

## Aspergilosis Aviar, ¿puede ayudar el laboratorio?

**El término “aspergilosis” se utiliza de manera genérica para designar diferentes enfermedades invasivas y no invasivas, así como algunas colonizaciones saprófitas no patológicas, causadas al ser humano y multitud de especies animales por hongos del género ‘Aspergillus’. Las aves son consideradas uno de los grupos animales más susceptibles a la aspergilosis, siendo además esta enfermedad una de las principales causas de morbilidad y mortalidad aviar (Tell, 2005). En este artículo nos referiremos fundamentalmente al problema que plantea la aspergilosis en la producción avícola, si bien esta patología debe tenerse también en cuenta en el tratamiento de aves individualizadas, ya sea por su valor ecológico, económico y/o sentimental (tal es el caso, por ejemplo, de las aves utilizadas en cetrería).**

**Sergio Quevedo-Caraballo, José L. Blanco, Marta E. García, Sergio Álvarez-Pérez\***  
Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid

\* E-mail: sergioaperez@ucom.es

**A**demás de por su elevada incidencia en producción avícola, la aspergilosis aviar se caracteriza por los graves perjuicios económicos que ocasiona en las explotaciones afectadas. Estas pérdidas económicas se relacionan principalmente con el decomiso de carcasas en los mataderos debido a la presencia de aerosaculitis y neumonía fúngica, la reducción de la tasa de crecimiento de las aves y el aumento de la tasa de mortalidad (Arné et al., 2011). Por ejemplo, se estima que las pérdidas ocasionadas por la aspergilosis en explotaciones de pavos de los Estados Unidos se elevan a más de 11 millones de dólares por año (Dykstra et al., 2013). Desafortunadamente, no existen estudios sistemáticos recientes sobre la prevalencia de la aspergilosis en otras especies de aves y regiones geográficas que permitan una estimación más precisa del impacto económico de esta enfermedad.

### **Etiología y patogenia de la aspergilosis aviar**

El principal agente etiológico de la aspergilosis aviar es *Aspergillus fumigatus*, especie implicada en el 95% de los casos, siendo *Aspergillus flavus* y *Aspergillus niger* las siguientes especies en importancia (**Figura 1**). Además, al igual que ocurre en mamíferos, la principal vía de entrada de los propágulos del hongo (generalmente esporas asexuales, también denominadas conidias) al organismo es a través de la vía respiratoria, y es precisamente el tracto respiratorio inferior donde suele comenzar el proceso de colonización fúngica. No obstante, la infección también puede iniciarse por la ingestión de material contaminado (por ejemplo, piensos enmohecidos) o a través de heridas profundas.

Generalmente, se distinguen dos formas de la aspergilosis respiratoria en aves: la forma aguda y la forma crónica. La forma aguda, comúnmente conocida como “neumonía de las incubadoras”, se caracteriza por una alta morbilidad y mortalidad con signos respiratorios y neurológicos ocasionales en aves de corral jóvenes (Arné et al., 2011; Hauck et al., 2020). Por su parte, la forma respiratoria crónica se observa con mayor frecuencia en aves de mayor edad, sobre todo en pavos adultos (Arné et al., 2011; Hauck et al., 2020). En otras ocasiones la infección es adquirida cuando el animal se encuentra todavía en estado de embrión, ya que *A. fumigatus* es capaz de atravesar las cáscaras porosas de los huevos, ocasionando que el embrión no llegue

a término. En cualquier caso, debe tenerse en cuenta que se trata de una enfermedad que no es contagiosa ni zoonótica, sino que los brotes de aspergilosis suelen ser el resultado de la exposición de los animales afectados a una misma fuente ambiental de *Aspergillus*.

Las razones de la alta susceptibilidad de las aves a la aspergilosis no están del todo claras, aunque se sospecha que la singular configuración anatómica de su sistema respiratorio, el cual está conectado con un extenso sistema de sacos aéreos que aumenta notablemente la superficie epitelial en contacto con el aire inhalado, tiene un papel fundamental en el riesgo de desarrollar la patología (Tell, 2005). Otros factores que parecen predisponer a la infección por *Aspergillus* spp. son los siguientes: i) situaciones de estrés provocadas por el transporte, posible hacinamiento de los animales y/o cuarentenas; ii) enfermedades y traumatismos previos o concomitantes; iii) malnutrición (por ejemplo, la hipovitaminosis A, que suelen darse en animales que se alimentan mayoritariamente o de forma exclusiva a base de semillas); iv) exposición a ambientes poco higiénicos, con escasa ventilación y lechos húmedos, que favorecen el crecimiento fúngico; y v) exposición a irritantes respiratorios y otros compuestos tóxicos presentes en el ambiente (Tell, 2005; Dykstra et al., 2013). No obstante, la

aspergilosis afecta por igual tanto a aves salvajes como a aves mantenidas en cautividad, inmunocompetentes o inmunocomprometidas y prácticamente de cualquier rango de edad.

