



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado

CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS ASOCIADOS
A PROCESOS PATOLÓGICOS EN ESPECIES DE INTERÉS
VETERINARIO

Autor

BERTA MARTÍNEZ MARTÍNEZ

Director/es

INMACULADA MARTÍN BURRIEL

ROSA MARÍA BOLEA BAILO

Facultad de Veterinaria

2015

ÍNDICE

Resumen.....	Pág. 2
Abstract.....	Pág. 3
Introducción.....	Pág. 4
- Diagnóstico clínico y anatomopatológico.....	Pág. 4
- Diagnóstico Microbiológico.....	Pág. 4
- Diagnóstico molecular.....	Pág. 6
Justificación y objetivos.....	Pág. 9
Metodología.....	Pág. 10
- Diagnóstico histopatológico.....	Pág. 10
- Diagnóstico microbiológico.....	Pág. 12
- Diagnóstico molecular.....	Pág. 14
Resultados y discusión.....	Pág. 21
- Diagnóstico histopatológico.....	Pág. 21
- Diagnóstico microbiológico.....	Pág. 21
- Diagnóstico molecular.....	Pág. 22
Conclusiones.....	Pág.26
Conclusions.....	Pág. 27
Valoración personal.....	Pág. 28
Bibliografía.....	Pág. 29
Anexos.....	Pág. 31

RESUMEN

Título: Caracterización de microorganismos asociados a procesos patológicos en especies de interés veterinario.

La caracterización microbiana mediante técnicas microbiológicas, bioquímicas y genéticas ha supuesto un gran avance, tanto en Salud Pública como en Sanidad Animal, y en otras aplicaciones del campo veterinario (industria alimentaria, biofarmacología, etc.), pudiendo llegar a conocer las cepas implicadas en los diferentes procesos y establecer su trazabilidad. Este trabajo fin de grado será un ejemplo de dicha relevancia.

El objetivo final fue realizar la caracterización microbiana de microorganismos que pudieran ser encontrados a partir de la toma de muestras en especies, de interés veterinario, afectadas patológicamente por ellos. Para ello realizamos el estudio de un gato con dermatitis necrótica.

En primer lugar, realizamos el estudio histopatológico mediante la tinción de la piel lesionada con Hematoxilina-Eosina (H-E). Tras ello, se procedió al estudio fenotípico del agente a través del cultivo en medios adecuados, aislamiento e identificación, mediante el estudio de las características macroscópicas, microscópicas y pruebas bioquímicas.

Por las lesiones clínicas observadas y el aislamiento en el medio de cultivo de agar Sabouraud, se demostró la presencia de hongos que fueron estudiados genéticamente para confirmar la identificación microbiológica, y para realizar una caracterización molecular del agente microbiano. Para ello se realizó la amplificación y secuenciación de la región variable de genes conservados en los microorganismos hallados, concretamente de una región variable del gen que codifica para la subunidad pequeña del rRNA ribosomal (18s rRNA), las regiones ITS (espaciador transcribable interno) del 18s-28s rRNA y un fragmento del gen constitutivo de la β -tubulina. Una vez obtenida la secuencia por el método Sanger se comparó con las secuencias presente en la base de datos GenBank mediante la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para la obtención del género y especie del agente etiológico hallado. La identificación final obtenida se corresponde con el hongo *Aspergillus tubingensis*.

ABSTRACT

Title: Characterization of microorganisms associated with disease processes in species of interest in veterinary.

The microbial characterization through micro-biological, biochemical and genetic techniques has represented a great step forward not only in animal health but also in public health, and in other applications in the veterinary field (food industry, biopharmacology, etc.), being able to identify the strains involved in the different processes and to establish traceability. So, this final project would be an example of such importance.

The ultimate goal is to do the microbial characterization of microorganisms that could ever be found in pathologically species of veterinary interest. For this, we made a study of necrotic dermatitis in a cat.

First of all, we made histopathological examination of damaged skin by hematoxylin and eosin staining. After, we analysed the agent phenotype through cropping in appropriate culture media, isolating and identifying the microbes present in the animals that were being studied. To do this we studied the macroscopic and microscopic characteristics and biochemical tests.

The clinical lesions seen and the positive crop in agar Sabouraud indicated the presence of fungi. This was studied genetically to confirm the identification microbiology and to make a molecular characterization of microbial agent. For this, we made the amplification and sequencing of three variable genomic regions of microorganism found, specifically, the gene coding for the small unit of rRNA (18S RNA), the ITS region (Internal Transcriber Spacer) of 18s-28s rRNA and a fragment of constitutive gene like β -tubulin. When we obtained the sequence by the Sanger method, we compared it with the sequences present in the GenBank database using the BLAST tool to get the genus and species of the microorganism found. The final diagnosis was corresponding with the fungi *Aspergillus tubingensis*.

INTRODUCCIÓN

La identificación microbiana tiene como objetivo conocer el agente etiológico responsable del proceso infeccioso, las implicaciones patogénicas y la aplicación de una terapia antimicrobiana eficaz (García *et al.* 2011). Una identificación rápida y exacta puede ser la clave para solucionar un problema de contaminación microbiana con éxito, ya que proporciona información crítica sobre las posibles fuentes de dicha contaminación y las formas más efectivas para prevenirla, controlarla o luchar contra ella. Así, la identificación microbiana ha supuesto un gran avance tanto en Salud Pública como en Sanidad Animal, y en otras aplicaciones del campo veterinario como la industria alimentaria y la biofarmacología, pudiendo llegar a conocer las cepas implicadas en los diferentes procesos y establecer su trazabilidad.

- **Diagnóstico clínico y anatomopatológico**

El protocolo de actuación ante la aparición de una patología infecciosa consiste en primer lugar, en hacer un diagnóstico de las lesiones de forma macroscópica y de la sintomatología producida para así establecer un cuadro diferencial de las posibles causas, tomando también como referencia otros parámetros como la especie afectada, la raza, la edad y el sexo, entre otros, pues pueden orientar el diagnóstico por la predisposición que algunas enfermedades tienen. Puede hacerse ante-mortem o post-mortem mediante necropsia e histopatología si la enfermedad ha acabado con la vida del animal. Estos métodos permiten confirmar o descartar diagnósticos previos y conocer si el tratamiento efectuado era el oportuno, incrementando así la posibilidad de lograr un buen diagnóstico en otros casos (Aline, 1985).

Diagnóstico microbiológico

Una vez observadas y definidas las lesiones de forma macroscópica se procede a la toma de muestras para llevar a cabo la identificación del agente mediante métodos fenotípicos. Supone un pilar básico para la identificación microbiana y por ello se realiza de rutina en el laboratorio de microbiología, teniendo también en cuenta la sencillez de su realización y el coste, que hacen de este método una prueba asequible. Se basa en el cultivo de la muestra tomada en distintos medios, y en el estudio de las características observables como la morfología, el desarrollo, y las propiedades bioquímicas y metabólicas del agente que crece en dichos medios. Se realiza la comparación de microorganismos desconocidos con cultivos tipo. La fiabilidad de la identificación consiste en la observación de características similares a los cultivos de referencia. A pesar de esto, el principal problema de este tipo de identificación se basa en la ausencia de concordancia entre las características observables, morfológicas y/o

fenotípicas del microorganismo aislado respecto a las cepas de la especie tipo, haciendo que los métodos fenotípicos supongan la identificación más probable pero no definitiva (García *et al.* 2011).

El cultivo continúa siendo el método diagnóstico de elección pues permite el aislamiento del microorganismo implicado, su identificación, el estudio de la sensibilidad a antimicrobianos y facilita la aplicación de marcadores epidemiológicos (García *et al.* 2011). Para ello se precisa de un medio de cultivo que es un material nutritivo preparado para el crecimiento de microorganismos (Tortora *et al.* 2007) y un paso muy importante es la correcta elección de éste y de las condiciones de incubación (García *et al.* 2011). Según cuál sea el microorganismo que se busca, el medio contendrá unos nutrientes u otros. Pero además se controlarán otros parámetros como la temperatura de crecimiento, la humedad, el pH, ajustado de manera apropiada, y una concentración conveniente de oxígeno, tal vez ausente por completo (Tortora *et al.* 2007).

Cuando los microorganismos crecen en el medio de cultivo seleccionado, se procede a realizar una inspección tanto de las características macroscópicas como microscópicas, así como a la realización de pruebas bioquímicas. La morfología macroscópica se refiere a las grandes colonias que se forman, que son clones de un microorganismo originario. Este hecho fenotípico supone una gran ayuda a la identificación pues cada microorganismo crece de forma diferente, formando colonias de distinto color, forma, tamaño, textura, olor, brillo, etc. No es un método definitivo, pero dirige el diagnóstico hacia un grupo más o menos amplio de microorganismos (Fernández-Rodríguez, 2013).

