan bandas muy tenues a la altura del estándar de gliotoxina. Tercera etapa de la extracción clorofórmica. Carriles 6 y 7= Lote B-3, no se visualizan bandas que sugieran la presencia de gliotoxina. Cada etapa se extrajo con 50 ml de cloroformo por cada 400 ml de filtrado del cultivo. La cromatoplaaca se inyectó con 10 μ l, tanto el estándar como las muestras.

9 Determinación de gliotoxina en aislados de *A. fumigatus*

Se evaluó la producción de gliotoxina por CCF en siete extractos orgánicos de *A. fumigatus* obtenidos de aves enfermas.

En el análisis por CCF de las muestras MP49, MP53, MP55, MP56, MP57 y MP62, como se presenta en la figura 30 se detectó un compuesto con el mismo tiempo de retención que el estándar de gliotoxina. Mientras, en la muestra MP54, no se detectó algún compuesto similar al estándar. Además, en todos los extractos orgánicos analizados se observó la presencia de otros compuestos no caracterizados con tiempos de retención menores al estándar de gliotoxina.

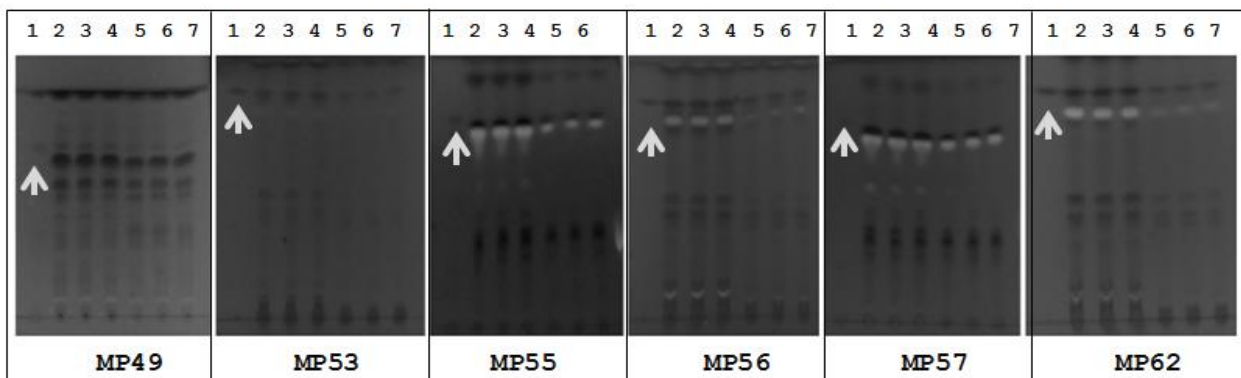


Figura 30. Cromatografía en Capa Fina. Se observan las cromatoplacas de los extractos orgánicos de *A. fumigatus*. Muestras MP49, MP53, MP55, MP56, MP57, MP62. Se observa la presencia de un compuesto con el mismo tiempo de retención que el estándar de gliotoxina. Carril 1: Estándar de gliotoxina (50 ng/ml), Carriles 2, 3 y 4: Primera extracción clorofórmica (triplicado), carriles 5, 6 y 7: Segunda extracción clorofórmica (triplicado). Las cromatoplacas se inyectaron con 10 μ l, tanto el estándar como las muestras.

10 Determinación de gliotoxina en tejido pulmonar

Se evaluó la producción de gliotoxina por CCF en siete extractos orgánicos de pulmones de aves positivas al aislamiento de *A. fumigatus*. Como se observa en la figura 31 la muestra MP49 presentó un compuesto similar al estándar de gliotoxina. Mientras, como se muestra en la figura 32 las muestras MP53, MP54 y MP57 presentaron compuestos diferentes a la gliotoxina de referencia. Por otra parte, en las muestras MP55, MP56 y MP62 no se detectó ningún compuesto. En el cuadro 6, se presenta la relación entre las lesiones microscópicas observadas en los pulmones de estas aves, con relación a la detección de gliotoxina en el tejido. Además, se logró confirmar que el método empleado para la extracción de gliotoxina de tejido pulmonar fue adecuado, pues al evaluar por CCF el tejido control positivo (estándar interno) se confirmó la presencia del compuesto. En cambio, en el tejido control negativo no se detectó compuesto alguno.

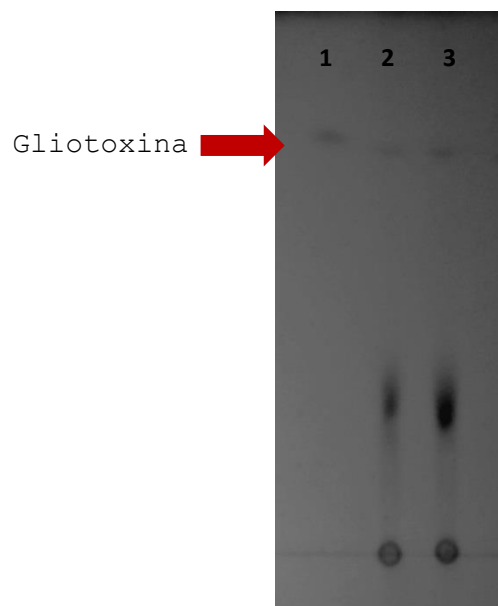


Figura 31. Cromatografía en Capa Fina. Cromatoplaaca del extracto orgánico de tejido pulmonar de la muestra MP49. Se observa un compuesto similar al estándar de gliotoxina. Carril 1: Estándar de gliotoxina (50 ng/ml), carriles 2 y 3: Extracto orgánico (duplicado). La cromatoplaaca se inyectó con 10 μ l, tanto el estándar como las muestras.

