



**Facultad de Veterinaria
Universidad** Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en Veterinaria

ASPERGILOSIS EN RAPACES. Estudio clínico-lesional, microbiológico y genético de los aislamientos.

ASPERGILLOYSIS IN RAPTORS. Clinical, pathological, microbiological, and genetic studies of the isolates.

Autor

SILVIA DIEGO ALASTRUÉ

Directores

BERNARDINO MORENO BURGOS
INMACULADA MARTÍN BURRIEL

Facultad de Veterinaria

2016

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
ASPERGILOSIS EN AVES	3
PATOGENIA.....	4
CUADRO CLÍNICO	5
LESIONES.....	6
DIAGNÓSTICO.....	6
• Diagnóstico clínico y anatopatológico	7
• Diagnóstico microbiológico	8
• Diagnóstico molecular.....	9
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	11
METODOLOGÍA.....	12
VALORACIÓN DE LOS HALLAZOS CLÍNICOS Y LESIONES MACROSCÓPICAS	12
DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO.....	12
DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO	13
DIAGNÓSTICO MOLECULAR.....	13
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	18
HISTORIA CLÍNICA.....	18
HALLAZOS MACROSCÓPICOS.....	18
DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO	18
DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO	19
DIAGNÓSTICO MOLECULAR.....	19
CONCLUSIONES	21
CONCLUSIONS	22
VALORACIÓN PERSONAL.....	23
BIBLIOGRAFÍA – REFERENCIAS	24
ANEXO I	27
ANEXO II	28
ANEXO III	29

RESUMEN

Título: Aspergilosis en rapaces. Estudio clínico-lesional, microbiológico y genético de los aislamientos.

La aspergillosis es una enfermedad de gran importancia en aves rapaces en libertad y en cautiverio, aunque es en esta situación donde se manifiesta especialmente. El principal agente causal es *Aspergillus fumigatus*, y con menor frecuencia, otras especies como *A. flavus*, *A. niger*, *A. nidulans* o *A. terreus*. No obstante, es una enfermedad multifactorial muy dependiente del ambiente y del manejo.

Entre la sintomatología se incluyen los procesos respiratorios. Puede presentar curso agudo o crónico y la distribución de las lesiones puede ir de local a sistémica.

En los últimos años están apareciendo especies crípticas de *Aspergillus*, es decir aquellas indiferenciables macroscópicamente en el cultivo microbiológico ni por el resto de pruebas diagnósticas clásicas. Además, presentan una mayor resistencia a antifúngicos.

Por ello, el objetivo de este trabajo fue estudiar mediante técnicas moleculares casos de aspergillosis en rapaces en los cuales se aisló *Aspergillus fumigatus*, para detectar la presencia o no de posibles especies crípticas, y relacionarlas con los datos clínicos y las lesiones.

Las muestras fueron remitidas desde el centro de Recuperación de Fauna silvestre de la Alfranca, de animales que presentaban síntomas y/o lesiones compatibles con la enfermedad.

Se realizó un estudio histopatológico de las muestras, un estudio microbiológico, con aislamiento en medio agar Sabouraud con cloranfenicol y se hizo una identificación basada en características macroscópicas y microscópicas.

Los cultivos microbiológicos fueron positivos a hongos en dos muestras, siendo compatibles con *Aspergillus fumigatus*. Se procedió a una identificación genética del agente implicado y así confirmar o descartar la identificación microbiológica. La secuenciación de un fragmento del gen de la beta-tubulina confirmó *Aspergillus fumigatus* como el agente causal de la patología en dos de las aves analizadas.

ABSTRACT

Title: Aspergillosis in raptors. Clinical, pathological, microbiological and genetic studies of the isolates.

Aspergillosis is an important disease in raptors both for wild birds and especially in animals kept in captivity. Several species are involved in this pathology, mainly *Aspergillus fumigatus* and less frequently others like *A. flavus*, *A. niger*, *A. nidulans* o *A. terreus*. However, aspergillosis is a multifactorial disease, very dependent on management and environmental conditions.

Respiratory signs are one of the main presentations. It can have an acute or chronic course and lesion distribution may be local or systemic.

Recently, *Aspergillus* cryptic species are appearing. These species are indistinguishable by standard methods from classical species. Moreover, they are more resistant to routine treatments.

The aim of this work was to achieve a more accurate diagnosis about the microorganisms causing disease, through their microbiologic and genetic characterization, to differentiate cryptic species. Additionally, it tried to correlate this characterization with the clinical signs and pathological findings.

Samples were obtained from raptors with signs or lesions suggesting aspergillosis and were collected at the Centro de Recuperación de Fauna Silvestre de la Alfranca.

Histopathology was performed by routine methods in those samples. Frozen samples were used for microbiological studies. They were cultured in Sabouraud with chloranfenicol and identified by gross and microscopic examination.

Microbiological cultures were positive in two samples, being compatible with *Aspergillus fumigatus*. Genetic analysis of the isolates was performed and the results compared with the previous microbiological identification.

Sequencing of a fragment of the beta -tubulin gene identified *Aspergillus fumigatus* in both isolates.

INTRODUCCIÓN

La aspergilosis es una infección fúngica provocada por hongos del género *Aspergillus*. Fue descrito por primera vez en 1729 por P. A. Micheli, quien comprobó que la cabeza conidial de este hongo se parecía a un "aspergillum" (instrumento utilizado para dispersar agua bendita) (1). La aspergilosis no es una enfermedad contagiosa siendo producida por especies de hongos saprófitos que viven en la materia orgánica en descomposición y que, habitualmente, se aprovechan de estados de inmunodepresión para producir infecciones oportunistas. No obstante, existen casos en los que el exceso de contaminación fúngica, especialmente del alimento o del ambiente, puede provocar una micosis sin existir un estado previo de inmunodeficiencia.

Debido a que la mayoría de los hongos que son importantes desde el punto de vista clínico producen, para su diseminación, esporas vehiculizadas por el aire, las micosis son generalmente infecciones del tracto respiratorio. A esto contribuye el pequeño tamaño de las esporas de algunas de las especies de *Aspergillus*, como las de *A. fumigatus*, mucho menor que las del resto de especies de este género (Richard & Thurston, 1983), lo cual dificulta que sean atrapadas en la cavidad nasal o la tráquea (2-4).

En el 95 % de los casos, el responsable de esta infección es *Aspergillus fumigatus* (5) seguido por *A. flavus* y otros como *A. niger*, *A. nidulans* o *A. terreus* (6). No obstante, en la mayoría de los estudios realizados hasta el momento, la identificación de las diferentes especies de hongos se realiza únicamente mediante métodos clásicos. En los últimos años se está observando la aparición de especies crípticas tras el uso de técnicas moleculares, por ello, en este estudio se plantea el uso de estas técnicas para la contrastación de los resultados obtenidos por las clásicas.

Aspergilosis en aves

En comparación con los mamíferos, las aves son particularmente susceptibles a *A. fumigatus*. Esta susceptibilidad, podría atribuirse a características anatómicas como la falta de epiglotis que actuaría como barrera frente a la entrada directa de partículas al tracto respiratorio inferior, la falta de diafragma que resulta en una carencia de reflejo tusígeno potente, la falta de epitelio celular pseudoestratificado ciliado en algunos tramos del tracto respiratorio (2) y/o a características celulares como la falta de macrófagos de superficie en las vías aéreas con una localización en el tejido conectivo atrial (7).

La aspergilosis aviar ha sido descrita en todo el mundo y se cree que prácticamente todas las especies de aves, tanto domésticas como salvajes, son susceptibles a la infección. No obstante, se ha observado que algunas especies parecen ser más sensibles que otras. Por ejemplo, entre las aves domésticas la aspergilosis es más frecuente en pavos que en pollos, mientras que en aves salvajes aparece con mayor frecuencia en rapaces, anátidas, córvidos y gaviotas, y menos frecuentemente en aves costeras. Incluso dentro de cada uno de estos grupos existen diferencias. Así por ejemplo, en el caso de las aves de presa, destacan por su susceptibilidad especies como: águila de cabeza blanca (*Haliaeetusleucocephalus*), águila real (*Aquila chrysaetos*), azor (*Accipitergentilis*), gavilán negro (*Accipitermelanoleucus*), halcón gris (*Falco rusticolus*), halcón de cola roja (*Buteojamaicensis*), halcón de patas ásperas (*Buteolagopus*), y el búho de las nieves (*Nycteascandiaca*) (8).

