



**Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza**



Trabajo Fin de

Autor/es

Director/es

Facultad de Veterinaria



ÍNDICE

1 RESUMEN/ABSTRACT	1
2 INTRODUCCIÓN	2
2.1. Presentación/Generalidades	2
2.2. Aspergilosis en aves	3
2.3. Aspergilosis en reptiles	4
2.4. Patogenia	6
2.5. Cuadro clínico	8
2.6. Anatomía patológica	9
2.7. Diagnóstico	10
3 JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	14
4 MATERIAL Y MÉTODOS	16
4.1. Aproximación al tema de estudio	16
4.2. Casos de estudio	16
4.3. Métodos	16
5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
5.1. Historia clínica	21
5.2. Hallazgos anatomo-patológicos	21
5.3. Diagnóstico microbiológico	24
5.4. Diagnóstico molecular	26
6 CONCLUSIONES/CONCLUSIONS	29
7 VALORACIÓN PERSONAL	30
8 BIBLIOGRAFÍA	30
ANEXO I	33
ANEXO II	33

1 RESUMEN

INTRODUCCIÓN. La aspergilosis es la enfermedad micótica más frecuente en aves. En reptiles, sin embargo, no está suficientemente estudiada. Debido a las características patogénicas del agente, la prevalencia de enfermedad es más alta en individuos silvestres en cautividad. Puede presentar un curso agudo o crónico y se puede distribuir de manera localizada o sistémica. La especie que se aísla con más frecuencia es *A. fumigatus*. Mediante la combinación principalmente de anatomía patológica y microbiología se puede llegar a un diagnóstico definitivo de género, pero estas pruebas no son tan fiables para determinar la especie. La existencia de especies crípticas (idénticas morfológicamente) y de distintos morfotipos dentro de las especies hace necesaria la utilización de técnicas genéticas de diagnóstico, sobre todo teniendo en cuenta que la identificación de la especie implicada repercute en la epidemiología y en el tratamiento.

OBJETIVO. El objetivo principal de este trabajo fue el estudio clínico, anatomo-patológico, microbiológico y genético de casos sospechosos de aspergilosis remitidos desde el Centro de Recuperación de Especies Silvestres de La Alfranca (Zaragoza).

MATERIAL Y MÉTODOS. Se recogieron las muestras de cinco aves (un quebrantahuesos, un estornino negro, un buitre leonado, una espátula y un azor) y de una tortuga Jicotea. Se analizaron los datos de la historia clínica y necropsia, se analizó histopatológicamente cada muestra y en caso de que se confirmara la presencia de hongos se procedió a su cultivo. Se realizó la caracterización macro y microscópica y se genotiparon los aislados de las muestras mediante la amplificación y secuenciación de un fragmento del gen codificante para la β -tubulina.

RESULTADOS. En las cinco muestras de aves se detectó *A. fumigatus* y en la de la tortuga *A. tubingensis*. La técnica de identificación molecular resultó ser adecuada para genotipar los aislados de cada muestra.

ABSTRACT

INTRODUCTION. *Aspergillus* is the most frequent fungal agent of disease. However, it is not enough documented in reptiles. Due to its pathogenic characteristics animals kept in captivity display a higher prevalence. The clinical course can be acute or chronic, and the distribution pattern varies from located to systemic. The most frequently isolated species is *A. fumigatus*. A definitive diagnostic of the gender involved can be reached by the combination of anatomo-pathological and microbiological diagnostic

techniques. However, these methods are not always able to identify the species. The existence of cryptic species (identical morphology) and different morphotypes for a single species uncovers the need for using genetic diagnostic methods, taking into account that finding out the species involved has an effect in the epidemic data of a disease and its treatment.

OBJECTIVE. The principal objective of this study was to perform a clinical, anatomopathological, microbiological and genetic analysis of the samples referred from the Recovery Centre for Wild Animal of La Alfranca.

METHODOLOGY. To accomplish this objective, samples of five birds (bearded vulture, spotless starling, griffon vulture, common spoonbill and northern goshawk) were taken. Clinical and necropsy information was analysed and a histopathological analysis was performed for each sample. If the presence of fungal structures was confirmed the next step consisted in the cultivation of the fungus. Once the isolates were ready, an analysis of the macro and microscopic morphology was performed. Finally, the genetic identification of the isolates was performed by PCR amplification of a fragment of the β -tubulin gene and further sequencing.

RESULTS. *A. fumigatus* was detected in the avian samples and *A. tubingensis* in the tortoise sample. The genetic identification method proved to be an adequate technique of genotyping.

2 INTRODUCCIÓN

2.1. *Presentación/Generalidades*

Aspergilosis es el término asignado por Hinson y colaboradores en 1952 que agrupa las distintas formas de enfermedad causadas por un hongo del género *Aspergillus* en humanos y numerosas especies animales. Los pertenecientes a este género, encuadrado en el filo Ascomycota, son hongos filamentosos, hialinos y saprófitos que se distribuyen de manera ubicua por todo el mundo^{1,2}. El objetivo principal de este trabajo es realizar un estudio clínico, anatomopatológico, microbiológico y genético de infección por *Aspergillus* en especies exóticas a partir de las muestras recibidas con sospecha de esta enfermedad del Centro de Recuperación de Fauna Silvestre de La Alfranca (Zaragoza). Los casos recibidos son de aves y tortugas, por lo que se procede a introducir este género de hongo de manera general y también de manera más específica analizando la enfermedad en aves y en reptiles.

Se conocen alrededor de 900 especies de *Aspergillus*, todas ellas compuestas por hifas hialinas septadas² y con reproducción sexual y asexual³. Principalmente las estructuras que propician la

reproducción asexual (conidióforo, vesícula, fiálides y conidios) son las que permiten diferenciar microscópicamente las diferentes especies², como *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. nidulans* y *A. terreus*, que son las más frecuentes en aves⁴, aunque con un predominio casi total de *A. fumigatus* (95% de los casos⁵). En reptiles el estudio de la aspergilosis no se encuentra tan avanzado como en aves y no hay datos concluyentes sobre la frecuencia de las diferentes especies del hongo.

La aspergilosis no es contagiosa⁶ y no produce enfermedad en organismos inmunocompetentes² a no ser que la carga fúngica sea máxima⁴, lo que lo convierte en un patógeno oportunista. Las esporas son vehiculizadas por el aire, lo que explica la localización de las manifestaciones clínicas y lesiones que se desencadenan en la mayoría de los casos: el tracto respiratorio⁷.

La diferenciación entre especies de *Aspergillus* solía realizarse mediante métodos clásicos como el cultivo de los mismos y el posterior análisis de sus características morfológicas. Sin embargo, en los últimos años, y debido a la aparición de especies crípticas (especies no diferenciables morfológicamente), se han introducido y desarrollado técnicas moleculares para tipificar cada especie⁸.

2.2. *Aspergilosis en aves*

La aspergilosis en las aves adquiere una relevancia mayor que en otras especies de vertebrados. Dentro de los agentes infecciosos causantes de enfermedad en aves, los micóticos son los segundos más frecuentes, por detrás de los bacterianos, y a su vez, de entre los agentes micóticos, el más frecuente es el género *Aspergillus*⁹.

2.2.1 Factores internos que favorecen la aspergilosis en aves

Las aves tienen ciertas características que explican la mayor relevancia de esta enfermedad en comparación con otras especies de mamíferos: la estructura de su aparato respiratorio, constituido por sacos aéreos, que favorece el desarrollo fúngico, la falta de epiglotis y diafragma, la temperatura corporal normal de su organismo (38-45 °C) y sus peculiares características celulares (distribución limitada de columnas ciliadas pseudoestratificadas en el aparato respiratorio⁵, falta de macrófagos de superficie propios de los mamíferos caracterizados por la producción de mieloperoxidasa y mecanismos oxidativos para fagocitar conidios de *Aspergillus* spp. y dependencia por lo tanto de los heterófilos que usan proteínas catiónicas, hidrolasas y lisozimas incapaces de destruir hifas)^{5,10}. Sin embargo, según estudios más recientes, el hecho de que la falta de macrófagos de superficie sea determinante en la incapacidad o incompetencia del sistema inmune respiratorio aviar y por tanto responsable de la alta susceptibilidad de las aves no tiene suficiente base científica fundada⁶.

2.2.2 Factores externos que favorecen la aspergilosis en aves

Debido a las características patogénicas de *Aspergillus* existen diferencias en la prevalencia de la enfermedad entre los distintos grupos de aves. Al ser un patógeno oportunista, que desarrolla enfermedad en individuos inmunocomprometidos, estas diferentes prevalencias no responden tanto a un patrón por especie de ave, como a las condiciones en las que estas viven y la manera en que estas condiciones influyen en el estado inmunológico de cada grupo. De esta manera, las especies de aves silvestres en cautividad, como usualmente son las rapaces, son el grupo con mayor prevalencia de esta enfermedad. Vivir en cautividad, ya sea en zoos, centros de rehabilitación o propiedades privadas, provoca un estado de inmunosupresión en el animal que puede tener su origen tanto en el estrés derivado de la vida en cautividad, como en los posibles tratamientos farmacológicos que puedan recibir, las deficiencias de manejo que pueda haber, o las condiciones del ambiente en el que habitan. El hacinamiento, la higiene del lugar y la ventilación son factores que no solo pueden contribuir a desencadenar un estado de inmunosupresión en el individuo, sino también a elevar la carga fúngica y el número de esporas en el ambiente hasta niveles máximos, lo que podría hacer que individuos con un sistema inmunológico competente desarrollaran también la enfermedad^{4,11}.

2.3. Aspergilosis en reptiles

La aspergilosis en reptiles no adquiere la dimensión que alcanza en las aves, pero siguen siendo muchos los casos descritos y ocurren de manera regular. Sin embargo, la literatura publicada hasta el momento es algo incierta, haciendo que no sea posible dar datos concluyentes sobre la distribución, frecuencia y prevalencia de la enfermedad ni sobre las especies concretas de *Aspergillus* involucradas¹².

2.3.1 Hongos como agentes primarios o secundarios de enfermedad en reptiles

Aunque pueden actuar como agentes primarios de enfermedad, la mayoría de las veces lo hacen de manera secundaria, oportunista, cuando el sistema inmune está comprometido, ya sea por factores intrínsecos al animal, como una enfermedad concomitante, o extrínsecos, como unas condiciones ambientales desfavorables (sobre todo teniendo en cuenta que son animales ectotermos). El hecho de aparecer como agentes secundarios y de que el curso de este tipo de enfermedades sea progresivo y clínicamente silente, puede conducir a diagnósticos erróneos y/o a infradiagnosticar la infección. Esto resulta en un escaso consenso entre los trabajos publicados hasta el momento, y por tanto impide proporcionar datos uniformes y homogéneos sobre la distribución y prevalencia real de las enfermedades micóticas¹².

Dentro de las enfermedades micóticas, el género *Aspergillus* es de los que más comúnmente se aíslan¹³, sin ser el de mayor importancia como lo era en aves. Donde sí parecen coincidir todos los estudios publicados, aunque sean escasos, es en afirmar la existencia de una micobiota normal en los reptiles de la que forma parte *Aspergillus* en algunas especies (aún no se ha probado que sea en todos los reptiles). Un estudio realizado en 2003 encontró *Aspergillus* en el 69 % de las muestras tomadas de la piel de reptiles escamosos, lo que hay que tener en cuenta a la hora de diagnosticar una lesión con hifas¹².