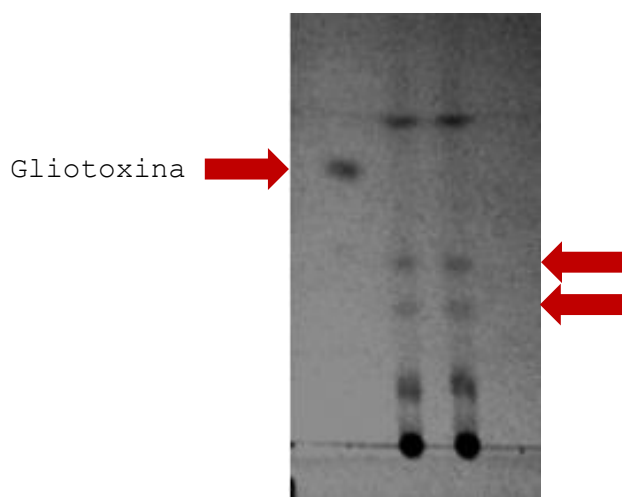


Figura 32. Cromatografía en Capa Fina. Cromatoplaaca del extracto orgánico de tejido pulmonar de la muestra MP53. Se observan compuestos con diferente tiempo de retención comparado al estándar. de La cromatoplaaca se inyectó con 10 μ l, tanto el estándar como las muestras gliotoxina. Carril 1: Estándar de gliotoxina (50 ng/ml), carriles 2 y 3: Extractos orgánicos (duplicado).

Identificación	Lesiones microscópicas	Determinación de gliotoxina en pulmón
MP49	Neumonía hemorrágica generalizada, severa, de curso agudo, necrosis focal. Presencia de hifas en el parénquima pulmonar	Compuesto sugerente de ser gliotoxina
MP53	Neumonía hemorrágica, generalizada, moderada, de curso agudo, con escasos macrófagos y heterófilos, zonas de necrosis, así como numerosas hifas en el tejido	Se detectaron otros compuestos
MP54	Macrófagos, necrosis e hifas dicotómicas difundiéndose a lo largo del parénquima pulmonar	Se detectaron otros compuestos
MP55	Neumonía hemorrágica generalizada, moderada, de curso agudo con la presencia de macrófagos y heterófilos en cantidad moderada	No se detectaron compuestos
MP56	neumonía hemorrágica generalizada, moderada, de curso agudo con la presencia de macrófagos y heterófilos en cantidad moderada	Se detectaron otros compuestos
MP57	neumonía hemorrágica generalizada, moderada, de curso agudo con la presencia de macrófagos y heterófilos en cantidad moderada	Se detectaron otros compuestos
MP62	neumonía hemorrágica generalizada, moderada, de curso agudo con la presencia de macrófagos y heterófilos en cantidad moderada	No se detectaron compuestos

Cuadro 6. Relación de lesiones microscópicas con respecto a la detección de gliotoxina en pulmón.

11 Determinación de aflatoxinas en los aislados de *A. fumigatus*

Se detectó y cuantificó la presencia de aflatoxinas totales en seis aislados de *A. fumigatus*, los resultados se presentan en el cuadro 7.

Muestra	Aflatoxinas (ppb)
MP49	48
MP53	32
MP54	0
MP55	10
MP56	58
MP62	10

Cuadro 7. Producción *in vitro* de aflatoxinas totales, a partir de los aislados de *A. fumigatus*.

12 Discusión

12.1 Aislamiento micótico

En nuestro país, debido a las prácticas que se realizan contra la influenza aviar, conforme al "Acuerdo en el que se da a conocer la campaña y las medidas zoonosanitarias que deberán aplicarse para el diagnóstico, prevención, control y erradicación de la Influenza Aviar Notificable, en las zonas del territorio de los Estados Unidos Mexicanos"⁵³, el acceso a las producciones avícolas es restringido. Sin embargo, pese a las limitaciones para realizar el muestreo de las aves en la granja, se logró el aislamiento de *A. fumigatus* a partir de aves enfermas, el hongo se recuperó en un porcentaje alto (9.58%), considerando el total de la población muestreada, así como de las aves provenientes del mercado "Sonora" (23.33%). De acuerdo con Tell⁸, las neumonías de origen micótico en aves, son producidas en un 95% por *A. fumigatus*, por lo que, los resultados obtenidos en este estudio coinciden con los mencionados en la literatura. Por otra parte, es importante señalar que los siete aislamientos de *A. fumigatus* se obtuvieron de aves procedentes del mercado "Sonora", como ya se mencionó, fueron aves de segunda calidad, de las que se hipotetiza, estuvieron expuestas a la contaminación micótica desde su eclosión en la incubadora, no obstante, las

condiciones inadecuadas de alojamiento a las que fueron sometidas, así como su estado nutricional e inmunológico, implicaron factores preponderantes para la presentación de la enfermedad. En cambio, de los pollos muestreados en la granja de Cuautla, Morelos, no se logró el aislamiento de *A. fumigatus*, debido a que mantienen buenas prácticas de producción pecuaria y adquieren pollos de buena calidad desde el proceso de incubación hasta que terminan el periodo de engorda en la granja, aplicando un programa eficiente de limpieza y desinfección en instalaciones y equipos.

La edad es un factor preponderante en el desarrollo de la aspergilosis aviar, con frecuencia afecta animales jóvenes o geriatras, como los individuos estudiados en este trabajo. Sin embargo, además de los factores intrínsecos presentes en el hospedador y en el ambiente donde se alojan, es trascendental considerar las capacidades metabólicas y determinantes genéticos que permiten el establecimiento de *A. fumigatus* para el desarrollo de la enfermedad. Con ello, es relevante mencionar de acuerdo con Rementería¹⁹ que las infecciones invasivas en humanos son ocasionadas en un 90% por *A. fumigatus*, mientras en las aves el porcentaje es mayor, lo peculiar es que en estudios de monitoreo ambiental, el hongo representa solo el 1% del total de conidias de *Aspergillus* spp en el aire, lo cual sugiere que esta especie posee mecanismos

eficientes para actuar como un patógeno potencial en comparación con otros microorganismos. Cabe destacar que la termotolerancia que presenta *A. fumigatus* y la temperatura corporal elevada de las aves, es clave para promover la germinación de los conidios una vez que se encuentran en los sacos aéreos, es decir, parte del éxito de la infección radica principalmente en esta característica, de la que otros hongos carecen incluyendo diversas especies de *Aspergillus*.