Además de la susceptibilidad a nivel de especie, existen otros factores que van a condicionar la aparición de la aspergilosis. Entre estos podrían citarse las condiciones ambientales, los factores inmunodepresores o la edad. Se ha observado que las malas condiciones ambientales favorecen un aumento de la concentración de esporas en el aire. Entre estas destacan los ambientes cálidos y húmedos, con escasa ventilación, poca limpieza y desinfección, así como el almacenamiento del alimento durante largos períodos de tiempo o la exposición a gases irritantes. Por otra parte, la inmunosupresión puede ser ocasionada por multitud de factores, por ejemplo, el cautiverio y manejo de animales de vida salvaje supone estrés para el animal; la cautividad es uno de los más importantes en aves rapaces. También la administración de fármacos como tetraciclinas, tratamientos prolongados con corticoides o vacunas pueden suponer estados de inmunodepresión. De igual forma puede ocurrir con enfermedades concomitantes como problemas metabólicos, dietas inadecuadas que deriven en carencias nutricionales (especialmente relevante la hipovitaminosis A), sobrepopulaciones o co-infecciones (6).

Respecto a la edad, en experimentos llevados a cabo en ciertas especies de aves (palomas y codornices japonesas) se ha observado que los animales jóvenes son más susceptibles a la infección por el hongo (9, 10). En pollos domésticos, una de las formas de presentación más importantes de la aspergilosis es la neumonía de la incubadora.

Patogenia

La principal vía de infección por *A. fumigatus* en aves, es la inhalatoria. Los sacos aéreos torácicos posteriores y abdominales son el lugar donde se localiza la infección primaria

ya que, una vez inhalado el aire, este llega directamente a ellos. Cuando los esporos alcanzan el parénquima pulmonar se activan las células fagocíticas (macrófagos alveolares y heterófilos) como mecanismo de defensa. Cuando la cantidad de esporos es muy elevada o el sistema inmune está alterado, hay un fracaso en la eliminación y comienza el crecimiento del hongo.

Los factores de virulencia del hongo todavía no se conocen bien, pero hay estudios que sugieren una resistencia de los conidios de *A. fumigatus* a los macrófagos respiratorios de las aves (6). En las últimas fases de la infección, las células dendríticas activan una respuesta inmune adaptativa específica caracterizada por la proliferación de linfocitos CD4 con respuesta Th1 (11, 12).

Las fases reproductivas de hongo, asexuales en el caso de *A. fumigatus* (13), se pueden apreciar en los tejidos. Las condiciones potenciales que pueden facilitar la reproducción del hongo son: la presencia de sacos aéreos cavernosos, la elevada T^a corporal de las aves (de 38 a 45 °C) y la sensibilidad a las glicotoxinas del hongo que provocan necrosis, generando así un ambiente rico en nutrientes para su crecimiento (2).

Cuadro clínico

La aspergilosis se puede clasificar en función del curso de la enfermedad en aguda o crónica.

- Aspergilosis aguda:

Cursa con una dificultad respiratoria de rápido desarrollo y cambios vocales en caso de verse afectada la siringe. También puede observarse anorexia, polidipsia y poliuria. En la mayoría de los casos acaba con la muerte del animal en un plazo de 1-7 días aunque, en ocasiones, no aparecen síntomas. Las lesiones serán locales centrándose principalmente en el pulmón.

- Aspergilosis crónica:

Se observan síntomas respiratorios acompañados de adelgazamiento, ambos con avance progresivo. Con menor frecuencia se describen daños oculares, tales como queratitis con blefaroespasmo, secreciones turbias o fotofobia así como afecciones neurológicas o cardíacas como *cor pulmonale* debido a la hipertensión pulmonar (6, 14).

Cuando aparece afectado el tracto respiratorio inferior, es frecuente encontrar una disfunción orgánica o una sintomatología gastrointestinal debido a la relación anatómica

estrecha entre los sacos aéreos y la cavidad celómica. Las lesiones serán de carácter sistémico, afectando a un gran número de órganos y estructuras.

Lesiones

Se reconocen dos tipos de reacciones tisulares, granulomatosa e infiltrativa. La primera, es de carácter focal, se trata de una lesión encapsulada en la que el tejido vascular no se ve afectado. En el caso de la infiltrativa, es una lesión superficial y difusa que, en la mayoría de las ocasiones, afecta a vasos sanguíneos. Aparece principalmente en pulmones y sacos aéreos, órganos muy ventilados. También pueden encontrarse una sección en la que se combine ambos tipos de reacciones (6).

El tracto respiratorio es el que aparece afectado con mayor frecuencia, observándose nódulos caseosos de color blanco-amarillento ubicados en los pulmones, sacos aéreos o tráquea. Los sacos aéreos pueden verse engrosados, opacos y con material fibrinoso. Además, pueden observarse lesiones en el pericardio y en otros órganos. En las rapaces es frecuente encontrar lesiones en la bifurcación traqueal en casos leves. Además, en estas se asocia frecuentemente con alteraciones de la piel.

Diagnóstico

Para la identificación de la especie de *Aspergillus*, se utilizan técnicas clásicas como el estudio de las características macro y microscópicas de los cultivos. Además, en los últimos años se han incorporado técnicas moleculares y analíticas como la secuenciación de los genes de la β -tubulina, calmodulina y actina o la amplificación de DNA polimórfico al azar (RAPD). Las técnicas más modernas, permiten un diagnóstico rápido y han desvelado errores en aquellos diagnósticos basados únicamente en la identificación de *A. fumigatus* mediante sus características morfológicas (15).

Hasta el momento, *A. fumigatus* era considerado como el único y más importante *Aspergillus* patogénico conocido dentro de la Sección *Fumigati*, situación que ha cambiado recientemente con la descripción de casos clínicos que incluyen, *Neosartorya pseudofischeri*, *A. lentulus* (resistente a múltiples antifúngicos) y *A. undagawe* (*Neosartorya*) como especies patógenas relacionadas con *A. fumigatus* (15).

- **Diagnóstico clínico y anatomopatológico**

Como punto de partida, se deben valorar los síntomas clínicos que presenta el paciente, para establecer un diagnóstico diferencial que nos permita acercarnos a la causa real del problema.

A continuación se describen algunas pruebas de apoyo:

A. Técnicas de diagnóstico por imagen:

- Radiografía: técnica no invasiva en la cual se pueden apreciar cambios sutiles en la radiopacidad pulmonar y la pérdida de definición de la silueta cardiaca. Estos son hallazgos inespecíficos y por lo general asociados a un estado de infección avanzado. No aporta un diagnóstico definitivo (16).

- Tomografía computerizada y resonancia magnética: precisan de anestesia del paciente durante un largo periodo de tiempo lo cual se desaconseja para animales débiles. Permiten obtener imágenes tridimensionales y son útiles para el seguimiento del tratamiento. Son equipos complejos por lo que su disponibilidad es escasa (16).

- Endoscopia: técnica invasiva que requiere de la sedación del animal, pero que permite la observación directa del crecimiento fúngico y sus lesiones y la toma de muestras mediante biopsia por aspiración con aguja fina para su posterior estudio o cultivo. Las lesiones en las primeras etapas pueden limitarse a una ligera turbidez o un aumento de la vascularización de los sacos aéreos (16).

B. Análisis laboratorial

En la hematología, se observa heterofilia, leucocitosis, linfopenia, monocitosis y anemia no regenerativa especialmente en las formas crónicas. Con la alteración de valores normales se evidencia que hay un proceso infeccioso pero de manera inespecífica. Ocurre lo mismo con la bioquímica sanguínea, en la que los parámetros alterados dependen del órgano dañado por el hongo y sus toxinas (16).

En el proteinograma (por la técnica de electroforesis proteica), es característico de la Aspergilosis, encontrar hiperproteinemia con hipalbuminemia e hiperglobulinemia y un descenso del ratio albumina/globulina (≤ 0.5). Sin embargo se han descrito casos en los que los valores son normales. Se trata de una prueba todavía en estudio para una mejor comprensión de los resultados (16).

En cuanto a la detección de anticuerpos mediante técnicas como ELISA, hay estudios que indican que permite identificar casos de aspergilosis activa cuando todavía los signos clínicos son escasos resultando de gran ayuda a la hora de decidir el inicio de un tratamiento; también resulta útil para el seguimiento de respuesta al tratamiento. No obstante debe acompañarse de otras pruebas porque pueden aparecer falsos positivos por la ubicuidad del agente así como falsos negativos (16).

