

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA**

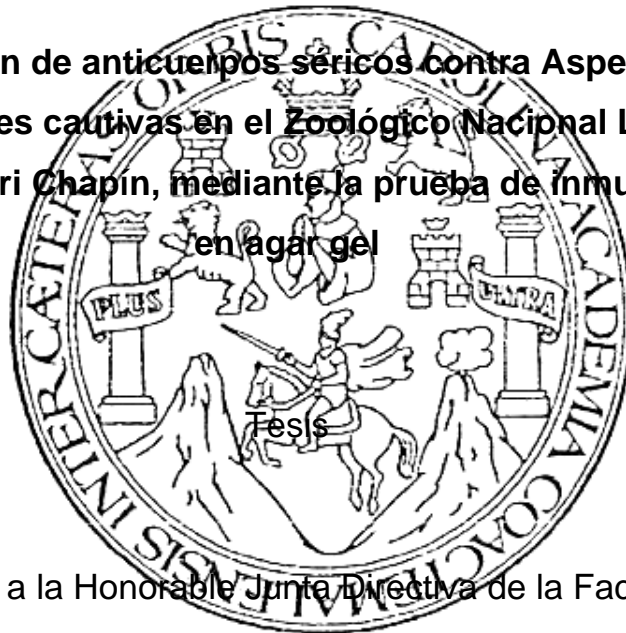
**“Determinación de anticuerpos séricos contra *Aspergillus Sp.* en aves rapaces cautivas en el Zoológico Nacional La Aurora y Club Autosafari Chapín, mediante la prueba de inmunodifusión en agar gel”**

**Andrea Castañeda Díaz-Samayoa**

**Guatemala, Noviembre de 2005**

Universidad de San Carlos de Guatemala  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia  
Escuela de Medicina Veterinaria

**Determinación de anticuerpos séricos contra *Aspergillus* Sp.  
en aves rapaces cautivas en el Zoológico Nacional La Aurora y  
Club Autosafari Chapin, mediante la prueba de inmunodifusión  
en agar gel**



Presentada a la Honorable Junta Directiva de la Facultad de  
Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de San Carlos  
de Guatemala

Por:

Andrea Castañeda Díaz-Samayoa

Previo a optar al título de  
Médico Veterinario

Guatemala, noviembre de 2005

**JUNTA DIRECTIVA**  
**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**  
**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**  
**ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA**

Decano: Lic. Marco Vinicio De La Rosa M.  
Secretario: Lic. Gabriel G. Mendizabal F.  
Vocal I: Dr. M.V. Yeri Veliz Porras  
Vocal II: Dr. M.V. Fredy Gonzalez  
Vocal III: Dr. M.V. Edgar Bailey  
Vocal IV: Br. Yadyra Rocío Pérez Flores  
Vocal V: Br. José Abraham Ramírez

Asesores:

Dr. Gustavo González  
Dra. Lucero Serrano  
Dr. Carlos Camey

## **Honorable Tribunal Examinador**

En cumplimiento con lo establecido por los estatutos de la Universidad de San Carlos de Guatemala presento a consideración de ustedes el trabajo de tesis titulado:

Determinación de anticuerpos séricos contra *Aspergillus* Sp. en aves rapaces cautivas en el Zoológico Nacional la Aurora y Club Autosafari Chapín, mediante la prueba de inmunodifusión en agar gel

Que fuera aprobado por la Junta Directiva de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

**Previo a optar al título profesional de:**

**Médica Veterinaria**

**Guatemala, noviembre de 2005**

## TESIS QUE DEDICO

---

A mi papá el señor Joaquín Castañeda Juárez.....al fin lo logramos!!

## AGRADECIMIENTOS

---

A mis papás por enseñarme las principales cualidades necesarias para triunfar: sencillez, tenacidad y honestidad.

A mi tía, Dra. Laura Díaz-Samayoa de Aguirre por enseñarme el amor por los animales, grandes y pequeños.

A mis primos y tíos por compartir conmigo tantos momentos.

A mis asesores, por su paciencia y consejos, mil gracias.

Al personal del Zoológico Nacional La Aurora y Club Autosafari Chapín, especialmente al Dr. Gustavo González, Luis Martínez, Roberto Rabay y Orlando Rosales por su ayuda y amistad.

A mis catedráticos por todas las enseñanzas durante el camino recorrido.

**A mis amigos, especialmente a Olga Chávez, Margarita Ramazzini y Karen Calderón, las quiero mucho**

## ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. HIPÓTESIS .....	2
III. OBJETIVOS .....	3
3.1 General: .....	3
3.2 Específicos: .....	3
IV. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
4.1 Las aves rapaces: .....	4
4.2 Aspergilosis:.....	5
4.3 Inmunodifusión: .....	7
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
5.1 Materiales:.....	10
5.2 Métodos:.....	12
5.2.3 Análisis estadístico: .....	18
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	19
VII. CONCLUSIONES.....	23
VIII. RECOMENDACIONES.....	24
IX. RESUMEN.....	25
X. BIBLIOGRAFÍA .....	26
XI. ANEXOS.....	28

## I. INTRODUCCIÓN

Las pruebas serológicas, como los tests de antígeno anticuerpo pueden contribuir con el diagnóstico de diversas enfermedades en animales en cautiverio de forma relativamente temprana, o bien ser de utilidad para determinar la exposición al agente etiológico, lo cual es determinante para la prevención de la enfermedad, sugerir un pronóstico o bien orientar a la selección de otras técnicas de diagnóstico más definitivas.

La aspergilosis es una enfermedad infecciosa causada por especies del hongo saprófito ubicuo del género *Aspergillus*, que afecta aves silvestres y domésticas, así como mamíferos y que se caracteriza por presentarse frecuentemente en aves de presa mantenidas en cautiverio.

Debido a las diferentes presentaciones de la enfermedad y a los escasos signos iniciales, un diagnóstico temprano es realmente dificultoso. Según Bennett, la literatura sobre pruebas serológicas para micosis sistémicas es muy extensa, pero no se pueden hacer muchas generalidades útiles clínicamente.