En el caso de las bacterias, casi todas son similares en morfología microscópica y sólo se pueden establecer algunos grandes grupos, por lo que no es un criterio definitivo para el diagnóstico. Se suele recurrir a la tinción de Gram o al examen en fresco y sólo algunas se pueden identificar presuntivamente debido a formas muy peculiares como por ejemplo *Fusobacterium* que se trata de un bacilo Gram negativo fusiforme (Prescott *et al.* 2002).

En el caso de los hongos las características morfológicas, tanto macroscópicas como microscópicas (estructuras de reproducción sexual o asexual y características especiales de las hifas) son fundamentales para su identificación (Cuenca-Estrella *et al.* 2007). El aspecto general de un hongo en el medio de cultivo es muchas veces suficiente para que un especialista pueda indicar su género (García, 2004).

Las pruebas bioquímicas tienen como objetivo determinar las características metabólicas de los microorganismos a estudiar. Para las bacterias suponen un pilar básico en la identificación y hay una gran variedad de ellas, de lectura inmediata como la prueba de la catalasa y oxidasa; rápidas con lecturas de menos de 6 horas como la prueba de la ureasa y el indol; lentas con lecturas de 18 a 48 horas como la óxido-fermentación y la reducción de nitratos y pruebas basadas en caracteres de resistencia a ciertas sustancias como optoquinina, bacitracina y crecimiento en caldo hipersalino (García *et al.* 2011). Para las levaduras las principales pruebas bioquímicas son la filamentación precoz, detección de ureasa, prueba de la enzima nitrato-reductasa y prueba de la fenol-oxidasa (Solís *et al.* 2007). Para los hongos filamentosos los criterios de identificación son fundamentalmente morfológicos aunque en ocasiones se complementa con pruebas bioquímicas como la investigación de la ureasa (Cuenca-Estrella *et al.* 2007).

- **Diagnóstico molecular**

Debido a las dificultades de sensibilidad, especificidad y lentitud de las técnicas microbiológicas tradicionales, se han desarrollado durante la última década diversas técnicas en el campo de la biología molecular con gran potencial en el área del diagnóstico microbiológico (Guzmán, 2004). A diferencia del método de identificación anterior, se basan en el estudio del material genético de los microorganismos (DNA, ácido desoxirribonucleico y RNA, ácido ribonucleico), no en sus características externas (Dulbecco *et al.* 1997).

Las principales ventajas de este método son (Prescott *et al.* 2002):

- Ofrecen una capacidad de discriminación mucho mayor y son de utilidad en la precisión del diagnóstico cuando la visualización y el cultivo no son suficientemente resolutivos.
- Permiten un diagnóstico preciso cuando el patógeno no crece en el cultivo o se encuentra en bajas concentraciones.
- Son mucho más rápidas por que no necesitan que crezca el patógeno.
- Además de usarse para identificar microorganismos, se pueden usar en taxonomía ya que permiten establecer relaciones filogenéticas.

A pesar de todas estas ventajas, no es un método de implantación universal debido al coste más elevado y al grado de especialización que se requiere para su aplicación (García *et al.* 2011).

Todos los organismos vivos se caracterizan por su material genético. El DNA o RNA que contienen sus células posee secuencias que caracterizan cada especie. Por ello la detección de estas se ha propuesto como un excelente sistema de diagnóstico.

El análisis de DNA puede hacerse:

- Mediante PCR (Polymerase Chain Reaction)
- Mediante hibridación con la utilización de sondas
- Mediante digestión enzimática
- de los ácidos nucleicos

Para el diagnóstico basado en la digestión enzimática de los ácidos se utilizan endonucleasas de restricción como reactivos. Estas son enzimas que se encuentran de forma natural en diversas bacterias, que las usan de defensa para DNA extraño. Son capaces de detectar secuencias específicas y provocar el corte de ambas cadenas por ese punto. El DNA problema es expuesto a estas enzimas y los fragmentos obtenidos se separan por electroforesis obteniendo un patrón de restricción, que es una colección de bandas dispuestas de manera concreta para cada bacteria y para cada enzima. Este patrón se compara con estándares de especies conocidas y se llega a la identificación (Prescott *et al.* 2002).

Otro tipo de diagnóstico consiste en la identificación del DNA del microorganismo problema mediante sondas. Son moléculas de DNA de cadena sencilla marcadas mediante radiactividad o agentes químicos con el fin de ser utilizadas para la detección de secuencias complementarias de DNA o RNA. La gran limitación de esta técnica es su baja sensibilidad pues es necesario gran cantidad de DNA diana para detectar marcaje, por lo que será necesario realizar una amplificación previa (Zavala, 2005).

Las técnicas de amplificación génica solucionan este problema. La reacción en cadena de la polimerasa o PCR (Polymerase Chain Reaction) ha sido hasta la fecha uno de los descubrimientos más importantes en la historia de la biología molecular. Se trata de una ingeniosa estrategia que consigue generar millones de copias de la secuencia de DNA que se desee, permitiendo la visualización y el análisis de dicho fragmento. Las aplicaciones prácticas de la PCR en multitud de campos de la ciencia son casi innumerables. En el diagnóstico microbiológico cada vez está más implantada y sin lugar a dudas es el futuro, ya no tan lejano, de la microbiología clínica (Zavala, 2005). Mediante la PCR podemos amplificar fragmentos variables del genoma de los microorganismos que, una vez secuenciados, nos permitirán

identificar el género e incluso la especie a la que pertenece el microorganismo sin necesidad de disponer de grandes colecciones microbianas en el laboratorio de diagnóstico.

Los genes o regiones más utilizadas para los análisis dependen del microorganismo del que se trate. Para los hongos se ha propuesto el análisis de una región variable del gen que codifica para la subunidad pequeña del RNA ribosoma (18S rRNA) (Borneman *et al.* 2000), la región ITS (Internal transcribed spacer) (Talbot *et al.* 2014) y la región del gen que codifica para la β tubulina (Talbot *et al.* 2014), proteína que forma los microtúbulos implicados en la multiplicación celular. La región ITS se refiere al espacio de DNA no codificante situado entre la subunidad pequeña del DNA ribosomal (rDNA) y la subunidad grande. En el caso de los hongos existen dos ITS, ITS1 situada entre la subunidad pequeña y 5.8S e ITS2 entre 5.8S y la subunidad grande del rDNA (Orland, 2011). Entre las regiones del cistrón ribosomal, la región ITS tiene la mayor probabilidad de éxito para la identificación de hongos, con una gran variación inter e intraespecífica (Schoch *et al.* 2012). Para las bacterias la región 16S incluido en la subunidad 30S de DNA ribosomal es el marcador inicial y en muchas ocasiones el suficiente para realizar la identificación bacteriana más precisa (García *et al.* 2011).

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La identificación microbiana se considera una herramienta muy importante en el diagnóstico de patologías en los animales, ya que permite evidenciar el agente etiológico causante del problema. En el área de la clínica veterinaria, el aislamiento microbiano permite proponer un tratamiento específico de la enfermedad, aumentando así la probabilidad de respuesta a la terapia y con ello de curación, y en el caso de que el individuo haya fallecido, tratar o prevenir la aparición del agente en los individuos en riesgo, evitando así el mismo final. Esta práctica es muy común en los animales de abasto, donde una disminución del rendimiento ya es motivo suficiente de preocupación. Uno de los grandes problemas que acarrea el hecho de tratar sin conocer el microorganismo responsable es la aparición de resistencias a antimicrobianos y es que existen gran cantidad de patologías con sintomatología muy similar provocadas por agentes microbianos muy diferentes, sensibles a fármacos distintos. La principal consecuencia de esto es que los tratamientos habituales se vuelven ineficaces, las infecciones persisten y pueden transmitirse a otros individuos donde el tratamiento inicial ya no sirve.

Asimismo, el aislamiento permite llevar a cabo una identificación más exacta del agente, utilizando técnicas de secuenciación génica, cuando el caso sea relevante o con fines de investigación. Como consecuencia de la utilización de este método, se han descrito nuevas especies microbianas.

Para la realización de este trabajo, se ha hecho un seguimiento diagnóstico en un gato común europeo adulto, 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:

1. Analizar las lesiones producidas por agentes microbianos en especies de interés veterinario desde el punto de vista histopatológico.
2. Obtención de un cultivo puro del agente causal de la patología a partir del cual se procederá al estudio microbiológico y molecular.
3. Estudio morfológico del cultivo, macroscópico y microscópico, con el fin de aproximar la identificación del agente.
4. Diagnóstico molecular del agente provocador de la patología mediante amplificación y secuenciación de genes o segmentos de ellos.