A continuación, se expone una relación de casos en los que ha participado el hongo *Aspergillus*, resaltando los descritos en tortugas al principio de cada apartado. Teniendo en cuenta el planteamiento de que *Aspergillus* es parte de la flora normal de algunos tipos de reptiles, siempre está la duda de si en los casos descritos con aislamiento de este hongo participa de manera activa, ya sea de manera primaria o secundaria en la lesión, o es un mero contaminante ya que se encuentra de manera normal en el individuo. De hecho, en uno de los estudios que describe uno de los casos relatados a continuación, el cuarto del apartado de lesiones cutáneas, se aislaron miembros de los géneros *Aspergillus*, de piel y escamas aparentemente sanas y normales de un aligátor americano (*Alligator mississippiensis*)¹³.

2.3.2 Casos de aspergilosis en reptiles publicados en la literatura^{12,13}

Lesiones cutáneas

- Granulomas pata delantera tortuga almizclada (*Sternotherus odoratus*) acuática hembra.
- Queratitis tortuga de la Florida (*Gopherus polyphemus*) terrestre macho adulto, asociado a trauma y ceguera.
- Lesiones cutáneas y gingivales con aislamiento de *Aspergillus niger* en infección mixta de dermatitis necrotizante y neumonía en un estudio con cocodrilos marinos y australianos de agua dulce (*Crocodylus porosus* y *Crocodylus Johnstoni*).
- Aislamiento *Aspergillus* de dermatitis necrotizante mixta en un cocodrilo americano de 100 años (*Crocodylus acutus*) infectado con *Erysipelothrix indiosa*.
- Aislamiento *A. terreus* de lesiones edematosas y necróticas de dos iguanas San Esteban (*Sauromalus varius*).
- Aislamientos *Aspergillus* spp. en infecciones membrana lenticular y córnea en pitón reticulada (*Python reticulatus*) y boa arco iris colombiana (*Epicrates maurus*).

Aspergilosis profunda o sistémica

- Muerte por aspergilosis generalizada tortuga campanita (*Hydraspis hilarii*).

- Muerte tres tortugas Galápagos (*Geochelone nigra*) y una tortuga gigante de Aldabra (*Aldabrachelys gigantea*) con neumonía severa atribuidas respectivamente a *Aspergillus amstelodami* (ahora *hollandicus*) y a *Aspergillus* spp.
- Aislamiento *A. fumigatus* y *A. ustus* de lesiones neumónicas en un estudio de aligátor americanos (*Alligator mississippiensis*) cautivos de dos a seis semanas de edad.
- Aspergilosis pulmonar en dos anacondas verdes cautivas (*Eunectes murinus*).
- Muerte lagarto teyú colombiano (*Tupinambis nigropunctatus*) tras micosis generalizada causada por *Aspergillus* spp.
- Peritonitis con aislamiento *Aspergillus* spp. de una víbora bufadora (*Bitis arietans*).
- Lesiones nodulares por *Aspergillus* spp. en serpiente de agua del norte (*Nerodia sipedon*).
- Neumonía y dermatitis granulomatosa por *Aspergillus niger* en una serpiente cascabel diamantina del oeste (*Crotalus atrox*).
- Repetidos casos *Aspergillus* como agente primario causante de micosis sistémicas en serpientes.

En 2009 se publicó un estudio para evaluar la eficacia del itraconazol en infecciones por *Aspergillus* en reptiles que permite tener constancia de siete casos más de aspergilosis en reptiles. Fueron diagnosticados cuidadosamente mediante histopatología y cultivo y en cinco de los siete casos fue *A. fumigatus* la especie implicada, lo que puede servir como indicador de cuál es la especie más prevalente en reptiles cuando el diagnóstico y la documentación se hacen de manera correcta¹⁴.

2.4. Patogenia

Aspergillus es un hongo saprófito ubicuo y sus esporas se encuentran en la tierra, pastos, granos, semillas o cualquier sitio que le permita disponer de material orgánico para alimentarse. Además, son muy resistentes a las condiciones meteorológicas, aunque proliferan mejor en ambientes húmedos, con temperaturas cercanas a los 37°C, poca ventilación y mucha materia orgánica^{6,7}.

Las esporas son vehiculizadas por el aire e ingresan en el organismo del hospedador por las fosas nasales o directamente hasta la laringe por la boca⁶. Las esporas de *A. fumigatus* tienen un tamaño que les permite superar la primera barrera física de defensa y no quedar atrapadas en la cavidad nasal o la tráquea¹.

2.4.1 Aves

El tamaño de espora puede explicar el hecho de que el 95 % de los casos de aspergilosis en aves sean a causa de *A. fumigatus*⁵. Tras su ingreso en el organismo, el primer sitio de infección suelen ser los sacos aéreos, ya que el aire inhalado llega a los sacos aéreos torácicos y abdominales posteriores para pasar a continuación a contactar con el epitelio superficial del pulmón. Una vez allí, las esporas son rodeadas por células fagocíticas. Si la infección vence a los mecanismos innatos de defensa y sobrepasa las capacidades inmunológicas del hospedador, ya sea porque la carga fúngica es muy alta o porque el sistema inmune no es del todo competente, se establece la enfermedad. Es, por lo tanto, una enfermedad que principalmente afecta al sistema respiratorio, con la posibilidad de diseminarse y convertirse en sistémica pudiendo afectar a otros órganos. El mecanismo de diseminación al resto del cuerpo se desarrolla por extensión directa o vía hematógena, ya que las hifas tienen la capacidad de ser tejido-invasivas y angio-invasivas. Las células defensivas como los macrófagos también están implicadas en la diseminación de las mismas^{6,15}.

Una parte importante de la patogenicidad de *Aspergillus* se debe a la producción de micotoxinas, potentes metabolitos capaces de suprimir o minimizar el sistema inmune el hospedador. Este género de hongo puede producir aflatoxinas, ocratoxina A y gliotoxina¹.

Recientes estudios *in vivo* e *in vitro* sugieren que el galactosaminogalactano (GAG) es el principal mediador de la virulencia de *A. fumigatus* y que resulta determinante en la adherencia a los componentes del hospedador, pero las estrategias anti-GAG son un campo aún sin explorar¹.

2.4.2 Reptiles

En reptiles, las micosis pueden presentarse de forma superficial (cutáneas), profunda (sistémicas) afectando a uno o más órganos, o mixta, cuando a partir de la presentación superficial se extiende. La aspergilosis profunda afecta principalmente al aparato respiratorio inferior, con posibilidad de diseminarse a otras vísceras. Al igual que en las aves, el estado inmunológico del hospedador es fundamental para el desarrollo de la enfermedad, no estableciéndose en animales inmunocompetentes a no ser que la carga fúngica sea máxima. En estos animales las condiciones del medio en el que habitan marcan en gran medida el estado de su sistema inmune y, por tanto, el desarrollo o no de la enfermedad, sobre todo teniendo en cuenta que son ectotermos¹².

2.5. Cuadro clínico

2.5.1 Aves

Afecta principalmente al sistema respiratorio, sobre todo al inferior (pulmones y sacos aéreos), pero puede diseminarse a otros órganos como el hígado, tracto digestivo, bazo, corazón, riñones, encéfalo, piel, huesos, ojos y bolsa de Fabricio. Por lo tanto, es una enfermedad que puede presentarse de manera localizada o generalizada (diseminada o sistémica). Además, se puede manifestar de forma aguda o crónica^{1,15}.

Forma aguda

Suele presentarse en animales jóvenes expuestos a una alta concentración de esporas (situación normalmente desencadenada por una higiene deficiente) y conlleva una alta tasa de mortalidad y morbilidad¹. Su curso es muy rápido, normalmente menos de una semana, pudiendo morir el animal incluso en 2 días, pero estos son casos anecdóticos de rapaces aparentemente sanas que murieron en ese plazo tras estar expuestas al hongo⁴. Los síntomas que desencadena son algo inespecíficos, principalmente propios del aparato respiratorio: anorexia, letargia, fiebre, plumas estropeadas, signos respiratorios (como disnea, taquipnea, catarro, ruido respiratorio durante la espiración, indicativo de vías bajas o estridor inspiratorio propio de vías altas), poliuria/polidipsia, pérdida de peso, disquinesia y muerte súbita^{1,16}. Este tipo de curso de enfermedad se centra principalmente en el aparato respiratorio, sobre todo en pulmón, por eso la mayoría de los síntomas están relacionados con ese aparato, y tiene un patrón de distribución más localizado al ser tan rápido el proceso⁴.

Forma crónica

Se asocia con un estado de inmunosupresión del hospedador. Suele afectar a ejemplares de mayor edad y tiene una tasa de mortalidad y morbilidad menores. Los síntomas tampoco son específicos, entre los que destacan la pérdida de peso, reducción de la actividad e intolerancia al ejercicio con disnea¹. Varían mucho dependiendo de la localización y distribución de la enfermedad, y por lo tanto de los órganos afectados, ya que la forma crónica suele extenderse más a otros tejidos (aspergilosis generalizada) que la aguda^{1,4}, al ser consecuencia de un estado de debilidad inmunológica del animal y al tener un curso más progresivo y lento.

2.5.2 Reptiles

En reptiles, los signos clínicos de la aspergilosis también son muy inespecíficos y variados, ya que dependen de los órganos afectados y la distribución de esta enfermedad en reptiles es muy heterogénea. Tiene dos variantes: la superficial o cutánea y la profunda o sistémica, que afecta

principalmente al respiratorio inferior, pero con posibilidad de extenderse a hígado, bazo y otras vísceras¹².

2.6. *Anatomía patológica*

2.6.1 *Aves*

Necropsia

Existen dos formas o patrones de lesión: una granulomatosa o nodular, que se desarrolla generalmente en parénquima no aéreo que engloba las hifas en el interior, y una necrótica no encapsulada infiltrativa localizada generalmente en órganos aéreos, principalmente en pulmón y sacos aéreos¹⁵ que frecuentemente invade los vasos sanguíneos⁶. También es posible que converjan las dos formas y se manifiesten a la vez en el mismo lugar o tejido, lo que es denominado por algunos autores como forma mixta⁶.

En la forma necrótica no encapsulada se observan zonas de necrosis, recubiertas o no por placas amarillento-blanquecinas desde caseosas a gelatinosas y nodulares o confluentes, en ocasiones recubiertas de moho, de color variable dependiendo de la especie de *Aspergillus*, en pulmón, sacos aéreos, y/o tráquea¹¹ y raramente en la cavidad nasal y en los sacos aéreos de los huesos¹⁶.

La forma granulomatosa, que recuerda a los granulomas tuberculosos, podría decirse que es una presentación más crónica, al haber formado granuloma alrededor de las hifas del hongo. Los elementos de su estructura van cambiando en función de la cronicidad.

Histopatología

Las diferencias histopatológicas que hay entre diferentes presentaciones de la enfermedad son debidas a la evolución de la misma principalmente. En la forma necrótica, más aguda, se observan focos necróticos con presencia de un elevado número de hifas y signos de inflamación. A medida que se cronifica se comienza a vislumbrar una estructura granulomatosa. Esta se corresponde con necrosis central con detritus e hifas rodeada de capas, más o menos concéntricas, de macrófagos en ocasiones con aspecto epitelioide, células multinucleadas, linfocitos más externamente, y en ocasiones fibrosis. Esta estructura clásica puede variar en sus componentes predominando alguno de ellos^{11,15}.

