

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Departamento de Sanidad Animal**



**DESARROLLO DE UN NUEVO MODELO DE  
ASPERGILIOSIS PULMONAR EN RATA:  
CONSIDERACIONES PREVIAS, ESTUDIO COMPARATIVO  
Y APLICACIONES AL DIAGNÓSTICO DE LA  
ENFERMEDAD**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

Jesús Caballero de Toro

Bajo la dirección de los doctores

José Luis Blanco Cancelo  
Domingo Gargallo Viola  
Marta Eulalia García Sánchez

**Madrid, 2005**

**ISBN: 84-669-2848-0**



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**“DESARROLLO DE UN NUEVO MODELO DE  
ASPERGILOSIS PULMONAR EN RATA.  
CONSIDERACIONES PREVIAS, ESTUDIO  
COMPARATIVO Y APLICACIONES AL DIAGNÓSTICO  
DE LA ENFERMEDAD”**

**JESÚS CABALLERO DE TORO**

**TESIS DOCTORAL**

**Madrid, 2005**



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL**

**“DESARROLLO DE UN NUEVO MODELO DE  
ASPERGILOSIS PULMONAR EN RATA.  
CONSIDERACIONES PREVIAS, ESTUDIO  
COMPARATIVO Y APLICACIONES AL DIAGNÓSTICO  
DE LA ENFERMEDAD”**

**JESÚS CABALLERO DE TORO**

**Memoria presentada para optar  
al Título de Doctor en Veterinaria**

**Directores de la Tesis:**

**Dr. D. José Luis Blanco Cancelo**

**Dr. Domingo Gargallo Viola**

**Dra. Dña. Marta Eulalia García Sánchez**

**Madrid, 2005**

## ***Agradecimientos***

*A mis directores de tesis, Marta, José Luis y Domingo, por su apoyo, dedicación y consejos. Por haber sido mis maestros y amigos.*

*A mi mujer Elena, por su paciencia, su ayuda... por tanto, por todo.*

*A mis padres y hermanas por su constante apoyo a mis decisiones y por estar siempre ahí.*

*A mis compañeros en la facultad, Javier, Isabel, Mar y Marta, por haberme dado tantas lecciones y por hacer el trabajo ameno.*

*A mis compañeros en Glaxo, Alfonso, Ximo, Javi, María, Concha, Antonio, Elena, José Francisco, Iñigo, "las chicas del CIF",... por todo lo que me han enseñado y por los buenos momentos que hemos pasado juntos. Además a Santiago y John por su trabajo en la consecución del modelo de infección.*

*A Carlos Artigas, que tanto ánimo y facilidades me ha dado para escribir esta tesis.*

*A Isabel, por lo mucho que me enseñó y por haberme ayudado tantísimo con las radiografías de las ratas.*

*A Rosa y M<sup>a</sup> José, porque aprendí mucho de ellas, por su ayuda en muchos experimentos y por su buen humor.*

*A Basti, porque gracias a ella no estaba solo cuando comencé a escribir esta tesis ni tampoco ahora al terminarla.*



## ÍNDICE



<b>A. INTRODUCCIÓN</b>	1
1. <b>HONGOS</b>	3
1.1. <b>Definición</b>	3
1.2. <b>Patologías de etiología fúngica</b>	3
a. <b>Micotoxicosis</b>	3
b. <b>Micosis</b>	3
c. <b>Enfermedades alérgicas</b>	4
2. <b><i>Aspergillus</i> y ASPERGILOSIS</b>	5
2.1. <b><i>Aspergillus</i></b>	5
a. <b>Historia</b>	5
b. <b>Taxonomía e identificación</b>	6
c. <b>Ecología</b>	6
2.2. <b>Aspergilosis</b>	7
a. <b>Micotoxicosis</b>	7
b. <b>Colonización Saprofítica</b>	8
b.1 <b>Colonización broncopulmonar</b>	8
b.2 <b>Aspergiloma</b>	8
c. <b>Enfermedades alérgicas</b>	10
c.1. <b>Asma alérgica</b>	10
c.2. <b>Rinitis Alérgica</b>	10
c.3. <b>Sinusitis Alérgica</b>	10
c.4. <b>Alveolitis alérgica extrínseca o Alergia bronquial asmática o Neumonitis hipersensible</b>	10
c.5. <b>Aspergilosis Broncopulmonar Alérgica (ABPA)</b>	10
d. <b>Enfermedades sistémicas o invasoras</b>	11
d.1. <b>Aspergilosis Invasora (AI)</b>	11
d.2. <b>Aspergilosis Diseminada o Sistémica</b>	12
d.3. <b>Aspergilosis Invasora crónica</b>	12
3. <b>ASPERGILOSIS INVASORA</b>	13



3.1. Generalidades -----	13
3.2 Patogenia -----	14
3.3. Modelos animales de asprgilosis invasora-----	16
3.4. Inmunología de la asprgilosis invasora -----	18
a. Inmunidad no específica o innata-----	18
a.1 Barreras anatómicas -----	19
a.2. Componentes humorales -----	19
a.3. Células Fagocíticas -----	19
b. Inmunidad Adquirida -----	20
c. Inmunosupresión y Aspergilosis-----	21
3.5. Diagnóstico-----	22
a. Síntomas y signos clínicos -----	23
b. Signos radiológicos -----	24
c. Cultivo y microscopía -----	25
d. Detección de Anticuerpos y Antígenos para el diagnóstico Aspergilosis Invasora.-----	26
e. Histopatología-----	29
f. Detección de ADN -----	31
3.6. Epidemiología y profilaxis -----	33
3.7. Tratamiento-----	35
a. Tratamiento Farmacológico-----	35
Anfotericina B-----	35
Azoles -----	38
Otros Antifúngicos-----	40
b. Tratamiento Quirúrgico-----	40
c. Inmunoterapia-----	41

## **B. MATERIALES Y MÉTODOS-----**

1. PLAN GENERAL DE TRABAJO -----	45
2. MATERIAL GENERAL DE LABORATORIO-----	47
3. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS ANTIGENICOS DE <i>Aspergillus fumigatus</i> ----	47
3.1. Medios de cultivo-----	47
3.2. Soluciones, tampones y reactivos-----	48

3.3. Cepa fúngica	48
3.4. Obtención de extracto antigénico miceliar	48
3.5. Obtención de extracto antigénico del filtrado de cultivo	50
4. DETERMINACION DEL CONTENIDO PROTEICO DE LOS EXTRACTOS ANTIGÉNICOS	51
4.1. Material	51
4.2. Instrumento	51
4.3. Metodología	51
5. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA-DUODECILSULFATO SÓDICO (SDS-PAGE)	52
5.1. Material	52
5.2. Instrumentos	54
5.3. Metodología	55
a. Preparación del gel de SDS-PAGE	55
b. Preparación del Stacking-gel	55
c. Preparación de las muestras	56
d. Aplicación de las muestras	56
e. Visualización de las bandas proteicas	56
6. OBTENCIÓN DE SUERO HIPERINMUNE EN CONEJO	57
6.1. Material	57
6.2. Metodología	58
a. Preparación de la emulsión	58
b. Inyección de la emulsión	58
c. Número de inyecciones	58
d. Extracciones sanguíneas	58
e. Sangrado	58
7. TÉCNICA DE ENZIMOINMUNOANÁLISIS (ELISA)	59
7.1. Material necesario	59
7.2. Metodología	60
8. WESTERN BLOT	61
8.1. Materiales	61
8.2. Metodología	62
9. CRECIMIENTO DE <i>Aspergillus fumigatus</i> EN CULTIVO CELULAR DE PNEUMOCITOS	64

9.1	Materiales	64
9.2	Metodología	65
10.	PREPARACIÓN DE INÓCULO DE <i>A. Fumigatus</i>	66
10.1.	Materiales	66
10.2.	Metodología	67
11.	DETECCIÓN DE GALACTOMANANO MEDIANTE UN TEST DE AGLUTINACIÓN EN LÁTEX: (PASTOREX <sup>®</sup> ASPERGILLUS)	68
11.1.	Materiales proporcionados por el fabricante	68
11.2.	Condiciones en que se realizaba la técnica	68
11.3.	Metodología	68
11.4.	Interpretación de resultados	69
12.	DETECCIÓN DE GALACTOMANANO MEDIANTE UN ELISA DOBLE SANDWICH: PLATELIA ASPERGILLUS TEST <sup>®</sup>	69
12.1.	Materiales	69
12.3.	Metodología	70
13.	REALIZACION DE UNA NESTED-PCR PARA DETECCIÓN DE ADN DE <i>Aspergillus</i> EN MUESTRAS CLÍNICAS	71
13.1.	Material	71
13.2.	Metodología	72
a.	Extracción de ADN de muestra	72
b.	Reconstitución de los cebadores	72
c.	Preparación de la mezcla de PCR	73
d.	Condiciones de la reacción de amplificación de la polimerasa	74
e.	Preparación del gel de agarosa al 2%	74
f.	Colocación de las muestras	74
g.	Visualización del Gel	75
14.	OBTENCIÓN DE ADN GENÓMICO	75
14.1.	Materiales	75
14.2.	Metodología	76
15.	DETECCIÓN DE $\beta$ -D-GLUCANO	77
15.1	Fundamento	77
15.2.	Material	78
15.3.	Metodología	78

16. ESTUDIO HISTOLÓGICO E INMUNOHISTOQUÍMICO -----	80
16.1. Materiales -----	80
a. Anticuerpos primarios -----	80
b. Anticuerpos secundarios conjugados -----	81
c. Sueros no inmunes -----	81
d. Cromógenos -----	81
e. Tampones -----	81
f. Reactivos necesarios para las tinciones histológicas -----	82
16.2. Metodología -----	82
a. Tinciones histológicas -----	82
b. Preparación de las muestras para las tinciones histoquímicas -----	84
c. Desarrollo de las técnicas inmunohistoquímicas -----	84
d. Controles negativos -----	85
f. Controles positivos -----	86
17. ESTUDIO RADIOLÓGICO DE ANIMALES INFECTADOS -----	86
17.1. Materiales -----	86
17.2. Metodología -----	86
18. MODELOS ANIMALES DE ASPERGILOSIS INVASORA -----	87
18.1. Materiales -----	87
a. Animales -----	87
b. Animalario: Instalaciones. -----	87
c. Inoculación -----	87
d. Toma de muestras -----	88
e. Inmunosupresión y terapia antibiótica -----	88
18.2. Métodos -----	89
a. Preparación del inóculo fúngico -----	89
a.1. Inóculo de conidias -----	89
a.2. Inóculo de hifas (micromicelios) -----	89
b. Inoculación en rata -----	90
b.1. Inoculación intratraqueal -----	90
b.2. Inoculación transtorácica -----	90
b.3. Protocolo de Inmunosupresión -----	91
c. Inoculación en ratón -----	91
c.1. Inoculación intratraqueal -----	91

c.2. Inoculación intranasal -----	91
c.3. Protocolo de Inmunosupresión -----	91
d. Sacrificio de los animales -----	92
e. Toma de muestras y evaluación de variables -----	92
e.1. Tiempo de supervivencia-----	92
e.2. Extracción de muestras -----	92
e.3. Procesado de las muestras-----	93

## C. RESULTADOS ----- 95

1. Influencia del medio de cultivo en la estructura antigénica de <i>A. fumigatus</i> -----	97
1.1. Características de crecimiento -----	97
1.2. Contenido proteico -----	98
1.3. SDS-PAGE -----	98
1.4. ELISA con suero hiper-inmune-----	100
1.5. Western-Blot -----	104
2. Crecimiento de <i>A.fumigatus</i> en cultivo celular -----	105
3. Modelos animales de Aspergilosis Invasora -----	106
3.1. Modelos en ratón -----	106
a. Inoculación Intranasal e Intratraqueal-----	106
b. Influencia del tipo de inmunosupresión y el tratamiento con Anfotericina B -----	110
c. Inoculación intraperitoneal -----	111
c.1. Influencia del tamaño del inóculo -----	111
c.2. Influencia del tipo de inmunosupresión-----	111
c.3. Influencia del tratamiento con Anfotericina B-----	116
3.2. Modelos de Aspergilosis en rata. Descripción de un nuevo modelo de inoculación transtorácica en ratas-----	118
a. Primer modelo preliminar: tipo de inóculo-----	118
b. Segundo modelo preliminar: tipo de inmunosupresión y tipo de inóculo -----	123
c. Tercer modelo preliminar: tipo de inóculo -----	130
d. Modelo definitivo-----	134
e. Modelo de infección a 72 días -----	124

e.1. Porcentaje de supervivencia y evolución del peso-----	135
e.2. Resultados de pruebas diagnósticas -----	137
e. 3. Descripción de las lesiones -----	141
f. Modelo de infección a 42 días-----	151
f.1. Porcentaje de supervivencia y evolución del peso -----	151
f.2. Resultados de pruebas diagnósticas-----	152
f.3. Descripción de las lesiones -----	156
f.4. Estudio radiológico -----	187
g. Modelo de infección a 24 días: Incremento del tamaño del inóculo	194
g.1. Porcentaje de supervivencia-----	195
g.2. Resultados de pruebas diagnósticas -----	196
g.3. Descripción de las lesiones-----	198
4. Apéndice de Imágenes -----	201
<b>D. DISCUSIÓN-----</b>	<b>205</b>
1. Influencia del medio de cultivo en la estructura antigénica de <i>A. Fumigatus</i> -----	207
2. Antigenicidad de extractos proteicos de <i>A. Fumigatus</i> -----	209
2.1. Crecimiento de <i>A. fumigatus</i> en cultivo celular-----	211
3. Modelos animales de Aspergilosis Invasora-----	211
3.1. Modelos de infección en ratón-----	213
3.2. Modelos de infección en rata-----	217
3.3. Descripción general de las lesiones -----	227
a. Inoculación transtorácica -----	227
b. Inoculación intratraqueal -----	228
3.4. Evaluación de métodos diagnósticos laboratoriales -----	228
<b>E. CONCLUSIONES -----</b>	<b>251</b>
<b>F. BIBLIOGRAFÍA-----</b>	<b>255</b>



## **A. INTRODUCCIÓN**





## **1. HONGOS**

### **1.1. Definición.**

Los hongos son organismos eucariotas que producen esporas, aclorofílicos que, por lo general, se reproducen sexual y asexualmente y cuyas estructuras somáticas están rodeadas por una pared celular típica que contiene celulosa, quitina o ambas <sup>5,107</sup>.