Los principales órganos diana para la aspergilosis aviar son los pulmones y sacos aéreos, la tráquea y la siringe, siendo frecuente en todos estos casos la observación de nódulos caseosos o placas y granulomas masivos con centros necróticos. También es frecuente la diseminación desde las vías aéreas a otros órganos del animal. Otras formas menos frecuentes de la enfermedad en aves son las dermatitis, las osteomicosis, las ooforitis y keratitis,

la vocalización, y marcada pérdida de peso sin pérdida del apetito. En algunos casos también pueden producirse vómitos, polidipsia y poliuria. Además, hematológicamente, las aves con aspergilosis suelen mostrar leucocitosis con heterofilia y monocitosis, linfopenia, hiperproteinemia y anemia no regenerativa.

### Diagnóstico y trazado epidemiológico de las aspergilosis en aves de producción

Al igual que en otros grupos animales, el diagnóstico de las aspergilosis aviares incluye técnicas de hematología, serología, citología, cultivo fúngico, histopatología y diagnóstico por imagen. Sin embargo, en el caso de las aves de producción, el mane-

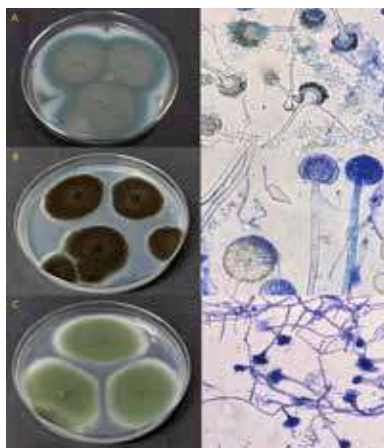
## “Los hongos del género *Aspergillus* son ubicuos en el ambiente, siendo el suelo y las acumulaciones de materia orgánica en descomposición sus principales hábitats”

y las encefalitis micóticas. En general, los signos clínicos son inespecíficos y dependen del tipo de manifestación de la enfermedad, la localización de la infección y el estado inmune del ave (Tell, 2005; Dykstra et al., 2013). Los signos más comunes suelen ser: disnea, letargia, inapetencia, rinitis, cambios en el comportamiento y en

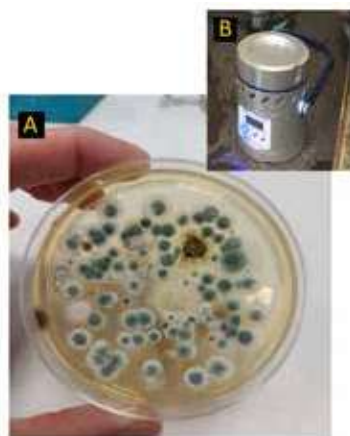
jo a nivel de grupo es mucho más común que el de los animales a nivel individual y, por tanto, el diagnóstico temprano de la aspergilosis supone un gran desafío. De hecho, el diagnóstico de aspergilosis en avicultura suele realizarse de manera mayoritaria en los exámenes *post mortem* realizados a los animales, en los que la observación de lesiones macroscópicas tales como múltiples nódulos densos en los pulmones u otros órganos internos o de tapices fúngicos en los sacos aéreos, es claramente indicativo de la muerte por aspergilosis (Arné et al., 2011). La confirmación de tal diagnóstico se lleva generalmente a cabo mediante el aislamiento del hongo en cultivo, asociado a la evidencia de invasión tisular y la observación de hifas en histopatología. Debido a la ubicuidad de los hongos del género *Aspergillus*, el aislamiento del hongo sin la presencia de lesiones tiene escaso valor diagnóstico.

Una vez realizado el aislamiento fúngico en medios micológicos convencionales (por ejemplo, agar Sabouraud glucosado y agar dextrosa patata, con o sin suplementos antibióticos), la especie de *Aspergillus* implicada puede identificarse mediante criterios tradicionales (aspecto macroscópico y microscópico) o por técnicas de biología molecular (amplificación por PCR de marcadores moleculares con valor taxonómico, seguido de la secuenciación Sanger de los amplicones resultantes y la búsqueda

**Figura 1.** Aspecto macroscópico (izquierda) y microscópico (tinción con azul de metileno, objetivo de 40x; derecha) de *Aspergillus funigatus* (A), *Aspergillus niger* (B) y *Aspergillus flavus* (C).