METODOLOGÍA

La realización de este trabajo fin de grado ha constado de tres partes: diagnóstico histopatológico, estudio microbiológico mediante el aislamiento del agente patógeno para la obtención de un cultivo puro y diagnóstico molecular o genético a partir de este, mediante secuenciación de DNA.

Todo ello se llevó a cabo sobre un mismo animal, un gato común europeo de 3 años de edad, eutanasiado por la presencia de un adenocarcinoma intranasal incompatible con la vida. Además en la historia clínica se recogía que el animal padecía leucemia felina (FeLV).

- **Diagnóstico histopatológico**

En el caso de la medicina veterinaria, el diagnóstico anatomopatológico juega un papel fundamental para la identificación de patologías. Es el obtenido mediante estudio macroscópico y microscópico de los tejidos obtenidos a través de la biopsia o la necropsia y se basa en los hallazgos patológicos, identificando el sistema u órgano afectado y describiendo morfológicamente la lesión (Rodostis *et al.* 2002).

Previo a la realización de la necropsia es importante conocer la historia clínica del animal, pues orientará sobre los hallazgos a encontrar y sobre el diagnóstico a emitir. Para la obtención de la máxima información del examen post-mortem de un animal es fundamental seguir un proceso riguroso rutinario que permita la visualización de todos los sistemas. De este modo se asegura la descripción de todas las lesiones posibles, ya que la omisión de algún aparato o sistema puede llevar a la imposibilidad de diagnosticar un problema o incluso a un diagnóstico equivocado.

En este caso, la necropsia se llevó a cabo de forma privada. Las lesiones más relevantes encontradas fueron: tumor intranasal de diámetro considerable con metástasis pulmonar, degeneración grasa hepática, muy común en la especie felina y dermatitis necrótica multifocal.

De los tejidos y órganos afectados se realizó la histopatología en la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza. Nos centraremos en este estudio en la muestra procedente de las zonas alopécicas correspondientes a las lesiones asociadas a dermatitis. Para ello, una vez obtenida la muestra del animal se sumergió inmediatamente en formol tamponado al 10% en un volumen suficiente para que flotase libremente durante 48 horas. Esta fase se denomina fijación ya que permite que se mantenga la estructura similar a la normal en el organismo al estimular la formación de enlaces cruzados entre las proteínas. Además, permite que las

células mantengan su estructura para conservar propiedades intactas. Esto se consigue porque inactiva ciertas enzimas celulares que de otra manera iniciarían la autólisis y llevarían a la degeneración post-mortem. A continuación se lavó la muestra para eliminar el exceso de fijador y se deshidrató para evitar la interferencia del agua del tejido con medios de inclusión hidrófobos. Para ello se aplicó una serie gradual de soluciones acuosas de menor a mayor grado de concentración de agente deshidratante, como el alcohol etílico (70%, 96% y 100%). Esto se hace así porque si se introdujera en una solución al 100% de alcohol inmediatamente, el agua saldría de forma muy rápida del tejido y se deformaría. Tras esto se pasó a una solución de Xileno, sustancia miscible tanto para el alcohol como para la parafina líquida usada para la inclusión. Esta etapa se denomina aclaramiento o diafanización porque el tejido se torna transparente al modificar el índice de refracción facilitando su observación en microscopía de luz. Tras esta etapa, el tejido sigue siendo una estructura blanda y frágil, de tal forma que previo a la obtención de los cortes fue necesario incluirlos en un medio de soporte como la parafina. Cuando está a temperatura elevada, 56-60º, la parafina se funde y penetra en el tejido. Para permitir este proceso, una vez añadida la parafina, se colocaron las muestras en una estufa durante 4 horas aproximadamente manteniendo la temperatura a 60º. Al enfriarse, la parafina solidifica formando un bloque rígido que puede ser cortado fácilmente en el microtomo, en secciones lo suficientemente delgadas como para permitir el paso de la luz. Para microscopía óptica la mayor parte de los preparados tienen un grosor entre 5 y 10 micrómetros. Para fijar la muestra en el portaobjetos se introdujeron las diferentes secciones efectuadas en un baño termostático aproximadamente a 45ºC. Es una cubeta dentro de la cual está la solución de montaje que contiene gelatina al 1% que hace función de adhesivo. En ella, el preparado se va estirando, eliminándose las arrugas y pliegues formados por el corte, debido a la dilatación de la parafina por el calor. Es importante que la temperatura no alcance la de fusión de la parafina para que se mantenga la inclusión. Tras esto se recogieron los preparados utilizando portaobjetos tratados con Xileno y se dejó secar a 56ºC durante 30 minutos.

El método de coloración más empleado es el de hematoxilina-eosina. El primero es un colorante básico por lo que tiñe estructuras ácidas (basófilas) en tonos azul y púrpura, como por ejemplo los núcleos celulares y la eosina es un tinte ácido que tiñe componentes básicos (acidófilas) de rosa como el citoplasma.

Para teñir un corte de parafina, previamente hay que eliminarla puesto que es insoluble en agua y para ello se sumergió el portaobjetos en un solvente orgánico como el xilol, dos veces durante 10 minutos. Después los cortes se rehidrataron pasando por una serie de

graduaciones decrecientes de alcohol etílico (100%, 96% y 70%) y se aclararon con agua. Tras esto se tiñeron primero de hematoxilina durante 15 minutos, se aclararon en agua, después con eosina 30 segundos y se aclararon de nuevo para eliminar los excesos. Una vez teñidos, se deshidrataron de nuevo haciéndolos pasar por una serie de alcoholes en grado ascendente (70%, 96% y 100%). Posteriormente se hicieron pasar por xilol durante 10 minutos y se realizó el montaje final en DPX, que es una resina acrílica con base de xileno. Para ello se añadieron 3 gotas de éste componente, se colocó el cubreobjetos con la precaución de que no quedaran burbujas de aire y se dejó secar en una estufa a 42°C aproximadamente. Una vez secado, es cuando se llevó a cabo la observación al microscopio óptico para establecer el diagnóstico histopatológico.

- **Diagnóstico microbiológico**

En la necropsia además de extraer tejido para histopatología conservado en formol, se recopilaron muestras de piel lesionada para llevar a cabo el aislamiento en el laboratorio de microbiología, que se conservaron en refrigeración a 4°C. Se realizó cultivo y aislamiento de hongos y bacterias. Para las bacterias se hizo siembra en una placa de agar sangre, medio universal para ellas, ya comercializada como tal. Para hongos se usó un medio especial, Sabouraud con cloranfenicol, realizado en laboratorio tal y como se comenta más adelante.

Para la siembra, en primer lugar se encendió el mechero de gas, creando así las condiciones de esterilidad adecuadas. Se tomó la muestra del animal y se cauterizó la superficie de la lesión con un bisturí incandescente, evitando así la contaminación del cultivo con flora microbiana propia de la piel. Con otro aséptico se cortó la zona lesionada y se introdujo un asa de siembra también estéril para tomar los microorganismos que ahí pudiera haber. Estos se sembraron en agar sangre y en agar Sabouraud con cloranfenicol. El tejido, antes de desecharlo, se guardó congelado por si no hubiera éxito en el aislamiento microbiano, volver a la muestra patológica y resembrarlo. En el agar sangre se hizo siembra por agotamiento mientras que en el medio especial para hongos se hizo en cuatro puntos, uno en el centro y los otros tres equidistantes en la circunferencia de la placa. Tras este procedimiento se incubaron las siembras a 37°C el agar sangre y a 25°C el Sabouraud.

Para la realización del medio de cultivo fúngico se utilizó, como se ha comentado anteriormente, Sabouraud agar con cloranfenicol dispensado en polvos de la casa comercial Panreac®. Se utilizó con este antibiótico puesto que si no sería un medio donde crecería todo tipo de microorganismos, tales como bacterias y hongos, y en este caso las primeras eran indeseables. Es cierto que sin este los hongos crecerían mucho mejor pero no nos compensaría

el crecimiento bacteriano. Además el pH del agar comercializado es de 5.6 +/- 0.2 limitando también el desarrollo de éstas.