Referente a los aislados obtenidos de *A. flavus*, *A. terreus*, *R. oryzae*, *Mucor* spp, *Geotrichum* spp y *C. albicans*, se determinó que correspondieron a micobiota contaminante, pues en la histopatología de las muestras seleccionadas remitidas para su estudio, no se localizaron lesiones relacionadas con micosis.

12.2 Hallazgos a la necropsia

Las lesiones observadas con mayor frecuencia en los individuos afectados por *A. fumigatus*, fueron piogranulomas miliares, difusos, en pulmones y sacos aéreos, así como neumonía hemorrágica severa, descripción que coincide con la realizada por Cacciutollo y colaboradores⁴⁴, en la anatomopatología de aves con aspergilosis, de granja y silvestres, donde las lesiones de tipo superficial difuso se presentaron sólo en tejidos expuestos a flujo constante de aire como los pulmones y

sacos aéreos, además mencionan que los piogranulomas son característicos en la presentación aguda de la enfermedad. También, es fundamental considerar que la forma en que se presentan las lesiones, depende sustancialmente de la respuesta inmune del hospedador, pues los nódulos se observan cuando la aspergilosis es de curso crónico, e implican que el sistema inmune trata de contener la infección⁴⁰.

12.3 Identificación por métodos micológicos

En las últimas tres décadas, se han desarrollado técnicas para el diagnóstico de la aspergilosis, entre las que destacan las pruebas inmunológicas como la Inmunodoble difusión (IDD)⁵⁴, ELISA⁵⁵ con la detección de antígenos específicos como el galactomnano y moleculares mediante la extracción de ácidos nucleicos⁵⁰, si bien es cierto, estas técnicas facilitan el diagnóstico de la enfermedad al reducir el tiempo que por métodos micológicos tradicionales puede extenderse hasta por 10 días, el diagnóstico definitivo de la enfermedad de acuerdo con McClenny⁵³, es el aislamiento del agente etiológico y debe complementarse con otras pruebas diagnósticas como la histopatología y citología. Asimismo, la identificación fenotípica del hongo a partir de muestras de aislados clínicos es eficaz, pero requiere la capacitación adecuada del personal

de laboratorio para realizar el reconocimiento de las estructuras fungales características del género y especie.

12.4 Identificación molecular

En cuanto a la identificación molecular de *A. fumigatus*, mediante la técnica de PCR punto final empleando iniciadores específicos diseñados y probados por Camarillo⁵⁰ en estudios previos, se logró caracterizar eficientemente al microorganismo utilizando las regiones ITS del complejo de ADNr. De acuerdo con Jun y colaboradores⁵⁷, estas regiones han demostrado ser de utilidad en la identificación de hongos patógenos, debido a la variabilidad que presentan en sus secuencias, obteniendo resultados deseables en la diferenciación de especies. Como se ha mencionado, el diagnóstico definitivo es por excelencia el aislamiento del agente etiológico, sin embargo, disponer de herramientas moleculares como la anteriormente referida, sobre todo si puede emplearse *in situ*, reduciría notablemente el tiempo que conlleva esperar el desarrollo *in vitro* del hongo, lo cual suele retardar las acciones pertinentes para el control de la enfermedad. Pérez y Carrasco⁴⁵, han discutido sobre la confiabilidad del aislamiento, argumentando que *A. fumigatus* por ser un hongo cosmopolita, con facilidad contamina los tejidos, razón por la cual, para confirmar el diagnóstico, el aislamiento debe apoyarse de otros elementos como la

histopatología. Pemán⁵⁸ también coincide al respecto, en cuanto a la utilización de la PCR para el diagnóstico de esta micosis, pues la presencia de conidias en el ambiente y la elevada sensibilidad de la prueba pueden conducir a resultados falsos positivos. Por lo tanto, es preciso elegir tejido lesionado y colectarlo en condiciones asépticas, esto reduce la posibilidad de contaminación en la muestra.

Con respecto al rendimiento de ADN obtenido a partir de los aislados de *A. fumigatus*, se hipotetiza que haya sido diferente en cada aislamiento, debido a la capacidad de adaptación que presentaron para desarrollar en el medio de cultivo, pues el primocultivo se realizó en caldo dextrosa Sabourud (Bioxón® BD) que se encuentra adicionado con peptona de carne y peptona de caseína, estos ingredientes promueven mejor el desarrollo del hongo en comparación con un medio de cultivo sintético como el caldo Czapek-Dox (Oxoid®), el cual se utilizó para producir la biomasa fúngica con la que se realizó la extracción de ADN.

12.5 Histopatología

Con respecto a la evaluación microscópica de las lesiones producidas por *A. fumigatus*, las más frecuentes fueron la neumonía hemorrágica generalizada severa e inflamación con la presencia de heterófilos en cantidad moderada, así como numerosas hifas dicotómicas y necrosis. Retomando los estudios

realizados por Cacciuttolo y colaboradores⁴⁴, las lesiones microscópicas halladas en la aspergilosis aguda, se presentan de forma difusa, con la participación de células fagocíticas como macrófagos y heterófilos, en respuesta al desarrollo masivo de hifas, esta descripción coincide con las lesiones microscópicas halladas en los pollos enfermos de aspergilosis estudiados en este trabajo. A pesar de que la aspergilosis se asocia con inmunodepresión, según Beernaert y colaboradores⁴⁰, cuando las aves inhalan un número abrumador de conidias, se presenta la aspergilosis aguda, mientras que la forma crónica, está directamente relacionada con la inmunodepresión, aunque esta afirmación se contrapone con los resultados de Cacciuttolo y colaboradores⁴⁴, quienes mencionan que las lesiones encontradas en la aspergilosis crónica, corresponden a nódulos granulomatosos bien organizados, formados debido a que el sistema inmunológico aún tiene la capacidad de controlar la diseminación del hongo. No obstante, es fundamental señalar que la aspergilosis se puede presentar simultáneamente con otras patologías de entidad etiológica variable, esto también determina el tipo de lesiones que se desarrollen⁴⁰.