2.6.2 *Reptiles*

En reptiles las lesiones varían dependiendo de la forma de enfermedad que sea, cutánea/superficial o sistémica o profunda. Las lesiones cutáneas, según los casos registrados, suelen ser necróticas o edematosas (en piel, tejido gingival, córnea, etc.) o con formación de granulomas de superficie^{12,13}.

Cuando es aspergilosis profunda la típica lesión observada es la neumonía granulomatosa o nodular con placas de moho en superficie de tráquea, o membranas celómicas, con diseminación a otros órganos normalmente en forma de granulomas que recuerdan a los de la tuberculosis¹².

2.7. *Diagnóstico*

2.7.1 Aves

A pesar de que es una enfermedad importante y bien descrita en la actualidad el diagnóstico antemortem sigue siendo difícil o no definitivo, lo que obliga a depender de una combinación de técnicas diagnósticas para alcanzarlo de manera fiable¹¹.

2.7.1. A Clínico

Todo diagnóstico empieza por la anamnesis, incluyendo historial clínico y análisis de las condiciones en las que se encuentra el animal y del ambiente. En los casos de curso agudo los síntomas se desarrollan en un corto periodo de tiempo y son más reconocibles desde un enfoque sintomatológico y clínico del diagnóstico que los casos de aspergilosis crónica en los que el diagnóstico está más enfocado a analizar los factores predisponentes, que es cuando la anamnesis adquiere una importancia vital¹¹.

En estos casos el análisis de los factores predisponentes de enfermedad se sustenta sobre tres pilares fundamentales: el estado sanitario del animal (intrínseco) con especial atención al sistema inmune, la predisposición racial y de edad de la enfermedad, y el ambiente en el que vive el individuo, atendiendo a las condiciones del medio y a su concentración fúngica. Se amplía la información de estos tres puntos a continuación por orden en el que están escritos en la anterior frase:

- Deficiencias nutricionales, tratamientos sanitarios, infecciones o cualquier enfermedad no infecciosa, intoxicaciones, manejo inadecuado, estrés y condiciones ambientales desfavorables pueden inducir una depresión del sistema inmune^{6,11}.
- No se han podido confirmar diferencias de susceptibilidad entre especies, la prevalencia de aspergilosis responde más a cualquier variable que pueda afectar al estado del sistema inmunológico. Los individuos jóvenes son más susceptibles¹¹.
- Muy estrechamente relacionado con el primero de los pilares, al influir las malas condiciones del medio directamente sobre el estado inmunológico del animal. Temperatura inadecuada, deficiente ventilación, excesiva humedad o sequedad, mala higiene. Hay que analizar la concentración fúngica del ambiente, al poder desencadenar enfermedad si está en una concentración muy alta sin necesidad de estar el sistema inmune del animal debilitado^{11,17}.

Una vez realizada la anamnesis, se pasa a analizar los signos clínicos. Sobre todo, hay que prestar atención a los signos respiratorios. Se empieza por calcular la frecuencia respiratoria, ya que puede denotar disnea. A continuación, una exploración exhaustiva de las estructuras respiratorias, con ayuda de un estetoscopio para las estructuras inaccesibles. Los sonidos estridores inspiratorios denotan que el problema está situado en vías altas, y si el sonido espiratorio es audible el problema se encuadra en vías bajas (pulmón, sacos aéreos). Si la aspergilosis trasciende del aparato respiratorio y se extiende a otras zonas, los signos clínicos dependerán de lo que esté afectado, y habrá que realizar una exploración completa conforme al aparato afectado¹¹. En cualquier caso, al ser los signos de aspergilosis tan inespecíficos, el examen clínico carece de relevancia diagnóstica pero sí que es útil para acotar la zona afectada y ver cómo de grave es el cuadro¹¹.

2.7.1. B Anatomopatológico

Ya que el diagnóstico *ante-mortem* de esta enfermedad es difícil, debido a lo inespecíficos que son los síntomas, el diagnóstico *post-mortem* se presenta a veces como la única vía diagnóstica. Sobre todo, en los casos en los que el órgano afectado es inaccesible y, por lo tanto, es imposible recoger muestras para cultivo o histología¹¹. Hay que realizar una necropsia sistemática y ordenada, teniendo en cuenta las anteriores fases diagnósticas que nos pueden guiar a la hora de buscar la zona afectada y tomar muestras. Los hallazgos de la necropsia se han descrito anteriormente en el apartado de anatomía patológica.

La histología es clave para el diagnóstico, ya que el cultivo y posterior observación macroscópica necesitan analizarse junto con la reacción histológica que se ha desencadenado, dado que ninguna de las técnicas por separado puede asegurar el diagnóstico¹¹. Las características histológicas han sido analizadas anteriormente en el apartado anatomía patológica. Como complemento a la histología se sitúa la citología. Para la recogida de muestras de cara a la citología no es tan necesario actuar asépticamente como para el cultivo, con recoger los fluidos después de enjuagar los órganos afectados es suficiente. Se pueden observar tanto células inflamatorias como hifas¹¹.

Siempre se ha de tener presente a la hora de enfocar el diagnóstico diferencial, tanto en aves como en reptiles, destacar que desde un punto de vista anatomopatológico macroscópico las lesiones granulomatosas son similares en varias enfermedades como granulomas bacterianos (por ejemplo, los causados por *E. coli*) y tuberculosis^{12,18}. En aves se conoce una gran variedad de posibles agentes causantes de granulomas hepáticos, que pueden ser tanto virales como bacterianos, fúngicos o parasitarios¹⁸.

De especial importancia es la confusión en reptiles con la tuberculosis, de hecho, el caso de la tortuga utilizada en este estudio venía principalmente con esa sospecha. Desencadena un patrón anatomopatológico granulomatoso con lesiones nodulares blanco-grisáceas en subcutáneo y en distintos órganos. Histopatológicamente las lesiones revelan la típica inflamación granulomatosa con células gigantes multinucleadas¹⁹. El uso de tinciones diferenciales es de gran utilidad en su diferenciación, con Z-N para micobacterias y PAS o Grocott para hongos¹⁸.

2.7.1. C Microbiológico

El cultivo del organismo sí es necesario y definitivo para el diagnóstico de aspergilosis combinado con el examen histológico, aunque no siempre sirve. El análisis de las características macroscópicas y microscópicas del aislamiento permite identificar si se trata de *Aspergillus*, y más concretamente la especie, aunque esta no con suficiente fiabilidad⁸. La identificación macroscópica atiende al aspecto, color anverso y reverso, diámetro y textura de las colonias, mientras que la microscópica centra el análisis en las cabezas conidiales, conidios, conidióforos, vesículas, fiálides, métrulas, células de Hülle, cleistotecios y esclerotes²⁰. En la identificación microscópica de *Aspergillus* se observan las siguientes características: hifas hialinas, septadas, rectas con ambos lados paralelos y con terminaciones redondeadas, grosor de pocas micras dependiendo de la especie (*A. fumigatus* presenta las más pequeñas de 2 a 3 µm) y ramificaciones dicotómicas en ángulo de 45 grados. La morfología de los conidióforos varía con la especie^{1,2,11}.

La recogida de muestras es crucial de cara al cultivo del hongo, siendo muy importante evitar la contaminación, aunque luego el medio de cultivo sea un medio específico selectivo agar Sabouraud con cloranfenicol¹¹.

2.7.1. D Molecular

En los últimos años, se han desarrollado, y se siguen perfeccionando, las técnicas diagnósticas de identificación molecular en respuesta a la creciente necesidad de una identificación precisa de la especie de *Aspergillus*. Con el cultivo y su consecuente análisis macroscópico se puede caracterizar la especie, o al menos eso se pensaba hasta que se introdujo el concepto de las especies crípticas, que son aquellas no diferenciables macroscópicamente. Así pues, el enfoque diagnóstico de la identificación macroscópica parece quedarse corto e incompleto, y en cualquier caso no es fiable al 100%^{8,21}. La importancia de tipificar de manera precisa las especies de *Aspergillus* no solo radica en ampliar y perfeccionar el campo de la filogenética, también permite tener un conocimiento epidemiológico que puede resultar clave a la hora de enfocar clínicamente la enfermedad que desencadena, pudiendo relacionar la presencia y concentración de diferentes especies de *Aspergillus* en el medioambiente con

las causantes de enfermedad en los individuos estudiados. De la misma manera, puede resultar determinante a la hora de instaurar un tratamiento, ya que las diferentes especies tienen diferentes mecanismos de respuesta a los antifúngicos, y siempre teniendo presente el aumento de resistencias que se está detectando en los últimos tiempos^{22,23}.

Existen muchas técnicas de identificación y tipificación molecular, todas ellas con distintas características, y que se han venido utilizando en las últimas décadas⁸ según lo que fuera más adecuado para cada caso. Para su elección hay que tener en cuenta su poder discriminatorio y la eficacia de las mismas, su reproducibilidad y las posibilidades que tenga el laboratorio en el que se realizara el análisis²⁴. Muchas técnicas se basan en la secuenciación parcial o completa de diferentes genes diana o marcadores moleculares como las regiones ITS y proteínas codificantes como la calmodulina y la beta-tubulina⁸. De hecho, se ha llegado a considerar la región ITS como el código de barras universal de los hongos²⁵. Sin embargo, las regiones ITS no siempre son fiables para la diferenciación de especies filogenéticamente próximas^{3,26} y recientes estudios afirman que la región de la beta-tubulina resulta más discriminante y fiable para la identificación molecular de *Aspergillus*^{22,26}. Diversos grupos de investigación han implementado otras técnicas como PCR, RFLP, SSCP Y RAPD-PCR debido a que los secuenciadores de ADN todavía no están muy extendidos en los laboratorios clínicos⁸. En los últimos años se ha planteado el uso de la técnica de RFLP-PCR en el gen de la beta-tubulina y el análisis de microsatélites del ADN como métodos alternativos a la secuenciación⁸.

Así pues, el diagnóstico de un posible caso de aspergilosis se entiende como un proceso compartimentado y sistemático en el que se empieza por analizar clínicamente el caso, lo que normalmente sirve para determinar la gravedad del mismo y de complemento a las siguientes técnicas diagnósticas, lo que lleva a depender del diagnóstico post-mortem para dar un diagnóstico definitivo. El diagnóstico anatopatológico permite ya encaminar las sospechas de manera más fiable, aunque debido a la similitud del patrón de esta enfermedad con los de otras no se alcanza un diagnóstico hasta que no se combina con la microbiología, que junto con la citología e histología permiten caracterizar el agente causal identificando el género y la especie de *Aspergillus* implicada. Sin embargo, para tipificar de manera completamente fiable la especie es necesario recurrir a las técnicas moleculares.

A este proceso diagnóstico se le pueden añadir otras técnicas diagnósticas, que por sí mismas no sirven para diagnosticar la enfermedad de manera definitiva, pero que combinadas con las que se acaban de describir ofrecen la posibilidad de evaluar la extensión y gravedad de la enfermedad y/o de apoyo a los resultados que hayan podido obtenerse¹¹. Estas técnicas se describen en el siguiente apartado.