La composición era la siguiente: 40g/l de glucosa, 0.05 g/l de cloranfenicol, 10 g/l de una mezcla de peptonas y 15 g/l de agar. A un litro de agua destilada se le añadió 65 gramos de esta mezcla y con ayuda de un agitador magnético se removió a la vez que se iba calentando hasta llegar a la ebullición. Una vez alcanzado este paso se dejó hervir durante un minuto. Antes de esterilizar, se controló el pH con tiras marcadoras aunque también se podría usar un phmetro. En el caso de no ser el adecuado se regularía con hidróxido sódico 0.1N o HCl 0.1N, para aumentarlo o disminuirlo respectivamente. En este caso no fue necesario realizarlo puesto que al usar agua destilada y el medio en buenas condiciones no es frecuente que se desregule. De hecho, si la variación fuera muy pequeña puede que no fuera recomendable usar estos productos, ya que se modificaría la composición del medio y con ello aspectos como la textura. Después se distribuyó en frascos y se esterilizó en el autoclave a 121°C durante 15 minutos. Tras esto se dejó enfriar en una estufa a 55°C, temperatura a la cual sigue licuado y se pasó a placas. Es recomendable poner un espesor considerable pues los hongos tardan en crecer y por la evaporación podría quedar el medio muy escaso. Tras esto se dejaron solidificar a temperatura ambiente y se refrigeraron hasta su uso.

En el caso de la placa de agar sangre el crecimiento bacteriano resultó negativo mientras que el fúngico en agar Sabouraud con cloranfenicol fue positivo. Tras esto se procedió a la identificación del hongo mediante la observación de las características macroscópicas y microscópicas.

Macroscópicamente se observó el aspecto general de las colonias, si eran aterciopeladas, algodonosas, vellosas o pulverulentas, el color del anverso y del reverso de la colonia y si viraba o permanecía del mismo tono a lo largo de los días.

Para la visualización microscópica existen dos procedimientos, la técnica de la cinta adhesiva y el microcultivo. En nuestro caso se usó la primera de ellas que se trata de una tinción de azul algodón de lactofenol. Es una tinción simple pues se emplea un sólo colorante y toda la muestra se tiñe del mismo color. Se utiliza comúnmente para la observación microscópica de hongos obtenidos en los cultivos por aislamiento, ya que preserva e identifica los componentes estructurales fúngicos. No es considerada una tinción diferencial, sin embargo posee características tintoriales que permite observar cada uno de los componentes fúngicos y apreciar fácilmente las estructuras para una adecuada identificación. El fenol inactiva las enzimas líticas de la célula e impide que ésta se rompa, de igual forma que destruye la flora

acompañante e inactiva a la célula, quitándole el grado de patogenicidad. El ácido láctico preserva las estructuras fúngicas al provocar un cambio de gradiente osmótico con relación al interior fúngico, lo que genera una película protectora. El azul de algodón es un colorante ácido, que tiñe el citoplasma y la quitina presente en las células fúngicas, mientras que el glicerol mantiene húmeda la preparación (López-Jácome *et al.* 2014).

Para llevar a cabo esta técnica de la cinta adhesiva y tinción con azul algodón de lactofenol, se encendió el mechero para crear las condiciones de esterilidad adecuadas. Tras esto se colocó una gota de azul algodón de lactofenol en un portaobjetos y con ayuda de unas tijeras y pinzas flameadas se cogió un trozo de cinta adhesiva que se colocó sobre el cultivo de hongos. Así se pegaron al papel celofán que se colocó sobre la gota de tinte. La muestra se cubrió con un cubreobjetos para facilitar la observación a microscopio óptico y se llevó a cabo la identificación microscópica.

- **Diagnóstico molecular**

El diagnóstico molecular basado en el estudio del DNA ha experimentado un avance considerable en los últimos años como consecuencia de la identificación, y caracterización de un elevado número de genes implicados en diversas patologías. Se basan en la detección del genoma del patógeno en el organismo.

En primer lugar se procedió a la extracción de DNA con el kit tissue&cells genomicPrep Mini Spin® de GE healthcare. Para extraer los ácidos nucleicos del material biológico es preciso provocar una lisis celular, inactivar las nucleasas celulares y separar los ácidos nucleicos de los restos de células. La realización de este proceso consistió en una modificación del protocolo ofrecido por la casa comercial para la extracción del DNA de tejidos. Tal y como se indica, se cogieron 50 mg aproximadamente del cultivo obtenido y se introdujo en tubos eppendorf de 1,5 ml y se lavó con 50µl del tampón PBS (Phosphate Buffered Saline). Una vez añadido se homogenizó con ayuda de un pistilo y se añadió 50µl de *Lysis solution 1*, que contiene detergente para romper las membranas celulares y se sometió a centrifugación durante 10 segundos a 2000 x g. Se añadió después 10µl de Proteinasa K (PK) mantenida en refrigeración a 4°C. Se trata de una proteasa muy activa que libera del DNA nuclear al medio y digiere las proteínas (Catasús *et al.* 1997). Esta mezcla se incubó a 56°C durante 1 hora. Pasado este tiempo se añadió 500µl de *Lysis solution 2*, que en este caso lleva alcoholes para precipitar los ácidos nucleicos, se agitó con un agitador tipo vórtex y se incubó durante 1 minuto a temperatura ambiente. Después se cargó en columnas de afinidad donde se unieron las moléculas de DNA y se centrifugó durante 1 minuto a 11000 x g. Así la solución pasó a través

de ésta donde quedaron adheridas las moléculas afines y el resto precipitó en la parte inferior pudiéndolo desechar fácilmente. Se volvió a realizar el mismo proceso, 500 µl de *Lysis solution 2*, centrifugación y eliminación de la solución restante. Tras esto se incorporó 500µl de *Wash Buffer* (tampón de lavado) que lleva etanol y se centrifugó a 11000 x g, pero esta vez durante 3 minutos. Se transfirió la columna a un nuevo tubo eppendorf de centrifuga y se añadió 100 µl de *Elution buffer* (tampón de elución) que contiene EDTA y tampón tris (trishidroximetilaminometano) precalentado a 70°. El objetivo de esto es que el DNA retenido en la columna se libere al tubo y pueda ser recogido. Se incubó durante 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifugó 1 minuto a 11000 x g.

Una vez realizado todo este proceso de extracción de DNA se procedió a cuantificarlo con un espectrofotómetro y el programa de NanoDrop[®]. Para ello en primer lugar se hizo una muestra 'blanco' y luego las problema. Para la muestra control se usaron 2 µl de *Elution buffer* y para el resto 2 µl de las respectivas.

Tras esto se llevó a cabo la PCR de las muestras problema que consiste en amplificar muchas veces una región específica del DNA o RNA y puede resumirse en 4 etapas (de la Puente, 2009), representadas en la Figura 1 (Anexo I):

1. Desnaturalización: separación de las cadenas de DNA, aumentando la temperatura (95°C), la cual rompe los enlaces de hidrógeno que mantiene unidos a las cadenas de DNA.
2. Alineamiento: adición de cadenas cortas de oligonucleótidos, denominados cebadores (forward o sentido, reverse o antisentido), que se unen por complementariedad de bases a cada una de las cadenas del fragmento de DNA que se desee amplificar. Uno se une a la cadena 5' --3' y otro a la cadena 3'—5', delimitando los extremos del fragmento a amplificar. Para conseguir un correcto anillamiento se disminuye la temperatura a 45-65°C para permitir que los cebadores hibriden con las cadenas de DNA de la muestra problema, por complementariedad de bases.
3. Elongación: en esta fase es necesario la adición de la DNA polimerasa, los cuatro nucleótidos (ATP, GTP, TTP, CTP) y demás cofactores, para que tenga lugar la síntesis de la cadena complementaria. La temperatura óptima para el funcionamiento de las polimerasas utilizadas en la PCR es de 72°C.
4. Repetición de las etapas 1 a 3 un número n de veces (entre 30-35 ciclos).

Este proceso se caracteriza por ser exponencial. En cada ciclo se duplica la región de DNA ubicada entre los cebadores. Este procedimiento se realiza en un equipo denominado termociclador, que permite regular las diferentes temperaturas que se requieren para cada uno de los pasos (Sambrook *et al.* 1989).

Una vez visualizado el producto amplificado mediante electroforesis en el gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio, se lleva a cabo la secuenciación que nos permitirá la identificación microbiana al comparar las secuencias resultantes en bases de datos ya establecidas o bien la realización de análisis filogenéticos. Con fines de identificación molecular se suele amplificar regiones diana multicopia y sitios altamente conservados ya que hace fácil la amplificación en todos los hongos. Las regiones diana multicopia utilizadas generalmente son los genes ribosomales. El ribosoma de células eucariotas tiene dos subunidades de RNA ribosomal (rRNA): 40S y 60S, que están codificados por tres genes: el gen 5.8S, la subunidad pequeña (SSU, 18S) y por último la subunidad grande (LSU, 28S), los cuales están separados por regiones espaciadores de transcripción interna (ITS) como se observa en la Figura 2 (Anexo I) (Bellemain *et al.* 2010).