Por lo tanto, se ha recurrido en la actualidad a la búsqueda de pruebas más estandarizadas para micosis que permitan el diagnóstico en fases iniciales de la enfermedad de forma simple.

La prueba de inmunodifusión es la más ampliamente usada por ser sencilla y rápida, además de no necesitar equipo especial para llevarla a cabo, y ha demostrado ser una excelente ayuda en el diagnóstico de laboratorio de aspergilosis.

El presente estudio se orienta a determinar si se encuentran presentes anticuerpos contra *Aspergillus* sp. en el suero de aves rapaces cautivas en dos colecciones zoológicas utilizando para ello la prueba de inmunodifusión en agar gel, y lograr determinar si dicha prueba podría emplearse como una prueba rutinaria anual de los zoológicos en el control del estado de salud de las aves en cautiverio.



## II. HIPÓTESIS

---

Las aves rapaces en cautiverio del Zoológico Nacional La Aurora y Club Autosafari Chapín presentan anticuerpos séricos contra *Aspergillus* sp.

### III. OBJETIVOS

---

#### 3.1 General:

Contribuir al conocimiento de los métodos de diagnóstico para aspergilosis existentes a la fecha en rapaces.

#### 3.2 Específicos:

- Determinar la seroprevalencia (positiva o negativa) a anticuerpos contra *Aspergillus sp* en aves rapaces cautivas.
- Establecer si la prueba de inmunodifusión es indicada para realizarse de forma rutinaria para el diagnóstico temprano de aspergilosis en aves de zoológico.

## IV. REVISIÓN DE LITERATURA

---

### 4.1 Las aves rapaces:

Las aves rapaces comprenden dos órdenes taxonómicos, Falconiformes (rapaces diurnos) y Strigiformes (rapaces nocturnos o “búhos”).

El orden Falconiformes consiste en cuatro familias: Accipitridae (milanos, halcones, buitres del viejo mundo, gavilán pescador, y águilas), Pandionidae (águila pescadora), Falconidae (halcones), y Sagittariidae (ave secretaria).

El orden Strigiformes consiste en dos familias: Tytonidae (lechuzas de campanario y búhos de campo) y Strigidae (búhos verdaderos). (6)

Ambos órdenes se han especializado en la caza de presas vivas, a las que capturan con sus poderosas garras, encontrándose aproximadamente 300 especies de aves rapaces diurnas (falconiformes) y alrededor de 200 especies de aves rapaces nocturnas (strigiformes). (5)

Dentro del orden Falconiformes, la familia Accipitridae es de gran importancia debido a que concentra a la mayor parte de aves de presa diurnas, incluyendo a las águilas y gavilanes. Consiste en una de las familias aviares más grandes y representa a la familia más grande dentro de este orden, de tal manera que se reconocen 233 especies agrupadas en 67 géneros en esta familia alrededor del mundo.(10, 12 )

El orden Strigiformes comprende búhos de una amplia gama de tamaños, pudiendo observarse especies tan pequeñas como un gorrión hasta especies del tamaño de un águila. Su distribución es mundial y se encuentran habitando la gran mayoría de habitats terrestres. (5)

A pesar de la gran diferencia existente entre los falconiformes y estrigiformes, respecto a su tamaño, plumaje y comportamiento, las dos tienen características externas comunes: las dos poseen, sin excepción alguna, un pico fuerte y ganchudo para desgarrar sus presas y garras potentes y afiladas con las que apresan y retienen a sus víctimas. (12)

## 4.2 Aspergilosis:

Se denomina aspergilosis a la enfermedad infecciosa, no contagiosa causada por especies del hongo saprófito ubicuo del género *Aspergillus*, que afecta humanos, mamíferos y principalmente a aves, tanto silvestres como domésticas. (2,3)

La infección natural con *Aspergillus* en pájaros se conoce desde hace muchos años y fue la primera forma descrita de la enfermedad. Es la afección fúngica de mayor importancia y uno de los agentes infecciosos más importantes de las aves. (13)

Esta enfermedad micótica del sistema respiratorio es la más común entre aves rapaces mantenidas en cautiverio. (3) Se ha determinado que constituye la enfermedad de origen no traumático más importante en estas aves. (6)

Aunque puede presentarse de forma individual o virtualmente en cualquier especie de ave rapaz, existen claras predilecciones por especie.

Las especies de aves rapaces mayormente susceptibles a esta enfermedad son el azor norteño (*Accipiter gentilis*), halcón gerifalte (*Falco rusticolus*), búho nival (*Nyctea scandiaca*), ratonero calzado (*Buteo lagopus*), gavián cola roja inmaduro (*Buteo jamaicensis*), y águila dorada o real (*Aquila chrysaetos*). (3,9)

También existen especies resistentes como el halcón pradeño (*Falco mexicanus*) y gavián de Harris (*Parabuteo unicinctus*). (2)

La aspergilosis aviar tiene implicaciones en los programas de conservación aviares, debido a que la primera generación de ejemplares para proyectos de reproducción, se derivan directamente de la vida silvestre, los cuales son animales estresados y susceptibles a la infección. (4)

### 4.2.1 Etiología:

El agente causal más común de la aspergilosis aviar es usualmente *Aspergillus fumigatus*, con ocasionales reportes de *A. flavus* y *A. nidulans*. *A. terreus* ha sido también reportado. Las cepas individuales difieren marcadamente en cuanto a patogenicidad. (7)

La especie más comúnmente aislada en aves rapaces enfermas es *Aspergillus fumigatus*, la cual se aísla en un 95 % de rapaces con aspergilosis. (2,3)

#### **4.2.1.1 Aspergillus sp.**

*Aspergillus sp.* es un hongo saprófito ubicuo de naturaleza oportunista. Es un hongo formador de micelios clasificado como un Ascomiceto, con la capacidad de reproducirse asexualmente. (7)

Por la facilidad de dispersión de sus conidios y por su pequeño tamaño, éstos pueden permanecer en suspensión en el ambiente durante un largo periodo de tiempo, por lo que el hombre y los animales se encuentran expuestos constantemente a su inhalación. (1)

El hongo puede encontrarse comúnmente como contaminante de los alimentos animales, y materia orgánica animal o vegetal en descomposición, viéndose su crecimiento favorecido por la mala higiene. La ventilación inadecuada y ambientes polvorientos incrementan el riesgo a la exposición según Oglesbee, 1997. (7)

#### **4.2.1.1.2 Características morfológicas del hongo:**

Las principales características macroscópicas de importancia en la identificación de especies son el ritmo de crecimiento, color de la colonia y termotolerancia.