2.7.1. E Otros

Diagnóstico por imagen

De todas las pruebas de diagnóstico por imagen que existen, las únicas que se llegan a utilizar son la radiología y la endoscopia¹¹.

Hematología/bioquímica y serología

Los signos que se observan en la mayoría de casos son: leucocitosis con heterofilia (puede indicar que hay una infección y que el sistema inmune está involucrado), linfopenia y monocitosis y anemia no regenerativa, especialmente en estadios crónicos de la enfermedad⁶. Los resultados de la bioquímica varían en función de los órganos afectados¹¹. En cuanto a la serología, existen multitud de técnicas: electroforesis proteínas, evaluación proteínas fase aguda, detección anticuerpos frente a *Aspergillus*, detección de antígeno y detección de toxinas¹¹.

2.7.2 Reptiles

En reptiles el diagnóstico definitivo se realiza combinando la citología, histología y el cultivo como en aves. Hay que destacar la importancia que tiene para un diagnóstico fiable en reptiles el, además del cultivo del hongo, demostrar histológicamente que está implicado en la lesión y que la morfología microscópica de las estructuras fúngicas del cultivo es compatible con la observada en histología, al ser *Aspergillus* parte de la micobiotia normal en reptiles. Además, también es recomendable asegurarlo mediante técnicas moleculares¹².

3 JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Aspergillus es uno de los causantes de infección más importante en las aves, siendo el más frecuente de los agentes etiológicos fúngicos. En reptiles también reviste de mucha importancia, aunque sin alcanzar la dimensión que adquiere en aves. Puede afectar a todas las especies de aves y reptiles, pero se ha observado mayor prevalencia en individuos en cautividad, y esto se debe a las características de patogenicidad del organismo. Al ser oportunista son los especímenes inmunocomprometidos los que pueden llegar a desarrollar enfermedad, y este perfil de individuo se suele encontrar en centros en los que se mantienen especies silvestres en cautividad, ya sea porque llegan animales enfermos (como en los centros de recuperación de fauna silvestre), por las condiciones del ambiente o por el estrés derivado de no hallarse en su hábitat natural.

Teniendo en cuenta la creciente presencia e importancia de los centros de recuperación de especies, realizar un análisis exhaustivo de la aspergilosis podría resultar determinante para el funcionamiento de estos centros y para la salud de las especies que albergan.

En aves el conocimiento de este patógeno está más avanzado que en otras especies y hay mucha documentación, pero, aun así, la falta de estandarización y guías (como en medicina humana) lleva a obtener datos epidemiológicos, diagnósticos y de tratamiento de poca calidad, y la realización de estudios de recopilación para mejorar en este sentido es una cuestión todavía necesaria.

En reptiles este problema está aún más lejos de alcanzar unos niveles aceptables de documentación y consenso. Hay poca literatura publicada hasta el momento (y la que hay está incompleta) y muestra discrepancias entre los autores. Al igual que en aves, una revisión de la información publicada y la estandarización de los protocolos a la hora de abordar casos sospechosos de aspergilosis podría ser el punto de inflexión de cara a poder disponer en el futuro de información fiable y consensuada.

Una de las razones más importantes por las que es necesario ampliar y consensuar la información de la que se dispone es el desafío que suponen las especies crípticas. Es determinante tanto para tener un conocimiento epidemiológico fiable como a la hora del abordaje clínico el tipificar con la mayor seguridad posible la especie de *Aspergillus* implicada en cada caso. Seguir ampliando el conocimiento de los métodos de identificación moleculares es crucial para afrontar dicho desafío.

1. Objetivo principal: realizar un estudio de la aspergilosis en especies exóticas, en concreto en aves y reptiles, desde un punto de vista clínico, anatopatológico, histopatológico, microbiológico y genético a partir de las muestras remitidas de individuos con sospecha clínica y lesional de aspergilosis durante este curso 2016/2017 desde el Centro de Recuperación de Especies Silvestres de La Alfranca (Zaragoza) y de las muestras almacenadas en la facultad de años anteriores de la misma procedencia con implicación de *Aspergillus* ya confirmada.

2. Objetivos secundarios:

- 2.1. Evidenciar la posible confusión a la hora de establecer un diagnóstico diferencial desde un punto de vista lesional macroscópico.
- 2.2. Verificar la eficacia de la técnica de identificación molecular de la amplificación y secuenciación de un fragmento del gen codificante para la β -tubulina para identificar genéticamente la especie de *Aspergillus* responsable en casos de aspergilosis.

4 MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Aproximación al tema de estudio

En primer lugar, con el objetivo de introducir el tema a tratar en el trabajo se realizó una búsqueda bibliográfica en la base de datos PubMed utilizando las siguientes palabras clave: “*Aspergillus*”, “aspergillosis”, “birds”, “avian”, “reptiles”, “molecular”, “typing”. Dicha búsqueda se amplió mediante la consulta de algunos de los artículos citados en la bibliografía seleccionada de PubMed. Además, se consultó el libro *Infectious Diseases and Pathology of Reptiles: Color Atlas and Text* de la biblioteca de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza¹².

4.2. Casos de estudio

Los sujetos de estudio seleccionados fueron los individuos del Centro de Recuperación de Especies Silvestres de La Alfranca (Zaragoza) con sospecha clínica y lesional de aspergilosis durante el curso 2016/2017 y los individuos de la misma procedencia de años anteriores con aspergilosis ya confirmada cuyas muestras se almacenan en la facultad. Se analizaron un total de 6 muestras pertenecientes a 6 individuos: 1 reptil, tortuga Jicotea (abreviatura utilizada: T), y 5 aves, un buitre quebrantahuesos (B), un estornino negro (H1), un buitre leonado (H2), una espátula (H3) y un azor (H4).

Los criterios de selección fueron los siguientes: individuos de cualquier edad, sexo y especie del Centro de Recuperación de Especies Silvestres de La Alfranca, ya sean residentes o remitidos al mismo, muertos con un diagnóstico diferencial clínico-lesional en el que esté presente la aspergilosis durante el periodo de tiempo concretado arriba.

4.3. Métodos

Se nos remitieron muestras de diversos órganos o estructuras de cada animal seleccionadas por los veterinarios del centro en función de la localización de la lesión considerada más adecuada para su posterior estudio. Con cada paquete de muestras de un individuo venía adjunto el historial clínico y los resultados de la necropsia. Las muestras venían conservadas en formol y congeladas.

4.3.1 Análisis histopatológico

El formol en el que venían inmersas las muestras desempeña doble función, la de conservación y la de fijación del tejido para evitar la degeneración post-mortem. En 48 h. la se completó la fijación. El protocolo de preparación de muestras histológicas comenzó con el lavado de las muestras para eliminar el exceso de fijador y evitar así interferencias con la sustancia de inclusión a posteriori. Después se deshidrató la muestra con alcohol de concentración creciente, pues el medio de inclusión que se utiliza en uno de los procesos posteriores es hidrófobo, y se aclaró con xileno (o xilol), que es un

compuesto miscible tanto con el alcohol del paso anterior como con la parafina que se utiliza en el siguiente paso. Una vez hecho esto, se realizó la inclusión en parafina líquida a unos 60 °C durante 3-4 h. De esta manera la sustancia penetra en el tejido y lo envuelve, para después traspasarlo a un recipiente molde en el que se enfriá formando bloques endurecidos de tejido que pueden ser cortados. Así pues, se procedió al corte de los bloques de muestras con un microtomo disponiendo las zonas de más interés hacia la estructura de corte del aparato. Se realizaron secciones de 4 µm, lo suficientemente finas para permitir el paso de la luz y que pudieran ser observadas por microscopía óptica, por duplicado de cada muestra. Una vez hechas, se introdujeron en agua caliente (45 °C) para su extensión y posteriormente se depositaron sobre un portaobjetos para su secado. Antes de la tinción se volvieron a aclarar con xileno (o xilol), ya que es necesario extraer la parafina del tejido al ser hidrófoba, y se hidrataron con alcoholes de concentración decreciente y agua destilada, ya que los colorantes a utilizar después son de base acuosa. Una vez hidratadas se procedió a realizar la fase de tinción. Los colorantes elegidos fueron los de hematoxilina-eosina y PAS específico para hongos (por eso se secciona cada muestra por duplicado) y la tinción se realizó siguiendo los protocolos de tinción de cada colorante. Para guardar las muestras por tiempo prolongado es necesario volver a deshidratarlas y a aclararlas con xileno para después adicionar la resina adhesiva y cubrir la sección con un cubreobjeto.

4.3.2 Análisis microbiológico

El cultivo se realizó a partir de muestras descongeladas. El medio utilizado fue el agar Sabouraud/Cloranfenicol con pH 5.6 (+/-0.2), un medio selectivo para el aislamiento de hongos gracias a sus agentes selectivos para inhibir el crecimiento de bacterias: el pH y el cloranfenicol, un antibiótico de amplio espectro. Las muestras T y B eran porciones de órganos afectados con lesión visible y se sembraron siguiendo la técnica de los tres puntos, poniendo en contacto el fragmento con el agar (retirándolo después) en tres puntos equidistantes. Las cuatro muestras restantes se sembraron mediante la técnica de los tres puntos utilizando un asa de siembra, ya que estaban conservadas en fase líquida en tubos. El líquido se obtuvo mezclando la cepa del hongo aislada con el líquido de congelación. Una vez realizadas las siembras las placas se introdujeron en una estufa para su incubación a 37 °C unas 48 h.

Tras la incubación, se realizaron el análisis y la caracterización macroscópica del crecimiento mediante visualización directa tanto por el anverso como por el reverso de la placa.

Después del cultivo se realizó la preparación para el análisis microscópico mediante el líquido de tinción azul de lactofenol. El procedimiento consiste en adherir un trozo de celo a la colonia y depositarlo sobre un portaobjetos con una gota de azul de lactofenol para su observación con un microscopio.