12.6 Producción y extracción de la gliotoxina de

A. fumigatus

Se han propuesto diferentes métodos para la producción de gliotoxina. Moreno¹⁴ evaluó tres tipos de medio de cultivo para la producción del compuesto, estos contenían una base común compuesta por dextrosa y minerales como cloruro de zinc, cloruro de magnesio, cloruro de calcio, entre otros, además de un ingrediente específico para cada uno, que podía ser extracto de harina de arroz, extracto de harina de maíz o extracto de malta, todos eran adicionados con Asparagina. Moreno¹⁴ reportó que el medio de cultivo más adecuado para la producción de gliotoxina era el que contenía extracto de malta, porque promovió con mayor eficiencia el desarrollo *in vitro* de *A. fumigatus*. Revees⁵² al igual que Moreno¹⁴, empleó caldo extracto de malta y aplicó agitación orbital. Davis¹¹ utilizó el medio de cultivo mínimo para *Aspergillus* que contiene glucosa, oligoelementos, hierro y está enriquecido con L-Glutamina, produjo la toxina en condiciones estáticas. En cambio, Cramer y colaboradores²⁸ usaron caldo Czapek-Dox (Oxoid®) para llevar a cabo la biosíntesis del metabolito, sometiendo el cultivo a agitación orbital. A pesar de que estos autores consiguieron producir la gliotoxina de manera adecuada, para el presente estudio fue necesario establecer las mejores

condiciones con el propósito de optimizar los recursos destinados para este trabajo. Debido a que los medios de cultivo enriquecidos con vitaminas y aminoácidos suelen ser costosos, se decidió emplear caldo Czapek-Dox (Oxoid®), que es sintético y está compuesto por nitrato de sodio, cloruro de potasio, sulfato ferroso, sulfato de potasio, glicerofosfato de magnesio y sucrosa como fuente de carbono. Además, es utilizado como medio de referencia para describir las colonias del género *Aspergillus* spp²⁰.

Con el objeto de conocer cuál era la forma más favorable para la biosíntesis de gliotoxina, como se ha descrito, se realizaron ensayos con cultivos en condiciones de agitación orbital y estática en botellas Roux, en los dos casos se produjo el compuesto, pero fue más eficiente con el cultivo estático, probablemente este resultado se debe a que existe mayor superficie en contacto con el aire, lo cual beneficia el desarrollo de *A. fumigatus*. En cambio, empleando agitación orbital a pesar de tener la finalidad de airear el cultivo, el rendimiento no fue mejor. En cuanto a la temperatura de incubación de 37°C, es reportada como adecuada para la producción de gliotoxina por Reves y colaboradores⁵², Gardier y colaboradores²⁴, Cramer y colaboradores²⁸ y Davis¹¹. Kosalec y colaboradores⁵⁹, publicaron que la biosíntesis del compuesto es mayor a 37°C que a 25°C.

Por otra parte, se modificó el método para la extracción clorofórmica de gliotoxina originalmente propuesto por Davis¹¹, en el que se utilizaba una proporción de cloroformo de 1:1 con respecto al filtrado del cultivo, en este trabajo se redujo a una proporción de 1:8, es decir el empleo del solvente se disminuyó en un 85.9%. Davis¹¹ menciona una extracción clorofórmica al filtrado, sin embargo, realizando solo una extracción el compuesto no se recupera de forma eficiente, por lo tanto fue necesario llevar a cabo ensayos utilizando diferentes concentraciones de cloroformo, efectuando la extracción del compuesto en diferentes etapas. Con base en los resultados obtenidos de estos ensayos se decidió realizar la extracción clorofórmica en dos etapas, con ello se recuperó mejor el compuesto.

12.7 Análisis de gliotoxina

El análisis de gliotoxina se realizó mediante CCF, esta técnica analítica es ampliamente utilizada para la detección preliminar de gliotoxina^{11, 59, 60}, se emplea con frecuencia por ser accesible, de bajo costo y rápida. Asimismo, la CCF es apropiada para determinar la efectividad de extracción de algún compuesto. De acuerdo con Richard y colaboradores⁶⁰ la gliotoxina se detecta cuando la concentración del compuesto se

encuentra por arriba de 5.33 µg/g empleando como sustrato arroz.

A pesar de que la CCF es un método aceptado para el análisis de micotoxinas, se han desarrollado otras técnicas analíticas que permiten caracterizar y cuantificar eficientemente este tipo de metabolitos con alta sensibilidad y especificidad, como la Cromatografía de Líquidos de Alta Presión-Espectrometría de Masas (CLAP-EMs), la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) que presenta menor sensibilidad en comparación con el análisis por CLAP-EMs, no obstante es altamente específica para la caracterización de moléculas.

De acuerdo con los resultados obtenidos por CCF, se detectó la toxina de forma preliminar en el 85.7% de los extractos orgánicos de *A. fumigatus*, mientras en el 14.2% no se visualizó algún compuesto similar a la gliotoxina de referencia, posiblemente porque el aislado no produjo la toxina o bien la concentración del compuesto fue insuficiente para ser detectada con el método analítico empleado, por lo tanto, es necesario analizar la muestra mediante CLAP para determinar si la gliotoxina está presente y de ser así cuantificarla. Además, en el 100% de los extractos orgánicos se presentaron otros compuestos no caracterizados con tiempo de retención diferente al estándar, por lo que, es conveniente realizar su

caracterización para determinar si alguno de ellos participa en la patogénesis de la aspergilosis aviar.

Los resultados obtenidos del análisis por CCF coinciden con los reportados por Moreno¹⁴, donde evaluó la producción de gliotoxina en diez cepas de *A. fumigatus* obtenidas de aislamientos clínicos de aves con aspergilosis, en siete cepas detectaron compuestos similares a gliotoxina y en dos de estas se confirmó la molécula. También, es relevante hacer notar que no todos los aislados de *A. fumigatus* producen gliotoxina, otros lo hacen en bajas concentraciones y algunas cepas son tardías en biosintetizar el metabolito.