La detección de antígenos mediante el kit comercial de GM (Galactomanano, componente de la pared celular del hongo) ELISA sándwich ha demostrado una baja sensibilidad para halcones. Lo que advierte de la necesidad de investigar para mejorar esta técnica en su aplicación en aves (16).

La detección de toxina fumigaclavina A (FuA), mediante inmunoensayos enzimáticos, ha presentado buenos resultados para muestras de tejidos, sin embargo no ha ocurrido lo mismo en el caso de muestras de plasma y suero sanguíneo (16).

C. Estudio anatomo-patológico

En el caso de que el desenlace sea fatal para el animal, es interesante la realización de una necropsia del cadáver con la mayor brevedad posible para evitar las alteraciones orgánicas derivadas del proceso de descomposición.

Las muestras tomadas son procesadas en el laboratorio para su observación microscópica. La diferenciación de especies mediante esta técnica, necesita un entrenamiento profesional y se basa en la observación de las estructuras especializadas. En el caso de *Aspergillus*, produce esporas asexuales (conidios, mitosporas) sobre un conidióforo en cuyo ápice se dilata formando una vesícula.

- **Diagnóstico microbiológico**

Algunos de los parámetros a valorar en esta prueba de utilidad en la clasificación subgenéricas son: color de los conidios por el anverso y color de pigmentos en el reverso, el diámetro de las colonias (en mm) que puede variar según las condiciones de H^a y T^a, la producción de esclerocios (masa redondeada compacta de micelio endurecido que contiene reservas alimenticias desarrollada para resistencia a condiciones desfavorables, con diversidad de colores y tamaños), generalmente, asociadas a la sección: *Candidi*, *Circumdati*, *Flavi* o, *Nigri*, - o cleistotecios (estructura reproductiva de un Ascomycete con forma esférica o semiesférica,

que en su interior encierra a las esporas) , principalmente asociada a los géneros *Eurotium*, *Neosartorya* y *Emericella*).

También se puede valorar la capacidad de reproducción sexual, la cual acontece mediante la formación de cleistotecios (*Ascomycota*, *Pezizomycotina*, *Eurotiomycetes*, *Trichocomaceae*), compuestos por ascosporas agrupadas en ascos dispuestos en el centrum de manera desordenada.

Existen 11 géneros teleomórficos dentro del género anamórfico *Aspergillus* y sus subgéneros, que se diferencian en función de la forma, color, tamaño, estructura y superficie, entre otras, de las ascosporas.

Algunos de los problemas que plantea esta técnica son la necesidad de un tiempo de incubación adecuado para poder evaluar las características y de un conocimiento mínimo sobre la taxonomía del género *Aspergillus* (17, 18).

- **Diagnóstico molecular**

Las técnicas moleculares surgieron ante la necesidad de alcanzar un reconocimiento rápido y exacto del agente causal de la infección fúngica, incluso en ausencia de una sintomatología específica, para la correcta instauración de una terapia antifúngica, clave para reducir la alta mortalidad que presenta en la actualidad esta patología (18).

En los últimos años se han diseñado varios marcadores moleculares, basados en la secuenciación de fragmentos génicos, para la identificación de hongos patógenos (Tabla 1 de Anexo I) y para el diagnóstico de la aspergilosis invasora (Tabla 2 de Anexo I).

Dentro del reino *Fungi*, los cambios taxonómicos derivados de los diversos estudios filogenéticos han afectado a un gran número de géneros y especies patógenos para el hombre. A su vez, el análisis de secuencias de numerosos aislados clínicos ha incrementado sustancialmente el conocimiento de la diversidad de especies capaces de ocasionar micosis.

La aplicación de técnicas moleculares tiene grandes ventajas, entre ellas la detección del hongo en las primeras fases de la enfermedad. Pero destaca por su importancia, conseguir diferenciar las especies de *Aspergillus* de mayor relevancia médica, ya que, una identificación errónea de la especie, repercute en el éxito o fracaso del tratamiento farmacológico.

Es en este punto donde adquiere interés el concepto de especies crípticas: “*muchas especies, que tradicionalmente habían sido consideradas como simples morfoespecies, constituyen en realidad complejos de especies, en muchas ocasiones solo diferenciables molecularmente*” (19). Desde un punto de vista clínico, el interés radica, no solo en la mayor velocidad de obtención de resultados, sino también en las variaciones de virulencia y en la respuesta a los antifúngicos que presentan las diferentes especies, importante a la hora de elegir un tratamiento.

Se han publicado recomendaciones para la identificación molecular de cepas clínicas de *Aspergillus* a nivel de especie. Inicialmente, se identifica fenotípicamente al aislado y se continúa con la secuenciación de la región ITS (espaciador transcribible interno) del 18s-28s rRNA o de los genes de la β-tubulina o calmodulina (19).

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Hasta el momento, la evaluación de caracteres morfológicos ha sido la principal herramienta para la determinación del agente etiológico causante de la aspergilosis.

Sin embargo, en la actualidad, el avance de la tecnología, en particular en el campo de la biología molecular, ha permitido la identificación de lo que se conoce como *especies crípticas*, aquellas que son morfológicamente similares, pero diferentes genéticamente. Se cree que es un campo por profundizar y por ello se sigue estudiando.

En el campo de la clínica, los nuevos métodos diagnósticos aumentarían la probabilidad de éxito del tratamiento, ya que cuenta con una mayor precisión en la identificación del agente causal y una mayor rapidez de obtención de resultados permitiendo la instauración del tratamiento específico, en un estadio menos avanzado de la enfermedad. Además, presenta la posibilidad de detección de patógenos en muestras de pacientes que están recibiendo terapia antifúngica ya que la viabilidad del hongo no es imprescindible para el diagnóstico.

Con todo ello, no se busca desprestigiar a las técnicas clásicas, que siguen siendo claves en microbiología, pero si dar a conocer las ventajas que presenta el uso de las técnicas más avanzadas a la hora de realizar un diagnóstico más exacto y precoz.

Para la realización de este trabajo, se ha hecho un seguimiento diagnóstico de tres rapaces, partiendo de la historia clínica recibida hasta la identificación de género y especie del agente etiológico mediante secuenciación.

Los **objetivos** principales de este trabajo fin de grado son:

- Estudio de las aspectos clínicos y características lesionales, tanto macroscópicas como microscópicas, asociadas a la infección fúngica.
- Aislamiento del agente causal de la patología.
- Estudio morfológico del aislado, tanto macroscópico como microscópico, con el fin de aproximar la identificación del agente.
- Diagnóstico molecular del agente causal de la patología mediante amplificación y secuenciación de un fragmento del gen de la β -tubulina.

METODOLOGÍA

Valoración de los hallazgos clínicos y lesiones macroscópicas

Estos dos factores se valoraron a partir de la historia recibida.

Diagnóstico histopatológico

En este estudio se parte de muestras identificadas y acompañadas por una hoja de registro en la que aparece el historial clínico del animal y los hallazgos más relevantes de la necropsia realizada por los veterinarios encargados en el Centro de Recuperación de Fauna Silvestre de La Alfranca, en Zaragoza.

Las muestras se correspondieron con tres rapaces, un águila ratonera (muestra nº 1), un alimoche (muestra nº 2) y un buitre leonado (muestra nº 3) y fueron recibidas inmersas en formol en una proporción 1:10 en un recipiente cerrado. Este protocolo se utiliza para evitar alteraciones postmortem en las muestras. El formol fija en 24 horas una muestra de un grosor de 3-5 milímetros (20), con lo que fueron necesarios un par de días para completar el proceso de fijación. Se busca que el tejido mantenga una estructura lo más parecida a la original, al estimular la formación de enlaces cruzados entre las proteínas.

Tras la fijación, se realizó el tallado, es decir, el corte fino de los diferentes órganos con o sin lesiones representativas para su posterior inclusión en parafina. Estos cortes se introdujeron en "cassettes" o pequeños recipientes de plástico que permiten la penetración de los diferentes reactivos empleados en la inclusión. Las zonas de interés se colocan hacia abajo ya que serán las que se corten con el micrótomo y se tiñan para visualizarlas al microscopio.