4.3.3 Análisis molecular

Se extrajo de las placas con crecimiento una muestra de micelio de aproximadamente 50 mg para realizar la extracción de ADN. Para la realización de este proceso se utilizó el kit *GE de Healthcare illustra TM tissue & cells genomicPrep Mini Spin Kit* siguiendo el protocolo de extracción de ADN genómico de tejidos animales, que, aunque no es específico para la extracción de ADN en hongos, es aplicable. El protocolo utilizado fue el siguiente:

1. Homogeneización de la muestra: los 50 mg obtenidos se mezclaron con 1 ml PBS en un tubo de plástico cilíndrico con esferas de cerámica (necesarias ya que el ADN fúngico es de complicada extracción al ser las hifas difíciles de romper) en un homogeneizador de tejidos TeSeE Precess 48, Biorad durante dos tandas de 1 min. Después se tomaron 50 µl del sobrenadante para continuar la extracción.
2. Lisis: al homogeneizado del hongo se añadieron 50 µl de solución de lisis 1 del kit, encargada de disolver la membrana lipídica al contener detergentes, y 10 µl de proteinasa K. La mezcla se agitó en un vortex y se centrifugó 10 s a 2000 x g. A continuación, se dejó incubar 1 h. a 56 °C.
3. Carga y unión: transcurrido este tiempo se añadieron 500 µl de solución de lisis 2 del kit previamente agitada con un vortex, que produce la deshidratación y consiguiente precipitación de los ácidos nucleicos insolubles en alcohol gracias a los alcoholes que contiene, y la mezcla se incubó 10 min a temperatura ambiente. Una vez pasado el tiempo, se cargó en una columna (un tubo de plástico con un filtro para que se quede adherido el ADN que se introduce en un tubo colector para recoger lo que pase ese filtro) y se centrifugó 1 min a 11000 x g. A continuación, se eliminó el líquido filtrado.
4. Limpieza 1 y 2: se añadieron 500 µl de la solución de lisis 2 y se centrifugó 1 min a 11000 x g descartando el líquido sobrante. Después se añadieron 500 µl de una solución tampón de lavado y se centrifugó 3 min a 11000 x g descartando el tubo colector.
5. Elución: se transfirió la columna a un nuevo tubo de microcentrifugación y se añadieron 50 µl de tampón de elución precalentado a 70 °C. En el protocolo se especifica 200 µl, pero dado que es para tejidos y no para hongos y los hongos son difíciles de romper, y por tanto se obtiene menos ADN, no conviene diluirlo tanto. De todas maneras, se añadieron en una segunda recuperación otros 150 µl de tampón de elución precalentado a la columna para recuperar una muestra más diluida en un tubo independiente. Se dejaron incubar 1 min a temperatura ambiente y luego se centrifugaron 1 min a 11000 x g. Finalmente, se recogieron los líquidos de elución resultantes de cada muestra (el más concentrado y el más diluido resultante de la segunda recuperación) con ADN del tubo de microcentrifugación y se guardó a -20 °C.

A continuación, se realizó una cuantificación de ácidos nucleicos en cada eluido resultante del procedimiento anterior mediante el espectrofotómetro Nanodrop (casa comercial).

Una vez comprobada la presencia de ácidos nucleicos en las eluciones resultantes del primer procedimiento se procedió a realizar la PCR.

Inicialmente, teniendo en cuenta las características del estudio y las posibilidades del laboratorio, se planteó la opción de realizar la identificación molecular mediante la amplificación con PCR y secuenciación de un fragmento del gen codificante para la Beta-tubulina y de las regiones ITS (Internal Transcriber Spacer, secuencias del genoma que se encuentran separando los genes ribosomales⁸). Ya que como se ha dicho en la introducción recientes estudios señalan que la región de la beta-tubulina resulta más discriminante, fue la metodología finalmente elegida para la identificación molecular en este trabajo. El gen de β-tubulina es uno de los pocos genes complejos que son interrumpidos por uno o varios intrones, cuya posición se conserva en todas las especies investigadas hasta ahora, lo que permite un diseño fácil de los cebadores en torno a esta región. Además, los intrones asociados con el gen β-tubulina muestran grandes variaciones tanto en longitud como en secuencia. Estas características hacen de esta región del genoma una buena candidata para el desarrollo de marcadores²⁷.

Se introdujeron en la máquina de PCR las muestras problema, compuestas por los componentes por muestra que se detallan en la [Tabla 1](#), más un blanco compuesto por todas esas sustancias excepto el ADN.

Tabla 1: Componentes mezcla de amplificación de un fragmento del gen β-tubulina a partir de muestras de hongos.

Componentes mezcla amplificación PCR / muestra		
ADN	3 µl muestras concentradas	5 µl muestras diluidas
H ₂ O destilada x2		31 µl
Tampón concentrado x10		5 µl
Mg Cl ₂		1.5 µl
Primer Bt2a		0.5
Primer Bt2b		0.5
dNTPs		8 µl
Enzima Taq polimerasa		0.5 µl

Primers: Bt2a (5'-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTC-3') y Bt2b (5'-CCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-3')²⁶.

Se establecieron las condiciones a las que se va a someter a las muestras: 94 °C 5 min, 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 40 s (estas tres últimas etapas se repiten 35 veces para reproducir 35 ciclos), y 72 °C 7 min. Al finalizar el proceso se almacena a 4 °C.

Mientras se realizaba la reacción PCR se preparó el gel de agarosa al 2 % (0.6 g de agarosa en 30 ml de tampón de electroforesis TBE) para la electroforesis de ácidos nucleicos en gel. A finalizar la PCR la amplificación se visualizó con luz ultravioleta gracias al colorante gel Red (marca comercial). Antes del siguiente paso, se seleccionaron las muestras que iban a seguir con los procesos posteriores de entre las 12 resultantes (6 animales a estudio con dos muestras cada uno, la más concentrada y la más diluida). El criterio de selección utilizado fue elegir de entre las dos muestras de cada animal la que mejor visualización tuviera en la electroforesis.

Una vez comprobada la correcta realización de la PCR se procedió a la purificación del ADN con la enzima ExoSapIt (casa comercial) para eliminar todo lo que pudiera interferir a la hora de hacer la secuenciación (nucleótidos y cebadores). Añadida la enzima se dejó incubar 45 min a 37 °C y posteriormente se desnaturalizó incubando 15 min a 80 °C.

Ya purificadas, las muestras se enviaron a un laboratorio externo en Portugal (StabVida) para su secuenciación mediante el método de Sanger, que es una técnica de secuenciación enzimática que se basa en la utilización de la enzima ADN polimerasa para sintetizar de manera secuencial una hebra complementaria a la hebra molde a secuenciar en presencia de un cebador, los cuatro deoxinucleótidos del ADN y dideoxinucleótidos (variantes de los cuatro deoxinucleótidos que en su carbono 3' no contienen el grupo hidroxilo, cada uno marcado con un pigmento diferente) que interrumpen la síntesis de ADN obteniéndose así fragmentos de distintos tamaños²⁸. Después los fragmentos se separan por tamaño mediante electroforesis a través de un polímero. Al final del recorrido del capilar con polímero un haz láser determina la fluorescencia del dideoxinucleótido incorporado al final del fragmento. Un programa asociado al secuenciador proporciona un cromatograma en el que se visualizan los picos de fluorescencia de los distintos nucleótidos de la secuencia. La secuencia se analizó con el programa BioEdit, que permite obtener un formato apto para ensamblar el extremo 5' de la secuencia (obtenido con la secuencia reversa y complementaria resultante del uso del primer Bt2b) con el extremo 3' de la secuencia (resultante de la secuencia directa obtenida con el primer Bt2a). La secuencia ensamblada del fragmento amplificado por PCR se comparó con la base de datos de GenBank mediante el programa BLAST.

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La historia clínica y los hallazgos macroscópicos referidos a continuación son un resumen de la información aportada, junto con las muestras conservadas en formol y congeladas, por parte del Centro de Recuperación de Fauna Silvestre de La Alfranca (Zaragoza).

5.1. *Historia clínica*

- Tortuga Jicotea: muerte hembra adulta tras 229 días en el centro. Ingresada por entrega de sus propietarios al Acuario de Zaragoza y remisión posterior al centro.
- Quebrantahuesos: muerte macho joven tras 11 días en el centro. Capturado con trampa en el comedero de la Garcipollera por cojera. Una vez ingresado se le diagnostica antigua fractura de fémur izquierdo. Ingresa con 3420 g y pierde 1040 g a pesar de comer cada día.
- Estornino negro: muerte ejemplar macho joven tras 9 días en el centro. Comía con voracidad hasta su muerte, aunque se observaban los dedos de las garras agarrotados.
- Buitre leonado: macho adulto que llega al centro muerto, en rigor mortis y con predación post-mortem incipiente.
- Espátula: macho joven llega al centro en estado terminal pero vivo, caquéctico y con fracturas que le imposibilitan el vuelo.
- Azor: muerte ejemplar macho adulto tras 14 días en el centro. Ingresado por traumatismo con fractura abierta de carpo. Pérdida del 25 % del peso inicial a pesar de comer con regularidad.

5.2. *Hallazgos anatomo-patológicos*

5.2.1 Hallazgos de necropsia

- Tortuga Jicotea: excelente estado nutricional. Erosiones caseificadas en regiones poplíteas y pliegue de los codos. Hígado globoso con esteatosis hepática fisiológica (formación huevos) y nódulos calcificados en superficie de hasta 1 mm de diámetro. Mismos nódulos tapizando fascias, superficie intestino y pulmón. Neumonía intersticial y congestión acusadas. Consistencia elástica pulmón, no depresible.

Discusión: la tortuga se remitió a la facultad con la sospecha principal de tuberculosis, lo que reafirma el hecho de la posible confusión que puede surgir a la hora de realizar un diagnóstico diferencial desde un punto de vista clínico-lesional al observar lesiones granulomatosas por su similitud con las de otras enfermedades^{12,18}.

- Quebrantahuesos: fractura en bisel zona media diáfisis fémur izquierdo con signos de consolidación y remodelación, pero sin alinear. Hematomas casi reabsorbitos con contusiones en piel y músculo en pectorales craneales. Masas blancas circulares gelatinosas de varios mm tapizando fascia esternal en pectorales, fascia músculos supracoracoideos, periostio esternón y coracoides, pericardio, sacos aéreos y superficie pulmones. Parénquima pulmonar hemorrágico, con colonias fúngicas. Granulomas en pulmones.
- Estornino negro: estado nutricional normal. Pericarditis caseosa, con masa blanca envolviéndolo manteniéndolo adherido al esternón. Absceso hepático en lóbulo derecho craneal que sustituye parte del parénquima y en polo caudal pulmón derecho.

Discusión: el estornino se remitió a la facultad con la sospecha principal de infección bacteriana, otro caso de posible confusión a la hora de establecer el diagnóstico diferencial, pues bacterias como *E. coli* pueden desencadenar granulomas o lesiones nodulares como las halladas en este animal¹⁸.

- Buitre leonado: estado nutricional pobre y deshidratado. Parasitación por *Amblycera* e *Ischnocera*. Colonias fúngicas sobre tapiz caseoso en todos los sacos aéreos y parénquima pulmonar muy infiltrado de nódulos caseosos. Laceración hepática masiva resuelta. En lugar de la vesícula biliar se halla una masa caseosa colonizada por moho.
- Espátula: estado nutricional muy pobre. Traumatismos múltiples, hematomas y hemorragias repartidos de manera generalizada por músculos, articulaciones, huesos y otras localizaciones. Traumatismo craneoencefálico y hemorragia interna generalizada con encharcamiento del pulmón. Presencia de nódulos en riñón derecho, llenando el espacio entre este y el pulmón y ocupando más de la mitad del parénquima pulmonar. Colonias de moho tapizando parte del riñón, pulmón y sacos aéreos. Parasitosis intestinal.
- Azor: caquexia. Fractura carpo derecho con necrosis de hueso, tendones y piel distal al foco de fractura. Edema ex vacuo subpericárdico. Hepatomegalia. Colonias de moho ocupando la mitad del parénquima del pulmón derecho, sobre granuloma caseoso.