Según Rementería¹⁹, solo el 11% de los aislados de *A. fumigatus* provenientes de ambiente son capaces de producir gliotoxina. Alshareef y Robson⁶¹, mencionan que entre el 0 y 33% de los aislados ambientales producen la toxina. Por otra parte, Ben-Ami y colaboradores⁶² refieren que el 93% de los aislamientos de origen clínico producen el compuesto. Con fundamento en los resultados publicados por estos autores, surge la hipótesis de gliotoxina como un factor de virulencia que se activa con el metabolismo secundario al inicio de la infección, durante la invasión hacia los tejidos del hospedador. Para conocer si el potencial patógeno de *A. fumigatus* se asocia con la capacidad de producir gliotoxina,

Kupfahl y colaboradores²⁷ compararon la toxina producida a partir de aislados provenientes de casos clínicos de pacientes con aspergilosis y *A. fumigatus* obtenidos de monitoreos ambientales, los resultados publicados acerca de estos trabajos indican que no existe una correlación positiva en cuanto a la producción del compuesto con relación al origen del aislamiento, pues en los dos casos el hongo biosintetizó la toxina. Sin embargo, es probable que gliotoxina también beneficie *A. fumigatus* en el ambiente para superar las condiciones de competencia por el sustrato contra otros microorganismos. No obstante, cuando se trata de aislados clínicos, además de evaluar la producción de gliotoxina *in vitro*, es conveniente demostrar que el metabolito se biosintetizó durante la infección, para lo cual se determinará su presencia a partir de los tejidos infectados.

Concerniente a la hipótesis planteada en este trabajo (pág.28), de acuerdo con el análisis realizado por CCF a los extractos orgánicos de pulmones positivos *A. fumigatus*, solo la muestra MP49 presentó un compuesto con el mismo tiempo de retención al estándar de gliotoxina. La relación en cuanto a la detección de gliotoxina en tejido pulmonar infectado, con las lesiones microscópicas, es fundamental, por lo que, es importante señalar que el ave MP49, presentó las lesiones más severas de neumonía hemorrágica y necrosis focal, comparado con el resto

de las aves con aspergilosis. Por otra parte, en tres muestras se detectó la presencia de compuestos con polaridad diferente a la gliotoxina de referencia, estos hallazgos son importantes debido a que los compuestos aparentemente se produjeron *in vivo*, y probablemente son metabolitos que intervienen en el proceso patogénico de la aspergilosis aviar. Otra hipótesis al respecto, es que se trate de conjugados formados por gliotoxina unida a proteínas que presentan grupos tiol libres y en consecuencia haya cambiado la conformación química de la molécula así como su polaridad, por lo tanto, en la cromatografía se comportó diferente al estándar. No obstante, en la histopatología de estos pulmones, también se presenta neumonía hemorrágica. Los resultados obtenidos de la extracción de gliotoxina en pulmón, coinciden con los reportados por Richard y Debey¹³, ellos relacionan la presencia de gliotoxina con la necrosis del tejido pulmonar en pavipollos, a los cuales se indujo la infección por *A. fumigatus* utilizando una cepa alta y baja productora de gliotoxina. En este trabajo detectaron la toxina en todas las aves inoculadas sin importar la cepa utilizada y determinaron la concentración del compuesto, que en algunos tejidos superó las 6 ppm. Aparentemente, la biosíntesis de gliotoxina no está relacionada con la dosis del inóculo empleada.

Para complementar los resultados expuestos en este trabajo, se requiere el análisis por CLAP-EMs de los extractos orgánicos de *A. fumigatus* y de los tejidos de los cuales se obtuvieron estos aislamientos, para caracterizar a la molécula de gliotoxina así como cuantificarla. También, es indispensable profundizar en el estudio molecular de la biosíntesis de gliotoxina para dilucidar cuáles son las condiciones que determinan la producción de la molécula, por qué existen aislados que no la producen u otros que lo hacen en cantidad baja o alta, así como esclarecer si existe sinergismo con otros metabolitos.

12.8 Determinación de aflatoxinas en los aislados de *A. fumigatus*.

Las aflatoxinas son metabolitos secundarios producidos por algunas especies del género *Aspergillus*, entre ellas *A. flavus* y *A. parasiticus*. Existen muchos tipos de aflatoxinas, pero solo las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 representan importancia toxigénica⁶⁰. Por otra parte, la biosíntesis de aflatoxinas así como de otras micotoxinas depende de factores relacionados con la humedad, temperatura, oxigenación y el tipo de sustrato al que el hongo se encuentra expuesto. Regularmente, las aflatoxinas están presentes en piensos contaminados, que al consumirlos se absorben con rapidez por el intestino delgado

dando lugar a trastornos metabólicos diversos principalmente en el hígado⁶³.

Especialmente las aves son susceptibles a los efectos que producen las aflatoxinas, sobre todo los guajolotes y gansos. Las aves afectadas por el consumo de estos metabolitos desarrollan degeneración grasa, proliferación de conductos biliares, cuagulopatías, así como la reducción de la síntesis de proteínas, disminuyendo los parámetros productivos hasta ocasionar la muerte⁶³.

En este trabajo se detectó la presencia de aflatoxinas totales por inmunoafinidad en seis aislados de *A. fumigatus*, este hallazgo es importante debido a que estas micotoxinas son relevantes para la seguridad alimentaria. No obstante, se requiere invariablemente la caracterización del compuesto para definir de qué tipo de aflatoxina se trata. Aunque los reportes respecto a la biosíntesis de aflatoxinas por *A. fumigatus* son pocos, Rementería¹⁹ menciona que esta especie es capaz de producir aflatoxina B1.

El estudio de la aspergilosis aviar es importante, conlleva a pérdidas económicas significativas para la industria avícola y es una afección de impacto ecológico en las aves silvestres en cautiverio. Sin embargo, suele ser subdiagnosticada, por lo que con esta investigación se contribuye a la comprensión de la

enfermedad a través del estudio bioquímico de los metabolitos producidos por *A. fumigatus* los cuales son importantes para el desarrollo de la misma.