Morfológicamente, encontramos dos grupos principales de hongos: levaduras y hongos miceliales o mohos. Las levaduras son unicelulares, y su reproducción suele ser asexual <sup>3,176 5,107</sup>. Los hongos miceliales son pluricelulares presentando unas estructuras somáticas o micelio, a partir del que se desarrollan las estructuras reproductoras que dan lugar a la formación de esporas <sup>3,176,5,107</sup>.

### **1.2. Patologías de etiología fúngica.**

Podemos distinguir tres tipos <sup>107</sup>:

a. Micotoxicosis:

Algunos de los metabolitos producidos durante el crecimiento de los hongos pueden provocar serios daños al ser ingeridos tanto por los animales como por el hombre. A estas sustancias las denominamos micotoxinas y a la enfermedad producida micotoxicosis <sup>107,171</sup>.

b. Micosis:

Son las infecciones producidas por hongos. Las podemos clasificar, desde un punto de vista práctico en <sup>277</sup>:

- Micosis cutáneas.
- Micosis subcutáneas.
- Micosis sistémicas.

Las micosis cutáneas las podemos encuadrar en dos grupos. En el primero de ellos estarían las dermatofitosis, producidas por hongos de los géneros *Microsporum*, *Epidermophyton* y *Trichophyton* que crecen sobre los tejidos queratinizados tanto del hombre como de los animales. En el segundo grupo tenemos las dermatomicosis o

infecciones cutáneas producidas por hongos no dermatofitos.

Las micosis subcutáneas se caracterizan por poseer baja capacidad virulenta, por lo que requieren de la introducción mecánica del microorganismo en el tejido antes de que puedan manifestar un proceso mórbido. Normalmente la enfermedad resultante permanece localizada en esta área si bien existen casos como el de la Esporotricosis equina, en los que resulta frecuente una extensión lenta por vasos linfáticos<sup>277</sup>

En lo referente a las micosis sistémicas podemos decir que la mayoría de los hongos aislados de procesos clínicos se encuentran de forma ubicua en el medio ambiente<sup>107,170,277</sup>. En medicina humana, normalmente se asocia la aparición de la enfermedad sistémica a condiciones especiales del hospedador o bien del medio que provocan una bajada de defensas del organismo,<sup>170</sup>. El estudio de las enfermedades fúngicas ha ocupado un primer plano en los últimos años, debido a la aparición del SIDA y el gran avance en el campo de los trasplantes<sup>170</sup>. No ha sucedido esto en medicina veterinaria, aunque la importancia de estas enfermedades está siendo cada vez más considerada, sobre todo en la clínica de pequeños animales<sup>108</sup>

c. Enfermedades alérgicas:

Se trata de procesos basados en reacciones de hipersensibilidad por primoexposición a algunos antígenos fúngicos. En el hombre se describen procesos como rinitis y sinusitis alérgica, asma extrínseca, alveolitis alérgica extrínseca o aspergilosis broncopulmonar alérgica, causadas por antígenos fúngicos del género *Aspergillus*<sup>170,277</sup>.

## **2. Aspergillus Y ASPERGILOSIS**

### **2.1. Aspergillus**

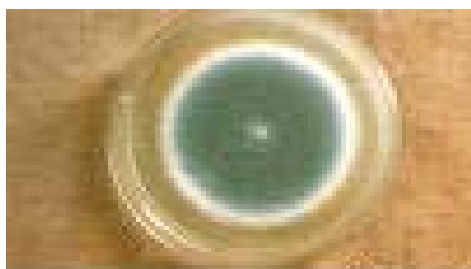
#### **a. Historia**

La primera descripción de hongos del género *Aspergillus* se la debemos a Pier Antonio Micheli (1729) que marca el punto de partida de la micología como ciencia en su obra “Nova Plantarum Genera”. La denominación del género se debe a la similitud morfológica entre los conidióforos de los *Aspergillus* y los hisopos utilizados para

rociar (aspergilar) agua bendita en ciertas liturgias, con los que debía estar familiarizado el padre Micheli.

La primera descripción de una patología provocada por *Aspergillus* la hacen Meyer y Emmert en 1815, que descubrieron la enfermedad pulmonar en el grajo. Pero no fue hasta 1850 cuando Fresenius cultiva el hongo a partir de las lesiones del tracto respiratorio en pájaros y le denomina *Aspergillus fumigatus*. En 1847 Sluyter publica la primera descripción de neumomycosis humana causada por *Aspergillus*, y es Virchow en 1856 el que realiza un amplio estudio anatomopatológico de la enfermedad así como una detallada descripción microscópica del género <sup>71,3,256,342</sup>.

Desde entonces, se han descrito unas 200 especies de *Aspergillus*, de las cuales alrededor de 20 han sido descritas como agentes etiológicos de infecciones en humanos o animales <sup>342</sup>.



Cultivo de *A. fumigatus*

#### b. Taxonomía e identificación

El género *Aspergillus* está encuadrado dentro de la familia *Moliniaceae*, Subclase Hyphomycetos, dentro de la subdivisión *Deuteromycotina*, junto con otros conocidos géneros tan diversos como *Penicillium*, *Trichoderma*, *Microsporium* o *Coccidioides* <sup>160</sup>. La identificación de los hongos del género *Aspergillus*, como de todos los hongos miceliares, se suele realizar basándose en criterios exclusivamente morfológicos de las conidias y de los conidióforos. A pesar de ello, y con el fin de diferenciar distintas géneros de hongos con el género *Aspergillus*, así como para diferenciar distintas especies y cepas de *Aspergillus*, se han venido desarrollando métodos bioquímicos, basados en la detección e identificación de metabolitos secundarios, como por ejemplo micotoxinas <sup>107</sup>, la identificación del sistema de ubiquinona o el examen de patrones enzimáticos <sup>184,208</sup>. Con el mismo fin, se han desarrollado métodos moleculares, obtenidos a partir tanto de ADN genómico como mitocondrial o ribosomal <sup>66,115,276</sup>. El criterio más frecuentemente utilizado son los valores de reasociación ADN-ADN, encontrándose valores superiores al 92% entre distintas cepas de *A. fumigatus* y

menores de 70% entre *A. fumigatus* y *Neosartorya*<sup>176</sup>, habiendo utilizado también los análisis de intrones y la hibridación de secuencias de ADN digeridas por endonucleasas

115

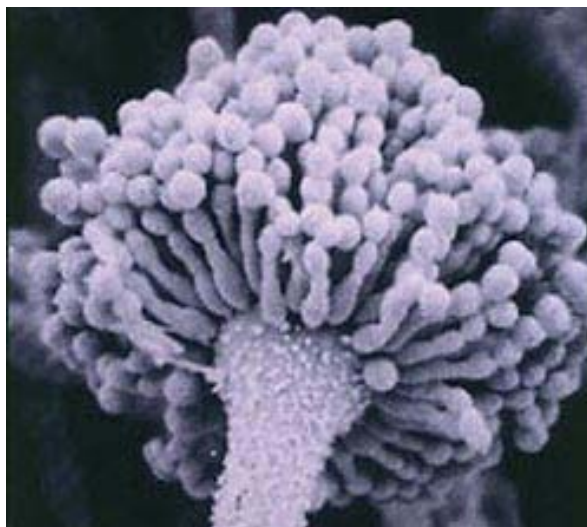
### c. Ecología

*Aspergillus* es un hongo miceliar de vida saprofita que suele vivir en el suelo, alimentándose a partir de restos orgánicos, con lo que entra a formar parte del ciclo medioambiental del carbón y del nitrógeno<sup>260,342</sup>. Los hongos del género *Aspergillus* son capaces de crecer en muy distintos substratos naturales y bajo un amplio rango de condiciones medioambientales, lo que los hace tremendamente ubicuos<sup>23</sup>. Así el género *Aspergillus*, junto con *Penicillium*, es uno de los más frecuentes contaminantes de muestras y cultivos que se manejan en el laboratorio.

Los estudios volumétricos en distintos ambientes de Europa y Estados Unidos, realizados a lo largo de las distintas estaciones del año, indican que es en otoño-invierno cuando existe una mayor tasa de conidias de hongos del género *Aspergillus* en el ambiente. Estos estudios suelen estar realizados en especies con cierta relevancia clínica

342

En el aire podemos encontrar gran cantidad de conidias debido a la abundante esporulación que realiza a partir de sus conidióforos<sup>224,232</sup>, así, cada conidióforo puede producir unas 50.000 conidias. El número máximo de esporas contadas en aire es de mil millones por metro cúbico<sup>342</sup>. Dichas conidias poseen un diámetro de 2 a 3  $\mu\text{m}$ , y no poseen ningún mecanismo especial que permita su liberación del conidióforo<sup>23</sup>.



Conidióforo de *Aspergillus fumigatus*

## 2.2. Aspergilosis

En un sentido amplio podemos definir las Aspergilosis como el daño a los tejidos provocados por hongos del género *Aspergillus*<sup>374</sup>. Pueden ser de cuatro tipos, micotoxicosis, enfermedades alérgicas, colonizaciones saprofiticas y enfermedades invasoras o sistémicas.

### a. Micotoxicosis

Se denominan así las intoxicaciones que se producen en el hombre y en los animales, por efecto de las micotoxinas, que son productos del metabolismo secundario de los hongos que excretan al medio en el que crecen<sup>171,382</sup>. Debido a la gran cantidad de medios en los que los hongos toxicogénicos son capaces de desarrollarse, la presencia de estas sustancias en alimentos resulta frecuente y preocupante<sup>107</sup>. Así, por ejemplo, los cereales en los que han crecido hongos toxicogénicos, pueden contener cantidades de micotoxinas que pasan a los seres humanos o bien a los animales cuando los ingieren. En caso de ser ingeridas por el ganado, las micotoxinas pueden llegar al ser humano a través de las secreciones de aquellos, como la leche. En otras ocasiones el problema no es la contaminación del substrato por el hongo, ya que existen alimentos en cuya elaboración se utilizan hongos toxicogénicos como fermentadores, por lo que pueden producir micotoxinas. Así, se han encontrado micotoxinas en productos como la cerveza<sup>256</sup> o el Sake, producto fermentado, a partir del arroz por *A. oryzae*<sup>342</sup>.

El grado de los efectos adversos que provoca la ingestión de micotoxinas viene no sólo determinado por la concentración de toxinas presentes en el alimento sino también por el tiempo de exposición a las mismas. Así, a pesar de los problemas que puedan causar las intoxicaciones agudas por micotoxinas, principalmente pérdidas en los niveles de producción en el ganado, lo que resulta más preocupante es el papel que ciertas toxinas, con demostrado efecto genotóxico como la Aflatoxina, Ocratoxina o Fumonisina, pueden jugar en la etiología del cáncer en humanos<sup>97</sup>, como por ejemplo en el carcinoma hepatocelular<sup>107,151</sup>

Resulta importante destacar el papel que juegan algunas de estas toxinas, como la Gliotoxina, en la patogenia de las Aspergilosis Invasoras. De ello nos ocuparemos más adelante.

## b. Colonización Saprofítica

En estos procesos no existe una invasión de los tejidos por parte del hongo, que sin embargo se desarrolla adyacente a ellos. Este tipo de colonización se puede dar en nariz y /o senos, canal auditivo y principalmente en bronquios y pulmón <sup>314</sup>, en este último caso en forma de colonización broncopulmonar o bien de Aspergiloma.

### b.1 Colonización broncopulmonar:

Es la presencia del hongo en el tracto respiratorio sin que exista evidencia directa de daño tisular. Los factores que suelen provocar esta colonización incluyen el uso prolongado de antibióticos de alto espectro, enfermedades pulmonares crónicas o malnutrición. Se suele encontrar una alta incidencia de colonización saprofitica en pacientes que sufren de asma bronquial, bronquiectasis, bronquitis crónica, fibrosis quística y síndrome de disquinesia ciliar primaria <sup>170</sup>

### b.2 Aspergiloma:

También llamados micetomas o bolas fúngicas, consisten en la colonización, por parte de hongos del género *Aspergillus*, de cavidades torácicas, normalmente mal drenadas al resto del árbol bronquial, y que fueron causadas por otra enfermedad pulmonar, como la tuberculosis, sarcoidosis, histoplasmosis, tumores pulmonares, o cualquier otra enfermedad que forme cavidades en el parénquima pulmonar, bronquios o pleuras. También puede darse un Aspergiloma en senos paranasales obstruidos de manera crónica. <sup>170,176,314</sup>. Los Aspergilomas se producen entre un 10 a 15% de pacientes que han sufrido alguna enfermedad que produzca cavidades en pulmón <sup>2</sup>. La estructura de un aspergiloma consiste en una masa esférica embebida en una matriz proteica central (que suele contener fibrina, moco y restos celulares) con estructuras esporuladas en la periferia, que pueden crecer durante meses o años sin llegar a invadir la cápsula fibrosa que la rodea ni el tejido pulmonar adyacente <sup>170,176,314</sup>. En muchas ocasiones los Aspergilomas son asintomáticos. En caso de aparecer, el síntoma que se da con más frecuencia es una hemoptisis recurrente, causada por rotura de los vasos que existen dentro de la cavidad <sup>176,314</sup>, que a su vez puede estar provocada por el movimiento del Aspergiloma o por el efecto de ciertas enzimas proteolíticas que el hongo secreta durante su crecimiento <sup>170</sup> y que causan signos clínicos en otros muchos cuadros causados por *Aspergillus*, como la epistaxis y aclarado de la trufa que se produce en perros que sufren Aspergilosis Nasal <sup>105</sup>.