La subunidad 18S así como la región ITS acumulan mutaciones neutrales a través del tiempo, permitiendo distinguir entre organismos genéticamente relacionados a nivel de especie y subespecie. Otra de las regiones ampliamente utilizada para la identificación de hongos, es la correspondiente al gen β -tubulina (*tubB*), una proteína que constituye los microtúbulos de las células 16 eucariotas. A pesar que esta proteína está muy conservada entre eucariotas, la comparación de regiones intrónicas permite diferencias entre individuos de una misma especie (Doshi *et al.* 1991). Los genes ribosomales y las regiones ITS no siempre proporcionan una buena resolución para especies filogenéticamente próximas, el análisis de otra región, como el gen de β -tubulina, puede ser necesario para asegurar una identificación adecuada (Talbot *et al.*, 2014).

Para la realización del diagnóstico molecular se amplificaron por PCR tres fragmentos del genoma: un fragmento del gen 18S rRNA, las regiones ITS 1 y 2 comprendidas entre los genes - ribosomales 18S, 5.8S y 28S y el gen de la β -tubulina. La muestra se amplificó por duplicado. Para el primero los cebadores que se usaron fueron SSU-0817 (forward) y SSU-1536 (reverse), para el segundo fueron ITS1 (forward) e ITS2 (reverse) y para la β tubulina los cebadores bt2a (forward) y bt2b (reverse). Todos ellos en una concentración de 20 picomoles/ μ L. La secuencia de nucleótidos de los cebadores es la siguiente (Talbot *et al.*, 2014) (Borneman *et al.* 2000):

- SSU-0817: 5'-TTAGCATGGAATAATRAATAGGA-3'

- SSU-1536: 3'-ATTGCAATGCYCTATCCCCA-5'
- ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'
- ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'
- bt2a: 5'-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3'
- bt2b: 5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-3'

Para la realización de la PCR se necesitan una serie de elementos para que así la DNA polimerasa pueda sintetizar y amplificar la hebra, tales como agua ultrapura tipo I, solución tampón, cloruro de magnesio ($MgCl_2$), nucleótidos (dNTPs), el cebador forward y el reverse y por supuesto, DNA. De éste se introdujeron 5 μ l y del resto un total de 20 μ l, por lo que había 25 μ l en cada pocillo. Para ello, se hicieron tres mezclas con lo necesario para amplificar el fragmento 18srRNA, la región ITS y el fragmento de gen de la β -tubulina en las muestras a estudiar. La Tabla 1 (Anexo II) muestra la composición de la mezcla de amplificación para una muestra única y para un total de 4 muestras.

Las distintas fases del termociclador a las cuales se sometieron las muestras fueron: 94°C 5', 94°C 30'', 55°C 30'', 72°C 30'', 72°C 7' y 4°C ∞ . La segunda, tercera y cuarta fase sufrieron 35 ciclos para obtener una cantidad de DNA suficiente.

Mientras tanto se procedió a realizar el gel de agarosa para la electroforesis. El molde que se utilizó era de 30 ml, por tanto se usó 30 ml de TBE y 0,6 g de agarosa para que la concentración fuera al 2% (concentración adecuada para la resolución de fragmentos del tamaño de los amplificados en este estudio). Se adicionaron ambos compuestos en un matraz Erlenmeyer y se calentó en microondas hasta ebullición dos o tres veces hasta que estuviera bien disuelta la agarosa. Una vez disuelta la agarosa se adicionaron 4 μ l de Bromuro de Etidio, en campana de gases, para poder visualizar las bandas con fluorescencia y se dejó solidificar en la cubeta con un peine incrustado que permitiese que quedara un espacio en cada púa para cargar la muestra.

Así, una vez finalizada la PCR se extrajo la muestra amplificada del termociclador y se sometió a electroforesis en gel de agarosa. Para ello se puso el gel ya solidificado en una cubeta de electroforesis y se cubrió completamente de una solución tampón, en este caso TBE 1x. Se cogió 9 μ l de DNA, se puso sobre papel de parafina (Parafilm®) y se mezcló con 2 μ l de tampón de carga que contiene agua, sacarosa y un azul de bromofenol. Todo ello se depositó en el hueco dejado por las púas del peine en el gel de agarosa y se conectó ánodo y cátodo en la cubeta haciendo pasar la corriente que provocó la migración hacia el cátodo de los fragmentos de DNA. Estos se separan en función del tamaño. Los geles de agarosa permiten una electroforesis rápida en la cual las partículas se van dispersando por los grandes poros

existentes y se emplean fundamentalmente para separar las moléculas grandes con un peso molecular de 200kDa (Sambrook *et al.* 1989). Además se cargó también en el gel un DNA marcador de tamaño conocido (100pb) para facilitar la labor de determinar el tamaño de los DNA desconocidos.

Tras 10-20 minutos de corriente eléctrica a unos 100 voltios y 50 mA se detuvo la electroforesis, se recogió el gel y se miró en luz ultravioleta. Gracias a la incorporación del bromuro de etidio a la doble cadena de DNA, se observa por fluorescencia el DNA desplazado en función del tamaño de pares de bases de los fragmentos, que como se ha explicado anteriormente se puede saber debido al DNA marcador de tamaño conocido.

Los productos de PCR suelen contener restos de nucleótidos y de cebadores que interfieren en la secuenciación. Por este motivo, es necesario llevar a cabo un paso de purificación previa a la secuenciación de los productos de PCR. Pueden purificarse mediante el empleo de kits específicos, como Exosap-IT® de USB. Está compuesto por dos enzimas hidrolíticas, como lo son la exonucleasa I recombinante y la fosfatasa alcalina de camarón (*Pandalus borealis*), formuladas en un tampón especial. La exonucleasa degrada los residuos monocatenarios de los cebadores o de cualquier otro DNA producido en la PCR mientras que la fosfatasa se encarga de hidrolizar los dNTPs sobrantes de la mezcla de PCR. Para llevar a cabo este proceso se cogieron 10µl de cada muestra de PCR y 4µl de la preparación de Exosap-IT® diluida 1:4 en agua, se centrifugó y se introdujo de nuevo en el termociclador. En este caso se elevó la temperatura a 37º durante 45 minutos (fase de tratamiento), posteriormente a 80º durante 15 minutos (fase de inactivación) y luego 4º para mantenimiento.

Una vez purificado el DNA es cuando se llevó a cabo la secuenciación. Esta consiste en el copiado de la secuencia patrón, no es una amplificación de la secuencia como en el caso de la PCR. La reacción de secuencia necesita de la hebra molde, uno solo de los cebadores (la inclusión de los cebadores sentido y antisentido genera dos secuencias superpuestas ilegibles), la enzima DNA polimerasa, el cofactor de la enzima MgCl₂, una solución tampón (buffer), los cuatro deoxinucleótidos (dNTPs) y los cuatro dideoxinucleótidos marcados con cuatro fluoróforos diferentes (ddNTPs: ddGTP, ddATP, ddTTP, ddCTP). Todo esto, excepto la hebra molde y los cebadores, viene incluida en los kits comerciales de secuenciación. En nuestro caso, se utilizó el kit Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing® (Applied Biosystems). Esta reacción se basa en el método Sanger que se explica más adelante. Las cantidades utilizadas de reactivos fueron:

- 3µl de DNA amplificado por PCR y purificado

- 4.5µl de agua
- 2.5 µl de mezcla de secuenciación formada por 1.5µl de cebador sentido (forward) de secuenciación y 6µl de kit o 1.5µl de cebador antisentido (reverse) de secuenciación y 6µl de kit

El cebador de secuenciación es igual al usado en la PCR pero diluido a 10µMolar. Para ello se cogió 10µl de cebador a 20µMolar, que es el de PCR, 10µl de agua y se sometió a una pequeña centrifugación.

Así se obtuvieron seis mezclas de amplificación con un volumen final de 10µl, todas ellos diferentes: fragmento del 18S- rRNA con primer forward (ssu-0817), fragmento del 18S-rRNA reverso (ssu-1536), gen de la β-tubulina forward (Bt-2a), gen de la β-tubulina reverse (Bt-2b), fragmento ITS forward (ITS 1) y fragmento ITS reverse (ITS4).

Las reacciones de secuencia se realizaron en una placa de 96 pocillos, la cual se tapó con papel film para evitar la evaporación y se introdujo en el termociclador que es donde se llevó a cabo verdaderamente la secuenciación, con las siguientes fases: 96°C 1', 96ª 10'', 50ª 5'', 60°C 4' y 4°C ∞ para mantener. Las fases 2, 3 y 4 se sometieron a 25 ciclos de repetición.