A excepción de *Aspergillus nidulans* y *Aspergillus glaucus*, el ritmo de crecimiento es de rápido a moderadamente rápido.

Las colonias de *Aspergillus* presentan una textura con apariencia polvorienta. El color de la superficie puede variar dependiendo de la especie. El reverso varía desde descolorido hasta amarillento ténue en la mayor parte de aislamientos. Sin embargo, el color en la parte reversa puede ser púrpura o bien de color olivo en ciertas cepas de *Aspergillus nidulans* y desde anaranjado hasta púrpura en *Aspergillus versicolor*.

El *Aspergillus fumigatus* es un hongo termotolerante y crece bien a temperaturas por encima de 40 °C. Esta propiedad es única del *Aspergillus fumigatus* entre las demás especies del género *Aspergillus*. El *Aspergillus*

*fumigatus* puede crecer en un rango de temperaturas a partir de 20 hasta 50°C.  
(14)

### 4.3 Inmunodifusión:

Dentro de las pruebas serológicas in vitro, se encuentran numerosas pruebas de precipitación en gel siendo una de estas la inmunodifusión, la cual consiste en una difusión simple de los reactivos.

Los análisis inmunológicos de este tipo se utilizan para el diagnóstico de enfermedades, complementándose con la historia clínica. Asimismo contribuyen al tratamiento y pronóstico de diversas enfermedades.

Con la evolución de la tecnología se han simplificado las pruebas, requiriéndose que estas sean sensibles, y por lo tanto capaces de detectar los anticuerpos o antígenos. Se requiere además que posean especificidad, es decir la avidéz que tiene un anticuerpo con el antígeno que le dio origen. El objetivo de estas pruebas es mejorar la disponibilidad, precisión y exactitud de los resultados.

En las pruebas de precipitación se utilizan antígenos solubles y es una prueba que sirve para detectar antígenos o anticuerpos (según sea necesario) de enfermedades infecciosas, para detectar la respuesta inmune y para cuantificar inmunoglobulinas o fracciones del complemento.

La inmunodifusión en gel es la forma más simple y directa de generar una reacción antígeno-anticuerpo. En 1946 Oudin describió la reacción antígeno-anticuerpo en tubos llenos de agares purificados que no tuvieran moléculas que interfirieran con la difusión de los reactivos.

Existen diferentes tipos de inmunodifusión: 1) inmunodifusión simple en una dimensión, 2) inmunodifusión simple en dos dimensiones, 3) inmunodifusión doble en una dimensión e 4) inmunodifusión doble en dos dimensiones. *Una dimensión* quiere decir que el reactivo se difunde en una sola dirección, *dos dimensiones* quiere decir que se difunde en forma radiada, *simple* quiere decir que solo uno de los reactivos se difunde y *doble* quiere decir que ambos se difunden. (11)

#### 4.3.1 Principios de la Prueba de Inmunodifusión en Agar Gel:

La inmunodifusión en agar gel (AGID) es una prueba cualitativa o semi-cuantitativa, basada en los principios de doble difusión descritos por Oudin y Ouchterlony. (11) Un anticuerpo y su antígeno homólogo soluble son colocados en fosos separados adaptados a un medio de difusión adecuado (agarosa), permitiendo su difusión hacia el medio. Entre ambos fosos se establece un gradiente de concentración de cada uno de los componentes de la reacción, es decir, entre el foso que contiene el antígeno y el que contiene el anticuerpo. De esta manera se forma una línea visible de precipitación.

Se hace un pozo o agujero central y seis pozos en la periferia con antígeno en el centro, colocándose dos controles positivos y luego se colocan los sueros de seis diferentes pacientes sobre los antígenos.

Se pueden colocar seis sueros de diferentes pacientes porque la prueba de Ouchterlony es una prueba múltiple y permite realizar estudios de varios pacientes al mismo tiempo. La placa se incuba a temperatura ambiente durante 18 a 24 horas hasta que se forme una precipitación que se dará donde la cantidad de anticuerpos y antígenos sea equivalente, manifestándose en forma de líneas blanquecinas. Esta prueba también sirve para el análisis de antígenos (principalmente en las intradermoreacciones) tales como la prueba de identidad, la prueba de no identidad y la prueba de identidad parcial. (11)

- (a) Prueba de Identidad: las líneas de precipitación se unen porque los antígenos son iguales.
- (b) Prueba de No Identidad: las líneas de precipitación se cruzan porque los antígenos no son iguales.
- (c) Prueba de Identidad Parcial: hay una parte igual del determinante antigénico en ambos antígenos y hay una parte que es completamente diferente.

#### 4.3.2 Líneas de Precipitación:

Hay dos tipos de líneas de precipitación causadas por la precipitación de anticuerpos verdaderos. Una banda ancha débil del tipo H producida por antígenos polisacáridos; y una banda clara, bien definida y frecuentemente múltiple, reacción de tipo R, producida por las proteínas del antígeno. Las últimas reacciones son de gran significado diagnóstico, porque en muchos pacientes (humanos) con eosinofilia pulmonar alérgica, sólo se obtiene un fino arco de precipitina.

La demostración de precipitinas en pacientes con evidencia radiológica de aspergiloma es positiva en casi todos los casos. Las reacciones son fuertes consistiendo de múltiples bandas, en la mayoría de los casos, hasta 15 a 20 en algunos sueros.