El diagnóstico de los Aspergilomas suele realizarse mediante una radiografía torácica, o bien por Tomografía Computerizada (CT), en la que aparece una imagen de masa radiodensa, normalmente rodeada de una zona de aire, más radiolúcida <sup>314</sup>. Normalmente los Aspergilomas se sitúan en los lóbulos craneales, o bien en la zona más craneal de lóbulos inferiores de los pulmones y, aunque suelen ser individuales, se han descrito dobles y múltiples <sup>170,176</sup>. Por otro lado, estos pacientes presentan unos títulos elevados de anticuerpos específicos <sup>176</sup>, que son utilizados en su diagnóstico laboratorial debido a su alta sensibilidad, superior al 95% <sup>314</sup>. Así mismo se han puesto a punto técnicas de inmunoblotting que detectan antígenos de *Aspergillus* en suero de pacientes con valor diagnóstico <sup>133,187</sup>

En algunas ocasiones los Aspergilomas pueden evolucionar hacia una forma en la que el hongo invade el tejido adyacente, pudiendo llegar en estos casos a ser la causa primaria de una Aspergilosis Invasora <sup>314</sup>.

El tratamiento del Aspergiloma se centra en evitar la hemoptisis (que causa la muerte por asfixia del 26% de los pacientes que mueren por Aspergiloma), llegándose incluso, en casos graves, a realizar embolizaciones de la arteria bronquial para ocluir los vasos de los que parten las hemorragias. El tratamiento definitivo consiste en la resección quirúrgica del Aspergiloma, a pesar de que esta intervención suele estar asociada a tasas de mortalidad durante la operación mayores al 7% y suele provocar complicaciones postoperatorias graves, tales como hemorragia y fístulas broncopleurales. El tratamiento con fármacos antifúngicos, tanto inhalados como sistémicos, suele ser adicional al sintomático y quirúrgico <sup>314</sup>.

### c. Enfermedades alérgicas

Están provocadas por los antígenos del hongo y por la reacción del individuo cuando entra en contacto con ellos, sin que sea necesaria la invasión de tejidos. Normalmente son enfermedades asociadas a cierto tipo de profesiones que obligan a entrar en contacto directo con substratos donde suele crecer el hongo, como es la de granjero.

#### c.1. Asma alérgica:

Los alérgenos presentes en las conidias de hongos del género *Aspergillus* pueden provocar asma alérgica. El asma producida por hongos suele ser más prevalente en niños que en adultos y suele ser un asma lenta y persistente. El diagnóstico diferencial con asma provocadas por otro tipo de alérgenos se realiza mediante la anamnesis, in



vivo mediante test de hipersensibilidad cutánea (respuesta celular) o in vitro evidenciando la presencia de IgE específica frente a antígenos de *Aspergillus*<sup>170</sup>.

#### c.2. Rinitis Alérgica:

Las formas clásicas se denominan fiebre del heno y rinitis alérgica. Se presenta tras la exposición de individuos susceptibles a alergenos de las conidias o bien de las hifas de distintos hongos, entre ellos los del género *Aspergillus*. La presentación puede ser estacional o no, y los síntomas son indistinguibles de lo que se presentan cuando los alergenos no proceden de hongos<sup>170,314</sup>.

#### c.3. Sinusitis Alérgica:

Afecta a individuos atópicos, es crónica y afecta a distintos senos nasales sin invadir tejido. Se caracteriza por una elevada producción de moco que rellena la cavidad del seno y que contiene muchas hifas. El diagnóstico suele ser radiológico, evidenciándose un aumento progresivo de la radiodensidad de varios o todos los senos paranasales<sup>170 314</sup>.

#### c.4. Alveolitis alérgica extrínseca o Alergia bronquial asmática o Neumonitis hipersensible:

Está causada tras la exposición de individuos susceptibles a antígenos fúngicos, entre otros del género *Aspergillus* y otros hongos. Su presentación depende del tiempo y la intensidad de la exposición. La forma aguda suele ser provocada por exposiciones intermitentes al alergeno, la primera de las cuales provoca la sensibilización y en las siguientes el paciente presenta los síntomas tras 4 u 8 horas, y que suelen remitir a las 12 horas espontáneamente. Los cuadros clínicos que se presentan son similares a los originados por otros alergenos como el polen. En el caso de que la exposición sea constante se puede desarrollar un cuadro crónico irreversible que conlleva una intensa fibrosis pulmonar<sup>170,256</sup>.

#### c.5. Aspergilosis Broncopulmonar Alérgica (ABPA)

Se define como una enfermedad inmunológica que suele presentarse como un asma y que llega a convertirse en una enfermedad destructiva del pulmón, lo que define los signos clínicos, serológicos, radiológicos y patológicos de la enfermedad<sup>176 170,364</sup>. Es sin duda la enfermedad alérgica más grave que causan los hongos del género

*Aspergillus*, y una de las que se conocen desde más antiguo. Aparece en pacientes que sufren asma atópica o fibrosis quística y suele seguir el mismo curso y síntomas que el asma, con respuesta inmune principalmente celular y en los casos más severos cursa con bronquiectasia y fibrosis pulmonar <sup>364</sup>.

Se caracteriza por una grave bronquitis acompañada de síntomas de asma, eosinofilia en sangre periférica ( $>1000/\text{mm}^3$ ), reactividad cutánea inmediata frente a antígenos de *A. fumigatus*, formación de precipitinas en suero frente a antígenos de *A. fumigatus*, niveles elevados de IgE total en suero ( $>1\text{g/ml}$ ), bronquiectasia proximal y elevados niveles en suero de IgE e IgG frente a *A. fumigatus* <sup>176 170 314,342</sup>.

El diagnóstico del ABPA suele ser complicado, debido a que no presenta signos ni síntomas clínicos específicos y a que estos no suelen presentarse simultáneamente <sup>176, 170</sup>.

El tratamiento del ABPA suele realizarse con corticoides. A pesar de ello existen tratamientos con antifúngicos como natamicina inhalada o clotrimazol por vía sistémica que no suelen ser eficaces, particularmente a la hora de evitar recurrencias <sup>314</sup>.

#### d. Enfermedades sistémicas o invasoras

##### d.1. Aspergilosis Invasora (AI):

De esta enfermedad nos ocuparemos con más profundidad posteriormente, debido a que es el objeto de estudio del presente trabajo. Definiremos ahora qué entendemos por Aspergilosis Invasora, y a qué denominamos Aspergilosis Diseminada.

Una Aspergilosis Invasora es la enfermedad que provocan hongos del género *Aspergillus* cuando invaden tejido vivo. Generalmente se trata de una infección oportunista, que necesita que el paciente tenga un estado previo de inmunosupresión para desarrollarse <sup>14</sup>. Sin embargo se han descrito casos en que distintas especies de hongos, entre ellos *Aspergillus*, invaden tejidos, tanto en animales <sup>105</sup> como en el hombre <sup>289</sup>, sin que se haya podido demostrar un estado previo de inmunosupresión.

Debido al contacto directo con esporas ambientales, la Aspergilosis Invasora suele afectar al pulmón <sup>63</sup> y vías respiratorias altas <sup>288</sup>, ya que esta suele ser la puerta de entrada del hongo, a pesar de lo cual, y de forma mucho menos frecuente, también podemos encontrarlo infectando piel, en cuyo caso los hongos del género *Aspergillus* necesitan de una lesión previa para su implantación <sup>256,300,192</sup> peritoneo, riñón <sup>211,263,357</sup>,

huesos<sup>205,354</sup>, ojos<sup>99</sup>, encéfalo<sup>278</sup> y tracto gastrointestinal<sup>176,300</sup>.

#### d.2. La Aspergilosis Diseminada:

La sistémica se produce cuando aparece invasión de tejidos en dos o más órganos no adyacentes, y suele ser una complicación fatal de la Aspergilosis Invasora, por lo que uno de los órganos afectados es el pulmón, aunque en ocasiones la lesión primaria pulmonar no sea importante y pase desapercibida<sup>278</sup>. También se puede dar una Aspergilosis Diseminada sin origen pulmonar; se trata de aquellos casos en que las esporas del hongo son transportadas a través de catéteres o intervenciones quirúrgicas, provocando la implantación visceral del hongo<sup>161,143</sup>. En este caso no existe enfermedad respiratoria previa a partir de la que se haya diseminado, por lo que la llamaremos Aspergilosis yatrogénica o visceral. La sintomatología de estos procesos depende del lugar o lugares donde se implante la espora o esporas transportadas.

#### d.3 Aspergilosis Invasora crónica<sup>71</sup>:

La AI pulmonar puede presentarse de dos formas, de las que la más frecuente es la aguda, que es de la que hablamos cuando nos referimos a Aspergilosis Invasora a lo largo de este trabajo, aunque también se ha descrito una forma crónica de la que hablaremos a continuación brevemente.

Esta presentación de la enfermedad es menos frecuente y preocupante que la Aspergilosis aguda, y suele darse en pacientes que no tienen un estado de inmunosupresión evidente. Así, se da en enfermos que padecen enfermedad crónica granulomatosa, diabéticos (diabetes mellitus), alcohólicos, aquellos que utilizan corticosteroides debido a una enfermedad crónica pulmonar o en enfermos de SIDA.

La sintomatología es parecida a la de un Aspergiloma, y se da durante meses. Estos pacientes suelen tener tos productiva, en ocasiones acompañada de hemoptisis, malestar y pérdida de peso. En caso de presentarse fiebre esta suele ser moderada. La extensión de la enfermedad suele ser local, en ocasiones hacia el plexo braquial o a la columna vertebral. En ocasiones el hongo, en su crecimiento, produce cavidades en el pulmón que no existían previamente, pero que pueden dificultar el diagnóstico diferencial con un Aspergiloma.

El cultivo del hongo suele verse dificultado debido a la escasez de estructuras fúngicas de forma que, en ocasiones, únicamente se hallan estructuras granulomatosas de las que es prácticamente imposible aislar el hongo.

Estos pacientes suelen poseer buenos niveles de anticuerpos anti-*Aspergillus* en suero, lo que puede ser de gran ayuda a la hora de ser diagnosticado.

### **3. ASPERGILOSIS INVASORA**

#### 3.1. Generalidades

Desde que en 1953 se realizó la primera descripción de una Aspergilosis Invasora (AI)<sup>264</sup>, el número de pacientes que sufre esta enfermedad ha ido aumentando hasta nuestros días<sup>71</sup>. La causa de ello ha sido el incremento de pacientes con riesgo de sufrir la enfermedad, como lo son los enfermos de SIDA<sup>228</sup>, aquellos sometidos a regímenes intensivos de quimioterapia como tratamiento de distintos tipos de tumores<sup>189</sup>, aquellos que sufren terapia inmunosupresiva severa como son los trasplantados<sup>246,267,305,378</sup>, o los que sufren enfermedades autoinmunes tales como el lupus eritematoso<sup>71,314</sup> o enfermedades pulmonares como la enfermedad obstructiva crónica del pulmón<sup>244,270</sup>. Frecuentemente se suele asociar la aparición de la Aspergilosis Invasora a largos periodos de neutropenia, de manera que cuanto mayor es este periodo más probable es que aparezca una Aspergilosis<sup>324</sup>.

La media de incidencia de la AI en pacientes que sufren leucemia aguda es de entre un 5 a un 25%, de un 5 a un 10% en aquellos que han sufrido un trasplante alogénico de médula ósea y entre un 0'5 y un 5% en tres grupos de pacientes; aquellos que han sufrido tratamientos citotóxicos por enfermedades sanguíneas, en trasplantados autólogos de médula ósea o aquellos que sufren trasplantes de órganos sólidos<sup>246,176</sup>. En cualquiera de estos casos la mortalidad suele ser mayor del 75%, aunque es especialmente alta en trasplantados de médula ósea (92%) y de páncreas (100%)<sup>176</sup>.

La especie que con más frecuencia está implicada en la AI es *A. fumigatus*, implicada en alrededor del 90% de los casos, aunque se han descrito aislamientos de muchas otras especies del género<sup>321,349,71,161,314,222,351</sup>. Hay que tener en cuenta además que existen hongos de otros muchos géneros capaces de producir invasión de tejidos, aunque se dan más raramente<sup>149</sup>.

Las especies patógenas de *Aspergillus* crecen fácilmente y con relativa rapidez en los medios rutinarios utilizados en bacteriología y micología clínica. Algunas especies como *A. glaucus*, requieren altas concentraciones de glucosa para su óptimo

crecimiento. Únicamente las especies patógenas son capaces de crecer a 35-37°C y *A. fumigatus* es capaz de crecer a 50°C <sup>71</sup>; además, la mayor parte de los aislados de *A. fumigatus* son capaces de crecer a tensiones de oxígeno del orden de 0.1% <sup>126</sup>.

En el medio de cultivo las colonias se desarrollan blanquecinas y esponjosas en la superficie del Agar. La producción de conidias comienza a partir de las 36 o 48 horas de incubación a 30-37° C. Un medio frecuentemente utilizado para inducir la esporulación es el Agar Patata, sin embargo, para su identificación, se recomienda el crecimiento en medios como el Czapek-Dox o el Agar Extracto de Malta <sup>71</sup>.