Una vez finalizado, se utilizó BigDye XTerminator® Purification kit de Applied Biosystems. Está diseñado para secuestrar componentes de la secuenciación sobrantes. Se añadió a los 10µl de cada pocillo, 10µl de Xterminator Solution (captura los nucleótidos no incorporados y las sales libres de la reacción de secuenciación) y 45µl de SAM (reactivo que mejora el rendimiento del reactivo y estabiliza la muestra después de la purificación). Para facilitar este proceso se hizo una mezcla con los dos últimos reactivos y se recogió de ésta 55µl que se añadieron a cada pocillo. Una vez completados se agitó durante 30 minutos a 2500rpm y posteriormente se centrifugó 3 minutos a 31000rpm. Por último se introdujo la placa en el equipo de electroforesis capilar 3130 Genetic Analyzer® de Applied Biosystems. El equipo funciona de manera completamente automática inyectando las muestras en un capilar previamente cargado con un polímero que funciona como si fuera un gel de secuencia, permitiendo separar fragmentos de DNA de cadena sencilla que se diferencian en una única base. A una altura determinada el láser del dispositivo detecta fluorescencia emitida por la cadena sencilla de DNA fluorescente y traduce dicha emisión en la secuencia correspondiente.

La reacción de secuencia se fundamenta en el método enzimático de Sanger. En dicho método se utilizan análogos didesoxinucleótidos que se incorporan a la cadena creciente de DNA compitiendo con nucleótidos normales y actuando como terminadores dando lugar a un bloqueo en la síntesis de la cadena. Esto se debe a que carecen de grupo OH (hidroxilo) en el

carbono 3' y la DNA polimerasa necesita un grupo terminal 3' OH para añadir el siguiente nucleótido. Al incorporarse de manera aleatoria se van a crear un conjunto de fragmentos de DNA de diferentes longitudes complementario al molde de DNA que está siendo secuenciado. Estos se hacen migrar a través de un gel de poliacrilamida donde se separan por tamaños. El equipo de secuenciación cuenta con un dispositivo que permite captar la emisión de luz de los cuatro didesoxinucleótidos. La lectura se hace entonces partiendo de las secuencias más cortas hasta la secuencia completa, y se genera un gráfico con picos de emisión de luz en la posición de cada uno de los nucleótidos de la secuencia de interés (cromatograma). En este caso el secuenciador usado es 3130 Genetic Analyzer® de Applied Biosystems.

El cromatograma resultante de la electroforesis capilar se visualizó con en el programa informático Bioedit® para así obtener la secuencia de nucleótidos y analizarla. Tras ello, se comparó con las secuencias existentes en la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) mediante la herramienta informática BLAST, que es un programa informático de alineamiento de secuencias de tipo local, ya sea de DNA, RNA o proteínas. Este programa es capaz de comparar una secuencia problema contra gran cantidad de secuencias que hay recogidas en la base de datos y encontrar aquellas que tengan mayor parecido.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se muestran los resultados obtenidos a lo largo del trabajo fin de grado en todos y cada uno de los pasos, desde la histopatología de la piel lesionada del animal hasta la obtención del género y especie del agente etiológico implicado.

- **Diagnóstico histopatológico**

Como se ha comentado anteriormente, se realizó un estudio histopatológico de las lesiones encontradas en los distintos órganos, pero el trabajo se centró en el estudio de la dermatitis necrótica.

A la izquierda de la figura 3 (Anexo I) se observa la piel con ausencia de lesiones mientras que a la derecha se ve el cuadro patológico. Se pierde continuidad en la epidermis y dermis, las células están necrosadas e incluso se puede ver la costra desprendida. Además se intuye una gran cantidad de células de tipo inflamatorio asociado a la lesión, infiltradas en la dermis, principalmente de carácter mononuclear. No obstante, no se aprecian hifas fúngicas en la lesión.

- **Diagnóstico microbiológico**

Tras la necropsia del animal, el diagnóstico diferencial acerca del posible agente etiológico causante de la dermatitis necrótica era muy amplio. Por ello, además de tomar muestra de piel para el estudio histopatológico se obtuvo también para realizar cultivo microbiano, tanto bacteriológico en agar sangre como fúngico en caldo Sabouraud con cloranfenicol. Como se ha comentado anteriormente, el cultivo bacteriano resultó negativo mientras que sí hubo crecimiento micótico a las 48 horas post-siembra. Cabe decir que los hongos tardan alrededor de 4-7 días en crecer, mientras que las bacterias en 24 horas ya forman sus colonias. En nuestro caso, el crecimiento fúngico fue extraordinariamente rápido. Con éste se procedió a realizar el estudio microbiológico macroscópico y microscópico con el fin de aproximar la identificación del agente etiológico.

Macroscópicamente las colonias halladas eran blancas tanto por el anverso como en el reverso tal y como se muestra en las figuras 4 y 5 del Anexo I, aunque el anverso, a lo largo de los días que se tuvo conservado en refrigeración, comenzó a adquirir una coloración más oscura. Las colonias tenían un aspecto algodonoso y vellosa, con el borde externo liso.

Para la observación microscópica se usó la tinción con azul algodón de lactofenol. Nada más hacer la primera visualización al microscopio óptico se vio que eran organismos pluricelulares por lo que se descartó que se tratase de levaduras. Eran hongos eucariotas pluricelulares o también llamados hongos filamentosos con micelio hialino. Tal y como se ve en las figuras 6 y 7 (Anexo I) las hifas son delgadas, con un diámetro menor de 4µm, hialinas y septadas. Esto descartó que se tratase de hongos cenocíticos, centrándose la identificación en hongos tabicados. Para seguir con el reconocimiento del agente etiológico se estudió las características de las estructuras reproductoras asexuales:

- Conidióforo simple.
- Presencia de vesícula, que es un ápice hinchado del conidióforo muy típico de *Aspergillus spp.*
- Presencia de fiálides o célula conidiógena productora de conidios, salientes de la vesícula.
- Conidios formando fila seguida a la fiálide.

Las características macroscópicas, tanto del anverso como del reverso y microscópicas de las estructuras reproductoras del cultivo fúngico aislado aproximaron la identificación a que el agente etiológico correspondiera al género *Aspergillus spp.* Pero tal y como señala el artículo de Balajee *et al.* en 2005, la identificación fiable de *Aspergillus spp.* requiere análisis molecular en adicción a los métodos fenotípicos. Esto se debe a que es difícil diferenciar este hongo basándose únicamente en la apariencia morfológica, distinguiendo las características reproductoras asexuales y sexuales, y además la esporulación suele ser lenta (Alcazar-Fuoli *et al.* 2008). Asimismo, algunos aislados de *Aspergillus spp.* pueden mostrar características microbiológicas atípicas en el cultivo comparándolo con cepas tipo, dificultando más aún la identificación (Aulstrey-Izquierdo *et al.*, 2012).

- **Diagnóstico molecular**

Una vez cultivado el hongo se procedió a la caracterización microbiana molecular. Para ello, en primer lugar se hizo la extracción de DNA, como se ha comentado anteriormente y se cuantificó mediante el programa NanoDrop®. La cantidad estimada por el espectrofotómetro era de aproximadamente 5ng/ul en ambas muestras.

Para la elección de las regiones de DNA que iban a ser estudiadas (18S rRNA, ITS y β-tubulina) en el hongo aislado se revisó bibliografía. En el estudio llevado a cabo por Embong *et al.* en 2008 se secuenció la región 18S rRNA para un aislado de tipo fúngico justificando que se

trataba de un gen de múltiples copias, y por tanto fácil de secuenciar, que evoluciona lentamente y se encuentra altamente conservado en los hongos, lo que lo hace atractivo para la detección fúngica en muestras clínicas. El problema de esta región es que es poco específica para poder determinar la especie concreta del agente objeto de estudio. En cuanto a la región ITS, se considera la de mayor probabilidad para la obtención de una identificación exitosa en la más amplia gama de hongos, considerándolo como el 'código de barras' que más claramente define la variación inter e intraespecífica (Schoch *et al.*, 2012). Están disponibles los cebadores de forma universal y contienen regiones altamente variables que permiten la diferenciación de gran cantidad de especies (Talbot *et al.*, 2014). Pero a veces, la variación de la región ITS1-5.8S-ITS2 no es suficiente para la identificación de la especie de *Aspergillus spp.*, teniendo que recurrir a otras secuencias como la β -tubulina (White *et al.*, 1990).

Una vez seleccionadas las secuencias a amplificar y tras la amplificación mediante PCR, se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 2% obteniendo la imagen que se muestra en la Figura 8 (Anexo I).

Los fragmentos obtenidos mediante la PCR mostraron las tallas esperadas según la bibliografía, aproximadamente 600pb (pares de bases) para los fragmentos de la región ITS y β -tubulina y entre 700 y 800pb para el del 18s rRNA.