En el caso de muestras negativas altamente sospechosas, el suero puede ser concentrado. En algunos casos pueden ocurrir reacciones cruzadas de las diferentes especies de *Aspergillus*, pero con controles apropiados éstas usualmente no aparecen.

Estudios realizados por varios investigadores no han establecido reacciones cruzadas entre *A. Fumigatus*, *A. Níger* y *A. Flavus*.

Coleman y Kaufman en un estudio realizado en 1971, descubrieron que el método de inmunodifusión es 100 % específico en una evaluación de su efectividad con 65 sueros de individuos con otras infecciones micóticas sistémicas, bacterianas o enfermedades neoplásicas y de humanos aparentemente sanos. Esta observación también ha sido confirmada por otros autores.

La prueba de inmunodifusión es la más ampliamente usada por ser sencilla y rápida, además de no necesitar equipo especial para llevarla a cabo. Esta ha demostrado ser una excelente ayuda en el diagnóstico de laboratorio de aspergilosis. La presencia de anticuerpos precipitantes, relacionados al número de bandas o título, indican infección, colonización o alergia debido a una especie de *Aspergillus*. También es útil en el seguimiento de la enfermedad, ya que se ha notado disminución en el número de bandas de precipitinas y cambios significativos en el título como respuesta de los pacientes a la terapia. (8)



## V. MATERIALES Y MÉTODOS

---

### 5.1 Materiales:

#### 5.1.1 Material Biológico:

- 66 muestras séricas de aves rapaces procedentes del Zoológico Nacional La Aurora.
- 16 muestras séricas de aves rapaces procedentes del Club Autosafari Chapín.
- 1 ml de antígeno de *Aspergillus sp.* (en pool)
- 1 ml de suero control positivo

#### 5.1.2 Material de Laboratorio:

- 86 tubos Eppendorf o de reacción
- Centrífuga (International Clinical Laboratories)
- Kit Comercial para Inmunodifusión en Agar Gel (Pulse Scientific) el cual incluye: 1 *Aspergillus Pool Ag* (1 ml), 1 *Aspergillus Pool*, control positivo (1ml); 1 cleargel ID plates (6 placas).
- 1 micropipeta unicanal con capacidad de 17  $\mu$ l.
- 86 puntas de pipeta
- Papel mayordomo
- Hojas de Identificación correspondientes a cada placa y al suero a ser analizado
- Marcador para identificar las 6 placas
- 1 ml de agua destilada
- 1 recipiente a ser empleado como cámara húmeda de incubación
- Lámpara para lectura de resultados

### 5.1.3 Material de Campo:

- Equipo de transporte para aves
- Redes de mano para captura
- Carretilla para colocación de equipo de trabajo
- Tabla con hojas para anotación de datos del espécimen trabajado
- Lector de Microchip (AVID Microchip reader) para identificación
- Mesa portátil
- Báscula electrónica portátil
- 1 lapicero
- Tubos Vacutainer Plus SST, estériles de 13 x 100 mm, con recubrimiento interior de silicón como activador del coágulo.
- Gradilla
- Jeringas de 3 y 5 ml estériles y agujas de distintos calibres según el tamaño del ave a ser muestreada
- Alcohol en spray
- Gasa
- Capuchón para aves

### 5.1.4 Recursos Humanos:

- 1 estudiante de Medicina Veterinaria
- 2 asistentes de médico veterinario del Zoológico Nacional La Aurora
- 2 asistentes colaboradores del Club Autosafari Chapín
- 1 médico veterinario
- 1 médico veterinario técnico en laboratorio
- Personal administrativo de ambas instituciones
- 3 asesores de tesis

## **5.2 Métodos:**

### **5.2.1 Descripción del área:**

Se realizó la investigación en las aves rapaces diurnas y nocturnas que habitan en el Zoológico Nacional La Aurora, y en el Club Autosafari Chapín.

#### **5.2.1.2 Ubicación:**

- Zoológico Nacional La Aurora: se encuentra ubicado en el boulevard Juan Pablo II, interior zona 13, ciudad de Guatemala, en las siguientes coordenadas: latitud norte: 14° 36'; longitud: 90° 31' 45"; altura: 1510 msnm.
- Club Autosafari Chapín: está ubicado en el Km. 87.5 carretera a taxisco, localizado en el municipio de Guanagazapa, Escuintla, Guatemala; en las siguientes coordenadas: latitud norte: 14 ° 6'; longitud oeste: 90° 37'40"; altura: 20 -25 msnm.

#### **5.2.1.3 Condiciones Climáticas:**

- Zoológico Nacional La Aurora:
  - Temperatura máxima promedio: 24.6° C
  - Temperatura mínima promedio: 14.7 ° C
  - Humedad relativa: 78 %
  - Temperatura máxima absoluta: 31.6° C
  - Temperatura mínima absoluta: 4.9 ° C
  - Temperatura media: 18.8 ° C
  - Evapotranspiración: 1499
  - Balance hídrico: -379
  - Brillo solar: 2443

- Club Autosafari Chapín (Escuintla):

- Temperatura máxima promedio: 29.4° C
- Temperatura mínima promedio: 18.1° C
- Temperatura media: 25 ° C
- Humedad relativa: 84 %
- Clima: cálido tropical
- Extensión: 64 manzanas aproximadamente (40)

## 5.2.2 Descripción del experimento:

### 5.2.2.1 Especies Muestreadas:

Se muestreó todas las especies de aves en cautiverio de ambas colecciones zoológicas con excepción de aquellas aves de pequeño tamaño, en las cuales resultó riesgosa la extracción de sangre debido a su bajo peso corporal.