### 3.2 PATOGENIA

Como ya hemos mencionado anteriormente, *A. fumigatus* es considerado un patógeno facultativo, es decir, que necesita de un estado previo de inmunosupresión para invadir tejidos, si bien cuenta con una amplia gama de mecanismos y sustancias que utiliza en su acción patógena <sup>71</sup>. A pesar de que este axioma se cumple en la mayoría de las AI, hay que destacar que en muchas ocasiones también se describe la enfermedad en pacientes en los que no se puede establecer un estado previo de inmunosupresión <sup>74</sup>.

Del total de conidias de *A. fumigatus* inhaladas, alrededor del 90% se depositan en el epitelio nasofaríngeo y traqueal, alcanzando muy bajo número el tracto respiratorio inferior <sup>178</sup>. Una vez depositadas en el epitelio las conidias deben adherirse al epitelio respiratorio para no ser expulsadas por los movimientos ciliares. Para ello las conidias poseen ciertas toxinas capaces de inhibir el movimiento ciliar <sup>11</sup>, así como adhesinas capaces de unirse a fibrinógeno, laminina, complemento, fibronectina, albúmina, inmunoglobulinas, colágeno y proteínas del surfactante <sup>33,34,41</sup>. Estas uniones ocurren mediante interacciones no específicas, físico-químicas, o específicas, mediante la unión receptor-ligando <sup>176</sup>. No todas estas moléculas se encuentran en la superficie del epitelio respiratorio, de manera que las conidias de *A. fumigatus* son capaces de secretar enzimas que provocan daño tisular, tales como proteinasas y ribonucleotoxina, y un consiguiente aumento de fibrinógeno y laminina <sup>33,34</sup>.

Una vez adheridas al epitelio respiratorio, las conidias poseen mecanismos para escapar de la fagocitosis de los macrófagos mediante la secreción de toxinas procedentes del metabolismo secundario del hongo, como la gliotoxina, un metabolito capaz de inhibir la fagocitosis por los macrófagos e inducir en ellos mecanismos de apoptosis. La gliotoxina es además capaz de bloquear la activación de linfocitos T y B <sup>88,243,322,323,362</sup>. Tal vez la capacidad de las células endoteliales y epiteliales de internalizar conidias

pueda también ayudar al hongo a evadir los macrófagos <sup>245</sup>, si bien no se sabe si este mecanismo es inducido por el propio hongo. Existe un tercer mecanismo por el que las conidias de *Aspergillus* podrían escapar a la acción de los macrófagos y que tiene que ver con el grado de pigmentación de las mismas, habiéndose comprobado que conidias procedentes de cepas mutantes que carecen de pigmentos se unen más fácilmente a factores del complemento, facilitando así su opsonización <sup>307,333-335</sup>. Además estos mutantes parecen tener una pared más permeable, lo que aumenta su susceptibilidad a tratamientos antifúngicos <sup>166,348</sup>.

Las conidias que no han sido expulsadas por los movimientos ciliares, que han logrado escapar de los macrófagos y se han adherido al epitelio, germinan. En esta germinación juega un papel fundamental la síntesis, por parte del hongo, de un péptido de 180 kDa inmunoanálogo de la miosina presente en los músculos <sup>92</sup>. Simultáneamente el hongo comienza a invadir tejido. Normalmente los neutrófilos son muy eficaces a la hora de eliminar las hifas, sin embargo en pacientes inmunosuprimidos o bien no están en número suficiente o bien son incapaces de cumplir su cometido. La invasión tisular precisa la degradación por parte del hongo, del medio en que se halla, es decir el pulmón, para lo que disponen de un completo mecanismo enzimático. Las dos principales proteínas estructurales presentes en el pulmón son la elastina y el colágeno, por lo que *Aspergillus* posee mecanismos enzimáticos con elastasas y colagenasas <sup>31,176</sup>. Una evidencia de la producción de elastasa in vivo es que se producen anticuerpos anti-elastasa en pacientes que padecen Aspergilosis <sup>259</sup>. La elastasa responsable de esta actividad se caracterizó como una serin-proteasa alcalina de 33kDa muy semejante a la quimiotripsina <sup>177</sup>; sin embargo la disrupción del gen responsable de su síntesis no provoca una disminución de la patogenicidad de la cepa en un modelo de infección intranasal en ratones <sup>326</sup>. La explicación a este hecho es que la cepa seguía teniendo su actividad colagenasa y que además la actividad elastasa de *Aspergillus* no se debe tan sólo a esta enzima, de manera que se han descrito además una metaloproteasa de 43 kDa, una aspartático-proteasa (Aspergillopepsin F) de 39 kDa y una quimiotripsina que poseen actividad elastasa. Además estas proteínas poseen también actividad colagenasa y son capaces de degradar fibrinógeno y laminina <sup>31</sup>. Así mismo *A. fumigatus* es capaz de sintetizar una ARNasa de 18 kDa que ayuda a la destrucción de las células, además de una fosfolipasa que ayuda a degradar los tejidos <sup>176,177</sup>.

El crecimiento de *Aspergillus* en tejido provoca una gran necrosis de los mismos, así como daños vasculares, como trombosis <sup>71,330</sup>. La diseminación del hongo a otras

localizaciones en el organismo se produce vía hematológica, a pesar de que no son frecuentes los aislados del hongo en los hemocultivos <sup>75</sup>. Esta diseminación se produce gracias a fragmentos de la hifa del hongo, no siendo necesaria la esporulación del mismo <sup>47</sup>. *A. fumigatus* es capaz de sintetizar una hemolisina de 30 kDa que provoca la lisis de los eritrocitos y que se ha demostrado se produce *in vivo* <sup>176</sup>.

A pesar de todos estos estudios, la posibilidad de que existan cepas de *A. fumigatus* que presenten distinta patogenicidad sigue en el aire. Se ha podido demostrar diferencia entre la virulencia de distintas cepas de *A. fumigatus* en modelos de ratón, asociada a un fragmento de ADN de 0'45 kb <sup>219</sup>. Sin embargo, la cantidad de individuos infectados por *A. fumigatus* en los que no se ha podido demostrar un estado previo de inmunosupresión no es muy grande, por lo que, independientemente de si existen cepas más o menos patógenas <sup>136</sup>, hay autores que piensan que en todo caso se precisa de una situación de inmunosupresión para provocar AI <sup>34</sup>.

### 3.3. Modelos animales de Aspergilosis Invasora

Existen gran cantidad de modelos animales de Aspergilosis Invasora desarrollados con el fin de estudiar el comportamiento de la enfermedad *in vivo* <sup>25,51,90,166,173,229,275,304,311,323,333,335</sup>, así como con el fin de evaluar tanto fármacos antifúngicos <sup>9,76,79,101,112,128,156,203,226,231,295,298,34,81,68,7,61,67,113,147,168,209,239,240,297,341</sup> como métodos de diagnóstico <sup>101,146,215,340,52,306,312,365</sup>. A pesar de ello no existe un consenso entre la comunidad científica sobre el modelo a utilizar, ni en la especie de animal a inocular, ni en la ruta de inoculación ni en el tipo ni dosis de inmunosupresión a realizar <sup>176,374</sup>.

El principal problema que presentan estos modelos es que la infección que se logra no se asemeja suficientemente a la que se da en humanos <sup>176</sup>, como ocurre en modelos con otros hongos, como puede ser *Candida*, y que resultaría lo ideal <sup>316</sup>. Así por ejemplo, las inoculaciones intravenosas en ratón provocan una Aspergilosis Diseminada, (que no precisan de un estado de inmunosupresión en los animales), parecida a la Aspergilosis yatrogénica que hemos definido anteriormente, pero que en absoluto mimetiza la infección pulmonar en inmunosuprimidos, que es la que se da con mayor frecuencia en humanos. Sin embargo las inoculaciones intranasales e intratraqueales en las que se inoculan una gran cantidad de conidias del hongo en un momento determinado, provocan una infección hiperaguda, lejos del patrón de enfermedad que se da en

humanos, donde el paciente está sometido a una exposición constante y repetida a las conidias <sup>176</sup>. En ratones y ratas se ha intentado solucionar este problema con la inoculación de conidias contenidas en bolas de Agar, que germinan dentro de dichas bolas y comienzan a invadir el tejido convertidas ya en hifas <sup>304,229</sup>. En rata, aprovechando su mayor tamaño y por vía intratraqueal, se ha procurado infectar un solo pulmón del animal, evitando así el daño en el otro pulmón, lo que permitiría una evolución más crónica de la enfermedad. Esta inoculación requiere dosis de inóculo menores de  $10^3$  conidias por animal para no provocar la muerte del 100% de los inoculados en menos de 12 días <sup>180</sup>. A pesar de todo lo indicado, la vía respiratoria es la que se recomienda para estudios de patogenia <sup>176</sup>, aunque algunos autores la desestiman en la evaluación de Antifúngicos, ya que los corticosteroides (muy frecuentemente utilizados para conseguir la inmunosupresión de los animales) y los polienos (como la Anfotericina B, fármaco de referencia utilizado en Aspergilosis) presentan toxicidad sinérgica <sup>261</sup>.

La infección que se provoca a través de las vías respiratorias mediante la inoculación de conidias de *A. fumigatus* depende de varios factores que pueden ser controlados. En primer lugar del tamaño del inóculo, pues existe una correlación directa entre éste y la letalidad que provoca. Así mismo depende del peso de los animales, por cuanto que animales de mayor peso son capaces de soportar dosis mayores de inóculo. Por último, depende de la inmunosupresión a que se someta a los animales. Resulta imprescindible someter a inmunosupresión a los animales que se inocula por vías respiratorias para conseguir una infección ya que, por ejemplo, un ratón inmunocompetente es capaz de eliminar inóculos de hasta  $10^8$  conidias sin que se produzca enfermedad <sup>261,176</sup>. Todo ello lleva a que el tipo de infección que se produce así como el patrón inflamatorio que este provoca dependen, en gran parte, del tipo de inmunosupresión utilizada <sup>25</sup>.

El animal más utilizado en modelización de Aspergilosis ha sido el ratón, de manera que se han realizado modelos de inoculación intranasal, intravenosa e intraperitoneal <sup>195,374</sup>.

Los modelos en rata resultan menos frecuentes que los de ratón. Normalmente se realizan por inoculación intratraqueal (la vía intranasal no permite una infección uniforme en las ratas), menos frecuentemente por vía intravenosa y muy raramente por vía subcutánea o intraperitoneal <sup>336,374</sup>.



En el conejo, el tamaño del animal permite la realización de otros modelos más sofisticados. Así, a la Aspergilosis sistémica por inoculación intravenosa y a la pulmonar por inoculación intratraqueal podemos añadir la endoftalmitis y la endocarditis aspergilaes <sup>374</sup>.

Otros animales en los que se han realizado modelos de Aspergilosis son los primates, con modelos de Aspergilosis alérgica, aves <sup>374</sup>, cobayas <sup>261</sup>, y finalmente vacas y ovejas, con modelos naturales de placentitis, que también se han realizado en ratones <sup>154</sup>.

La evaluación de la infección que provoca el hongo en los animales inoculados resulta, así mismo, complicada. En muchas ocasiones el parámetro utilizado es la supervivencia de los animales normalmente complementado con resultados de recuentos tipo Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en distintos órganos, como pulmón, riñones, bazo, encéfalo e hígado <sup>101,229,7,22,67,90,147,179,209,239,240</sup>. Sin embargo estos recuentos no resultan realmente buenos indicadores del grado de desarrollo del hongo que invade tejido, debido al gran desarrollo del micelio durante la enfermedad, así como a la gran cantidad de tiempo que pueden sobrevivir en el pulmón las conidias inoculadas que no han germinado <sup>176</sup>, de manera que el número de colonias que aparecen en la placa de recuento depende tanto del desarrollo del hongo como del tipo y cantidad de disgregación a que se someta el tejido. Sí resulta de más utilidad la evaluación de la cantidad de quitina presente en los órganos examinados, que correlaciona bastante bien con la cantidad de biomasa del hongo, lo que nos puede dar una idea de la cantidad de crecimiento *in vivo* del mismo <sup>273,182</sup>. Así mismo resultaría bastante fiable la determinación de la cantidad de ADN fúngico presente en la muestra mediante la realización de una PCR cuantitativa <sup>186,40,294</sup>.

### 3.4. Inmunología de la Aspergilosis Invasora

#### a. Inmunidad no específica o innata

Este tipo de inmunidad es la que juega un papel más importante a la hora de evitar la infección por *Aspergillus* en individuos sanos. Se compone de tres tipos de defensa, desarrollados a continuación:

### a.1. Barreras anatómicas:

La mayor parte de las conidias de *A. fumigatus*, así como la mayor parte de las partículas inspiradas, son eliminadas a través de la acción de los cilios del epitelio pseudoestratificado cilíndrico ciliado de la parte superior del árbol traqueobronquial. Ahora bien, *A. fumigatus* sintetiza toxinas, tales como la gliotoxina, fumagilina y ácido helvólico, capaces de inhibir el movimiento ciliar <sup>11</sup>. Por otro lado, las células endoteliales y epiteliales son capaces de internalizar conidias, con lo que pueden facilitar la infección <sup>245</sup>. También existen estudios que demuestran que la unión de las conidias con las células epiteliales está facilitada en células epiteliales alteradas o activadas <sup>41</sup>. El surfactante presente en los alvéolos, juega un papel importante en la protección frente a *Aspergillus*, a través de sus proteínas hidrofílicas A y D, que mejoran la aglutinación, fagocitosis y destrucción de las conidias de *A. fumigatus* por los macrófagos y neutrófilos <sup>41,371,6,41</sup>.