Las secuencias que se obtuvieron de las tres regiones fueron las siguientes:

- 18S rRNA

```
'CGCCGTAATGATTAATAGGGATAGTCGGGGCGTCAGTATTCAGCTGTCAGAGGTGAAATTCTTGGAT
TTGCTGAAGACTAACTACTGCGAAAGCATTTCGCAAGGATGTTTTTCATTAATCAGGGAACGAAAGTTAG
GGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCGACTAGGGATCGGACGGT
GTTTCTATTATGACCCGTTTCGGCACCTTACGAGAAATCAAAGTTTTTGGGTTCTGGGGGGAGTATGGTC
GCAAGGCTGAACTTAAAGAAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTG
ACTCAACACGGGGAACTCACCAGGTCCAGACAAAATAAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGA
TCTTTTGGATGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATTTGTCTGCTTAATTGCGATAACGA
ACGAGACCTCGGCCCTTAAATAGCCCGTCCGCATTTGCGGGCCGCTGGCTTCTTAGGGGGACTATCG
GCTCAAGCCGATGGAAGTGCGCGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGCACGC
GCGCTACACTGACAGGGCCAGCGAGTACATCACCTTGGCCGAGAGGTCTGGGTAATCTTGTTAAACCC
TGTCGTGCT'
```

- ITS

```
'GGGCCCAACCTCCCATCCGTGTCTATTATACCCTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCGCTTGTCCGCCGCCG
GGGGGGCGCCTTTGCCCCCGGGCCCGTGCCTGCCGAGACCCCAACACGAACACTGTCTGAAAGCGT
GCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAAACCTTCAACAATGGATCTCTGGTTCGGGCATCGAT
```

GAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAAC
GCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGG
TTGTGTGTTGGGTCGCCGTCCCCCTCTCCGGGGGGACGGGCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTC
CGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACGTTTTCCA
ACCATTTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGG
AGGA'

- β -tubulina

'TGGTACGTATTCACTGCCACTGGATTGGGGATGGAACATCATCTCTCAAGCTATCTTAGCTTGAGTTCA
GATGTTATCCATCGGGTATATAGCTATCGGGTTAAGAACACGTCTAACAACTCAACAGGCAGACCATCT
CTGGCGAGCACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAACCTTTTTCACACCTCTCAATTGGTCAACA
ATGTGGAAAGGATTGGGTTTCTGACGCGCAGGATAGTTACAATGGCACCTCCGACCTCCAGCTGGAG
CGCATGAACGTCTACTTCAACGAGGTTAGATCACACCGTCCCTGAGTTTTTTCACGACAATATCATCAAT
GTCCTGACCACTTCAGCAGGCTAGCGGTAACAAGTATGTCCCCCGTCCGTCCTCGTCGATCTCGAGCC
CGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTTCGGCCAGCTCTCCGCCCCGACAACTTCGTCTTCGG
CCAGTCCGGTGCTGGTAACAACCTGG'

Para la región ITS, de las 600pb amplificadas se consiguieron secuenciar 552pb, del gen 18S rRNA se secuenciaron 691pb y de la β -tubulina la secuencia completa (508pb), desde el cebador directo al cebador reverso.

Un ejemplo de los cromatogramas que se obtuvieron mediante el método de Sanger se muestra en la Figura 9 (Anexo I).

Una vez recopiladas estas secuencias se procedió a compararlas con la base de datos GenBank, mediante la herramienta BLAST. Con la secuencia obtenida de la región 18S tan sólo se pudo concretar el género del cual se trataba el hongo aislado, *Aspergillus spp.* La identidad era del 100% pero con gran cantidad de especies tales como *A.niger* (nº de acceso: KP036601.1), *A.awamori* (KF922319.1), *A.terreus* (JQ012802.1) y *A.fumigatus* (JQ012800.1). Con la región ITS secuenciada la identidad era al 100% con *A.tubingensis* (KP307912.1) y *A.niger* (KP329757.1). Finalmente, la región de la β -tubulina resultó ser la discriminante pues consiguió un 100% de cobertura y de identidad con *A.tubingensis*. Esta secuencia nos permite por tanto, determinar la especie pero no discrimina entre cepas, ya que el fragmento obtenido mostró similitud total con varias tales como CBS11732 (AY820012.1), CBS42565 (AY820009.1), USMP06 (KF434110.1) y USML03 (KF434104.1), entre otras.

Estos resultados concuerdan con las teorías de Embong *et al.* (2008) y White *et al.* (1990) comentadas anteriormente en las que se describe que tanto la región 18s rRNA como la ITS no siempre ayudan a discriminar la especie fúngica de la cual se trata y hay que recurrir a otros genes tales como el de la β -tubulina.

A. tubingensis es un hongo miembro del clado de *A. niger*, pertenecientes a la sección Nigri, que ha sido identificado como agente etiológico de rinosinusitis micóticas, aspergilosis invasivas, otomicosis e infecciones oculares en humanos (Hendrickx *et al.*, 2012). Resulta difícil distinguir *A. tubingensis* de otros del clado de *A. niger* (Talbot *et al.*, 2014), se ha logrado diferenciar gracias a técnicas moleculares como en el trabajo de Susca *et al.* (2007) en el que la distinción de ambos hongos se basó en la amplificación y secuenciación del gen de la calmodulina. Howard en 2014 afirma en su artículo que tanto el gen de la calmodulina como el de la β -tubulina son dos regiones útiles para diferenciar especies de este grupo, consideradas crípticas, es decir morfológicamente indistinguibles, pero cuya identificación molecular permite diferenciarlas. Con los resultados obtenidos en este trabajo fin de grado, se apoya la teoría de que el gen de la β -tubulina sea adecuado para la diferenciación de estas especies puesto que discrimina con 100% de identidad *A. tubingensis*, mientras que la región ITS secuenciada presentaba también total identidad con *A. niger*.

Según nuestro conocimiento, la aparición de este agente etiológico en gatos no se ha descrito previamente. Sin embargo, este hongo se ha aislado como agente causante de dermatitis necrótica a *A. niger* (Carmo *et al.* 2014) en cabras. Por otra parte, el trabajo de Talbot *et al.* (2014) describe por primera vez como agentes etiológicos de la SNA canina (Sino-Nasal Aspergillosis) a *A. tubingensis* y *A. uvarum*, ambos pertenecientes al clado de *A. niger*. En humana, se aisló este agente en un paciente con osteomielitis mandibular (Bathoorn *et al.* 2013). Al igual que en este caso, el individuo objeto de nuestro estudio se encontraba altamente deteriorado e inmunocomprometido debido al tumor intranasal y la leucemia felina que padecía, enfermedad altamente inmunosupresora, pudiéndose considerar por tanto como una aspergillosis invasiva de hongos oportunistas.

En la especie humana los casos patológicos en los cuales se aísla *A. tubingensis* están en aumento (Talbot *et al.*, 2014). Bien es cierto, que tal y como explican Bathoorn *et al.* (2013), posiblemente todos estos patógenos se identificaban anteriormente como *A. Niger* y es ahora cuando se está reclasificando este hongo mediante secuenciación.

CONCLUSIONES

Una vez finalizado este trabajo fin de grado, se extrajeron una serie de conclusiones que se recopilan a continuación:

- El diagnóstico anatomopatológico es de vital importancia, sobre todo en veterinaria, pero casi siempre ha de acompañarse, como mínimo, de un aislamiento microbiano para poder realizar una aproximación sobre el agente etiológico causante de la patología, en el caso de enfermedades infecciosas.
- El estudio de las características macroscópicas y microscópicas del cultivo aislado son fundamentales pero no siempre permiten la identificación del agente patógeno, como en el caso de *Aspergillus spp*, teniendo que recurrir al diagnóstico molecular.
- El diagnóstico molecular, mediante técnicas de secuenciación génica, permite generalmente identificaciones más exactas y objetivas acerca del agente objeto de estudio.
- No todas los fragmentos génicos utilizados comúnmente en diagnóstico molecular discriminan la especie, en nuestro caso sólo la región del gen constitutivo de la β -tubulina tuvo un 100% de identidad con una única especie permitiendo el diagnóstico como *Aspergillus tubingensis*
- Es la primera vez que se describe el aislamiento de *A. tubingensis* en gatos, probablemente debido a que sin identificación molecular este hongo puede ser confundido con *Aspergillus niger*.
- En este y otros casos conocidos, *A. tubingensis* ha causado patología en pacientes inmunocomprometidos. En el caso clínico estudiado, la dermatitis necrótica era una patología asociada, no protagonista del cuadro clínico del animal.