- POBLACIÓN A: ZOOLOGICO NACIONAL LA AURORA

66 aves rapaces procedentes del Zoológico Nacional La Aurora:

- 12 tecolotes de montaña o búhos cafés (*Ciccaba virgata*)
- 3 tecolotes comunes (*Bubo virginianus*)
- 1 búho cornudo (*Asio stygius*)
- 5 lechuzas de campanario (*Tyto alba*)
- 6 tecolotes de anteojos (*Pulsatrix perspicillata*)
- 4 tecolotes de feria o lechuzas cariblanca (*Asio clamator*)
- 5 gavilanes del camino (*Buteo magnirostris*)
- 8 gavilanes de Harris (*Parabuteo unicinctus*)
- 9 gavilanes grises (*Buteo nitidus*)
- 8 gavilanes cola roja (*Buteo jamaicensis*)
- 2 grandes halcones negros (*Buteogallus urubitinga*)
- 3 cara caras (*Caracara plancus*)

- POBLACIÓN B: CLUB AUTOSAFARI CHAPIN

16 aves rapaces procedentes del Club Autosafari Chapín:

- 5 tecolotes comunes (*Bubo virginianus*)
- 2 lechuzas de campanario (*Tyto alba*)
- 3 tecolotes de anteojos (*Pulsatrix perspicillata*)
- 4 gavilanes de Harris (*Parabuteo unicinctus*)
- 1 gavilán blanco o aguililla blanca (*Leucopternis albicollis*)
- 1 tecolote de feria o lechuza cariblanca (*Asio clamator*)

#### 5.2.2.2 Métodos de captura:

Se realizó la captura por las mañanas, bajándolas de las perchas con la ayuda de las redes de mano. Luego se transportaron al hospital veterinario o, cuando fué posible se trabajaron dentro del mismo recinto.

Se sujetó la cabeza colocando los dedos pulgar y medio lateralmente al pico y el dedo índice sobre la cabeza, sosteniendo al mismo tiempo las alas y patas del ave con la mano derecha.

Se colocó un capuchón sobre la cabeza del ave a fin de disminuir la percepción a los estímulos ambientales y reducir el estrés de la captura. Se aprovechó a leer el microchip que identificaba a cada ave.

Considerando que se trata de especies en las cuales la sujeción prolongada produce efectos negativos debido al estrés se procuró en todo momento proporcionarles una técnica de captura adecuada, permitiendo realizar la toma de muestras de forma rápida y precisa.

#### 5.2.2.3 Obtención de la muestra:

- Se procedió a la lectura del microchip de identificación del ave.
- Se extendió el ala y se localizó la vena ulnar, aplicándose para ello un poco de alcohol, que permitió una mayor visualización y que el área estuviera aséptica.
- Se aspiró lentamente la sangre con una jeringa para obtener un volumen proporcional al peso del ave (no más del 10 % del peso corporal).

- Se colocó la muestra obtenida en un tubo vacutainer estéril de 13 x 100 mm, con recubrimiento interior de silicón como activador del coágulo sanguíneo.
- Se dejó reposar las muestras por un mínimo de 2 horas antes de ser sometidas a centrifugación para obtención del suero.

#### **5.2.2.4 Procesamiento de las muestras:**

Se sometió las muestras a centrifugación, a una velocidad de centrifugación de 1500 rpm por 10 minutos.

Se procedió entonces a traspasar los sueros obtenidos a tubos de reacción (de Eppendorf), con una micropipeta desechable de plástico. Dichos tubos se identificaron debidamente y luego se colocaron en una gradilla para su posterior congelación.

Se mantuvo las muestras en congelación a -20 grados centígrados para evitar su alteración mientras se terminó de colectar todas las muestras, con la finalidad de correr todas las pruebas juntas debido a la naturaleza del kit.

Se descongeló todas las muestras a temperatura ambiente. Al terminar el muestreo se identificó las placas del kit de inmunodifusión para facilitar la lectura de los resultados.

Una vez identificadas las placas, se procedió a la rehidratación del control positivo de la siguiente manera: se añadió 1 ml de agua destilada al *Aspergillus* en pool liofilizado y se incubó a temperatura ambiente hasta que se disolvió completamente.

Cada placa del kit comercial de inmunodifusión en agar gel viene ya preparado con el medio a utilizar, el cual es agarosa. En cada placa hay 4 rosetas de fosos, presentando cada roseta 7 fosos (ver figura 1).

Placa de ID- Aspergillus

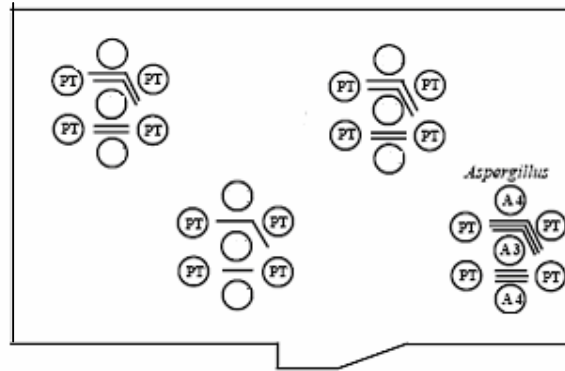


Figura 1

PT = Suero del paciente (Fosos no. 2, 3, 5, 6)

A4 = Suero control positivo de Aspergillus sp. (Fosos no. 1 y 4)

A3 = Antígeno de Aspergillus sp. (Foso no. 7)

En el foso 1 y 4 se colocó con una pipeta unicanal 17  $\mu$ l de control positivo de Aspergillus en pool hasta llenarse el foso. En los fosos 2, 3, 5 y 6 se colocó respectivamente 17  $\mu$ l de suero problema. Al final en cada roseta se tuvo 4 sueros problema distintos y en toda la placa se evaluó 16 sueros problema.

Después de añadir los controles positivos y los sueros de las aves muestreadas, se cerró la placa para pre-incubarla a temperatura ambiente por 30 minutos. Esto hace que las bandas de precipitación sean más intensas, en comparación con la adición de los antígenos inmediatamente. Se llenó el foso central (número 7) con 17  $\mu$ l de antígeno de Aspergillus en pool.