El siguiente paso fue la inclusión en parafina. Para ello, se los cortes de los distintos órganos se sumergieron inicialmente en agua corriente para eliminar el exceso de formol y, posteriormente, se pasaron por concentraciones crecientes de alcoholos con el objeto de deshidratar los tejidos; finalmente se sumergieron en parafina líquida. El proceso suele durar unas 18 horas. Tras este periodo, los cassettes se sacaron del inclusor y se transportaron a un montador de bloques. En este, se introdujeron en parafina líquida, a una temperatura de 56 – 60 °C. Se mantuvieron unas 3 horas para permitir su penetración en los tejidos. Para la formación de los bloques de parafina, las muestras se pasaron a un recipiente metálico, el cual se dejó enfriar permitiendo liberar el bloque de parafina solidificada.

El siguiente paso consistió en el corte de los bloques con el micrótomo; para ello, se realizaron secciones de 4 micras, previo enfriamiento en hielo de los mismos. Estas secciones se sumergieron en agua caliente a unos 45 °C para que la parafina se estirara y posteriormente se recogieron en un portaobjetos de cristal.

El último paso del procesado consistió en la tinción de las secciones para su visualización al microscopio. Para ello, las secciones se desparafinaron con xilol y se hidrataron en alcoholes de concentraciones decrecientes; a continuación se sumergieron en los colorantes y posteriormente se deshidrataron en concentraciones crecientes de alcoholes, montándose de forma permanente con DPX, un medio de montaje compuesto por una resina especial. Las tinciones empleadas en estos casos son las de rutina, es decir la Hematoxilina-Eosina, y una específica para la demostración de hongos, como es el PAS (técnica de Schiff o ácido periódico de Schiff).

Todo el proceso, se realizó en un laboratorio equipado con una campana de extracción para evitar la inhalación de gases irritantes que se pueden desprender durante la manipulación y acompañado con el uso de Equipos de Protección Individual (mascarillas, guantes).

Diagnóstico microbiológico

A partir de las muestras refrigeradas o congeladas obtenidas en la necropsia, se procedió a su cultivo. El medio de cultivo empleado, fue el agar Sabouraud complementado con cloranfenicol. El pH del agar empleado (5.6 +/- 0.2) actúa como barrera frente al crecimiento de flora contaminante, no obstante, se complementa con este antibiótico para un mejor control de esta.

Las muestras se incubaron a una temperatura de 37 °C durante 18 a 24 horas, estas condiciones se consideran el mejor método para el cultivo de especies de *Aspergillus* (8).

Tras el aislamiento, el hongo fue estudiado macroscópicamente en la placa, observándose sus características tanto en el anverso como en el reverso de la misma.

El estudio microscópico se realizó mediante la técnica de lactofenol para *Aspergillus spp.* y mediante tinción simple para las levaduras.

Diagnóstico molecular

Las técnicas de biología molecular basadas en detección de ácidos nucleicos, a diferencia de las inmunológicas, están escasamente implantadas en los laboratorios de microbiología en

general, por lo que se dispone de pocos protocolos estandarizados con el aval de un uso amplio y contrastado.

En base a los resultados de un trabajo previo del grupo en diagnóstico de aspergilosis en el cual se estudiaron algunas de las regiones de DNA con mayor interés en filogenia y taxonomía de los hongos (18S rRNA, ITS y β-tubulina), se decidió seleccionar para nuestro estudio la β-tubulina, ya que fue discriminante en la identificación del agente en dicho trabajo (21).

A partir de las 3 placas de Petri que contenían los cultivos puros de las muestras de pulmón, tráquea e hígado de cada animal, se realizó una extracción del DNA. Para ello, se hizo un raspado profundo sobre los crecimientos de las placas con el fin de arrastrar suficiente material genético. Se tomaron 2 colonias puras de cada una de las placas. A estas colonias las denominamos 1a y 1b para la primera placa que se corresponde con las muestras de águila ratonera, 2a y 2b para la segunda que se corresponde con las muestras de alimoche y 3a y 3b para la muestra del buitre leonado en la cual, crecieron levaduras de varios tipos.

Para la extracción del material genético se utilizó el kit *Tissue&cells genomic Prep Mini Spin®* de GE healthcare. Se siguieron las indicaciones facilitadas en el manual.

Un resumen del proceso:

- El material extraído se introdujo en tubos con unas perlas de cerámica y PBS y se homogeneizó en un homogeneizador de tejidos mediante agitación a gran velocidad (TissueLyser II, BioRad).
- El homogenizado se introdujo en un tubo de plástico de 1,5 mL y se combinó con un volumen de 50 µL de *Lysis solution 1*, solución de lisis que contiene detergentes, que son los encargados de digerir la membrana lipídica, y proteinasa K, enzima que se ocupa de la degradación de las histonas, proteínas que forman la cromatina junto al DNA.
- A la mezcla se le añadieron 500 µL *Lysis solution 2*, solución de lisis que contiene alcoholes que producen la deshidratación y precipitación de los ácidos nucleicos insolubles en alcohol.
- El homogeneizado mezclado con las soluciones de lisis se cargó en columnas de afinidad para la unión de las moléculas de DNA y precipitación y eliminación de todo el resto de líquidos y partículas.

- Las columnas se lavaron con *Wash Buffer* (tampón de lavado que contiene alcoholes en menor proporción).
- Finalmente las columnas se pasaron a nuevo tubo de plástico y se adicionaron 100 µL de *Elution buffer*, una solución que contiene EDTA, sustancia inhibidora de la acción de las enzimas DNAsas y tampón tris (trishidroximetilaminometano) precalentado. Este paso tiene como objetivo que el DNA se libere y pueda ser recogido.

A continuación, se realizó una cuantificación de ácidos nucleicos con el espectrofotómetro NanoDrop. El uso de este aparato no requiere diluir la muestra y nos proporciona la concentración en ng/µL. De cada muestra problema se usaron 2 µL. Antes de realizar la lectura se preparó una muestra “testigo” o “blanco” compuesta por 2 µL de *Elution buffer*.

El siguiente paso consistió en la amplificación del material genético mediante la técnica de PCR, que consiste en multiplicar un determinado fragmento de DNA presente en muestras biológicas, obteniéndose millones de copias del fragmento. Se llevó a cabo en un termociclador AB2720 (AppliedBiosystems), aparato que permite programar tiempo y temperatura, para cada paso del proceso.

La reacción de amplificación constó de 30 ciclos, no más para evitar la amplificación de la contaminación. Las temperaturas y el tiempo programados para cada fase fueron los siguientes:

- Desnaturalización: 96 °C durante 30 segundos
- Unión de cebadores: 55 °C durante 30 segundos
- Elongación: 72 °C durante 30 segundos

En nuestro caso, se utilizaron los cebadores específicos para la región del gen de la β-tubulina: Bt2a como cebador directo y Bt2b como cebador reverso. La secuencia de nucleótidos de los cebadores son las siguientes (22, 23):

- Bt2a (5' a 3'): GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCTTC
- Bt2b (5' a 3'): ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC

La β-tubulina es una proteína globular que constituye junto con la α-tubulina los microtúbulos de las células eucariotas. A pesar que esta proteína está muy conservada entre eucariotas, la comparación de regiones intrónicas permite (24).

Se preparó mezcla de amplificación para 7 muestras (6 muestras problema más el control negativo). El volumen final de la reacción fue de 50 µL que consistió en 5 µL de DNA genómico y 45 µL de una solución compuesta por:

- 29 µL de agua ultrapura tipo I
- 5 µL de Buffer 10X
- 1,5 µL de cloruro de magnesio (100 mM)
- 0,5 µL de Bt2a (20pmol/µL) y 0,5 µL de Bt2b (20 pmol/µL)
- 8 µL de dNTPs (1.25 mM cada uno)
- 0.5 µL de Taq polimerasa (5 u/µL)

Se visualizó el producto resultante de la PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % (preparado mezclando 0,45 gramos de agarosa en 30 mL de disolución tampón TBE 1X, Tris/Borato/EDTA). La electroforesis consiste en la separación de los ácidos nucleicos a través de una matriz tamponada, en este caso agarosa. La matriz funciona como un filtro, separando las moléculas en un campo eléctrico, de acuerdo al tamaño y la carga neta que poseen. El grupo fosfato es el responsable de la respuesta al campo eléctrico por la fuerte carga negativa que presenta en condiciones de pH neutro, que hace que los fragmentos migren hacia el polo positivo (ánodo) durante la electroforesis. La velocidad de separación depende de la concentración del gel y del voltaje eléctrico aplicado. La migración hacia el ánodo es más rápida cuanto menor sea el tamaño del fragmento (25).