### a.2. Componentes humorales

Se ha descrito la unión de *A. fumigatus* a distintos componentes del suero, aunque en ocasiones no se sepa el papel de dicha unión en el transcurso de la enfermedad. Así por ejemplo se sabe que los niveles de fibrinógeno están aumentados durante la Aspergilosis Invasora y que el fibrinógeno es capaz de unirse a *A. fumigatus*, pero no se sabe qué papel juega dicha unión durante la infección. También se conoce la capacidad de unión entre la proteína C-reactiva, que activa la cascada del complemento y ciertas fracciones de *Aspergillus*. La activación directa de la vía alternativa del complemento por *A. fumigatus* ha sido demostrada, aunque el mecanismo con el que inician la cascada del complemento las conidias en reposo, las germinadas y las hifas, parece ser distinto. Además, la capacidad de unión al hongo del componente C3 del complemento depende de cambios en la composición bioquímica de la superficie de cada una de estas tres formas <sup>167</sup>. Por otro lado, *A. fumigatus* produce un inhibidor del sistema del complemento, que parece actuar sobre la vía alternativa <sup>178</sup>.

### a.3. Células Fagocíticas

El papel de las células fagocíticas en la defensa frente a *Aspergillus* es importantísimo. La primera célula con la que se encuentran las conidias inhaladas es con los macrófagos. La competencia de los macrófagos para evitar la germinación de las conidias de *Aspergillus* depende de su ubicación anatómica; así, los macrófagos

alveolares humanos son competentes en esta actividad, mientras los presentes en el peritoneo no lo son <sup>176</sup>.

La unión de las conidias con el macrófago se realiza mediante ciertos receptores no específicos, como el manosilfucosil, no habiéndose identificado receptores específicos y, sin que sea necesaria la presencia de factores de opsonización tales como el complemento o las inmunoglobulinas. Tras la internalización de la conidia se produce un tiempo de espera de varias horas, que permite que la espora crezca, hasta que el macrófago inicia la destrucción de la misma, con lo que a las 24 horas el 90% de las conidias son destruidas. El mecanismo por el que se produce dicha destrucción no está completamente aclarado, aunque parece ser que se lleva a cabo mediante mecanismos no-oxidativos, siendo poco importante el papel de los oxidativos. Además se sabe que la actividad proteolítica de los macrófagos es inducida por antígenos de *A. fumigatus*. A pesar de la enorme capacidad de los macrófagos para destruir conidias, su efectividad no es del 100% de las inspiradas <sup>176</sup>.

Los neutrófilos (PMN) son los responsables de la destrucción de las hifas de *A. fumigatus*, a pesar de que también son capaces de eliminar las conidias que los macrófagos no logran destruir. Los neutrófilos se colocan en la superficie de las hifas, ya que son demasiado grandes para ser envueltas, y se unen a ellas, sin necesidad de que para ello se precise de complemento o inmunoglobulinas, aun cuando su presencia ayuda a tal acción. El contacto PMN-hifa desencadena la secreción de reactivos intermediarios del oxígeno que provocan daño en la hifa de una manera muy rápida (el 50% de las hifas son destruidas en unas 2 horas) <sup>176</sup>

Se ha descrito también que las plaquetas humanas pueden tener un papel en la protección frente a la Aspergilosis, ya que son capaces de unirse a la pared de las hifas invasoras de *A. fumigatus* y activarse <sup>58</sup>. La trombocitopenia, que en ocasiones se produce en pacientes que sufren largos períodos de neutropenia, puede incrementar el riesgo de sufrir Aspergilosis.

#### b. Inmunidad Adquirida

A pesar de que la respuesta a una infección por *A. fumigatus* suele conllevar una respuesta mixta, tanto humoral como celular, sólo es efectiva si está asociada a una respuesta celular, con aumento de linfocitos CD4, elevación de los niveles de IL-2, interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) e IL-12. Si la respuesta es mayoritariamente humoral, con una respuesta celular mínima, y un incremento en la producción de anticuerpos, IL-4,

IL-5 e IL-10, suele conllevar una progresión de la enfermedad <sup>212,284,285</sup>. Una de las conclusiones a las que se ha llegado, es que las distintas citoquinas juegan diferentes papeles dependiendo del estado de la enfermedad en que sean administradas. Así por ejemplo, la IL10 administrada en los estados más tempranos de la enfermedad provoca un aumento de la fagocitosis y destrucción intracelular de las conidias, pero administrada en estados más tardíos no se observa dicha acción <sup>176</sup>.

Se ha estudiado la posibilidad de crear inmunidad protectora en pacientes que sufren Aspergilosis. Así, en estudios realizados sobre ratón, se ha demostrado que una inoculación subletal de conidias de *A. fumigatus* provoca un aumento de la resistencia a la infección letal en posteriores inoculaciones. A pesar de que el papel de los linfocitos T aparece como fundamental en este hecho, los mecanismos por los que se produce no están claros <sup>51</sup>. En cualquier caso se sabe que los linfocitos T activados reducen la capacidad de adherencia de *A. fumigatus* al epitelio del tracto respiratorio <sup>206</sup>.

En el caso del ABPA la respuesta frente a los antígenos de *Aspergillus* es mayoritariamente humoral, asociada con una elevada eosinofilia pulmonar y elevados niveles de IL-4 e IL-5, pero no de IFN- $\gamma$  <sup>169,193</sup>.

### c. Inmunosupresión y Aspergilosis

La Aspergilosis Invasora es una enfermedad tradicionalmente asociada a pacientes inmunosuprimidos. En los modelos animales de Aspergilosis Invasora pulmonar, para conseguir una infección más o menos homogénea y repetitiva, se necesita que los animales estén inmunosuprimidos y además los distintos patrones de infección e inflamación que ofrecen estos modelos dependen del tipo de inmunosupresión a la que se someta a los animales <sup>220,25</sup>.

A pesar de que existen estudios en los que fármacos inmunosupresores, como la Cortisona, son capaces de aumentar la actividad metabólica de hifas de *A. fumigatus*, y estimular su crecimiento, parece demostrado que los efectos de dichos fármacos se centran en las células y citoquinas del sistema inmune <sup>286</sup>.

Uno de los fármacos asociados a estados de inmunosupresión que pueden desencadenar AI, son los corticosteroides. Los mecanismos por los que actúan en la AI necesitan ser estudiados con detenimiento, aunque algunos de ellos son relativamente bien conocidos. Así por ejemplo se sabe que los macrófagos expuestos a concentraciones terapéuticas de glucocorticoides son capaces de ingerir conidias pero son incapaces de destruirla y evitar su germinación. Estudios basados en microscopía electrónica parecen demostrar

que los glucocorticoides dotan de una mayor estabilidad las membranas de los lisosomas, evitando la formación del fagolisosoma, aunque otro tipo de estudios no han podido confirmar tal mecanismo <sup>176</sup>.

En cuanto a los PMN, la Hidrocortisona y la Dexametasona suprimen la producción de radicales de oxígeno que estas células producen en presencia de hifas, opsonizadas o no <sup>287</sup>.

Otros fármacos como la ciclosporina A puede inducir una importante inmunosupresión en la actividad antifúngica de los fagocitos <sup>283</sup>, especialmente cuando se combina con los corticosteroides.

Los efectos de los fármacos inmunosupresores frente a los linfocitos Th2 no parecen tener efectos en el desarrollo de la enfermedad. Así, en ratones tratados con Ciclofosfamida, la respuesta de los Th2 es similar a los controles inmunocompetentes. Sin embargo en estos animales se constata una reducción en la destrucción tanto de las conidias como de las hifas, que no se sabe si atribuir al efecto directo o indirecto sobre las células T o a ambos.

Mención especial requieren los efectos inmunosupresores que el propio hongo es capaz de provocar mediante sustancias que él mismo produce y secreta al medio. Como ya hemos mencionado anteriormente, el hongo es capaz de secretar moléculas capaces de inhibir el movimiento de los cilios de la mucosa respiratoria. Las conidias son capaces de secretar moléculas de bajo peso molecular capaces de afectar a la fagocitosis y a la liberación de sustancias encargadas de destruirlas. Dichas sustancias también son capaces de reducir la capacidad de los macrófagos para migrar o inhibir ciertas citoquinas en la transcripción. Estas moléculas no han sido identificadas y aunque tienen efectos similares a la gliotoxina en la transcripción, no parece que esta toxina esté entre ellas <sup>176</sup>.

### 3.5. Diagnóstico

Buena parte del éxito en el tratamiento de la Aspergilosis Invasora pasa por establecer un diagnóstico temprano de la enfermedad que nos permita comenzar a tratar a los pacientes en fases tempranas de la misma <sup>355,71,247</sup>. Sin embargo, el diagnóstico de la AI resulta complicado debido a diversas causas. En primer lugar debemos tener en cuenta la diversidad de los pacientes susceptibles de sufrir AI y la multitud de cuadros clínicos simultáneos que estos presentan, pudiendo enmascarar los síntomas de la AI. En

segundo lugar, la AI es lo suficientemente poco común como para que pocos profesionales de la salud tengan suficiente experiencia como para realizar diagnósticos certeros y tempranos. A esto se suma la inexistencia de un método diagnóstico laboratorial suficientemente sensible y específico como para diagnosticar la enfermedad en fases tempranas que nos aseguren un éxito del tratamiento <sup>71</sup>. Actualmente existen varias técnicas que permiten, en ocasiones, realizar el diagnóstico preclínico de la Aspergilosis, tal y como ocurre en la criptococosis, pero no siempre este adelanto permite un tratamiento eficaz <sup>53</sup>.

#### a. Síntomas y signos clínicos

La sintomatología que presentan los pacientes que sufren de Aspergilosis Invasora es variable y poco específica, <sup>176</sup>, lo que imposibilita un diagnóstico a través de ellos. Inicialmente se considera que alrededor del 25-33% de los pacientes no presentan síntomas atribuibles a AI. Con la evolución de la enfermedad comienzan a aparecer síntomas de los que los más tempranos suelen ser tos (normalmente húmeda) y fiebre. La presencia de fiebre por encima de los 38'5° C, que no responde al tratamiento con antibióticos, en pacientes susceptibles de padecer esta enfermedad, ha sido utilizada como señal para iniciar el tratamiento con antifúngicos <sup>247</sup>. Sin embargo, en pacientes tratados con corticosteroides la fiebre no suele presentarse y otros síntomas, como el dolor de pecho, se ven mitigados <sup>176,71</sup>. La disnea suele presentarse más frecuentemente en pacientes con un patrón difuso de la enfermedad y en los neutropénicos suele darse simultáneamente a un dolor agudo en el pecho. En ocasiones se puede escuchar roce pleural en la auscultación. La hemoptisis es un rasgo relativamente raro en la Aspergilosis Invasora aguda <sup>71</sup>.

Las variaciones en los parámetros séricos son escasas y poco indicativas. No obstante resulta relativamente frecuente la hipocapnia y en pacientes con presentación difusa de la enfermedad la hipoxia <sup>71</sup>. Los recuentos de leucocitos suelen ser normales, así como la mayor parte de los parámetros séricos, aunque en ocasiones se hallan aumentos no específicos en la bilirrubina o en la lactato deshidrogenasa. Suele ser más frecuente el hallazgo de coagulopatías y en pacientes neutropénicos con leucemia aguda es típico el aumento del fibrinógeno <sup>71,46</sup>. Así mismo se encuentran elevados los niveles de proteína C-reactiva <sup>71</sup>.

## b. Signos radiológicos

Los signos radiológicos que caracterizan la Aspergilosis Invasora son muy heterogéneos. Así pueden variar de uno a varios nódulos que pueden estar cavitados o no <sup>176,71</sup>, lesiones en forma de cuña, cavidades rodeadas de una pared más o menos gruesa (más típicas de pacientes con SIDA) y zonas de consolidación alveolar que, con el tiempo, suelen confluir en pequeños nódulos <sup>71</sup>. En ocasiones se presentan grandes infiltrados generalizados, que suelen ser bilaterales <sup>176</sup>. En pacientes con neutropenia, la aparición de neumotórax espontáneos suele sugerir la presencia de una Aspergilosis Invasora o una Zigomicosis <sup>71</sup>.

En cualquier caso, el hallazgo de estos signos radiológicos en pacientes susceptibles de sufrir AI no sirve, en ningún caso, para establecer un diagnóstico definitivo, por lo que está recomendada la realización de otros estudios <sup>71</sup>.

En todo caso, la aparición de signos radiológicos suele suceder en estados muy avanzados de la enfermedad. A la hora de establecer un diagnóstico útil, es decir, temprano, resulta de mucha mayor utilidad la Tomografía Computerizada (TC), de mayor sensibilidad que la radiografía simple. En pacientes neutropénicos el signo más frecuente es el llamado “signo del halo”, que aparece en fases relativamente tempranas de la enfermedad y consiste en una imagen de pequeño nódulo radiodenso, con bordes rectos, rodeado de una zona más radiolúcida <sup>71</sup> y que se corresponde con una necrosis hemorrágica que rodea la lesión fúngica <sup>176,314,332</sup>. Con la evolución de la enfermedad el signo del halo pasa a ser el “signo de la medialuna”, debido a un aumento en la cantidad de aire periférico de la lesión provocado por una contracción del tejido infartado <sup>314</sup>. Normalmente se encuentran varias de estas lesiones en los pulmones de enfermos de AI, aunque también puede darse una sola. Con la progresión de la enfermedad el nódulo tiende a convertirse en una cavidad, con lo que la proporción de aire crece en la lesión. El signo del halo y esta evolución del mismo resultan altamente indicativos y característicos de AI, aunque hay que tener presente que también aparece en enfermedades pulmonares causadas por Mucorales o *Fusarium* <sup>71</sup>.