13. Conclusiones

- Se obtuvieron siete aislados de *A. fumigatus* a partir de aves con aspergilosis aguda.
- La amplificación de la región ITS 1 Y 2 del ADNr, es útil en la identificación molecular de *A. fumigatus*.
- La producción de gliotoxina es adecuada en condiciones estáticas, así como la extracción clorofórmica es más eficiente realizando dos etapas.
- Seis aislados de *A. fumigatus* produjeron la gliotoxina *in vitro*, mientras, en uno no se detectó el metabolito.
- Se detectó de forma preliminar a la gliotoxina a partir del pulmón de un ave con aspergilosis. En los pulmones de tres aves, se detectaron compuestos diferentes al estándar de gliotoxina. En tres pulmones, no se detectaron compuestos. Es necesario trabajar con un número de muestra mayor para correlacionar estadísticamente estos hallazgos.
- La CCF es una técnica adecuada para la determinación preliminar de gliotoxina. Sin embargo, es necesario el empleo de técnicas analíticas más sensibles como la CLAP-EMs, para cuantificar y caracterizar a la molécula.
- Se detectaron y cuantificaron aflatoxinas totales en seis extractos orgánicos de *A. fumigatus*. Se recomienda su

análisis por CLAP-EMs para caracterizar a la toxina y conocer su impacto en la seguridad alimentaria.

- Se requiere profundizar los estudios bioquímicos y moleculares, para determinar las condiciones que inducen a la producción de gliotoxina durante la invasión tisular, así como realizar ensayos de virulencia.

14 Referencias

1. BANNET JW. An overview of the genus *Aspergillus*. In: Machida M, Gomi K, editors. *Aspergillus*. Great Britain: Caiser Academic Press, 2010:1.
2. BONIFAZ A. *Micología Médica Básica*. 3ª ed. México: McGraw-Hill. 2009:333.
3. BRAKHEGE A A, JAHN B, SCHMIDT A, editores. *Aspergillus fumigatus: Biology, Clinical Aspects and Molecular approaches to Pathogenicity*. Contrib Microbiol. Vol. 2, 3ª ed. Suiza: Karger, 1999:1-4.
4. RAPER KB, FENNELL DI. *The genus Aspergillus*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1965.
5. GIBBONS GJ, ROKAS A. The function and evolution of the *Aspergillus* genome. *Trends in Microbiology* 2013; 21:14-20.
6. GEISER DM, KLICH MA, FRISVAD JC, PETERSON SW, VARGA J, SAMSON RA. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Study Mycology*, 2007;59:1-10.
7. KLICH MA. Identification of clinically relevant aspergilli. *Medical Mycology* 2006; 44:127-131.
8. TELL LA. Aspergillosis in mammals and birds: Impact on Veterinary Medicine. *Medical Mycology* 2005; 43:571-573.
9. ARN'E P; THIERRY S, WANG D, DEVILLE M, LE LOC'H G, DESOUTTER, et al. *Aspergillus fumigatus* in Poultry. *International Journal Microbiology* 2011; 10:1-12.
10. RICHARD JL, DVORAK TJ, ROSS PF. Natural occurrence of gliotoxin in turkeys infected with *Aspergillus fumigatus* Fresenius. *Mycopathologia* 1996.134:167-170.
11. DAVIS C. The Glutathione STransferase GliG Mediates Gliotoxin Biosynthesis, not SelfProtection, in *Aspergillus fumigatus*: A Functional Genomic Investigation (Ph.D. Thesis.) Ireland: National University of Ireland, 2011.
12. WARING P, BEAVER J. Gliotoxin and related Epipolythiodioxopiperazines. Elsevier Science. 1996; 27:1311-1316.
13. RICHARD JL, DEBEY MC. Production of gliotoxin during the pathogenic state in turkey poults by *Aspergillus fumigatus* Fresenius. *Mycopathologia* 1995; 129:111-115.
14. MORENO RC. Desarrollo y Evaluación de un Método para la Producción de Gliotoxina (Tesis de Maestría). Edo de México, México: Universidad Nacional Autónoma de México, 1998.

15. VILLA GMR. Evaluación de un modelo animal (*Gallus gallus*) para la determinación de gliotoxina producida por *Aspergillus fumigatus* (Tesis de Maestría). Ciudad de México, México: Universidad Nacional Autónoma de México, 1998.
16. LARONE HD. Medically Important Fungi: A guide to Identification. 5ª ed. Washinton, DC: ASM Press.2011:281-283.
17. BAKER ES, BENNETT JW. An overview of the genus *Aspergillus* in: GOLDMAN HG, OSMANI AS, editors. The Aspergilli: Genomics, Medical Aspects, biotechnology, and Research Methods. Florida: Taylor Francis Grup. 2008:3-11.
18. ABARCA ML. Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. Revista Iberoamericana de Micología 2000; 17:79-84.
19. REMENTERIA A, LÓPEZ N, LUDWIG A, VIVANCO AB, BIKANDI J, PONTÓN J, GARIZAR J. Genes and molecules involved in *Aspergillus fumigatus* virulence. Revista Iberoamericana de Micología 2005;22:1-23.
20. GERMAIN G, SUMMERBELL R. Identifying Fungi. A Clinical Laboratory Handbook. 2ªed. Korea: Star Publishing Company in. 2011.
21. MOUYNA I, LATGÉ PJ. Cell Wall of *Aspergillus fumigatus*: Structure, Biosynthesis, and Role in Host-Fungus Interactions. In: CALDERONE AR, CIHLAR LR, editors. Fungal pathogenesis: Principles and Clinical Applications. Vol. 14 New York: Marcel Dekker 2002:515-532.
22. MACHIDA M; GOMI K. *Aspergillus* Molecular Biology and Genomics. Caister Academic Press. Japan: 2010:84.
23. SCHARF HD, HEINEKAMP T, REMME N, HORTSCHANSKY P, BRAKHAGE AA, HERTWEEK C. Biosynthesis and function of gliotoxin in *Aspergillus fumigatus*. Applied Microbiology Biotechnology 2012; 93:467-472.
24. GARDINER MD, HOWLETT JB. Bioinformatic and expression analysis of the putative gliotoxin biosynthetic gene cluster of *Aspergillus fumigatus*. FEMS Microbiology Letters 2005; 248: 241-248.
25. LEWIS ER, WIEDERHOLD PN, CHI J, HAN YX, KOMANDURI VK, KONTOYIANNIS PD, et al. Detection of Gliotoxin in Experimental and Human Aspergillosis. Infection Immunology 2005; 73:635-637.