En uno de los pocillos de carga del gel se incorporó una solución patrón de DNA de peso molecular conocido (fragmentos que difieren en 100pb), para facilitar la interpretación posterior de las muestras problema.

Tras la aplicación de la corriente (10-20 minutos, 100 voltios y 50 mA), se procedió a la observación del gel bajo la luz ultravioleta. El DNA emite una fluorescencia naranja al unirse al bromuro de etidio, sustancia intercalante del DNA que se añade en la elaboración del gel.

Una vez confirmada la amplificación, las reacciones de PCR se purificaron mediante un método enzimático (ExoSapIt, USB) para eliminar restos de nucleótidos y cebadores que pueden interferir en los resultados de la secuenciación.

La secuenciación se realizó en un servicio de secuenciación externo (StabVida, Portugal) por el método enzimático de Sanger, este método está basado en el uso de dideoxinucleótidos (ddNTP) que se diferencian de los deoxinucleótidos (dNTP) en que carecen del grupo OH en el carbono 3' de la ribosa.

Cuando uno de estos ddNTP se une a la cadena no permite la incorporación de un nuevo nucleótido y la replicación se detiene. La incorporación al azar de un dideoxinucleótido en el lugar del correspondiente deoxinucleótido, deriva en la formación de fragmentos de distintas longitudes complementarios a las hebras del DNA que está siendo secuenciado (26).

Cada uno de los dideoxirribonucleótidos está unido a un fluorocromo distinto que va a excitarse con la luz emitiendo un color determinado que se capta en el aparato de lectura, generando un cromatograma (gráfico en el cual se sitúa cada color detectado en su posición real de la cadena secuenciada). Conociendo el color con el que se corresponde cada nucleótido podemos obtener la secuencia de nucleótidos.

Cada fragmento de PCR se secuenció por ambos extremos (utilizando el cebador directo y el reverso en distintas reacciones) y los cromatogramas se analizaron con el programas informático Bioedit® se encarga de realizar la correlación entre señal de fluorescencia y nucleótido y nos permite visualizar la secuencia y analizarla (Imagen 1 de Anexo II).

Los secuencias parciales obtenidas se editaron para obtener la secuencia completa y, empleando la herramienta informática BLAST, se procedió a la comparación de las secuencias de estas cepas problema con las de las cepas control conocidas en una de las bases de datos de referencia, Gen Bank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/index.html>) para encontrar aquellas con las que presente una mayor identidad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Historia clínica

El águila ratonera (muestra 1) fue encontrada viva, con desnutrición, y tras 17 días en el centro de recuperación muere. El alimoche (muestra 2) fue hallado vivo con sintomatología de envenenamiento, muriendo a los dos días de ingreso en el centro. El buitre (muestra 3) fue encontrado vivo por un particular, alimentándolo durante varios días, y muriendo finalmente.

Hallazgos macroscópicos

En el águila ratonera (muestra 1) se observó un exudado caseoso y la presencia de granulomas discoidales con centro prominente, de 4 a 7 milímetros de diámetro, en los sacos aéreos, pulmón y corazón. Uno de estos aparecía repleto de colonias fúngicas azuladas.

En el alimoche (muestra 2) aparecieron tres placas de colonias fúngicas de 2-3 milímetros de diámetro en el tercio medio del epitelio de la tráquea.

En el buitre (muestra 3) se observaron nodulillos blancos, brillantes e irregulares, de menos de 1 milímetro de diámetro, salpicando densamente los sacos aéreos y la cara costal de ambos pulmones. En el periostio del coracoides izquierdo se observaron dos nodulillos.

Diagnóstico histopatológico

Microscópicamente, las lesiones observadas en el águila ratonera (muestra 1) se caracterizaban por la presencia de granulomas multifocales en pulmón, corazón y sacos aéreos. Estos presentaban un centro necrótico eosinofílico rodeado de macrófagos y células multinucleadas, y más externamente fibrosis en algunos de ellos (Imagen 1 de Anexo III). No se observó la presencia de estructuras fúngicas.

En el alimoche (muestra 2), la historia clínica mencionaba la presencia de tres placas de colonias fúngicas, de 2 a 3 milímetros de diámetro en el tercio medio del epitelio de la luz traqueal, sin embargo, las muestras remitidas en formol no contenían tráquea. En el estudio histológico de las muestras de pulmón no se apreciaron lesiones compatibles con hongos, apreciándose exclusivamente fenómenos vasculares con intensa hiperemia.

En el buitre leonado (muestra 3), se observaron, en el pulmón, granulomas semejantes a los descritos en el águila ratonera, sin embargo en este caso se evidenciaron estructuras fúngicas compatibles con hongos filamentosos.

Las lesiones observadas en el águila ratonera y el buitre son características de aspergilosis, y en este segundo además con la típica presencia de estructuras fúngicas en el seno de las mismas. Curiosamente, en el águila se aisló *A. fumigatus*, mientras que en el buitre se aislaron levaduras. Esto podría explicarse por la diferente distribución del hongo en las lesiones en el caso del águila. No obstante, los hallazgos microbiológicos del buitre son atípicos ya que las lesiones asociadas a *Candida* spp. aparecen predominantemente en el aparato digestivo, especialmente en el buche. Por lo que respecta al alimoche la ausencia de lesiones microscópicas en pulmón sugiere que las lesiones solo se encontraban en la bifurcación traqueal, algo habitual en casos leves de aspergilosis en rapaces, y que las muestras remitidas no tenían lesiones.

Diagnóstico microbiológico

El cultivo microbiológico resultó en crecimiento positivo en las tres rapaces, siendo compatible con *A. fumigatus* en las muestras 1 y 2, y compatible con levaduras en la muestra del buitre. El tiempo de crecimiento fue rápido, apareciendo en dos días. En el anverso, la superficie de las colonias compatibles con *A. fumigatus*, en su máximo crecimiento, eran algo aterciopeladas con el centro grisáceo o verdoso y los bordes blanquecinos (Imagen 2 del Anexo III). En el reverso aparecían blanquecinas. Microscópicamente, se observaban hifas septadas e hialinas, y los conidióforos en forma de aspérgilo. En el buitre, se observaron tres tipos de colonias diferentes las cuales variaban en color, siendo algunas de color rosa y otras blanco. Microscópicamente, aparecían como estructuras ovaladas de color azul y de unas 3-6 micras de tamaño.

Diagnóstico molecular

A partir de los cultivos microbiológicos, se extrajo el material genético problema y se hizo la lectura con el espectrofotómetro NanoDrop. La cuantificación de ácido nucleico es una medida de control básica para garantizar unos resultados de PCR válidos. Los resultados obtenidos fueron:

Muestra 1a 8.13 ng/μL; Muestra 2a 8.08 ng/μL; Muestra 3a 22.09 ng/μL; Muestra 1b 11.27 ng/μL; Muestra 2b 18.90ng/μL; Muestra 3b 9.78 ng/μL.

Tras una revisión bibliográfica (27) y con la experiencia previa de experimentos realizados de secuenciación de *Aspergillus* por el grupo con el que he realizado este trabajo, se consideró el uso de cebadores específicos para la región del gen de la β-tubulina para el diagnóstico molecular, frente a ITS o 18S rRNA, porque se considera que éstas últimas no son regiones suficientemente discriminatorias para detectar distintas especies del género *Aspergillus* (21).

Tras la amplificación mediante PCR, se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % obteniendo la imagen que se muestra en la Imagen 3 del Anexo III.

El uso de secuenciación nos permite valorar el tamaño, la composición nucleotídica y el orden de las bases en el fragmento de DNA en estudio. Esto nos permite identificar y distinguir la práctica totalidad de las especies fúngicas.

En el presente trabajo, las secuencias obtenidas tuvieron una talla de 550 pares de bases. Este resultado concuerda con el tamaño de fragmento de β-tubulina obtenido por otros autores (entre 402 y 510 pb), utilizando las mismas condiciones, para distintas especies de *Aspergillus* sp. (27).

En la figura 1 del Anexo III, se muestran las secuencias obtenidas detalladamente, las secuencias subrayadas se corresponden con los cebadores directo y reverso.