En formas no pulmonares de la enfermedad, la TC puede indicarnos la extensión de la enfermedad y si se ha producido la invasión de hueso. En pacientes con Aspergilosis Cerebral la TC ha sido utilizada junto a la Resonancia Magnética para su diagnóstico <sup>176</sup>. En el caso de la TC, existen estudios en los que se ha utilizado no sólo en el diagnóstico, sino también como método no invasivo de medir la evolución de la enfermedad y la respuesta a un tratamiento antifúngico <sup>361</sup>



Radiografía anteroposterior de un paciente con Aspergilosis Invasora pulmonar. Las flechas señalan los nódulos que forman el crecimiento del hongo. (www.aspergillus.man.ac.uk)



Tomografía computerizada del pulmón de un paciente con Aspergilosis Invasora pulmonar. (www.aspergillus.man.ac.uk)

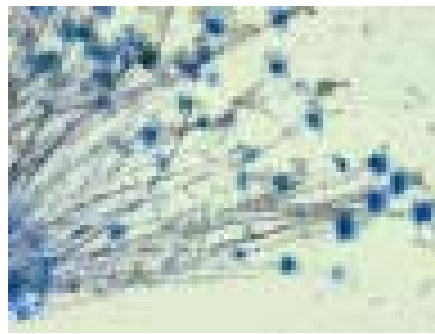
### c. Cultivo y microscopía

En pacientes que sufren Aspergilosis Invasora se aísla *Aspergillus* a partir de esputo entre un 8% y un 34% de los casos y entre un 45% y un 62% si se parte de lavado broncoalveolar (LBA) <sup>176,246,247</sup>. Los cultivos de esputo y LBA pueden ser también positivos en pacientes que sufran una colonización broncoalveolar, por lo que no es raro encontrarnos cultivos positivos en pacientes sanos <sup>246</sup>. Por el contrario, pacientes que sufren AI pueden presentar cultivos negativos <sup>71</sup> lo que no permite un diagnóstico fiable de la enfermedad utilizando esta técnica <sup>23</sup>. A pesar de ello, a la hora de valorar un cultivo positivo de *Aspergillus* hay que tener en cuenta el estado del paciente del que



procede, ya que, por ejemplo, en pacientes que sufren leucemia o trasplantados de médula ósea el valor predictivo positivo de AI de los cultivos del esputo y BAL es de entre un 80-90% <sup>314,246</sup> aunque en ocasiones estos cultivos positivos no se producen hasta fases avanzadas de la enfermedad <sup>247</sup>.

La combinación de los cultivos con el estudio microscópico de las muestras puede aumentar entre un 15% y un 20% el diagnóstico positivo respecto a los resultados sólo del cultivo. Las observaciones microscópicas tienen la ventaja de poder realizarse con gran rapidez, existiendo técnicas de tinción especiales para hongos (como por ejemplo calcoflúor) que facilitan las observaciones del hongo en muestras clínicas <sup>71</sup>.



Tinción de hifas de *A. fumigatus* a partir de Lavado Broncoalveolar en paciente que sufría AI. (www.aspergillus.man.ac.uk)

#### d. Detección de Anticuerpos y Antígenos

La detección de anticuerpos en sangre para el diagnóstico de la Aspergilosis Invasora resulta útil en el caso de pacientes no inmunosuprimidos, que suele ser el caso de animales como el perro, en el que es posible no sólo realizar el diagnóstico sino también el seguimiento de la enfermedad <sup>42,105</sup>, pero que resulta de muy baja utilidad en pacientes inmunosuprimidos, como suelen ser los humanos que sufren AI. No obstante, sí que se pueden hallar ciertos niveles de anticuerpos en pacientes inmunosuprimidos que sufren AI <sup>336,259</sup>. Si estos se hallan al inicio de la enfermedad suelen estar causados por la exposición al hongo previa a la enfermedad. Si se hallan al final suelen indicar la recuperación del individuo de su AI, por lo que podemos dar a estos datos un valor pronóstico, pero no diagnóstico <sup>46,176</sup>.

Sin embargo sí que se utilizan técnicas serológicas en busca de anticuerpos anti-*Aspergillus* en el diagnóstico de otras enfermedades provocadas por *Aspergillus*, como

el Aspergiloma o ABPA <sup>170,176</sup>.

En el caso de la AI resulta, pues, mucho más útil el hallazgo de componentes del hongo en sangre a la hora de diagnosticar la Aspergilosis Invasora en pacientes inmunosuprimidos.

A pesar de que la presencia de antígenos en suero de pacientes que sufren AI fue demostrada en 1979 <sup>268</sup>, el número de antígenos estudiados con fines diagnósticos es muy reducido <sup>176,133</sup>.

El primer antígeno detectado en animales que sufrían AI, infectados experimentalmente, fue el Galactomanano (GM) <sup>84</sup>. Este antígeno se aísla *in vitro* tanto a partir de la pared celular como del filtrado del medio donde se hace crecer *A. fumigatus* <sup>177,175</sup>. Suele aparecer como uno de los componentes de los preparados glicoproteicos obtenidos a partir de *A. fumigatus*, con más de 40 kDa <sup>175</sup> o en la fracción soluble en álcali de la pared de este hongo <sup>100,268</sup>. La capacidad antigénica de esta molécula habilita la posibilidad de ser detectada mediante métodos inmunológicos muy sensibles. Sin embargo, esta misma capacidad, junto con la ubicuidad de los *Aspergillus* en el ambiente y por lo tanto de una constante exposición a estos antígenos, hace que en el suero los antígenos suelen presentarse formando inmunocomplejos que deben ser disociados antes de proceder a la detección del GM <sup>319</sup>.

Los anticuerpos utilizados en las pruebas diagnósticas pueden ser tanto policlonales como monoclonales <sup>176</sup>; sin embargo, a la hora de estandarizar las condiciones en que se realizan las pruebas, conviene la utilización de anticuerpos monoclonales <sup>319</sup>. Utilizando este tipo de anticuerpo se han desarrollado dos métodos de detección de GM en suero de pacientes con fines diagnósticos.

El primer método, comercialmente disponible (Pastorex®), es una prueba de aglutinación en látex <sup>132,196</sup>, con un nivel de detección de 15 ng/ml de GM. El otro método, igualmente disponible comercialmente (Platelia Aspergillus®), está basado en un ELISA doble Sándwich con una sensibilidad en suero de 1 ng/ml y de 0'5 ng/ml en orina <sup>282,317,318</sup>; sin embargo esta mayor sensibilidad no permite una mejora en el diagnóstico ya que la detección de GM en orina resulta poco consistente y la aparición del antígeno resulta más tardía que en suero <sup>318</sup>. Por el contrario, la mayor sensibilidad del ELISA frente a la aglutinación en látex, sí que permite obtener positivos en pacientes infectados 2 o 3 semanas antes <sup>132,282,320,353</sup>, por lo que resulta mucho más adecuado para un diagnóstico más temprano, es decir, más útil, de la enfermedad. Sin

embargo este aumento de la sensibilidad de la prueba lleva asociado una disminución de la especificidad, es decir, una aparición de falsos positivos, individuos que no sufren la enfermedad pero que presentan un ELISA positivo. Así, en el caso de la aglutinación en látex el número de falsos positivos es prácticamente nulo, mientras en el ELISA varía de unos estudios a otros, presentando una media del 8% <sup>318</sup>.

Las causas de la aparición persistente de falsos positivos en los tests de GM no se conocen a fondo. Las explicaciones a este hecho pueden estar desde una reacción cruzada con algún componente del suero, o bien que la prueba es capaz de detectar infecciones subclínicas. Otra explicación es que componentes de hongos presentes en la ingesta podrían entrar en el torrente sanguíneo a través de pequeños daños en la mucosa intestinal <sup>200</sup> o bien el GM procedente de otros alimentos como los cereales <sup>183</sup>. También se han descrito falsos positivos en tratados con piperacillin-tazobactam <sup>360</sup>.

La disponibilidad comercial de estos métodos de detección de GM ha permitido la realización de multitud de estudios de diagnóstico (algunos de ellos comparando distintas técnicas de diagnóstico), tratamiento y evolución de la enfermedad tanto en modelos animales <sup>15,340 44</sup>, como en pacientes humanos <sup>22,38,72,101,130,146,215,247,254,345,350-352,375</sup>. En cuanto a los falsos negativos, se ha descrito que el tratamiento profiláctico de Anfotericina B puede suprimir la expresión de GM <sup>101</sup>.

El diagnóstico que se realiza mediante la detección por ELISA de GM puede ser mejorado si se realiza en muestras seriadas del mismo paciente <sup>200</sup>. En cualquier caso el hallazgo de GM en suero debe ser tenido en cuenta como un dato importante a la hora de manejar pacientes con alto riesgo de sufrir AI <sup>351</sup>.

No sólo ha sido el GM el antígeno buscado como indicador de infección por *Aspergillus*. Un ejemplo es la detección de antígenos en orina o en suero, mediante Western Blot con fines diagnósticos <sup>135,69,141</sup>, pronósticos <sup>253</sup> y de evolución de la enfermedad <sup>272</sup>, o la realización de distintas pruebas de ELISA en busca de distintos antígenos <sup>281,248,290</sup>. Estos intentos no han logrado una estandarización comparable a las pruebas de detección de GM, aunque en ocasiones estas pruebas de laboratorio logran buenos resultados diagnósticos <sup>60</sup>.

Otras proteínas solubles de *A. fumigatus* han sido detectadas mediante otras pruebas no inmunológicas, pero extraordinariamente sensibles. Uno de los primeros marcadores de infección buscados fue el D-Manitol en LAB mediante espectroscopia de masas o cromatografía de gas-líquido, utilizado en modelización animal, pero no como

diagnóstico<sup>101</sup>.

Sí se utiliza con valor diagnóstico la detección de  $\beta$ -D-(1-3)Glucano, un componente de la pared celular de *Aspergillus* y otros muchos hongos. Dicho diagnóstico está basado en la capacidad de esta sustancia para poner en marcha la vía de coagulación de los amebocitos *Limulus*. Estos amebocitos son las células sanguíneas presentes en la linfa de cangrejos de herradura, como el *Limulus polyphemus*. Los amebocitos poseen dos vías de formación de coágulo, una de ellas activada por toxinas bacterianas (que activan el factor C de la coagulación) y otra por (1-3)- $\beta$ -D-Glucano, presente en la pared celular de los hongos. El test de detección de (1-3)- $\beta$ -D-Glucano Fungitec®, utiliza esta última vía, que activa el factor G de la cascada de la coagulación de estas células y que, mediante una reacción en la que se utilizan diazo reactivos, finalmente consigue una reacción de color que puede ser medida por colorimetría<sup>237,217</sup>. La prueba, disponible comercialmente (Fungitec®) tiene una alta sensibilidad, del orden de picogramos por mililitro y ha sido utilizada en el diagnóstico de pacientes que sufren Aspergilosis u otras micosis<sup>218,236</sup>. El gran inconveniente de esta prueba es su escasa especificidad, provocada por su altísima sensibilidad así como su incapacidad de distinguir entre el  $\beta$ -D-Glucano presente en multitud de distintas especies de hongos. Además se han podido constatar algunos falsos positivos en enfermos que no sufren enfermedades fúngicas, como algunos dializados<sup>53,218</sup>.

El papel que el (1-3)-  $\beta$ -D-Glucano puede jugar en la patogenia de la AI no está claro aún, pero se sabe que los monocitos humanos poseen  $\beta$ -glucano receptores para que inicien la fagocitosis y que la presencia de la molécula soluble inhibe la fagocitosis. Es posible que la liberación de (1-3)-  $\beta$ -D-Glucano al medio por parte del hongo logre este mismo fin<sup>218</sup>.

#### e. Histopatología

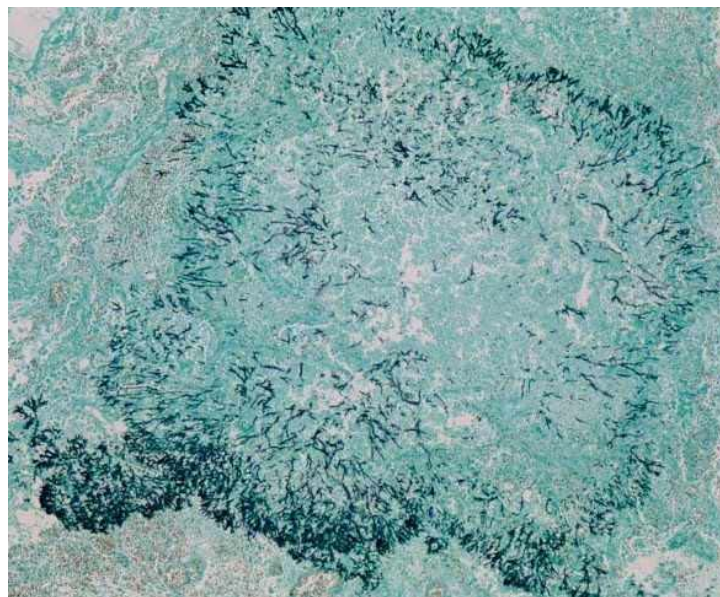
La información que proporciona el estudio Histopatológico resulta definitiva a la hora de diagnosticar una micosis invasora, ya que podremos observar las hifas invadiendo tejido. La imagen que presentan los hongos del género *Aspergillus* cuando crecen invadiendo tejido pulmonar es de hifas septadas que se ramifican en ángulos de 45°<sup>25,71</sup>; sin embargo existen otros hongos que presentan parecida morfología, tales como *Penicillium*, *Fusarium*<sup>63</sup>, *Paecilomyces*<sup>105</sup>, *Gymnascella*<sup>149</sup> o *Cylindrocarpon*<sup>150</sup>, por

lo que se hace necesario completar dicho diagnóstico con el aislamiento e identificación del hongo a partir del tejido infectado {Sabetta, Minitier, et al. 1985 ID: 85}.

El aspecto macroscópico de la lesión que suele presentarse en la AI es de uno o varios nódulos granulomatosos en distintas zonas del pulmón <sup>25,71</sup>. Microscópicamente aparecen amplias zonas de necrosis que contienen hifas, rodeadas de distintas células inflamatorias en capas concéntricas: neutrófilos, linfocitos, macrófagos, células gigantes y células plasmáticas. Debido a los distintos tipos de inmunosupresión a los que están sometidos los pacientes es posible que algunas de estas células no estén presentes en la lesión. Algunas lesiones antiguas pueden estar encapsuladas <sup>25,71,304</sup>.