**Figura 2.** Colonias de *Aspergillus* spp. creciendo en una de las placas de medio de cultivo utilizadas en un análisis de calidad ambiental tras 24 h de incubación (A) y muestreador de aire utilizado en dicho análisis (B).





da de las secuencias en bases de datos de secuencias nucleotídicas). Por otro lado, la PCR en tiempo real sobre muestras de necropsia puede utilizarse para cuantificar la carga fúngica en los tejidos del animal.

En cuanto al diagnóstico serológico de la aspergilosis aviar, los ensayos ELISA para la detección de anticuerpos disponibles en la actualidad son poco sensibles y/o específicos. Además, la exposición continuada de las aves a reservorios ambientales del hongo implica que la mayoría de los animales, incluyendo los clínicamente sanos, tenga un nivel basal elevado de anticuerpos anti-*Aspergillus*. Por su parte, los métodos de detección de antígenos incluyen la medición de galactomanano y betaglucono, los cuales tienen un valor diagnóstico muy limitado por presentarse en niveles elevados en aves clínicamente normales (Hauck et al., 2020).

Finalmente, debe tenerse en cuenta que existen diferentes técnicas de biología molecular para el tipado y subtipado de los aislamientos de *Aspergillus* (Tabla 1). Pese a la notable carga de trabajo y el coste económico que implican algunas de estas técnicas, debe destacarse su capacidad para ayudar a esclarecer la epidemiología de los brotes de aspergilosis aviar (Arné et al., 2011).

### Tratamiento y prevención de la aspergilosis en producción avícola

La prevención de la aspergilosis supone un reto importante en producción avícola. La mayoría de las medidas preventivas pretenden la eliminación de cualquier posible foco de exposición a propágulos de *Aspergillus* spp., para lo cual se requiere el mantenimiento de unos estándares adecuados de higiene y calidad ambiental (Dykstra et al., 2013).

Los hongos del género *Aspergillus* son ubicuos en el ambiente, siendo el suelo y las acumulaciones de materia orgánica en descomposición sus principales hábitats. Las conidias transportadas por el aire pueden depositarse y contaminar diferentes superficies y volver a ser de nuevo resuspendidas en la atmósfera por diversas causas naturales o inducidas por la actividad humana y animal, entrando así en un ciclo de deposición y resuspensión que puede repetirse durante periodos de tiempo prolongados, ya que las conidias de *Aspergillus* spp. permanecen viables durante meses. En este contexto, suele recomendarse la realización de mediciones periódicas de la carga fúngica en el aire de las explotaciones utilizando procedimientos estandarizados (Figura 2), así como el establecimiento de medi-

das de descontaminación ambiental en caso de ser necesario reducir dicha carga. Además, el agua puede suponer una vía alternativas de transmisión de la aspergilosis; no obstante, esta “vía húmeda” puede adquirir diversas formas, pudiendo producirse la entrada de las conidias del hongo al interior del hospedador por la toma directa de agua contaminada, la inoculación a través de heridas cutáneas o, indirectamente, por inhalación de aerosoles (“gotículas”) contaminada por conidias de *Aspergillus*.

Además de garantizar unas condiciones adecuadas de higiene ambiental, debe prestarse gran atención a la alimentación de los animales, ya que los piensos enmohecidos pueden ser un reservorio fúngico y, además, pueden contener pequeñas cantidades de micotoxinas, cuyos efectos podrían afectar a la productividad y el estado general de salud de los animales, haciéndolos más susceptibles a la aspergilosis. También deben reducirse al máximo los procedimientos y situaciones que

**Figura 3.** Ejemplo de ensayo *in vitro* de sensibilidad de *Aspergillus fumigatus* frente a los antifúngicos anfotericina B (AP, izquierda) y ketoconazol (KE, derecha), realizado mediante la técnica del Etest®. La concentración mínima inhibitoria (CMI) para anfotericina B corresponde al punto en el que el halo de inhibición del crecimiento fúngico intersecta a la tira que contiene un gradiente del antifúngico (2 µg/mL, flecha roja). Nótese que el aislamiento fúngico analizado es insensible a ketoconazol (CMI > 32 µg/mL).





puedan ocasionar estrés a los animales y, por tanto, resultar en un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad.