Tras la comparación de nuestras secuencias problema con la base de datos GenBank, mediante la herramienta BLAST, se concluyó que todos los aislados pertenecían a la misma especie. Las secuencias obtenidas mostraban un 100 % de cobertura e identidad con las correspondientes a cinco aislados de *Aspergillus fumigatus* recogidos en la base de datos (Figura 2 de Anexo III).

Estos hallazgos sugieren que el gen de la β-tubulina es útil en la identificación de *Aspergillus fumigatus* a nivel de especie y que en estas dos rapaces, la sospecha inicial de aspergilosis por este agente se mantiene, no asociándose a especies crípticas. No obstante, deberían estudiarse más casos de aspergilosis en rapaces para poder asegurar que son realmente producidos por *A. fumigatus* y no por alguna especie críptica.

El estudio del gen de la β-tubulina también se realizó en las levaduras aisladas del buitre, siendo los resultados negativos. Esto sugiere que la divergencia en la secuencia de este gen entre levaduras y hongos del género *Aspergillus* es alta, al menos en la región en la que

hibridan los cebadores utilizados. Se requieren más estudios analizando otros fragmentos de DNA como la región ITS para identificar las levaduras aisladas.

CONCLUSIONES

Tras la realización de este trabajo fin de grado podemos extraer las siguientes conclusiones:

1. Los síntomas clínicos observados en las rapaces analizadas eran inespecíficos no pudiéndose sospechar de aspergilosis.
2. Las lesiones macroscópicas son sugerentes de aspergilosis en algunos casos, especialmente si aparecen estructuras que recuerdan a hongos, con aspecto “enmohecido”.
3. El estudio histopatológico no ha mostrado lesiones compatibles con aspergilosis en algún caso (alimoche). Esto puede ser debido a las diferentes muestras utilizadas para el análisis microbiológico y el microscópico.
4. Las lesiones microscópicas observadas en el águila ratonera y en el buitre eran compatibles con aspergilosis, sin embargo, en el águila no se observaron estructuras fúngicas asociadas a las lesiones. Esto sugiere que el estudio histopatológico por sí solo podría no ser definitivo, debiéndose acompañar necesariamente de la historia clínica y de las lesiones macroscópicas.
5. El aspecto macroscópico y microscópico de las colonias aisladas en el medio Saboureaud, de las muestras procedentes del águila y del alimoche, sugerían *Aspergillus fumigatus*.
6. Se observó una gran concordancia entre los resultados microbiológicos y la secuenciación del gen de la β-tubulina, permitiendo confirmar los aislamientos como *A. fumigatus*.
7. Las condiciones de nuestro estudio para el análisis del gen de la β-tubulina no parecen ser útiles en la diferenciación de levaduras.

CONCLUSIONS

The results obtained in this TFG allowed us to conclude:

1. Clinical symptoms observed in these raptors were nonspecific and aspergillosis was not suspected.
2. Gross findings were suggestive of aspergillosis in some cases, especially when that moldy lesions appeared.
3. Histopathological examination showed no lesions consistent with aspergillosis in some cases (vulture). This might be due to different samples used for microbiological and microscopic analysis.
4. The microscopic lesions observed in the buzzard and vulture were consistent with aspergillosis, however, in the eagle no fungal structures were demonstrated within the lesions. This suggests that the histopathology alone may not be definitive, and it should be accompanied by the clinical history and gross findings.
5. The macroscopic and microscopic characteristics of the colonies isolated in the Saboureaud medium from the eagle and the vulture suggested *Aspergillus fumigatus*.
6. A good correlation between microbiological results and sequencing of the β -tubulin gene was found and both isolates were finally diagnosed as *A. fumigatus*.
7. The conditions used in this study to analyse the β -tubulin gene do not seem to be useful to differentiate yeasts.

VALORACIÓN PERSONAL

El tema de la Aspergillosis me resultó interesante ya que no fue muy estudiado durante la carrera en materia de microbiología, anatomía patológica y genética. La especie tratada, rapaces, tampoco es habitual en la integración de aves ni exóticos por lo que me ha abierto un campo de trabajo desconocido hasta el momento de la realización del trabajo.

Además, me ha permitido poner en práctica mis conocimientos teóricos relacionados con técnicas básicas de laboratorio tales como:

- Medidas de asepsia en procesamiento de las muestras (uso de guantes, mantenimiento de zona estéril con mechero Bunsen...).
- Cultivo de muestras a partir de órganos.
- Observación de las características macroscópicas del aislado fúngico obtenido.
- Tinción con hematoxilina y eosina para la identificación microscópica.
- Preparación de muestras para la realización de PCR y secuenciación genética.

Para la obtención e interpretación de resultados he trabajado con equipos y programas nuevos hasta el momento como el caso del programa informático BLAST así como con aparatos ya conocidos hasta el momento, como el microscópico óptico con el cual he desarrollado la agilidad visual y destreza en el manejo.

BIBLIOGRAFÍA – REFERENCIAS

1. Alcalá L, Muñoz, P., Peláez, T., Bouza, E. Aspergillus y aspergilosis. Disponible en: <http://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/micologia/aspergillus.pdf>. [Consulta: 10 de Mayo de 2016].
2. Tell LA. Aspergillosis in mammals and birds: impact on veterinary medicine. Medical mycology. 2005;43 (1):71-3. Epub 2005/08/23.
3. Fedde MR. Relationship of structure and function of the avian respiratory system to disease susceptibility. Poultry science. 1998;77(8):1130-8. Epub 1998/08/26.
4. Richard JL, Thurston JR. Rapid hematogenous dissemination of Aspergillus fumigatus and A. flavus spores in turkey poult following aerosol exposure. Avian diseases. 1983;27(4):1025-33. Epub 1983/10/01.
5. Olias P, Hauck R, Windhaus H, Van der Grinten E, Gruber AD, Hafez HM. Articular aspergillosis of hip joints in turkeys. Avian diseases. 2010;54(3):1098-101. Epub 2010/10/16.
6. Beernaert LA, Pasmans F, Van Waeyenberghe L, Haesebrouck F, Martel A. Aspergillus infections in birds: a review. Avian pathology: journal of the WVPA. 2010;39(5):325-31. Epub 2010/10/19.
7. Klika E, Scheuermann DW, De Groodt-Lasseel MH, Bazantova I, Switka A. Pulmonary macrophages in birds (barn owl, Tyto tyto alba), domestic fowl (*Gallus gallus f. domestica*), quail (*Coturnix coturnix*), and pigeons (*Columba livia*). The Anatomical record. 1996;246(1):87-97. Epub 1996/09/01.
8. Deem SL. Fungal diseases of birds of prey. The veterinary clinics of North America Exotic animal practice. 2003;6(2):363-76. Epub 2003/06/28.
9. Beernaert LA, Pasmans F, Haesebrouck F, Martel A. Modelling Aspergillus fumigatus infections in racing pigeons (*Columba livia domestica*). Avian pathology: journal of the WVPA. 2008;37(5):545-9. Epub 2008/09/18.
10. Tell LA, Clemons KV, Kline Y, Woods L, Kass PH, Martinez M, et al. Efficacy of voriconazole in Japanese quail (*Coturnix japonica*) experimentally infected with Aspergillus fumigatus. Medical mycology. 2010;48(2):234-44. Epub 2009/06/24.
11. Margalit A, Kavanagh K. The innate immune response to Aspergillus fumigatus at the alveolar surface. FEMS microbiology reviews. 2015;39(5):670-87. Epub 2015/05/03.
12. Croft CA, Culibrk L, Moore MM, Tebbutt SJ. Interactions of Aspergillus fumigatus Conidia with Airway Epithelial Cells: A Critical Review. Frontiers in microbiology. 2016;7:472. Epub 2016/04/20.