26. BALIBAR CJ, WALSH CT. GliP, a multimodular nonribosomal peptide synthetase in *Aspergillus fumigatus*, makes the diketopiperazine scaffold of gliotoxin. *Biochemistry* 2006; 45: 15029-15038.
27. KUPFAHL C, MICHALKA A, LASS-FLORL C, FISCHER G, HAASE G, RUPPERT T, *et al.* Gliotoxin production by clinical and environmental *Aspergillus fumigatus* strains. *International Journal of Medical Microbiology* 2008; 298:319-327.
28. CRAMER AR, GAMCSIK PM, BROOKING MR, NAJVAR KL, KIRKPATRICK WR, PATTERSON FT; *et al.* Disruption of a Nonribosomal Peptide Synthetase in *Aspergillus fumigatus* Eliminates Gliotoxin Production. *Eukariotic Cell* 2006; 5:972-980.
29. BOK WJ, CHUNG D, BALAJEE SA, MARR KA, ANDES D, NIELSEN KF, FRISVAD JC, KIRBY KA, *et al.* *GliZ*, a transcriptional regulator of gliotoxina biosynthesis, contributes to *Aspergillus fumigatus* virulence. *Infection Immunology*. 2006;74:6761-6778.
30. SCHRETTL M, CARBERRY S, KAVANAGH K, HAAS H, JONES G, O'BRIEN J, *et al.* Self-Protection against Gliotoxin-A Component of the Gliotoxin Biosynthetic Cluster, *GliT*, Completely Protects *Aspergillus fumigatus* Against Exogenous Gliotoxin. *PLoS Pathogens* 2010; 6:1-14.
31. WATANABE A, KAMEI K, SEKINE T, WAKU M, NISHIMURA K, MIYAJI M, *et al.* Effect of Aeration on Gliotoxin by *Aspergillus fumigatus* in its culture filtrate. *Mycopathologia* 2004; 157:254-254.
32. MULLBACHER A. AND EICHNER RD. Immunosuppression in vitro by a metabolite of a human pathogenic fungus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1984; 81: 3835-3837.
33. MULLBACHER A, MORELAND AF, WARING P, SJAARDA A. EICHNER R. Prevention of graft versus host disease by treatment of bone marrow with gliotoxin in fully allogeneic chimeras and their cytotoxic T cell repertoire. *Infection and immunity* 1988; 46:120-125.
34. MULLBACHER A, WARING P, EICHNER RD. Identification of an agent of *Aspergillus fumigatus* displaying anti-phagocytic and immunomodulating activity *in vitro*. *General Microbiology* 1985; 131:1251-1258.
35. BEAVER J, WARING P. Lack of correlation between early intracellular cellular calcium ion rises and the onset of apoptosis in thymocytes. *Immunology and cell biology* 1994; 72:489-499.

36. GARDINER MD, WARING P, HOWLETT JB. The epipolythiodioxopiperazine (ETP) class of fungal toxins: distribution, mode of action, functions and biosynthesis. *Microbiology* 2005; 151:1021-1032.
37. CALNEK BW, BARNES J, BEARD CW, REID WM, YODER WH. *Enfermedades de las aves*. Ed, México D.F: El Manual Moderno, 1995: 399-410.
38. Ricute GSL. Bioseguridad en granjas avícolas. *Avicultura* 2006. Disponible en: URL: <http://www.engormix.com/MA-avicultura/sanidad/articulos/bioseguridad-granjas-avicolas-t868/165-p0.htm>
39. HEARD J. D. Avian respiratory anatomy and physiology. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*;6:172-179.
40. BEERNAERT L. A, PASMANS F, WAEYENBERGHE VAN L, F. HAESEBROUCK, MARTEL A. *Aspergillus* infections in bird: a review. *Avian pathology* 2010;39:5,325-331.
41. JORDAN WT, PATTISON M. *Enfermedades de las aves*. 4^a ed, México D.F: El Manual Moderno, 1998:241-243
42. TARRADAS C, ZAFRA R, PÉREZ RA, BORGE C, BUSTAMANTE R. Descripción de un caso de acsitis en pollo asociado a un brote de aspergilosis pulmonar. *Revista Electrónica de Veterinaria* 2007;2:(5):1-5. Disponible en: URL: <http://www.veterinaria.org/revistas/recvet/n050507.html>
43. HARRISON G, HARRISON L, RITCHIE B. *Avian Medicine: Principles and application*. Florida: Wingers publishing, 1994:1189-1190.
44. CACCIUTTOLO E, ROSSI S, NARDONI S, LEGROTTAGLIE R, MANI P. Anatomopathological aspects of avian aspergillosis. *Veterinary Research Communications* 2009; 33:521-527.
45. PÉREZ J, CARRASCO L. Diagnóstico histopatológico de micosis en patología veterinaria. *Revista Iberoamericana de Micología* 2000; 12:18-22.
46. JONES P. M, OROSZ E. S. The diagnosis of aspergillosis in birds. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*. 2000; 9:52-58.
47. VALLADARES JC. El monitoreo microbiológico de las plantas incubadoras. *Avicultura* 2010. Disponible en: URL:<http://www.engormix.com/MA-avicultura/genetica/articulos/monitoreo-microbiologico-plantas-incubadoras-t2908/103-p0.htm>
48. RIDELL RW. Survey of fungus diseases in Britain. *British Medical Bulletin* 1951; 7:197-201.