Normalmente el diagnóstico histopatológico de la AI se realiza postmortem, ya que está contraindicado realizar una biopsia pulmonar en pacientes citopénicos <sup>200</sup>.

La tinción utilizada con el fin de facilitar la visualización de hongos creciendo en tejido es la Metamina plata o tinción de Grocott <sup>50,304</sup>. Esta tinción no es específica de *A. fumigatus*; sin embargo existen anticuerpos monoclonales que reconocen antígenos de *Aspergillus*, por lo que se pueden realizar tinciones inmunohistoquímicas más específicas <sup>15,96</sup>. Igualmente específicas resultan las técnicas de detección de *Aspergillus* in situ empleando técnicas de PCR que detectan el ADN del hongo directamente sobre los cortes histológicos, para lo que utilizan un buffer de hibridación semisólido en el que se desarrolla la PCR <sup>127,164</sup>.



Tinción de Grocott de un nódulo en una Aspergilosis Invasora Pulmonar. Se observan claramente las hifas

#### f. Detección de ADN

Debido a la dificultad en el diagnóstico de la AI pulmonar, la realización de PCR en busca del ADN del hongo causante de la enfermedad aparece como una alternativa de diagnóstico bastante atractiva <sup>346</sup>.

Los primeros estudios realizados al respecto se llevaron a cabo utilizando el Lavado Broncoalveolar (LBA) como fluido a partir del cual se quiere hallar el ADN del hongo <sup>19,214,310,39,325,214,352</sup>. El problema de la aplicación de esta técnica son tanto los falsos positivos como los falsos negativos. En el caso de estos últimos, puede utilizarse una PCR de competición, en la que unos marcadores internos nos indican, muestra a muestra, aquellas en las que la amplificación no está teniendo lugar <sup>39</sup>. Sin embargo resulta más frecuente la utilización de un marcador control positivo que se manipula en paralelo con las muestras indicando si ha habido amplificación <sup>176</sup>. El caso de los falsos positivos es más preocupante, debido a la presencia de hongos del género *Aspergillus* en el tracto respiratorio de manera natural. Así, más del 25% de los LBA procedentes de individuos sanos son positivos a PCR que detecta ADN de *Aspergillus*<sup>39</sup>. Hay, sin embargo, otras razones por las que una muestra de PCR puede resultar falso positivo; así en un estudio realizado por Loeffler *et al.* se pudo constatar gran cantidad de contaminaciones de muestras control, a pesar de las estrictas medidas para evitar la contaminación con conidias, debido a contaminaciones con ADN de hongos de los productos comerciales que se utilizan en la prueba de PCR <sup>185</sup>.

Ya hace tiempo que se comenzaron a realizar las primeras detecciones de ADN de *Aspergillus* en el suero de los pacientes <sup>159,214,38,89,338,375,344,376</sup> y en ocasiones también en orina <sup>265,134,214</sup> e incluso en líquido lagrimal <sup>152</sup>.

La utilización de sangre o suero permite eliminar los falsos positivos debidos a *Aspergillus* que colonizan sin causar enfermedad, como ocurría en las muestras de LBA. Por otro lado, la obtención de sangre de pacientes resulta mucho más sencilla que la obtención del LBA, que en pacientes en un avanzado estado de inmunosupresión resultaba una técnica demasiado comprometida para su vida. Además, la toma de muestras puede repetirse varias veces en el mismo paciente en cortos espacios de tiempo, lo que resulta imposible en el caso del LBA <sup>37,176,214</sup>.

La posibilidad de encontrar ADN de *Aspergillus* en suero es mayor que la de hallar hemocultivos positivos a *Aspergillus*, lo que abre una interrogante, ¿cómo se encuentra el ADN en la sangre?. Esto puede deberse a la mayor sensibilidad de la técnica PCR frente al cultivo <sup>37,214</sup>, aunque otra explicación parece estar en la posibilidad de que las

hifas que se liberen al torrente sanguíneo estén muertas y por tanto no puedan crecer en medios, mientras que sí podamos detectar el ADN <sup>38</sup>, sin embargo esta última teoría choca con la demostrada capacidad de diseminación del hongo.

La sensibilidad de las distintas técnicas de PCR, cuando el resultado se lee utilizando tinciones con bromuro de etidio, suele estar entre 1 y 50 pg de ADN en la mezcla de reacción <sup>214,265,310,325</sup>, pudiendo llegar a 50 fg si se realiza una Nested-PCR <sup>375</sup>. La Nested-PCR consiste en dos amplificaciones consecutivas de ADN. En la primera de ellas se utiliza una pareja de cebadores, llamados externos. El resultado de esta primera amplificación se utiliza como molde en la segunda, en la que se utiliza otra pareja de cebadores, internos, que amplifican una secuencia contenida en el segmento amplificado anteriormente, lo que permite este aumento tan considerable de la sensibilidad.

Así mismo la sensibilidad de la prueba puede verse aumentada hasta en diez veces en caso de realizarse la visualización de las bandas mediante una hibridación de Southern blot <sup>37</sup>. La especificidad de la PCR varía según la pareja de cebadores elegida. Así podemos encontrarnos que algunas de estas técnicas amplifican el ADN de la práctica totalidad de los hongos patógenos <sup>89</sup>, de todas las especies del género *Aspergillus* <sup>375,214</sup>, tan sólo de algunas especies del género *Aspergillus* <sup>39,265</sup> o bien únicamente de *Aspergillus fumigatus* <sup>310</sup>. Como ya hemos mencionado anteriormente, la invasión de tejidos pulmonares por parte de los hongos suele estar causada por aquellos pertenecientes al género *Aspergillus*; sin embargo una técnica demasiado específica deja de detectar otros hongos patógenos que pueden estar ocasionando la enfermedad. Por otro lado resulta de importancia conocer la especie de hongo que está provocando el problema, con el fin de evitar el tratamiento de hongos resistentes a ciertos fármacos; por ejemplo se han encontrado resistencias de varias cepas de *A. terreus* a la Anfotericina B <sup>321</sup>.

La solución a este problema se puede hallar en la realización de una PCR poco específica, seguida de alguna otra prueba como por ejemplo utilizando enzimas de restricción, que nos determine la especie de hongo que provoca la enfermedad <sup>344</sup>. Otra posibilidad es realizar una Nested-PCR en las que la primera amplificación nos señale la presencia del hongo, y la segunda indique la especie a la que pertenece <sup>152</sup>. Otro tipo de diagnóstico de AI está basado en la detección de ADN del hongo in-situ, es decir, mediante una PCR directamente sobre cortes histológicos, como ya hemos mencionado al final del apartado anterior correspondiente al Diagnóstico histopatológico de la AI <sup>127,164</sup>.

### 3.6. Epidemiología y profilaxis

Las conidias de *A. fumigatus* suelen tener un tamaño comprendido entre las 2 y 3 micras, por lo que tienden a permanecer suspendidas en el ambiente, permitiendo así que un ser humano pueda inhalar, varios cientos de ellas al día<sup>54, 117 144</sup>. La presencia de estas esporas en ambientes hospitalarios, donde pueden existir pacientes con riesgo de sufrir la enfermedad, resulta preocupante. Existen numerosos trabajos que asocian la aparición de brotes de Aspergilosis en hospitales con construcciones o reformas en el edificio<sup>65</sup>. A pesar de ello, Leenders et al. (1999) realizan un estudio en el que no encuentran relación entre los brotes de Aspergilosis producidos en su hospital con un aumento en el número de esporas en el ambiente el mismo. En este mismo estudio, y basándose en la secuencia de ADN de los hongos, demuestran que las cepas presentes en el ambiente del hospital, aisladas de manera persistente a lo largo de un año, no son las mismas aisladas de los pacientes durante los brotes de Aspergilosis en ese mismo año<sup>181</sup>. Esta misma observación ha sido realizada por otros autores, lo que sugiere la idea de una colonización de vías respiratorias en estos pacientes previa a la hospitalización<sup>225</sup>

Sin embargo, Chazalet *et al.* realizan un estudio en varios hospitales en el que el 40 % de las cepas aisladas a partir de pacientes presentan un genotipo igual a alguno de otra cepa presente en el ambiente de su hospital o bien en algún paciente del mismo. Este hallazgo les sirve para proponer un origen nosocomial de la enfermedad, máxime cuando, a pesar de haber logrado identificar gran cantidad de genotipos distintos en cada hospital, estiman no haber aislado más del 20% de las distintas cepas presentes en el ambiente hospitalario<sup>54</sup>. Dicho estudio afirma que en un ambiente confinado, como el de un hospital, la población de *A. fumigatus* es muy diversa, de modo que el 85% de las cepas con diferente patrón de ADN son aisladas una sola vez. En otros estudios se aíslan otras especies de *Aspergillus*, como *A. ustus*<sup>349</sup> o *A. Flavus*, que fue aislado del ambiente de un hospital en el que se dio un caso de AI causada por este mismo agente, llegándose a demostrar similitudes genéticas entre la cepa ambiental y la que está causando la patología<sup>81</sup>.

Las cepas aisladas varias veces (algunas de ellas de manera persistente), no lo son siempre de la misma zona del hospital, lo que impide un enfoque profiláctico que incluiría la búsqueda del nicho de origen de dichas conidias<sup>176</sup>. Sin embargo los aislados dentro de un mismo hospital presentan más similitudes genéticas entre ellos que con los aislados de distintos hospitales situados en otras zonas geográficas<sup>27</sup>.



Por otro lado parece que la mayor parte de los pacientes están infectados con una única cepa de *A. fumigatus*, aunque en ocasiones pueden aislarse dos o más <sup>54,70,279</sup> y que esta cepa no suele ser la misma entre unos pacientes y otros, ni aun en brotes <sup>54</sup>.

Estos estudios parecen demostrar el frecuente origen nosocomial de la AI <sup>54,70,176,321,343,349</sup>, una enfermedad que se transmite a través del aire, y que afecta de manera casi exclusiva, a un determinado número de pacientes de alto riesgo conocidos a priori. En estas condiciones, una de las medidas que parece elemental para prevenir la aparición de dicha enfermedad, es el control del aire que inspiran tales pacientes mediante su confinamiento en habitaciones especiales. Las condiciones que deben cumplir tales habitaciones han sido descritas por The Centers for Disease Control and Prevention (Atlanta, Ga.) <sup>71</sup>, que recomienda la utilización de habitaciones selladas en las que se realicen, al menos, 15 renovaciones completas del volumen de aire contenido en la habitación por hora, en las que el flujo de aire aferente sea filtrado a través de filtros de partículas de alta eficacia (filtro HEPA), capaces de eliminar más del 95% de partículas de 0'3 µm de diámetro. Además en estas habitaciones se debe mantener una presión mayor que la que exista en el pasillo y se debe utilizar un flujo de aire directo a la entrada.

La utilización de tales habitaciones en hospitales permite una reducción del número de conidias en el aire de la misma, a pesar de lo cual, pacientes internados en dichas habitaciones, siguen padeciendo AI, lo que hace suponer bien un mal funcionamiento del sistema o bien que existe una colonización pulmonar anterior a la hospitalización <sup>190</sup> <sup>176</sup>. Para realizar un completo control de las contaminaciones por *Aspergillus*, deberán tenerse en cuenta otros focos de contaminación distintos al aire, como por ejemplo el agua, y controlarlos para evitar contaminaciones <sup>16</sup>. En este caso podrían emplearse métodos como el tratamiento con ozono del agua, que ya han sido utilizados anteriormente para inactivar hongos aflatoxicogénicos <sup>28</sup>

Existen otras medidas para prevenir la aparición de AI en pacientes de alto riesgo como es la quimioprofilaxis, que consiste en la utilización de fármacos activos frente a *A. fumigatus* a bajas dosis. De cara al futuro debe tenerse en cuenta la posibilidad de conseguir una vacuna, basada en estudios que señalan la aparición de inmunidad adquirida en Aspergilosis mediada por macrófagos <sup>273</sup>

### 3.7. TRATAMIENTO

#### a. Tratamiento farmacológico:

Son muy pocos los antifúngicos que presentan actividad frente a *A. Fumigatus*. Entre ellos se encuentran los que se utilizan más frecuentemente, la Anfotericina B, y dentro de los azoles, el Itraconazol.

A pesar de ello hay que tener en cuenta que gran parte del éxito en el tratamiento de la AI con antifúngicos consiste en iniciar el mismo en la fase más temprana posible de la enfermedad, de ahí la necesidad de poseer un método diagnóstico temprano y eficaz, algo que hoy día no existe.

#### a.1. Anfotericina B

La Anfotericina B es un antibiótico poliénico producido naturalmente por *Streptomyces nodosus*, y que se ha utilizado como antifúngico desde su descubrimiento en 1955<sup>93</sup>.

Desde entonces y hasta hoy día, la Anfotericina B es el fármaco de referencia en el tratamiento de la Aspergilosis Invasora<sup>14</sup>.

El mecanismo de acción de la Anfotericina B no se conoce totalmente, aunque sabemos que se une a los esteroides (ergosterol en el caso de los hongos y colesterol en el caso de los mamíferos) presentes en la membrana, creando canales transmembrana que resultan en un aumento de la permeabilidad de los cationes monovalentes. Parece ser que la Anfotericina B se une con mayor afinidad al ergosterol que al colesterol, lo que permite una buena acción terapéutica aunque sin que desaparezca la acción tóxica. Pero este no es el único mecanismo de acción de la Anfotericina B, ya que inhibe las bombas de protones-ATPasa, lo que provoca una disminución en las reservas energéticas y fomenta la peroxidación de los lípidos, lo que provoca un incremento de la fragilidad de la membrana e induce la pérdida de  $\text{Ca}^{2+}$ <sup>176</sup>. Esta multiplicidad de mecanismos de acción es la principal causa de que la aparición de resistencias a la Anfotericina B sea prácticamente inexistente, así como de que posea un amplio espectro de actividad antifúngica, tanto frente a hongos miceliares como a levaduras<sup>227</sup>. Sin embargo sí que se han descrito casos de resistencias a este fármaco, sobre todo en varias cepas patógenas de algunas especies como *A. terreus*<sup>321,124</sup>.