13. Richard JL, Cutlip, R.C., Thurston, J.R., Songer, J. Response of turkey pouls to aerosolized spores of *Aspergillus fumigatus* and aflatoxigenic and non aflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus*. *Avian diseases*. 1980;25:16.
14. Fatunmbi OO, Bankole A. Severe disseminated Aspergillosis in a captive Abyssinian tawny eagle (*Aquila rapax raptor*). *Journal of wildlife diseases*. 1984;20(1):52-4. Epub 1984/01/01.
15. Piontelli E. Agentes comunes en las aspergilosis humanas: conceptos primarios en la diferenciación de sus complejos de especies. *Boletín Micológico*. 2014;29(2):63-100. Disponible en: <http://revistas.uv.cl/index.php/Bolmicol/article/download/228/208>. [Consulta: 13 de Mayo de 2016].
16. Fischer D, Van Waeyenbergh L, Cray C, Gross M, Usleber E, Pasmans F, et al. Comparison of diagnostic tools for the detection of aspergillosis in blood samples of experimentally infected falcons. *Avian diseases*. 2014;58(4):587-98. Epub 2015/01/27.
17. Chege S, Howlett J, Al Qassimi M, Toosy A, Kinne J, Obanda V. Opportunistic infection of *Aspergillus* and bacteria in captive Cape vultures (*Gyps coprotheres*). *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*. 2013;3(5):401-6. Epub 2013/05/07.
18. Cano J, Soler, M. Epidemiología molecular aplicada a la detección de brotes de aspergilosis nosocomial. *Revista Iberoamericana de Micología*. 2000;17(3):3.
19. Guarro J. Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2012;30(1):7.
20. Montero C. Manual de técnicas de histoquímica básica. 1997. Disponible en: <http://nинive.uaslp.mx/jspui/bitstream/i/2558/2/572%20M6M3.pdf>. [Consulta: 15 de Mayo de 2015].
21. Martinez B. Caracterización de microorganismos asociados a procesos patológicos en especies de interés veterinario. 2015:35.
22. Talbot JJ, Johnson LR, Martin P, Beatty JA, Sutton DA, Billen F, et al. What causes canine sino-nasal aspergillosis? A molecular approach to species identification. *Vet J*. 2014;200(1):17-21. Epub 2014/02/25.
23. Borneman J, Hartin RJ. PCR primers that amplify fungal rRNA genes from environmental samples. *Applied and environmental microbiology*. 2000;66(10):4356-60. Epub 2000/09/30.
24. Doshi P, Bossie CA, Doonan JH, May GS, Morris NR. Two alpha-tubulin genes of *Aspergillus nidulans* encode divergent proteins. *Molecular & general genetics: MGG*. 1991;225(1):129-41. Epub 1991/01/01.

25. Posso D, Ghneim T. Uso de marcadores microsatélites para la estimación de diversidad genética en plantas: manual de laboratorio. 2008.
26. Aguiar LM, Diaz, M.V. Secuenciación de ADN. Revista Planeta. Disponible en <http://perso.wanadoo.es/revistaplaneta/adn.htm>. [Consulta: 15 de Mayo de 2016].
27. Garzon N. Caracterización e identificación molecular de hongos de suelo aislados de los páramos de Guasca y Cruz Verde. 2013:34. Disponible en: <http://repository.javeriana.edu.co/bitstream/10554/14584/1/GarzonGrajalesNatalia2013.pdf>. [Consulta: 17 de Mayo de 2016].
28. Acosta G, Frías-de León M, Reyes M, Martínez J, Martínez M, Duarte E. Marcadores moleculares: una herramienta importante en el diagnóstico, tratamiento y epidemiología de la aspergilosis invasora. Cirugía y Cirujanos. 2014;82:109-18.

ANEXO I

Género o grupo fúngico	Marcador molecular
<i>Acremonium</i>	<i>ITS</i>
<i>Aspergillus</i>	β -tubulina
Dermatofitos	<i>ITS</i>
<i>Fusarium</i>	<i>EF-1α</i>
Levaduras	<i>D1/D2 (28S rRNA)</i>
Levaduras negras	<i>ITS</i>
<i>Mucorales</i>	<i>ITS</i>
<i>Phaeoacremonium</i>	β -tubulina
<i>Phialemonium</i>	<i>D1/D2 (28S rRNA)</i>
<i>Scedosporium</i>	<i>TUB (β-tubulina)</i>
<i>Sporothrix</i>	<i>Calmodulina</i>

Tabla 1. Marcadores moleculares utilizados en la identificación mediante secuenciación del DNA de hongos patógenos, basada en la referencia: (19).

Marcador molecular	Utilidad	Referencia
Secuencia del gen 18S del rRNA	Detección de <i>Aspergillus</i> en muestras de sangre, con mayor sensibilidad (79%) y especificidad (92%) que la prueba de ELISA y la determinación de 1-3- β -D-glucano	Kami y col. ¹³
Secuencia del mtDNA	Detección de <i>A. fumigatus</i> en biopsias y lavado broncoalveolar de pacientes con aspergilosis invasora. La sensibilidad es de 73%, la especificidad de 93%, y los valores predictivos positivo y negativo de 73 y 95%, respectivamente	Rantakokko y col. ¹⁴
Secuencia del gen del citocromo b mitocondrial	Detección específica de <i>A. fumigatus</i> y cuantificación de la carga fúngica en lavado broncoalveolar y sangre, con una sensibilidad de 13.2 fg de DNA	Spiess y col. ¹⁵
Amplificación de una región 18S	Detección y cuantificación específica de DNA de <i>A. fumigatus</i> con una sensibilidad de 10 ³ conidios/mL en modelo murino	Buitrago y col. ¹⁶
Secuencia del gen 18S del rRNA	Detección 100% específica y sensible (61.7%) de <i>A. fumigatus</i> , por PCR-ELISA en modelo murino. Este ensayo resultó más sensible que la detección de galactomananas y la PCR tiempo real	Scotter and Chalmers ¹⁷
Región del gen 28S del rDNA	Detección, PCR en tiempo real de diversas especies de <i>Aspergillus</i> y <i>Candida</i>	Baskova y col. ¹⁸
Secuencias parciales de los genes β -tubulina (β -tub) y <i>fumigatus</i> dentro de la sección <i>Fumigati rodlet A</i> (rodA)	Identificación específica y altamente reproducible de <i>A. fumigatus</i> dentro de la sección <i>Fumigati rodlet A</i> (rodA)	Serrano y col. ¹⁹

Tabla 2. Características de algunos marcadores moleculares desarrollados para el diagnóstico de aspergilosis invasora (28).

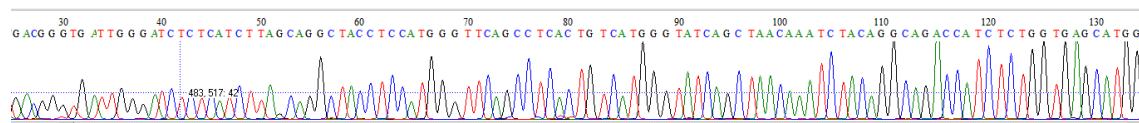
ANEXO II

Imagen 1. Imagen obtenida con el programa BioEditSequenceAlignment Editor del fragmento secuenciado obtenido mediante el método de Sanger de la región del gen de la β -tubulina.

ANEXO III

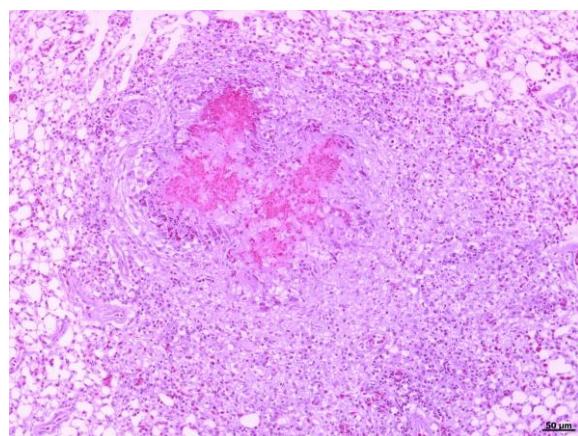


Imagen 1. Águila ratonera. Granuloma pulmonar. H-E.x100.



Imagen 2. Cultivo de *Aspergillus fumigatus* en agar Sabouraud.

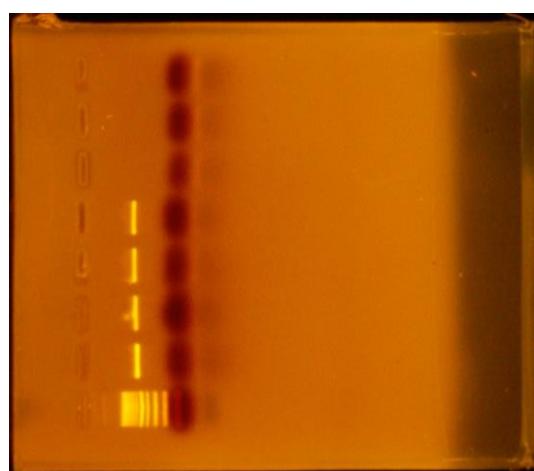


Imagen 3. Imagen resultante de la electroforesis en gel de agarosa al 1,5%.