Discusión: atendiendo de manera conjunta a la historia clínica y a los hallazgos en la necropsia cabe destacar la importancia de analizar dos cuestiones: si el animal desarrolló aspergilosis en el centro o ingresó ya con la enfermedad y el tipo de curso y distribución que siguió la misma. Así pues, la tortuga ejemplifica el típico caso de aspergilosis en especies silvestres en cautividad. El ejemplar entró en el centro sano, y casi un año después muere con lo que presumiblemente es aspergilosis crónica sistémica. Numerosos autores sitúan el hecho de vivir en cautividad como un factor predisponente determinante para el desarrollo de enfermedad^{4,11,16}. Uno de los casos señalados en

el apartado 2.3.2 de la introducción describe una situación similar y en una tortuga también, en concreto *Hydraspis hilarii*: muerte del ejemplar por aspergilosis sistémica en el centro Society's Garden durante el periodo de aclimatación^{12,13,29}. En los casos del quebrantahuesos, estornino y azor mueren tras un periodo mucho más corto en el centro, pero no se puede asegurar si llegaron con la enfermedad y en el centro empeoró, y por tanto fue un curso más lento y crónico, o se desarrolló una vez ingresados. El buitre y la espátula llegaron ya muertos (espátula en estado terminal) por lo que no hay duda de que desarrollaron la enfermedad en libertad, lo que hace imposible solo con el diagnóstico clínico y anatomo-patológico macroscópico asegurar la rapidez del curso de la enfermedad. Muchas publicaciones señalan el hecho de que los individuos en libertad también son susceptibles de contraer la enfermedad^{1,5,30}.

Cabe destacar que en los cinco casos de aves y en la tortuga se vio involucrado el pulmón, lo que concuerda con la literatura publicada que señala al sistema respiratorio bajo como principal diana de la aspergilosis^{1,6,12}.

5.2.2 Hallazgos histopatológicos

Tras la valoración microscópica se agruparon las lesiones en tres grupos básicos, aquellas que mostraban un predominio de necrosis, las que presentaban principalmente lesiones granulomatosas y aquellas de carácter mixto, en las que se apreciaban lesiones de ambos tipos. Este aspecto lesional es compatible con la cronicidad de las lesiones, siendo más agudas aquellas en las que las lesiones son más necróticas. Las muestras se clasificaron en los tres grupos mencionados en la [Tabla 2](#).

[Tabla 2:](#) Resultados análisis histopatológico.

Muestra	Patrón histológico
Tortuga Jicotea (<i>Trachemys scripta</i>)	Necrótico no encapsulado
Quebrantahuesos (<i>Gypaetus barbatus</i>)	Necrótico, visualización conidios (Figuras 1 y 2 anexo I)
Estornino negro (<i>Sturnus unicolor</i>)	Mixto con predominancia de necrosis
Buitre leonado (<i>Gyps fulvus</i>)	Mixto con predominancia de necrosis, visualización conidios
Espátula (<i>Platalea leucorodia</i>)	Granulomatoso, visualización conidios (Figuras 3 y 4 anexo I)
Azor (<i>Accipiter gentilis</i>)	Necrótico

Discusión: la histopatología permite visualizar hifas en una lesión de aspergilosis, ya sea aguda o crónica^{11,15}, con las tinciones utilizadas en la metodología, por lo que esta técnica se podría situar como la solución al problema de la posible confusión al establecer el diagnóstico diferencial desde un punto de vista lesional macroscópico¹⁸ debido a su similitud con el patrón de las enfermedades descritas en la introducción. La combinación de la histología con el diagnóstico microbiológico ha sido suficiente para el diagnóstico a nivel de género en todos los casos de este estudio.

5.3. *Diagnóstico microbiológico*

5.3.1 Análisis macroscópico

- Tortuga Jicotea: en anverso colonias flocosas, de unos 3 cm de diámetro, con pliegues, de color marrón verdoso y bordes y centro blanquecino (centro de 1 cm). Reverso incoloro (Figura 1).

Discusión: aspecto compatible con género *Aspergillus*, pero en principio no compatible con la morfología de ninguna de las especies más comunes^{2,20}.



Figura 1: Colonias obtenidas con el aislado de tortuga Jicotea.

- Quebrantahuesos: en anverso colonias con pliegues aterciopeladas-polvorientas de unos 3.5 cm de diámetro (analizadas un día más tarde que el resto) de color gris oscuro- marrón algo azulado y bordes blanquecinos. Reverso incoloro (Figura 2).

Discusión: aspecto compatible con género *Aspergillus* y concretamente, de entre las especies más comunes, con la especie *A. fumigatus*^{2,20}.



Figura 2: Colonias obtenidas con el aislado de quebrantahuesos.

- **Buitre leonado:** en anverso colonias con pliegues aterciopeladas-polvorrientas de unos 3 cm de diámetro verdoso-grisáceas con el centro amarillento y los bordes blanquecinos (halo). Reverso incoloro (amarillento en conjunto con el color del agar) con los bordes más claros ([Figura 3](#)).

Discusión: el aspecto del crecimiento es compatible con el género *Aspergillus* y concretamente, de entre las especies más comunes, con la especie *A. fumigatus*^{2,20}.



Figura 3: Colonias obtenidas con el aislado de buitre leonado.

- **Espátula:** en anverso colonias con pliegues aterciopeladas-polvorrientas de unos 3 cm de diámetro color canela con los bordes blanquecinos (halo). Reverso igual a la anterior muestra del buitre ([Figura 4](#)).

Discusión: aspecto compatible con el género *Aspergillus*, concretamente, de entre las especies más comunes, con la especie *A. terreus*^{2,20}.

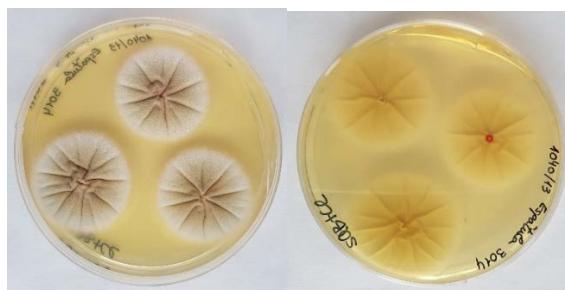


Figura 4: Colonias obtenidas con el aislado de espátula.

- **Estornino negro y azor:** misma morfología en anverso y reverso. En anverso micelio plano blanco-grisáceo con lo que parece ser crecimiento de un microorganismo contaminante por encima (ya que no concuerda con la morfología normal de *Aspergillus*) del mismo color tapando toda la placa. Reverso incoloro difuso muy extendido por la placa en el que se puede apreciar el diámetro: unos 3.5 cm.

Discusión: al estar las placas presumiblemente contaminadas no fue posible establecer compatibilidades.

5.3.2 Análisis microscópico

- Todos los crecimientos de las muestras de las 5 aves mostraron un patrón microscópico similar: hifas septadas, hialinas, con ramificaciones en ángulo de 45 ° y conidióforos de cabezas conidiales uniseriadas (vesícula con fiáldes, pero sin métrulas). Vesículas piriformes con una disposición más o menos columnar del complejo fiáldes-conidios (eje paralelo al eje del conidióforo), que ocupan la mitad o dos terceras partes de la vesícula. Conidios esféricos-ovoides.

Discusión: patrón microscópico reafirma la compatibilidad de los cultivos de las aves con género *Aspergillus* (ver apartado de diagnóstico microbiológico en la introducción). En cuanto a la especie, el aspecto de los crecimientos de quebrantahuesos y buitre leonado encaminaba la sospecha hacia la especie *A. fumigatus*, lo que se reafirma al analizar las características microscópicas y compararlas con las de las especies más comunes de *Aspergillus*^{2,20}. No sigue esta línea la espátula, cuyo aspecto encaminaba la sospecha hacia la especie *A. terreus*, pero el patrón microscópico era el mismo que en el resto de casos de aves, con lo que no queda tan clara la especie en este caso. Patrones microscópicos de azor y estornino negro concuerdan con el de la especie *A. fumigatus*^{2,20}.

- El patrón microscópico del crecimiento de la muestra de tortuga mostró las siguientes características: hifas hialinas, septadas, con ramificaciones en ángulo de 45 °, cabezas conidiales biseriadas (vesícula con fiáldes y métrulas) y vesículas con forma esférica, con una unión con el resto del conidióforo más acusada. Además, la disposición de las métrulas-fiáldes-conidios es radial y los conidios esféricos muy rugosos e irregulares.

Discusión: las primeras tres características, al igual que en aves, reafirman la compatibilidad del crecimiento con el género *Aspergillus* (ver apartado de diagnóstico microbiológico en la introducción). Sin embargo, difiere en la morfología de los conidióforos con respecto a las muestras de aves. Concuerda con el de la especie *A. niger*^{2,20}, pero como en el análisis macroscópico no se estableció compatibilidad ni con esa especie ni con ninguna del resto de las especies más comunes, se podría pensar que es una especie no común de la sección de la que es especie tipo la especie *A. niger*: sección *Nigri*³¹.

5.4. Diagnóstico molecular

Siguiendo el orden establecido en la metodología se detallan los resultados de cada procedimiento realizado y su consecuente discusión.

5.4.1 Extracción ADN y cuantificación ácidos nucleicos

Los resultados de la cuantificación de ácidos nucleicos existentes en cada eluido resultante del proceso de extracción de ADN fúngico fueron los siguientes:

- T y B: las cantidades no fueron suficientemente altas. Aun así, se decidió proseguir con la PCR porque no se necesitan grandes cantidades para que salgan resultados legibles.
- H1, H2, H3 y H4: H1 = 8.71 ng / µl; H2 = 9.41 ng / µl; H3 = 13.51 ng / µl; H4 = 12.58 ng / µl. De las muestras más diluidas resultantes de la segunda recuperación de ADN en el último paso del proceso de extracción del ADN se obtuvieron cantidades más bajas. H1' = 3.34 ng / µl; H2' = 2.84 ng / µl; H3' = 2.40 ng / µl; H4' = 3.13 ng / µl.

5.4.2 PCR y electroforesis

La electroforesis permitió visualizar el producto amplificado ([Figura 5](#)). Se obtuvo un único fragmento para cada una de las muestras con una talla compatible con el tamaño de fragmento diana. El producto amplificado mostraba suficiente pureza e intensidad para poder ser secuenciado.

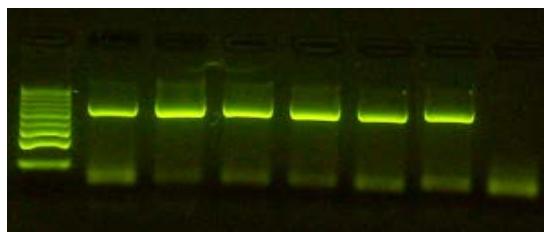


Figura 5: Electroforesis fragmento del gen β-tubulina (520 pb, aproximadamente) obtenido con el ADN de los hongos aislados de tortuga (carrera 2), quebrantahuesos (carrera 3), estornino negro (carrera 4), buitre leonado (carrera 5), espátula (carrera 6) y azor (carrera 7). La primera contiene un marcador de talla y la última el control negativo de amplificación.

5.4.3 Secuenciación

Se obtuvieron las secuencias directa y reversa de la región del gen β-tubulina con los primers Bt2a y Bt2b para cada muestra y, tras su comparación con otras secuencias de nucleótidos en la base de datos de GenBank, se obtuvieron los resultados que se muestran en la [Tabla 3](#).

Tabla 3: Identificación genética especie de hongo aislado de cada muestra.