Por último se cerró definitivamente las placas y se colocó en una cámara húmeda de incubación a temperatura ambiente por 24 horas.

Se realizó la lectura luego de 24 horas y se anotó los resultados en la hoja de protocolo. Se esperó otras 24 horas para llevar a cabo una segunda y definitiva lectura por no observarse reacciones de identidad positiva, negativa y parcial. (ver figura 2)

## Reacciones de Identidad Positiva, Negativa y Parcial

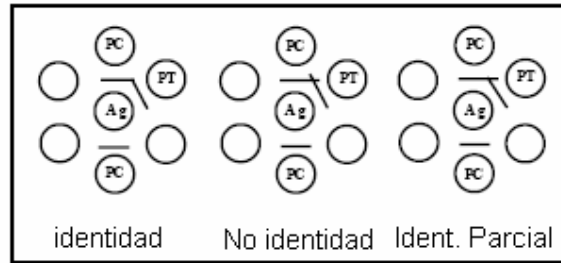


Figura 2

Se realizó la lectura utilizando una lámpara que permite identificar las bandas de precipitación que se forman en caso de observarse una reacción positiva. Para ello se sostuvo la placa sobre la lámpara de tal forma que la luz se proyectara a través de la placa y en ángulo de  $45^\circ$ . La rotación de las placas puede ayudar en la identificación de reacciones débiles o sospechosas positivas. (ver figura 3)

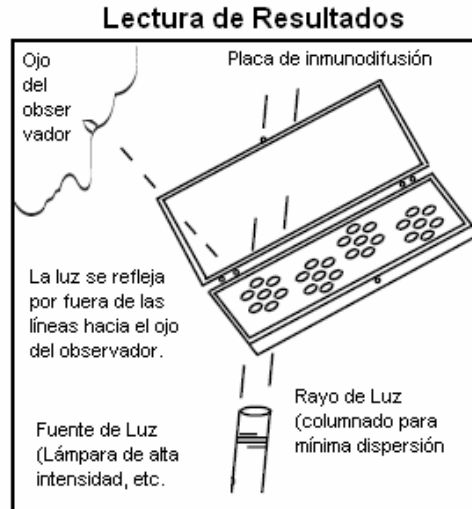


Figura 3

Se anotó los resultados de ambas lecturas en hojas previamente identificadas con los datos de cada placa. (Anexos)



### **5.2.3 Análisis estadístico:**

Se pretendió determinar la prevalencia a anticuerpos de *Aspergillus sp.* en las dos poblaciones de aves rapaces sujetas a estudio.

Se utilizó el análisis estadístico de diferencia de proporciones (promedio de positivos y negativos) entre los dos grupos para determinar la prevalencia a anticuerpos de *Aspergillus sp.* en las aves rapaces cautivas del Zoológico Nacional La Aurora y Club Autosafari Chapín.

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Cuadro 1: Aves Rapaces Muestreadas en el Zoológico Nacional La Aurora**

<b>Especie</b>	<b>Positivos</b>	<b>Negativos</b>	<b>Total</b>
Tecolote de Montaña ( <i>Ciccaba virgata</i> )	0	12	12
Tecolote Común ( <i>Bubo virginianus</i> )	0	3	3
Búho Cornudo ( <i>Asio stygius</i> )	0	1	1
Lechuza de Campanario ( <i>Tyto alba</i> )	0	5	5
Tecolote de Anteojos ( <i>Pulsatrix perspicillata</i> )	0	6	6
Tecolote de Feria ( <i>Asio clamator</i> )	0	4	4
Gavilán del Camino ( <i>Buteo magnirostris</i> )	0	5	5
Gavilán de Harris ( <i>Parabuteo unicinctus</i> )	0	8	8
Gavilán Gris ( <i>Buteo nitidus</i> )	0	9	9
Gavilán Cola Roja ( <i>Buteo jamaicensis</i> )	0	8	8
Gran Halcón Negro ( <i>Buteogallus urubitinga</i> )	0	2	2
Cara cara ( <i>Caracara plancus</i> )	0	3	3
Total	0	66	66

**Cuadro 2: Aves Rapaces Muestreadas en Club Autosafari Chapín**

<b>Especie</b>	<b>Positivos</b>	<b>Negativos</b>	<b>Total</b>
Tecolote Común ( <i>Bubo virginianus</i> )	0	5	5
Lechuza de Campanario ( <i>Tyto alba</i> )	0	2	2
Tecolote de Anteojos ( <i>Pulsatrix perspicillata</i> )	0	3	3
Tecolote de Feria ( <i>Asio clamator</i> )	0	1	1
Gavilán de Harris ( <i>Parabuteo unicinctus</i> )	0	4	4
Halcón Blanco ( <i>Leucopternis albicollis</i> )	0	1	1
<b>Total</b>	<b>0</b>	<b>16</b>	<b>16</b>

Se muestrearon 82 aves rapaces en condición de cautiverio procedentes de dos colecciones zoológicas distintas, (siendo 66 de ellas ejemplares del Zoológico Nacional La Aurora y 16 del Club Autosafari Chapín), para determinar la presencia de anticuerpos contra *Aspergillus* sp., empleando para ello la prueba de inmunodifusión en agar gel, dando como resultado a las 24 y 48 horas de incubación de las placas la no formación de bandas de precipitación, lo cual se interpreta como resultado negativo o ausencia de anticuerpos contra *Aspergillus* sp. para ambas colecciones, como se muestra en el cuadro 1 y 2.

La seroprevalencia negativa a anticuerpos contra *Aspergillus* sp. no confirma que las aves muestreadas estén libres de la enfermedad, únicamente demuestra que al emplear la prueba de inmunodifusión en agar gel, la cual es una prueba cualitativa o semicuantitativa, se obtuvo negatividad absoluta a anticuerpos contra este microorganismo.