49. MENDOZA L. Manual de Procedimientos. Course of Molecular Mycology, Medical Technology Program. Michigan State University. 2002.
50. CAMARILLO TJA. Métodos de Identificación para Miosis Causadas por *Aspergillus fumigatus* en Animales (Tesis de Licenciatura). Ciudad de México, México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2008.
51. SEGUNDO ZC. Caracterización de hongos unicelulares aislados de leches normales y mastíticas, mediante pruebas bioquímicas y moleculares (Tesis de Doctorado). Ciudad de México, México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2008.
52. REEVES EP, MESSINA CG, DOYLE S, KAVANAGH K. Correlation between gliotoxin production and virulence of *Aspergillus fumigatus* in *Galleria mellonella*. Mycopathologia 2004; 158:73-79.
53. Acuerdo: Por el que se da a conocer la campaña y las medidas zoonosanitarias que deberán aplicarse para el diagnóstico, prevención, control y erradicación de la Influenza Aviar Notificable, en las zonas del territorio de los Estados Unidos Mexicanos en las que se encuentre presente esa enfermedad. Diario Oficial de la Federación (21-06-2011).
54. CERVANTES ORA. Studies on antigens of *Aspergillus*: Their use in veterinary mycology (Ph.D. Thesis). Scotland: University of Glasgow, 1983.
55. ROVIRA MT, BELLACASA JP. Detección de antígeno galactomanano de *Aspergillus* en el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos. Revista Iberoamericana de Micología 2003;20:111-115
56. MCCLENNY N. Laboratory detection and identification of *Aspergillus* species by microscopic observation and culture: the traditional approach. Medical Mycology 2005;43:125-128.
57. JUN Z, FANRONG K, RUOYU L, XIAOHONG W, ZHE W, DUANLI W. Identification of *Aspergillus fumigatus* and Related Species by Nested PCR Targeting Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer Regions. Journal of Clinical Microbiology 2001; 39(6):2261-2666.
58. PEMÁN J. Diagnóstico de la aspergilosis invasiva. Revista Iberoamericana de Micología 2000;17:90-92.
59. KOSALEC I, PEPELJNJAK S, JANDRLIC M, Influence of media and temperature on gliotoxin production in *Aspergillus fumigatus* strains. Arh Hig Rada Toksikol 2005; 56: 269-273.

60. RICHARD JL, LYON RL, FICHTNER RE, ROSS PF. Use of thin layer chromatography for detection and high performance liquid chromatography for quantitating gliotoxin from rice cultures of *Aspergillus fumigatus*. Mycopathologia 1989;107:145-151.
61. ALSHAREEF F, ROBSON G. Genetic and virulence variation in an environmental population of the opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus*. Microbiology 2014; 160:742-751.
62. BEN-AMI R, LAMARIS G, LEWIS R and KONTOYIANNIS D. Interstrain variability in the virulence of *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus terreus* in a Toll-deficient *Drosophila* fly model of invasive aspergillosis. Med Mycol 2010; 48:310-317.
63. RAUBER RH, DILKIN P, GIACOMINI LZ, ARAÚJO CA, MALLMANN CA. Performance of turkey poults fed different doses of aflatoxin in the diet. Poultry Science 2007;86:1620-1624.

Anexo I

Soluciones y reactivos

Agua destilada adicionada con Tween 80 al 1%

Tween 80	1 ml
Agua destilada	100 ml

Adicionar el Tween 80 al agua destilada y esterilizar en autoclave a 21°C/ 15 lb de presión, durante 15 minutos.

Amortiguador de lisis (solución stock)

Tris HCL 50 mM pH 7.2	4 ml
EDTA 50 mM	4 ml
Duodecil sulfato de sodio (SDS) al 3%	12 ml
2-Mercaptoetanol al 1%	400 µl
Agua destilada estéril	5.6 ml

▪ Tris HCL 50 mM

Tris HCL	7.88 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver el Tris HCL en el agua destilada y ajustar el pH a 7.2. Almacenar a 4°C hasta su uso.

▪ **EDTA 50 mM**

EDTA	18.61 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver el EDTA en el agua destilada y ajustar el pH a 8.0.

▪ **Dodecil sulfato de sodio al 3%**

Dodecil sulfato de sodio (SDS)	3 g
Agua destilada	100 ml

▪ **2- Mercaptoetanol al 1%**

2- Mercaptoetanol	1 ml
Agua destilada	100 ml

Acetato de Sodio 3 M

Acetato de sodio (NaOAc)	246.09 g
Agua destilada	3000 ml

Solución TE

▪ **Tris 10 mM**

TrisMa Base	1.2114 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver el TrisMa base en el agua destilada y ajustar el pH a 8.0.

▪ **EDTA 1 mM**

EDTA 3.7224 g

Solución TrisMa Base 10 mM 1000 ml

Disolver el EDTA en la solución de TrisMa Base.

Etanol al 70%

Etanol (grado biología molecular) 70 ml

Agua destilada 30 ml

Almacenar a -20°C

Hidróxido de potasio al 10%

Hidróxido de potasio (KOH) 10g

Agua destilada 100 ml

**Tinción de Lactofenol azul de algodón
(modificada)**

Solución A

- Fenol (cristales) 20 mg
- Ácido láctico 20 mg
- Glicerina 40 ml

Solución B

- Azul de algodón 10 mg
- Agua destilada 20 ml

Mezclar la solución A y B hasta que se homogenicen. Posteriormente, filtrar la mezcla con papel de poro fino. Almacenar en frasco ámbar protegido de la luz.

Ácido clorhídrico 6N

Ácido clorhídrico (HCL)	49.38 ml
Agua destilada	100 ml

En un matraz aforado depositar el HCL y llegar al volumen de aforo con el agua destilada.

Diclorometano: metanol

(97:30, 5% v/v de ácido acético)

Diclorometano	97 ml
Metanol	3 ml
Ácido acético	0.5 ml

Mezclar los solventes, añadir el ácido acético y homogenizar. Almacenar en un recipiente de vidrio ámbar protegido de la luz.