Muestra	Tamaño secuencia (pb)	Secuencia	Secuencia más próxima	Resultado especie
Tortuga Jicotea (<i>Trachemys scripta</i>)	508	Figura 1 anexo II	MF150902.1	<i>A. tubingensis</i>
Quebrantahuesos (<i>Gypaetus barbatus</i>)	511	Figura 2 anexo II	KY808694.1	<i>A. fumigatus</i>
Estornino negro (<i>Sturnus unicolor</i>)	511	Figura 3 anexo II	KY808694.1	<i>A. fumigatus</i>
Buitre leonado (<i>Gyps fulvus</i>)	511	Figura 4 anexo II	KY808694.1	<i>A. fumigatus</i>
Espátula (<i>Platalea leucorodia</i>)	511	Figura 5 anexo II	KY808694.1	<i>A. fumigatus</i>
Azor (<i>Accipiter gentilis</i>)	511	Figura 6 anexo II	KY808694.1	<i>A. fumigatus</i>

Discusión: la existencia de especies crípticas (no diferenciables según morfología macro y microscópica) es según la mayoría de los autores una de las razones por las que realizar diagnóstico basado en técnicas moleculares^{3,8,22}, pero no es la única. La existencia de diferentes morfotipos para una misma especie, y de aislamientos atípicos es otra de ellas^{8,21}. Los casos del buitre quebrantahuesos, buitre leonado y espátula de este estudio se inscriben en la segunda de las razones. El aislamiento de la espátula macroscópicamente no era compatible con los de los buitres (ya con una morfología más similar entre ellos), pero finalmente los tres aislamientos resultaron pertenecer a la misma especie tras el análisis genético. Sin embargo, en este caso no solo la genética soluciona este problema. El análisis microscópico sí parecía indicar la pertenencia de los tres aislados a la misma especie. En cualquier caso, en los dos supuestos (especies crípticas y aislamientos atípicos y diferentes morfotipos) el tipificar genéticamente los aislamientos se presenta como una solución factible y fiable^{8,21,22} y remarca la importancia de este tipo de técnicas a la hora de especificar la especie implicada en un caso de aspergilosis.

Cinco de los seis casos de estudio resultaron ser *A. fumigatus*, lo que concuerda con la literatura publicada al ser la especie más prevalente, sobre todo en aves, que algunos autores la sitúan en un 95 % de prevalencia^{4,5}.

En el caso de la tortuga con *A. tubingensis*, no hay literatura publicada hasta el momento en la que esta especie sea responsable de un caso de aspergilosis ni en aves ni en reptiles. Sin embargo, en medicina humana sí parece ser frecuentemente aislado, sobre todo en casos de enfermedad pulmonar³². Además, parece que se han identificado muchas especies crípticas dentro de la sección *Nigri*, entre ellas *A. tubingensis*³², por lo que hay que tener en cuenta que en la rutina clínica de laboratorios que no usan

identificación molecular pueden haber pasado desapercibidos casos en los que el agente causal de la aspergilosis fuera *A. tubingensis*.

6 CONCLUSIONES

1. El diagnóstico clínico de la aspergilosis en aves y reptiles es difícil debido a que sus síntomas son inespecíficos.
2. El presente trabajo confirma que la aspergilosis en aves es fundamentalmente respiratoria, y sugiere que también lo puede ser en tortugas.
3. El diagnóstico *post-mortem* de la aspergilosis basado en las lesiones macroscópicas es posible en los casos en los que se observan colonias fúngicas en los órganos, pero puede confundirse con otras etiologías cuando se observan lesiones de aspecto granulomatoso.
4. El estudio histopatológico es importante para orientar el diagnóstico en caso de infección fúngica ya que permite la visualización de sus estructuras características.
5. El estudio microbiológico ha confirmado que *A. fumigatus* es una especie de crecimiento rápido, con colonias visibles a los dos días, y que su aspecto macroscópico puede ser variable, aunque la dificultad en la identificación que esto conlleva puede ser subsanada por el análisis microscópico.
6. Se ha constatado que el estudio del gen de la β-tubulina es adecuado para la identificación del Gº *Aspergillus* a nivel de especie y se ha confirmado que *A. fumigatus* es la principal especie que afecta a aves, mientras que se ha revelado una especie críptica en la tortuga, *A. tubingensis*, que además es la primera referencia que se tiene de esta especie en tortugas.

CONCLUSIONS

1. It remains difficult to make a clinical diagnosis of aspergillosis in birds and reptiles due to the fact that its symptoms are non-specific.
2. This study confirms the main target of *Aspergillus* infections in birds: the respiratory tract, and suggests the same premise for tortoises.
3. *Post-mortem* diagnosis of aspergillosis based on macroscopic lesions is possible as long as the presence of fungal colonies on the surface of the organs is noticed, but it can be misleading in those cases in which granulomatous lesions are seen.
4. The histopathological analysis is important to guide the diagnostic process in case of fungal infection because it allows us to visualize the typical fungal structures.

5. The microbiological analysis has confirmed *A. fumigatus* to be a fast-growing species, with the capacity of showing the first colonies in two days, and to have a variable macroscopic appearance, but the difficulty that this fact triggers can be solved with a microscopic analysis.
6. It has been assessed the adequacy of the genetic identification by sequencing a fragment of the β -tubulin gene to find out the species involved and it has been confirmed that *A. fumigatus* is the most frequent species isolated in birds, whereas a cryptic species has been found in tortoises: *A. tubingensis*, and it is the first time this species has been involved in an aspergillosis case in tortoises.

7 VALORACIÓN PERSONAL

Realizar este trabajo ha sido enriquecedor para mí en todos los sentidos. Me ha brindado la oportunidad de estudiar un agente que no habíamos tratado en profundidad durante la carrera desarrollando actividades en los campos de anatomía patológica, microbiología y genética, las asignaturas que más me han gustado desde siempre, y de aprender a realizar técnicas que habíamos estudiado pero que ahora, después de haberlas realizado yo misma, puedo decir que no las había entendido del todo. Esa es la clave de aprender algo, ser partícipe de ello además de estudiarlo teóricamente.

8 BIBLIOGRAFÍA

1. Seyedmousavi S, Guillot J, Arné P, de Hoog GS, Mouton JW, Melchers WJ, et al. Aspergillus and aspergilloses in wild and domestic animals: a global health concern with parallels to human disease. Med Mycol. 2015;53:765-97.
2. Alcalá L, Muñoz P, Peláez T, Bouza E. Aspergillus y aspergilosis. 1997. Disponible en: http://www.seimc.org/controldecalidadseimc/index.php?mn_MP=64&mn_MS=13&mn_MN=0&ex_pandable=0&=&pag=2. [Consulta 30 de abril de 2017].
3. Samson RA, Visagie CM, Houbraken J, Hong SB, Hubka V, Klaassen CHW, et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus Aspergillus. Stud Mycol. 2014;78:141-73.
4. Abundis-Santamaría E. Aspergillosis in birds of prey. 2003. Disponible en: <http://old.aspergillus.org.uk/secure/veterinary/ASPERGILLOSIS.pdf>. [Consulta: 30 de abril de 2017].
5. Tell LA. Aspergillosis in mammals and birds: impact on veterinary medicine. Med Mycol. 2005;43 Supl I:S71-3.
6. Beernaert LA, Pasman F, Van Waeyenbergh L, Haesebrouck F, Martel A. Aspergillus infections in birds: a review. Avian Pathol. 2010;39:325-31.

7. Latgé JP. Aspergillus fumigatus and Aspergillosis. Clin Microbiol Rev. 1999;12:310-50.
8. Nasri T, Hedayati MT, Abastabar M, Pasqualotto AC, Armaki MT, Hoseinnejad A, et al. PCR-RFLP on β-tubulin gene for rapid identification of the most clinically important species of Aspergillus. J Microbiol Methods. 2015;117:144-7.
9. Nemeth NM, Gonzalez-Astudillo V, Oesterle PT, Howerth EW. A 5-Year Retrospective Review of Avian Diseases Diagnosed at the Department of Pathology, University of Georgia. J Comp Pathol. 2016;155:105-20.
10. Mendoza L, Vilela R. Respuesta inmune contra hongos. En: Gutiérrez JA, editor. Inmunología veterinaria. México DF: Manual Moderno; 2010. p. 157-193.
11. Fischer D, Lierz M. Diagnostic procedures and available techniques for the diagnosis of aspergillosis in birds. J Exot Pet Med. 2015;24:283-95.
12. Paré JA, Jacobson ER. Mycotic diseases of reptiles. En: Jacobson ER, editor. Infectious diseases and Pathology of reptiles: color atlas and text. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group; 2007. p. 527- 570.
13. Jacobson ER, Cheatwood JL, Maxwell LK. Mycotic Diseases of reptiles. J Exot Pet Med. 2000;9:94-101.
14. Girling SJ, Fraser MA. Treatment of Aspergillus species infection in reptiles with itraconazole at metabolically scaled doses. Vet Rec. 2017;165:52-4.
15. Cacciuttolo E, Rossi G, Nardoni S, Legrottaglie R, Mani P. Anatomopathological aspects of avian aspergillosis. Vet Res Commun. 2009;33:521-7.
16. Neumann. Aspergillosis in Domesticated Birds. J Comp Pathol. 2016;155:102-4.
17. Jones MP, Orosz SE. The Diagnosis of Aspergillosis in Birds. J Exot Pet Med. 2000;9:52-8.
18. Supartika IKE, Toussaint MJM, Gruys E. Avian hepatic granuloma. A review. Vet Q. 2006;28:82-9.
19. Ebani VV, Fratini F, Bertelloni F, Cerri D, Tortoli E. Isolation and identification of mycobacteria from captive reptiles. Res Vet Sci. 2012;93:1136-8.
20. Abarca ML. Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. Rev Iberoam Micol. 2000;17:79-84.
21. Balajee SA, Marr KA. Phenotypic and genotypic identification of human pathogenic aspergilli. Future Microbiol. 2006;1:435-45.
22. Balajee SA, Houbraken J, Verweij PE, Hong SB, Yaghuchi T, Varga J, et al. Aspergillus species identification in the clinical setting. Stud Mycol. 2007;59:39-46.
23. Refojo N, Duarte-Escalante E, Dignani MC, Hevia AI, Abrantes RA, Davel G, et al. Genotipificación de aislamientos clínicos de Aspergillus flavus y su relación con aislamientos ambientales de un centro oncohematológico. Rev Iberoam Micol. 2013;30:25-30.

24. Handrich I, Drira I, Neji S, Mahfoud N, Ranque S, Makni F, *et al.* Microsatellite typing of *Aspergillus flavus* from clinical and environmental avian isolates. *J Med Microbiol.* 2013;62:121-5.
25. Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, *et al.* Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109:6241-6.
26. Garzon N. Caracterización e identificación molecular de hongos de suelo aislados de los páramos de Guasca y Cruz Verde, Cundinamarca-Colombia. [Tesis]. Bogotá: Facultad de Ciencias Pontificia Universidad Javeriana; 2013.
27. Ríos S, Ríos L. Principales marcadores moleculares utilizados para la identificación de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*. *Rev.MVZ Córdoba.* 2011;16:2470-83.
28. De Necochea R, Canul JC. Métodos físico-químicos en biotecnología: secuenciación de ácidos nucleicos. 2004. Disponible en: http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/secuenciacion_acidos_nucleicos.pdf. [Consulta: 7 de septiembre de 2017].
29. Hamerton AE. Report on the deaths occurring in the Society's Garden during the year 1933. *J Zool.* 1934;104:389-422.
30. Deem SL. Fungal diseases of birds of prey. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract.* 2003;6:363-76.
31. Accensi i Alemany F. Aportación al conocimiento de *Aspergillus* sección Nigri. [Tesis]. Barcelona: Facultad de Veterinaria Universitat Autònoma de Barcelona;2000.
32. Gautier M, Normand AC, L'Ollivier C, Cassagne C, Reynaud-Gaubert M, Dubus JC, *et al.* *Aspergillus tubingensis*: a major filamentous fungus found in the airways of patients with lung disease. *Med Mycol.* 2016;54:459-70.