En la actualidad no existen vacunas comerciales que ayuden a prevenir la aspergilosis aviar y las pocas vacunas experimentales generadas hasta la fecha no inducen una protección suficiente y duradera. En cuanto a los tratamientos antimicóticos, en muchos países no hay antimicóticos sistémicos registrados para su uso en aves de producción (Hauck et al., 2020). Algunos de los tratamientos utilizados con mayor frecuencia son la administración de nistatina o sulfato de cobre con el agua de bebida. Es importante tener en cuenta que la aplicación de cualquier compuesto antimicótico en aves debe realizarse de manera juiciosa, teniendo en cuenta la posible selección de cepas de *Aspergillus* resistentes a dichos compuestos, que supone una amenaza emergente a nivel mundial (Melo et al., 2020). En relación a esto último, se considera que la realización rutinaria de ensayos *in vitro* de susceptibilidad antifúngica a los aislamientos de *Aspergillus* spp. procedentes de las aves afectadas y su entorno ambiental es una herramienta útil para mejorar la eficacia de los tratamientos frente a la aspergilosis aviar a la vez que se previene la selección de cepas resistentes a los mismos (Figura 3).

### Conclusiones

En conclusión, la aspergilosis sigue siendo una enfermedad de gran importancia en producción avícola que, en no pocas ocasiones, resulta difícil de prevenir y erradicar. En este sentido, debe destacarse el papel del laboratorio en el diagnóstico temprano de esta patología, así como en el estudio epidemiológico de los brotes, la monitorización de los niveles ambientales de propágulos de *Aspergillus* spp., la selección de tratamientos óptimos, y la detección de posibles aislamientos resistentes a los antifúngicos.

### REFERENCIAS

Álvarez-Pérez S, García ME, Blanco JL, Peláez T (2012) Aspergilosis humanas y animales: ¿por qué es importante tener en cuenta los aspectos ambientales? *Laboratorio Veterinario* 60:2-11.

Arné P, Thierry S, Wang D, Deville M, Le Loc'h G, Desoutter A, Féménia F, Nieguitsila A, Huang W, Chermette R, Guillot J (2011) *Aspergillus fumigatus* in poultry. *International Journal of Microbiology* 2011:746356.

Dykstra MJ, Charlton BR, Chin RP, Barnes HJ (2013) Fungal infections. En: Swaine DE, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Suarez DL, Nair V. (Eds.) *Diseases of poultry*, 13th Edition. Iowa State Press, Ames. pp. 1077-1096.

Hauck R, Cray C, França M (2020) Spotlight on avian pathology: aspergillosis. *Avian Pathology* 49(2):115-118.

Melo AM, Stevens DA, Tell LA, Verissimo C, Sabino R, Xavier MO (2020) Aspergillosis, avian species and the One Health perspective: the possible importance of birds in azole resistance. *Microorganisms* 8(12):2037.

Tell LA (2005) Aspergillosis in mammals and birds: impact on veterinary medicine. *Medical Mycology* 43(Suppl. 1):S71-S73.

**MG**



**Tabla 1.** Principales técnicas utilizadas en el (sub)tipado molecular de aislamientos de *Aspergillus*. Modificado de Álvarez-Pérez et al. (2012).

Técnica (siglas en inglés)	Fundamento
Electroforesis de isoenzimas (MLEE)	Separación de proteínas mediante electroforesis en gel, seguida de la visualización de enzimas específicas mediante determinadas reacciones de tinción.
Cariotipado electroforético	Separación de cromosomas intactos en un gel de agarosa al ser sometidos a un campo eléctrico fluctuante.
Polimorfismos de ADN amplificado al azar (RAPD)	Unión al azar de oligonucleótidos cortos al ADN molde, seguida de la amplificación por PCR y separación electroforética de los fragmentos amplificados.
Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP)	Digestión del ADN molde mediante endonucleasas de restricción y separación electroforética de los fragmentos resultantes.
Hibridación de elementos multicopia <i>AfutI</i>	Hibridación de la secuencia <i>AfutI</i> (similar a un retrotransposón) a fragmentos de ADN generados mediante endonucleasas de restricción, seguida de la visualización de los patrones de hibridación mediante autorradiografía.
Polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP)	Digestión del ADN molde mediante endonucleasas de restricción seguida de la unión de adaptadores a los fragmentos resultantes, su amplificación por PCR y su separación electroforética.
Microsatélites	Amplificación de secuencias cortas repetidas en tándem y análisis del tamaño de los amplicones o del número de copias del fragmento repetido.
Polimorfismos de nucleótido único (SNP)	Análisis de las variaciones de una única base nitrogenada en un locus determinado por secuenciación Sanger de una región genómica concreta, secuenciación de genoma completo u otras técnicas.
Análisis de la secuencia del gen CSP	Estudio de la variabilidad en los motivos repetidos presentes en la secuencia del gen CSP de <i>Aspergillus fumigatus</i> , el cual codifica una proteína de la pared celular.
Tipado de secuencias multilocus (MLST)	Análisis de la variabilidad en la secuencia de distintos genes constitutivos, determinada por secuenciación Sanger o por secuenciación de genoma completo.