Debe darse a conocer que ninguna de las aves sometidas al estudio se encontraba manifestando signos clínicos de aspergilosis, y cada una de estas fue examinada de forma general al momento de su captura. El estudio pretendía únicamente determinar si alguna de las aves estudiadas presentaba (por el hecho de ser rapaz y encontrarse en condición de cautiverio) anticuerpos a nivel sérico, lo que indicaría si habían estado expuestas al *Aspergillus* sp. y de esta manera presentar mayor susceptibilidad al padecimiento de la enfermedad. Por lo tanto, la hipótesis planteada al inicio de la investigación, en la cual se afirmaba que las rapaces de ambas colecciones zoológicas presentarían anticuerpos contra *Aspergillus* sp. fue rechazada.

De forma general puede decirse que el hecho de que una prueba detecte anticuerpos o no, depende no sólo de la exposición al antígeno específico sino también de la capacidad de la técnica para detectar dichos anticuerpos.

El diagnóstico temprano de aspergilosis en la medicina aviar de especies no tradicionales como lo son las rapaces, ha sido poco estudiado y frecuentemente, la serología ofrece la única evidencia disponible para guiar el tratamiento, sugerir un pronóstico o bien para seleccionar un método de diagnóstico más definitivo.

Según Coleman y Kaufman en un estudio realizado en 1971, descubrieron que el método de inmunodifusión fue 100 % específico en una evaluación de su efectividad con 65 sueros de individuos incluyendo los sueros de humanos aparentemente sanos. Esta observación también ha sido confirmada por otros autores.

Sin embargo, según Redig (1981) al compararse distintos métodos de diagnóstico para la identificación de aspergilosis específicamente en aves rapaces (cautivos y de vida libre), determinó que ninguno resultó ser completamente eficaz. Asimismo determinó que en esta especie en particular, la precipitación en agar gel de doble difusión (AGDD) podría resultar ser particularmente pobre, debido a que implica una respuesta sub-óptima por parte de los anticuerpos, pero sugirió que debían hacerse más estudios al respecto.

Debe considerarse que en nuestro medio, la prueba de inmunodifusión resulta ser una prueba fácil de realizar, de bajo costo y rápida la cual permite

evidenciar la infección presuntiva con *Aspergillus* sp, y que permite mediante el conocimiento del perfil serológico de las aves muestreadas, la orientación al diagnóstico y monitoreo en la respuesta a la terapia. Sin embargo se recomienda el uso de técnicas de diagnóstico más específicas y sensibles tales como ELISA, aunque debe mencionarse que estas presentan la desventaja de su alto costo y a la necesidad de emplearse un conjugado específico para cada especie de ave rapaz, específicamente en búhos y halcones.

## VII. CONCLUSIONES

---

- 1) Las aves del Zoológico Nacional La Aurora y Club Autosafari Chapín no presentan anticuerpos contra *Aspergillus* sp. a nivel sérico al realizarse la prueba de inmunodifusión en agar gel.
- 2) La prueba de inmunodifusión en agar gel es una prueba que en nuestro medio presenta la ventaja de ser rápida, simple y de bajo costo, que permite evidenciar la infección presuntiva con *Aspergillus* sp, pero que de forma ideal debería complementarse con otros métodos más específicos para el diagnóstico definitivo de aspergilosis.
- 3) Todavía constituye un reto el diagnóstico temprano de la aspergilosis, particularmente en especies aviares no tradicionales como lo son las aves rapaces.
- 4) La negatividad absoluta a anticuerpos contra *Aspergillus* sp. obtenida tras realizar la prueba de inmunodifusión en agar gel en las rapaces de ambas colecciones zoológicas no afirma que las aves estudiadas se encuentren libres de la enfermedad.

## VIII. RECOMENDACIONES

---

- 1) En los aviarios de toda colección zoológica o particular, que albergue aves rapaces, deben implementarse medidas profilácticas tales como adecuada limpieza de recintos, mantenimiento óptimo del sistema inmunológico, y reducción de estrés mediante ambientes más naturales, debido a que son de gran importancia para lograr reducir el riesgo del padecimiento de aspergilosis.
- 2) Continuar con la investigación de otros métodos de diagnóstico temprano de la aspergilosis que se adapten a nuestro medio y que puedan ser complementarios y de mayor especificidad que la prueba de inmunodifusión en agar gel.
- 3) Considerar la suplementación profiláctica de antifúngicos como el itraconazole en la dieta de las aves rapaces en cautiverio que sean catalogadas como sospechosas de padecer aspergilosis, o bien de forma rutinaria a todas aquellas aves que por el simple hecho de ser rapaces y encontrarse en cautiverio estén mayormente predispuestas a esta enfermedad.

## IX. RESUMEN

---

El presente estudio tuvo la finalidad de determinar la presencia de anticuerpos contra *Aspergillus* sp. en aves rapaces en condición de cautiverio en dos colecciones zoológicas distintas mediante el uso de la prueba de inmunodifusión en agar gel.

Utilicé 82 sueros de distintas especies de aves rapaces. Corrí la prueba de inmunodifusión en agar gel para aspergilosis mediante el uso de un kit comercial para inmunodifusión.

Los resultados obtenidos rechazaron la hipótesis planteada al inicio del estudio debido a que no se encontró presencia de anticuerpos contra *Aspergillus* sp. en ninguna de las aves muestreadas.

Concluyo que las aves del Zoológico Nacional La Aurora y Club Autosafari Chapín no presentan anticuerpos contra *Aspergillus* sp. a nivel sérico tras realizarse la prueba de inmunodifusión en agar gel.

Recomiendo que se continúe con la investigación de otros métodos de diagnóstico temprano de la aspergilosis que se adapten a nuestro medio y que puedan ser complementarios y de mayor especificidad que la prueba de inmunodifusión en agar gel.