Colonia 1a:

GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTCTGGTATGTCTTGACCTCAAAGCTTGGATGACGGGTGATTGGGATCTCATCTTAGCAGGCTACCTCCATGGGT
TCAGCCTCACTGTCATGGGTATCAGCTAACAAATCTACAGGCAGACCACGGCTCTGGTGAGCATGGCCTGACGGCTGGCCAGTAAGTCGACCTAT
ATCCTCCAATTGAGAAAGCGGCCGAAACACGGAAAACAAGGAAGAAGCGGACCGTGCTGATGGGAAATAATAGCTACAATGGCTCCTCGAT
CTCCAGCTGGAGCGTATGAACGCTATTCAACGAGGTGTGGATGAAACTCTGATTATACTATTCCGCAACATCTCACGATCTGACTCGCTAC
TAGGCCAACGGTACAAATATGTTCTCGTGCCGTTCTGGTGATCTCGAGCCTGGTACCATGGACGCTGTCCGTGCCGGTCCCTCGGCAGCTAT
TCCGTCCCACAACTCGTCTCGGCCAGTCCGGTCTGGTAACAACTGGCCAAGGGTCACTACACTGAGGGT

Colonia 1b:

GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTCTGGTATGTCTTGACCTCAAAGCTTGGATGACGGGTGATTGGGATCTCATCTTAGCAGGCTACCTCCATGGGT
TCAGCCTCACTGTCATGGGTATCAGCTAACAAATCTACAGGCAGACCACGGCTCTGGTGAGCATGGCCTGACGGCTGGCCAGTAAGTCGACCTAT
ATCCTCCAATTGAGAAAGCGGCCGAAACACGGAAAACAAGGAAGAAGCGGACCGTGCTGATGGGAAATAATAGCTACAATGGCTCCTCGAT
CTCCAGCTGGAGCGTATGAACGCTATTCAACGAGGTGTGGATGAAACTCTGATTATACTATTCCGCAACATCTCACGATCTGACTCGCTAC
TAGGCCAACGGTACAAATATGTTCTCGTGCCGTTCTGGTGATCTCGAGCCTGGTACCATGGACGCTGTCCGTGCCGGTCCCTCGGCAGCTAT
TCCGTCCCACAACTCGTCTCGGCCAGTCCGGTCTGGTAACAACTGGCCAAGGGTCACTACACTGAGGGT

Colonia 2a:

GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTCTGGTATGTCTTGACCTCAAAGCTTGGATGACGGGTGATTGGGATCTCATCTTAGCAGGCTACCTCCATGGGT
TCAGCCTCACTGTCATGGGTATCAGCTAACAAATCTACAGGCAGACCACGGCTCTGGTGAGCATGGCCTGACGGCTGGCCAGTAAGTCGACCTAT
ATCCTCCAATTGAGAAAGCGGCCGAAACACGGAAAACAAGGAAGAAGCGGACCGTGCTGATGGGAAATAATAGCTACAATGGCTCCTCGAT
CTCCAGCTGGAGCGTATGAACGCTATTCAACGAGGTGTGGATGAAACTCTGATTATACTATTCCGCAACATCTCACGATCTGACTCGCTAC
TAGGCCAACGGTACAAATATGTTCTCGTGCCGTTCTGGTGATCTCGAGCCTGGTACCATGGACGCTGTCCGTGCCGGTCCCTCGGCAGCTAT
TCCGTCCCACAACTCGTCTCGGCCAGTCCGGTCTGGTAACAACTGGCCAAGGGTCACTACACTGAGGGT

Colonia 2b:

GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTCTGGTATGTCTTGACCTCAAAGCTTGGATGACGGGTGATTGGGATCTCATCTTAGCAGGCTACCTCCATGGGT
TCAGCCTCACTGTCATGGGTATCAGCTAACAAATCTACAGGCAGACCACGGCTCTGGTGAGCATGGCCTGACGGCTGGCCAGTAAGTCGACCTAT
ATCCTCCAATTGAGAAAGCGGCCGAAACACGGAAAACAAGGAAGAAGCGGACCGTGCTGATGGGAAATAATAGCTACAATGGCTCCTCGAT
CTCCAGCTGGAGCGTATGAACGCTATTCAACGAGGTGTGGATGAAACTCTGATTATACTATTCCGCAACATCTCACGATCTGACTCGCTAC
TAGGCCAACGGTACAAATATGTTCTCGTGCCGTTCTGGTGATCTCGAGCCTGGTACCATGGACGCTGTCCGTGCCGGTCCCTCGGCAGCTAT
TCCGTCCCACAACTCGTCTCGGCCAGTCCGGTCTGGTAACAACTGGCCAAGGGTCACTACACTGAGGGT

Figura 1. Secuencias obtenidas en la secuenciación del gen de la β-tubulina, con las secuencias de los cebadores en subrayado.

G: guanina T: timina A: adenina C: citosina

Descriptions

Sequences producing significant alignments:

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Aspergillus fumigatus isolate M 56 beta-tubulin gene, partial cds	1033	1033	100%	0.0	100%	KJ175505.1
Aspergillus fumigatus strain USMD02 beta-tubulin gene, partial cds	1033	1033	100%	0.0	100%	KF669421.1
Aspergillus fumigatus isolate A2S3_D7 beta-tubulin gene, partial cds	1033	1033	100%	0.0	100%	JX501424.1
Aspergillus fumigatus isolate A2S4_D54 beta-tubulin gene, partial cds	1033	1033	100%	0.0	100%	JX501423.1
Aspergillus fumigatus strain KCCM60331 beta-tubulin gene, partial sequence	1033	1033	100%	0.0	100%	HQ285593.1
Aspergillus fumigatus isolate A2S4_D49 beta-tubulin gene, partial cds	1031	1031	99%	0.0	100%	JX545087.1
Aspergillus fumigatus isolate AF8 beta-tubulin gene, partial cds	1031	1031	99%	0.0	100%	FJ436789.1
Aspergillus fumigatus isolate M 169 beta-tubulin gene, partial cds	1024	1024	100%	0.0	99%	KJ175506.1
Aspergillus fumigatus strain USMD06 beta-tubulin gene, partial cds	1022	1022	98%	0.0	100%	KF669422.1
Aspergillus fumigatus isolate AF23 beta-tubulin (benA) gene, partial cds	1014	1014	98%	0.0	100%	KF410682.1
Aspergillus fumigatus beta-tubulin (TUB1) gene, partial cds	1014	1014	99%	0.0	99%	AY048754.1
Aspergillus fumigatus isolate UOAHCPF 7510 beta-tubulin (tub2) gene, partial cds	1013	1013	100%	0.0	99%	GQ376140.1
Aspergillus fumigatus isolate AF117 beta-tubulin (benA) gene, partial cds	1009	1009	97%	0.0	100%	KF410677.1
Aspergillus fumigatus strain SousseC43 beta-tubulin (benA) gene, partial cds	1003	1003	97%	0.0	100%	KJ136108.1
Aspergillus fumigatus strain JL-A2 beta-tubulin gene, partial sequence	994	994	98%	0.0	99%	HQ285501.1
Aspergillus fumigatus strain FJAT-31052 beta-tubulin (tub2) gene, partial cds	989	989	95%	0.0	100%	KU737581.1
Aspergillus fumigatus strain SN-A4 beta-tubulin gene, partial sequence	989	989	95%	0.0	100%	HQ285510.1
Aspergillus fumigatus strain SousseC8 beta-tubulin (benA) gene, partial cds	985	985	95%	0.0	100%	KJ136109.1
Aspergillus fumigatus culture-collection MUT<ITA>:1277 beta-tubulin (Tub) gene, partial cds	983	983	95%	0.0	100%	KR856498.1
Aspergillus fumigatus strain FSU6264 beta-tubulin gene, partial sequence	983	983	95%	0.0	99%	GQ221161.1
Aspergillus fumigatus beta-tubulin gene, partial cds	981	981	94%	0.0	100%	KM491898.1

Figura 2. Comparación de las secuencias problema con la base de datos GenBank utilizando la herramienta informática BLAST.