ANEXO I

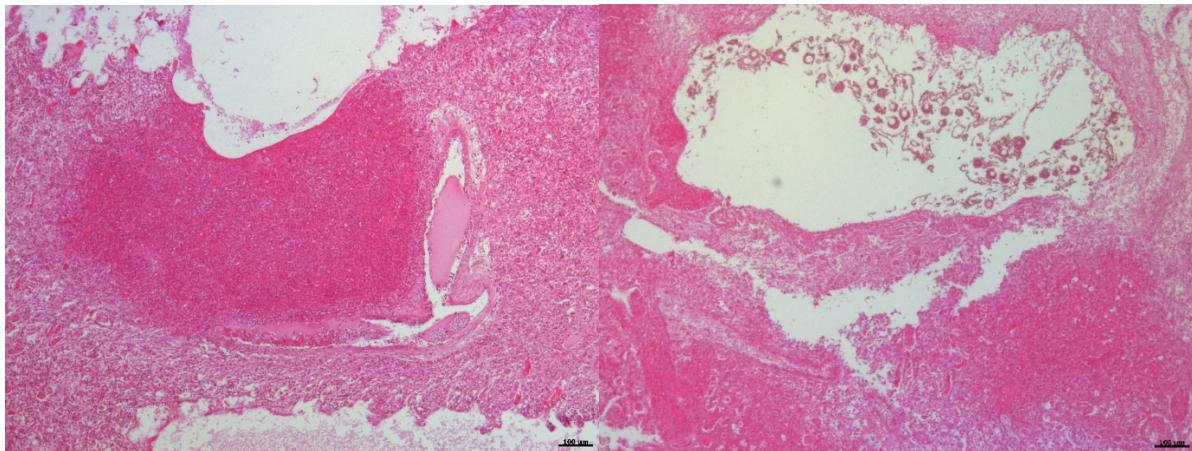


Figura 1 anexo I: necrosis y vasculitis

buitre quebrantahuesos x50.

Figura 2 anexo I: necrosis y conidios buitre

quebrantahuesos x50.

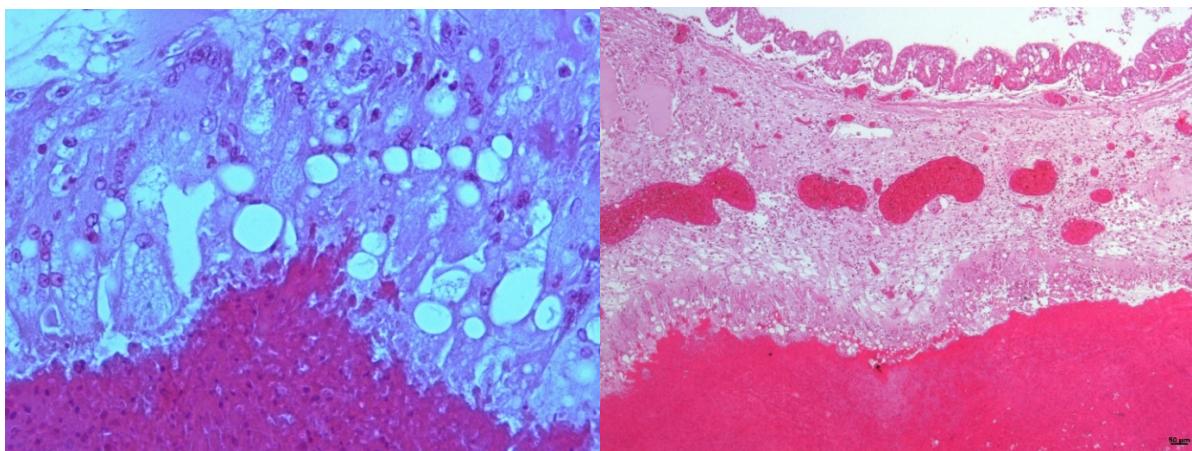


Figura 3 anexo I: células gigantes granuloma

espátula x400.

Figura 4 anexo I: granuloma espátula x50.

ANEXO II

TGGTACGTATTCACTGCCACTGGATGGGATGGAACATCATCTCAAGCTATCTAGCTGAGTTCA
GATGTTATCCATCGGGTATATAGCTATCGGGTAAGAACGCTAACAACCTCAACAGGCAGACCATCT
CTGGCGAGCACGGCTTGACGGCTCCGGTGTGAAGTACAACCTTTCACACCTCAATTGGTCAACA
ATGTGGAAAGGATTGGGTTCTGACGGCAGGGTAGTTACAATGGCACCTCCGACCTCCAGCTGGAG
CGCATGAACGTCATTCAACGAGGTTAGATCACACCGTCCCTGAGTTTCACGACAATATCATCAA
GTCCTGACCACCTCAGCAGGCTAGCGTAACAAGTATGTCCCCGTGCCGTCGATCTGAGCC
CGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGCCAGCTTCCGCCGACAACCTCGTCTCGG
CCAGTCGGTGTGGTAACAACCTGG

Figura 1 anexo II: secuencia fragmento β -tubulina tortuga Jicotea.

TGGTATGCTTGACCTCAAAGCTGGATGACGGGTGATTGGGATCTCTCATCTTAGCAGGCTACCTCCA
TGGGTTAGCCTCACTGTATGGGTACAGCTAACAAATCTACAGGCAGACCCTCTGGTGAGCATGG
CCTGACGGCTTGGCCAGTAAGTCGACCTATCCTCCAATTGAGAAAGCGGCCAACACGGAA
AACAGGAAGAAGCGGACGCGTGTGATGGGAAATAATAGCTACAATGGCTCTCGATCTCAGCT
GGAGCGTATGAACGTATTCACGAGGTGTGGATGAAACTCTGATTACTATTCGGCAACA
TCTCACGATCTGACTCGCTACTAGGCCAACGGTGACAAATATGTTCTCGTGCCTCTGGTGATCTCG
AGCCTGGTACCATGGACGCTGCGTCCGTGCCGGTCCCTCGCGAGCTATCCGTCCCACAACTTCGTCT
TCGGCCAGTCGGTGCTGGTAACAACTGG

Figura 2 anexo II: secuencia fragmento β -tubulina buitre quebrantahuesos.

TGGTATGCTTGACCTCAAAGCTGGATGACGGGTGATTGGGATCTCTCATCTTAGCAGGCTACCTCCA
TGGGTTAGCCTCACTGTATGGGTACAGCTAACAAATCTACAGGCAGACCCTCTGGTGAGCATGG
CCTGACGGCTTGGCCAGTAAGTCGACCTATCCTCCAATTGAGAAAGCGGCCAACACGGAA
AACAGGAAGAAGCGGACGCGTGTGATGGGAAATAATAGCTACAATGGCTCTCGATCTCAGCT
GGAGCGTATGAACGTATTCACGAGGTGTGGATGAAACTCTGATTACTATTCGGCAACA
TCTCACGATCTGACTCGCTACTAGGCCAACGGTGACAAATATGTTCTCGTGCCTCTGGTGATCTCG
AGCCTGGTACCATGGACGCTGCGTCCGTGCCGGTCCCTCGCGAGCTATCCGTCCCACAACTTCGTCT
TCGGCCAGTCGGTGCTGGTAACAACTGG

Figura 3 anexo II: secuencia fragmento β -tubulina estornino negro.

TGGTATGCTTGACCTCAAAGCTGGATGACGGGTGATTGGGATCTCTCATCTTAGCAGGCTACCTCCA
TGGGTTAGCCTCACTGTATGGGTACAGCTAACAAATCTACAGGCAGACCCTCTGGTGAGCATGG
CCTGACGGCTTGGCCAGTAAGTCGACCTATCCTCCAATTGAGAAAGCGGCCAACACGGAA
AACAGGAAGAAGCGGACGCGTGTGATGGGAAATAATAGCTACAATGGCTCTCGATCTCAGCT
GGAGCGTATGAACGTATTCACGAGGTGTGGATGAAACTCTGATTACTATTCGGCAACA
TCTCACGATCTGACTCGCTACTAGGCCAACGGTGACAAATATGTTCTCGTGCCTCTGGTGATCTCG
AGCCTGGTACCATGGACGCTGCGTCCGTGCCGGTCCCTCGCGAGCTATCCGTCCCACAACTTCGTCT
TCGGCCAGTCGGTGCTGGTAACAACTGG

Figura 4 anexo II: secuencia fragmento β -tubulina buitre leonado.

TGGTATGCTTGACCTCAAAGCTGGATGACGGGTGATTGGGATCTCTCATCTTAGCAGGCTACCTCCA
TGGGTTAGCCTCACTGTATGGGTACAGCTAACAAATCTACAGGCAGACCCTCTGGTGAGCATGG
CCTGACGGCTTGGCCAGTAAGTCGACCTATCCTCCAATTGAGAAAGCGGCCAACACGGAA
AACAGGAAGAAGCGGACGCGTGTGATGGGAAATAATAGCTACAATGGCTCTCGATCTCAGCT
GGAGCGTATGAACGTATTCACGAGGTGTGGATGAAACTCTGATTACTATTCGGCAACA
TCTCACGATCTGACTCGCTACTAGGCCAACGGTGACAAATATGTTCTCGTGCCTCTGGTGATCTCG
AGCCTGGTACCATGGACGCTGCGTCCGTGCCGGTCCCTCGCGAGCTATCCGTCCCACAACTTCGTCT
TCGGCCAGTCGGTGCTGGTAACAACTGG

Figura 5 anexo II: secuencia fragmento β -tubulina espátula.

TGGTATGCTTGACCTCAAAGCTGGATGACGGGTGATTGGGATCTCTCATCTTAGCAGGCTACCTCCA
TGGGTTAGCCTCACTGTATGGGTACAGCTAACAAATCTACAGGCAGACCCTCTGGTGAGCATGG
CCTGACGGCTTGGCCAGTAAGTCGACCTATCCTCCAATTGAGAAAGCGGCCAACACGGAA
AACAGGAAGAAGCGGACGCGTGTGATGGGAAATAATAGCTACAATGGCTCTCGATCTCAGCT
GGAGCGTATGAACGTATTCACGAGGTGTGGATGAAACTCTGATTACTATTCGGCAACA
TCTCACGATCTGACTCGCTACTAGGCCAACGGTGACAAATATGTTCTCGTGCCTCTGGTGATCTCG
AGCCTGGTACCATGGACGCTGCGTCCGTGCCGGTCCCTCGCGAGCTATCCGTCCCACAACTTCGTCT
TCGGCCAGTCGGTGCTGGTAACAACTGG

Figura 6 anexo II: secuencia fragmento β -tubulina azor.