## X. BIBLIOGRAFÍA

---

- 1) Abarca, L. 2000. Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. Revista Iberoamericana de Micología, Vol. 17: S79-S84. (en línea) Consultado 23-3-05. Disponible en <http://www.reviberoammicol.com/2000-17/S79S84.pdf>
- 2) Abundis, E. Aspergillosis in Birds of Prey. (en línea) Consultado 4-4-05. Disponible en <http://www.aspergillus.man.ac.uk/secure/veterinary/ASPERGILLOSIS.pdf>
- 3) Altman, M. 1997. Avian Medicine and Surgery. Philadelphia, Pennsylvania, E.U. W.B Saunders Company. 1070 p.
- 4) Bailey, T.A. 2002. Aspergillosis : therapy and prevention in raptors.(en línea) Consultado 13-3-05. Disponible en [www.falcons.co.uk/mefrg/Falco/falco20.pdf](http://www.falcons.co.uk/mefrg/Falco/falco20.pdf)
- 5) Cholewiak, D. 2003. Strigiformes (en-línea). Animal Diversity Web. Consultado 30/6/05. Disponible en <http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Strigiformes.html>
- 6) Deem, S.L. 2003. Fungal Diseases of Birds of Prey. Vet Clin Exot Anim 6. 363-376.
- 7) German, A. 2001. Avian Aspergillosis. (en línea) Consultado 8-3-05. Disponible en <http://www.aspergillus.man.ac.uk/indexhome.htm?secure/veterinary/AspAvian.html~main>
- 8) Guzman, L. 1984. Tesis. Preparación de Antígenos de Especies de Aspergillus y su uso en el diagnóstico de aspergilosis pulmonar secundaria a tuberculosis.
- 9) Kearns, K. 2003. Avian Aspergillosis. (en línea) Consultado 16-3-05. Disponible en [http://www.ivis.org/advances/Kearns/kearns2/chapter\\_frm.asp](http://www.ivis.org/advances/Kearns/kearns2/chapter_frm.asp)
- 10) Kirshbaum, K. 2004. Accipitridae. (en línea) Consultado 9/6/05. Disponible en

<http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Accipitridae.html>.

- 11) Mena, L. 1999. Pruebas Serológicas In Vitro: Precipitaciones en Gel. (en línea) Consultado 14/6/05. Disponible en <http://www.aulavirtual.com.sv/Inmunologia/inmuno19.htm>
- 12) Nicolai J. (1995) Aves Rapaces Diurnas y Nocturnas. Mundo Verde. Editorial Everest; Barcelona, España.
- 13) Rippon, J.W. (1990) Tratado de Micología Médica. 3ª. Ed. McGraw-Hill/Interamericana. México. 865 pp.
- 14) The Fungi: Aspergillus spp. 2005. (en línea) Consultado 29-3-05. Disponible en [http://www.doctorfungus.org/thefungi/Aspergillus\\_spp.htm](http://www.doctorfungus.org/thefungi/Aspergillus_spp.htm)

# **XI. ANEXOS**

Date: \_\_\_\_\_ Plate Lot # \_\_\_\_\_

**PLATE FORM**

**I**

**II**

**III**

**IV**

SERIES I/PLATE#		SERIES II/PLATE#		SERIES III/PLATE#		SERIES IV/PLATE#	
1	POSITIVE CONTROL [REF]	1	POSITIVE CONTROL [REF]	1	POSITIVE CONTROL [REF]	1	POSITIVE CONTROL [REF]
2	SPECIMEN #:	2	SPECIMEN #:	2	SPECIMEN #:	2	SPECIMEN #:
	RESULT:		RESULT:		RESULT:		RESULT:
3	SPECIMEN #:	3	SPECIMEN #:	3	SPECIMEN #:	3	SPECIMEN #:
	RESULT:		RESULT:		RESULT:		RESULT:
4	POSITIVE CONTROL [REF]	4	POSITIVE CONTROL [REF]	4	POSITIVE CONTROL [REF]	4	POSITIVE CONTROL [REF]
5	SPECIMEN #:	5	SPECIMEN #:	5	SPECIMEN #:	5	SPECIMEN #:
	RESULT:		RESULT:		RESULT:		RESULT:
6	SPECIMEN #:	6	SPECIMEN #:	6	SPECIMEN #:	6	SPECIMEN #:
	RESULT:		RESULT:		RESULT:		RESULT:
7	ANTIGEN [REF]	7	ANTIGEN [REF]	7	ANTIGEN [REF]	7	ANTIGEN [REF]

IF POSITIVE CONTROL BANDS FAIL TO APPEAR IN 24 HOURS, REPEAT THE TEST.

Form No. 1110 Rev. Dec 03

Date: \_\_\_\_\_ Plate Lot # \_\_\_\_\_

**PLATE FORM**

**I**

**II**

**III**

**IV**

SERIES I/PLATE#		SERIES II/PLATE#		SERIES III/PLATE#		SERIES IV/PLATE#	
1	POSITIVE CONTROL [REF]	1	POSITIVE CONTROL [REF]	1	POSITIVE CONTROL [REF]	1	POSITIVE CONTROL [REF]
2	SPECIMEN #:	2	SPECIMEN #:	2	SPECIMEN #:	2	SPECIMEN #:
	RESULT:		RESULT:		RESULT:		RESULT:
3	SPECIMEN #:	3	SPECIMEN #:	3	SPECIMEN #:	3	SPECIMEN #:
	RESULT:		RESULT:		RESULT:		RESULT:
4	POSITIVE CONTROL [REF]	4	POSITIVE CONTROL [REF]	4	POSITIVE CONTROL [REF]	4	POSITIVE CONTROL [REF]
5	SPECIMEN #:	5	SPECIMEN #:	5	SPECIMEN #:	5	SPECIMEN #:
	RESULT:		RESULT:		RESULT:		RESULT:
6	SPECIMEN #:	6	SPECIMEN #:	6	SPECIMEN #:	6	SPECIMEN #:
	RESULT:		RESULT:		RESULT:		RESULT:
7	ANTIGEN [REF]	7	ANTIGEN [REF]	7	ANTIGEN [REF]	7	ANTIGEN [REF]

IF POSITIVE CONTROL BANDS FAIL TO APPEAR IN 24 HOURS, REPEAT THE TEST.

Form No. 1110 Rev. Dec 03