CONCLUSIONS

Once this final Project was finished, the conclusions obtained from the results were:

- The anatomopathological diagnosis is fundamental, above all in Veterinary, but it's often necessary to complete it with a microbial isolation, at least to identify the microbial pathogen (infectious diseases).
- The macroscopic and microscopic microorganism characteristics study is very important, but do not always allow the microbial agent identification, like *Aspergillus spp.* In this case is necessary to perform a molecular diagnosis.
- The molecular diagnoses by sequencing gene allow microbial identifications more exact and objective.
- Not all commonly used molecular fragments discriminate the specie, in our case only the region of the constitutive gen β -tubulin displayed 100% identity with unique specie and allowed to diagnose the agent as *Aspergillus tubingensis*.
- This is the first time that *A.tubingensis* is isolated from cats, probably due to a misidentification of this fungus as *A. niger* when molecular techniques are not used.
- In this and in other known clinical cases, *A. tubingensis* has caused pathology in immunocompromised host. For this reason, it's considered like an opportunist agent. In the case studied, necrotic dermatitis was an associated pathology and not the main problem.

VALORACIÓN PERSONAL

En materia de aprendizaje este trabajo fin de grado me ha permitido ampliar mis conocimientos así como poner en práctica otros muchos sobre anatomía patológica, histopatología, genética y microbiología, impartidas estas dos últimas bastantes años atrás.

En el total del trabajo he tomado experiencia en prácticas tales como:

- Tinción con hematoxilina y eosina para la identificación microscópica de la patología hallada.
- Estudio histopatológico de lesiones.
- Creación del medio de cultivo agar Sabouraud con las pautas establecidas por la casa comercial correspondiente.
- Procedimiento de cultivo tanto de hongos como de bacterias.
- Observación de las características macroscópicas del aislado fúngico obtenido.
- Identificación microscópica aproximada del género de hongo hallado mediante la tinción con azul algodón de lactofenol, repasando las estructuras reproductivas asexuales más importantes.
- Extracción de DNA y purificaciones posteriores siguiendo las pautas de los kits comerciales empleados.
- Amplificación génica mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).
- Secuenciación de la región amplificada y comparación con otras almacenadas en la base de datos GenBank mediante el uso de la herramienta BLAST.

BIBLIOGRAFÍA

Alcazar-Fuoli, L., Mellado, E., Aslastruey-Izquierdo, A., Cuenca-Estrella, M., Rodríguez-Tudela, J.L. (2008). 'Antifungal susceptibility patterns and sequence-based identification' en *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 52, pp.1244–1251.

Alines, S.A. *Necropsia en animales domésticos*. Madrid: Editorial Continental, 1985.

Alstruey-Izquierdo, A., Mellado, E., Cuenca-Estrella, M. (2012). 'Current section and species complex concept in *Aspergillus*: Recommendations for routine daily practice' en *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol.1273, pp.18–24.

Balajee, S.A., Gribskov, J., Brandt, M., Ito, J., Fothergill, A., Marr, K.A. (2005). 'Mistaken identity: *Neosartorya pseudofischeri* and its anamorph masquerading as *Aspergillus fumigatus*' en *Journal of Clinical Microbiology*, vol.43, pp.5996–5999.

Bathoorn, E., Escobar Salazar, N., Sepelkhouy, S., Meijer, M., de Cock, H. y Haas, P.J. (2013). 'Involvement of the opportunistic pathogen *Aspergillus tubingensis* in osteomyelitis of the maxillary bone: a case report' en *BMC Infectious Diseases*, vol. 13, nº59.

Bellemain, E., Carlsen, T., Brochmann, C., Coissac, E., Taberlet, P. y Kausserud, H. (2010). 'ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases' en *BMC microbiology*, vol. 10, nº189.

Talbot, J.J., Halliday, C.L., Billen, F., Gibsong, S.J., Kidd, S., Steiner, M.J., Ujvari, B., Barrs, R.V., Johnson, L.R., Martin, P., Beatty, J.A. y Suttord, D.A. (2014). 'What causes canine sino-nasal aspergillosis? A molecular approach to species identification' en *The Veterinary Journal*, vol.200, nº1, pp. 17-21.

Borneman, J. y Hartin, R.J. (2000). 'PCR primers that amplify fungal rRNA genes from environmental samples' en *Applied Environmental Microbiology*, vol. 66, nº10.

Carmo, P.M.S., Portela, R.A., Oliveira-Filho, J.C., Dantas, A.F.M., Simoes, S.V.D., Garino, F. y Riet-Correa, F. (2014). 'Nasal and Cutaneous Aspergillosis in a Goat' en *Journal of Comparative Pathology*, vol.150, nº1, pp.4-7.

Catasús, Ll. y Matías-Guiu, X. (1997). 'Técnicas moleculares para la obtención de DNA y reacción en cadena de la polimerasa' en *Revista española de patología*, vol. 30, nº2, p.163-168.

De la Puente, R. (2009). 'Amplificación del ADN: la PCR' en *Blog de laboratorio*, 24 de Diciembre. <http://blogdelaboratorio.com/amplificacion-del-adn-la-pcr/> [Consulta: 5 de Mayo de 2014].

Doshi, P., Bossie, C.A., Doonan, J.H., May, G.S. y Morris, N.R. (1991). 'Two alpha-tubulin genes of *Aspergillus nidulans* encode divergent proteins' en *Mol Gen Genet*, vol.225, nº1.

Dulbecco, D.B., Ginseberg, H.S. *Tratado de Microbiología*. Barcelona: Masson-Salvat, 1997.

Embong, Z., Wan Hitam, W.H., Yean, C.Y., Abdul Rashid, N.H., Kamarudin, B., Zainal Abidin, S.K., Osman, S., Zainuddin, Z.F. y Ravichandran, M. (2008). 'Specific detection of fungal pathogens by 18S rRNA gene PCR in microbial keratitis' en *BMC Ophthalmology*, vol.8, nº7.

López-Jácome, L., Hernández-Durán, M., Colín-Castro, C.A., Silvestre Ortega-Peña, S., Cerón-González, G. y Franco-Cendejas, R. (2014). 'Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología' en *Investigación en capacidad*, vol. 3, nº1, p. 10-18.

- Fernández-Rodríguez, A., Alberola, J. y Cohen, M.C. (2013). 'Análisis microbiológico post mórtem' en *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, vol. 31, nº10.
- Cuenca-Estrella, M., Gadea, I., Martín, E., Pemán, J., Pontón, J. y Rodríguez-Tudela, J.L. (2007). 'Procedimientos de diagnóstico microbiológico de las micosis y estudios de sensibilidad a los antifúngicos' en *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, vol. 25, nº5.
- García Cortés, V. *Introducción a la microbiología*. Costa Rica: EUNED, 2004. (2ª Ed).
- García, C., Bou, G., Fernández, A., Saéz, J.A., Y Valdezate, S. (2011). 'Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología' en *Enfermedades Infecciosas y microbiología clínica*, vol. 29, nº8.
- Guzmán, A.M. (2004). 'Importancia del laboratorio en el diagnóstico de las micosis invasoras' en *Revista chilena de infectología*, vol.21, nº1.
- Hendrickx, M., Beguin, H., Detandt, M. (2012) 'Genetic re-identification and antifungal susceptibility testing of *Aspergillus* section *Nigri* strains of the BCCM/IHEM collection' en *Mycoses*, vol.55, pp.148–155.
- Howard, S.J. (2014). 'Multi-Resistant Aspergillosis due to Cryptic Species' en *Mycopathologia*, vol.178, pp. 435-439.
- Orland Rogers, S. *Integrated Molecular Evolution*. Florida: CRC Press, 2011.
- Prescott, L.M., Harley, J.P., y Klein, D.A. *Microbiología*. Madrid: McGrawHill, 2002. (5ªEd).
- Rodostis, O.M., Mayhew, J. y Houston, D.M. *Examen y diagnóstico clínico en veterinaria*. Madrid: Elsevier, 2002.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. *Gel electrophoresis of DNA*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- Schoch, C.L., Seifert, K.A., Huhndorf, S., Robert, V., L. Spouge, J.L., Levesque, C.A., Chen, W. (2012). 'Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi' en *PNAS*, vol. 109, nº6, pp. 6241–6246.
- Solís Cuesta, F. y Linares Sicilia, M.J. (2007). 'Identificación de levaduras' en *Revista Iberoamericana de Micología*, capítulo 11, pp. 11-1/11-20.
- Susca, A., Stea, G., Mulè, G. y Perrone, G. (2007). 'Polymerase chain reaction (PCR) identification of *Aspergillus niger* and *Aspergillus tubingensis* based on the calmodulin gene' en *Food Addit Contam*, vol 24, nº10, pp.1154-1160.
- Tortora, G.J., Funke, B.R. y Case, C.L. *Introducción a la microbiología*. Madrid: Panamericana, 2007. (9ªEd).
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S.J.W.T. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. New York, USA: Academic Press, 1990. pp. 315–322.
- Zavala Castro, J. *Manual de Técnicas Básicas de Biología Molecular*. México: Universidad Autónoma de Yucatán, 2005.