La Anfotericina B presenta actividad muy similar tanto frente a conidias como frente a hifas de *A. fumigatus*, en ensayos realizados *in vitro*,<sup>202</sup>, lo que habilitaría su uso como profiláctico, evitando la germinación de las posibles esporas que penetrasen en el

pulmón de un paciente de riesgo; sin embargo no siempre se obtienen buenos resultados en este sentido <sup>321,367</sup>.

La administración de Anfotericina B a pacientes presenta algunos inconvenientes. Uno de los más graves fue su prácticamente nula solubilidad, resuelta con la salida al mercado de Fungizona®, en la que la Anfotericina B aparece mezclada con un detergente, el desoxicolato, en una proporción de 3:7.

Sin embargo, la Anfotericina B presenta una efectividad que podemos calificar de mediocre, si no se administra en periodos tempranos de la enfermedad. Así, estudios realizados sobre más de mil casos en pacientes tratados con Anfotericina B (AmB) revelan que la mortalidad es del 86% en pacientes que sufren la enfermedad pulmonar, 66% en los que sufren sinusitis Aspergilar y del 99% en la Aspergilosis cerebral <sup>176</sup>. Tal vez la explicación para ello es que, a pesar de que en los tests *in vitro* prácticamente todas las cepas de *Aspergillus* son sensibles a la Anfotericina B, la correlación entre estos estudios y la efectividad *in vivo* no es óptima <sup>155</sup>, por lo que es necesario buscar nuevos ensayos *in vitro* <sup>293</sup>.

Por otro lado, y debido a la falta de un diagnóstico temprano, se han utilizado estos fármacos como profilácticos en pacientes de riesgo, aunque no se han obtenido resultados satisfactorios <sup>32</sup>.

Sin embargo, el gran inconveniente del uso de la Anfotericina B en el tratamiento de pacientes que sufren enfermedades fúngicas es su elevada toxicidad <sup>368</sup>. Así, el problema más grave que suele provocar cuando es infundida a un paciente es la nefrotoxicidad, caracterizada por hipocalcemia e incremento de creatinina, aunque también puede provocar fiebre, escalofríos, náuseas y vómitos, así como problemas cardiocirculatorios (como puedan ser problemas en la regulación de la presión sanguínea y arritmias) <sup>227</sup>.

En general este efecto nefrotóxico se considera reversible, aunque hay que tener en cuenta que existen estudios clínicos que apuntan a que estos efectos son irreversibles a partir de una dosis acumulada de 4 gramos de Anfotericina B.

Con el fin de paliar estos efectos tóxicos, se han desarrollado dos líneas de investigación importantes. La primera de ellas utiliza preparaciones en aerosol de la Anfotericina B, de modo que pueda ser administrada directamente en el pulmón, evitando así su distribución orgánica y por lo tanto los efectos tóxicos que esta genera <sup>29</sup>. Los resultados obtenidos por este tipo de formulaciones en modelos de AI en rata fueron relativamente buenos, <sup>297</sup>, así como los resultados de farmacocinética <sup>165</sup>, sin embargo los resultados

en pacientes humanos como profilaxis de la infección no han sido tan buenos <sup>299</sup>.

La otra línea de investigación consiste en la realización de distintas formulaciones en las que la Anfotericina B aparece asociada a lípidos. Detallamos a continuación algunos de estas preparaciones:

La más conocida es la Anfotericina B liposomal (AmBisome®), en la que la Anfotericina B se halla unida de forma no covalente a los fosfolípidos de la única bicapa que forma dichos liposomas. Estas estructuras liposomales son estables en plasma y su eliminación renal es menor que la de la Anfotericina B desoxicolato, lo que contribuye a una disminución en la toxicidad <sup>148,227</sup>. Sin embargo la eficacia de esta formulación ha sido puesta en entredicho en algunos estudios <sup>98,188</sup>. La explicación para esta falta de actividad podría estar en la facilidad que encuentran las células del Sistema Retículo Endotelial (SRE) para fagocitar los liposomas, eliminándolos así del organismo e impidiendo la acción de la Anfotericina B. Con el fin de evitarlo, se han dispuesto otros preparados, como el que une a la superficie del liposoma con polietilenglicol, logrando así una disminución de la toxicidad y un mayor tiempo de permanencia del fármaco en sangre que se traduce en una mejora en su eficacia <sup>341</sup>. Un paso más en este sentido utiliza esta forma liposomal de la Anfotericina B unida a polietilenglicol asociada a un anticuerpo monoclonal (34A) que reconoce las proteínas que se expresan en la superficie luminal de las células presentes en los capilares pulmonares del ratón, impidiendo así su captura por parte de las células del SRE. Los resultados terapéuticos obtenidos en modelos de AI pulmonar en ratón por esta molécula, así como la reducción de la toxicidad de la misma, son excelentes <sup>241</sup>; sin embargo existen estudios que muestran la aparición de nefrotoxicidad a altas dosis <sup>8</sup>.

La Anfotericina B liposomal ha sido también utilizada como aerosol, de manera que el fármaco únicamente se localiza en el pulmón, obteniéndose vidas medias del fármaco en este órgano de días. De este modo se minimizarían los efectos tóxicos y se optimizaría el tiempo de protección de la Anfotericina B en infecciones fúngicas pulmonares <sup>172</sup>.

Otra de estas preparaciones lipídicas es la Anfotericina B en Dispersión Coloidal (Amphotec® y Amphocil®). En este caso la Anfotericina B se une de manera no covalente al colesteril sulfato sódico en un ratio cercano al 1:1 molar. El resultado de esta unión son unas partículas en forma de disco de unos 115 nm de diámetro por 4 nm de grosor <sup>370</sup>, que han sido utilizadas con éxito <sup>370</sup> en pacientes trasplantados de médula ósea que sufrían infecciones fúngicas <sup>233</sup>. La respuesta terapéutica en la Aspergilosis

Sistémica o Diseminada es de un 48.8%, sin que se hayan observado efectos nefrotóxicos <sup>139,122</sup>.

Un tercer tipo de asociación entre la Anfotericina B y lípidos en busca de una menor toxicidad es aquella en la que el fármaco forma un complejo lipídico en un ratio de 1:1 molar, con dos lípidos, la dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) y el dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG), que están presentes en un ratio de 7:3 molar entre ellos (Abelcet<sup>®</sup>). La Anfotericina B unida a estos lípidos se une preferentemente a las membranas de las células fúngicas frente a las membranas de células de mamífero, lo que explicaría su menor toxicidad y mayor actividad, demostradas ambas en pacientes humanos que sufrían Aspergilosis y otras enfermedades fúngicas <sup>359</sup>. Los resultados obtenidos en pacientes humanos confirman menor toxicidad y mayor eficacia terapéutica que la AmB desoxicolato <sup>12</sup>. Este complejo lipídico de Anfotericina B en aerosol ha sido utilizada en el tratamiento de ratas en un modelo de Aspergilosis pulmonar, obteniendo mejores resultados que la Anfotericina B desoxicolato también en aerosol <sup>61</sup>.

Existen otros preparados con Anfotericina B y lípidos, como AnfotericinaB /Colesterol Sulfato, utilizada con relativo éxito en el tratamiento de Aspergilosis en conejo <sup>252</sup>.

Últimamente ha aparecido otra presentación de la Anfotericina B que trata de mantener sus virtudes minimizando sus efectos adversos. Se trata de la conjugación con arabinogalactano <sup>86,87,94</sup>, que ha dado buenos resultados en Leishmaniasis <sup>116</sup> y que está siendo utilizada en modelos de Aspergilosis Invasora <sup>95</sup>

## b.2. Azoles

El mecanismo de acción de los azoles consiste en inhibir el paso de la demetilación en el proceso de formación de la membrana celular de los hongos, mediante la competencia que el nitrógeno libre del azol hace con el átomo de hierro de las enzimas del citocromo P-450 por el oxígeno <sup>255</sup>. La inhibición que se produce de la enzima 14 $\alpha$ -demetilasa del citocromo p-450, inhibe la síntesis del ergosterol, que es el esteroles más importante presente en las membranas fúngicas.

Los azoles presentan actividad muy similar tanto frente a conidias como frente a hifas de *A. fumigatus*, en ensayos realizados *in vitro* <sup>202,363</sup>.

Los agentes más antiguos dentro de este grupo, miconazol y ketoconazol, no se utilizan de manera rutinaria en el tratamiento de la Aspergilosis Invasora debido a su escasa eficacia y su elevada toxicidad.

El Fluconazol es, posiblemente, el azol más utilizado hoy día, principalmente en el tratamiento de las candidiasis provocadas por *C. albicans*. Al contrario que los dos anteriores, el Fluconazol es altamente soluble en agua, pudiéndose administrar oral e intravenosamente, y además provoca escasos efectos secundarios. Sin embargo, su eficacia en la Aspergilosis Invasora es muy escasa, no siendo utilizado en el tratamiento ni en la profilaxis de esta enfermedad<sup>255</sup>, a pesar de que obtuvo resultados alentadores en su aplicación como profiláctico de la AI en modelos animales en conejo<sup>250 251</sup>, e incluso, en combinación con Anfotericina B en humanos<sup>48</sup>.

Entre los azoles comercializados actualmente, uno de los más activos frente a *A. fumigatus* es el Itraconazol, siendo utilizado tanto en tratamiento de AI<sup>255</sup> como en su prevención<sup>221,369</sup> así como en el tratamiento de ABPA<sup>315</sup>. Los tests de sensibilidad *in vitro* del Itraconazol demuestran una concentración mínima inhibitoria de 1 µg/ml, sin embargo su administración *in vivo* presenta varios inconvenientes. En primer lugar la vía de administración del Itraconazol ha venido siendo oral, debido a que no se disponía de un preparado intravenoso comercial, lo que suponía un grave inconveniente en pacientes con dificultades en la deglución<sup>71,176,56</sup>. La dificultad para obtener un preparado de Itraconazol para administración intravenosa está relacionada con su escasa solubilidad en agua. Sin embargo sí se han realizado estudios en animales en los que el Itraconazol era utilizado en tratamiento intravenoso mediante su previa solubilización en solventes tales como el hidroxipropil-β-ciclodextrina<sup>216</sup>. Actualmente existe un preparado intravenoso disponible comercialmente<sup>314</sup>. En segundo lugar, la absorción del Itraconazol es muy variable y depende del paciente así como de si se toma asociado o no a comidas<sup>255</sup>; así, el preparado en cápsulas debe ser administrado asociado a la ingesta, pero la formulación líquida no<sup>71</sup>. Esto obliga a una monitorización de los niveles séricos de Itraconazol en los pacientes tratados con el fin de conocer su eficacia. La absorción de Itraconazol está, pues, muy reducida en pacientes con problemas gastrointestinales, así como en pacientes con SIDA<sup>71</sup>. En tercer lugar, se ha descrito la aparición de cepas de *A. fumigatus* resistentes al Itraconazol<sup>201,67</sup>. En cuarto lugar, la administración simultánea de Itraconazol con otros fármacos es problemática, como por ejemplo inhibidores de proteasa o antihistamínicos<sup>71</sup> o inductores del citocromo P-450<sup>56,176</sup>. Por último cabe destacar la dificultad de establecer un test que correlacione de manera fiable la eficacia del Itraconazol *in vitro* frente a una determinada cepa con su eficacia en el tratamiento de la enfermedad<sup>78</sup>. No se han obtenido buenos resultados utilizando el Itraconazol como tratamiento profiláctico en infecciones fúngicas<sup>210,339</sup>.

El hidroxitraconazol es un metabolito activo del Itraconazol y presenta actividad antifúngica muy similar a éste <sup>56,176</sup>.

En muchas ocasiones se han realizado tratamientos utilizando combinaciones de fármacos frente a la Aspergilosis, sin embargo no se ha obtenido una combinación y una pauta de la que obtengan ventajas evidentes <sup>111</sup>.

### a.3. Otros Antifúngicos

El tratamiento de las Aspergilosis viene siendo hoy día un problema, por lo que se han probado tanto otros fármacos antifúngicos como otras dianas antifúngicas <sup>13</sup>.

Así, se ha investigado la acción antifúngica de varios azoles, como el Voriconazol <sup>138</sup>, que presenta la ventaja, frente al Itraconazol, de su buena penetración en el SNC <sup>350,328</sup>, aunque recientemente se han descrito reacciones adversas <sup>36</sup> y su combinación con Anfotericina B no parece haber dado los mismos buenos resultados que en candidiasis <sup>52,59</sup> el SCH 56592 (Posaconazol) <sup>114,137,120</sup>, el BMS-207147 (Ravuconazol). Otros antifúngicos como el NND-502 <sup>231</sup>, así como un preparado lipídico de la Nistatina (Nyotran®) <sup>93,235,356</sup> y algunos derivados de la Equinocandina <sup>20,114,125</sup>, Neumocandinas <sup>168</sup>, Pradimicinas y Benanomicinas, Nikomicinas, Alilaminas y Triocarbamatos, Sordarinas <sup>110</sup> y Péptidos Catiónicos <sup>13</sup>. Muchos de ellos presentan actividad frente a especies de *Aspergillus* <sup>314,202,249</sup> y frente a otros hongos patógenos <sup>10,21,114,194,257,258,358</sup>.

### b. Tratamiento quirúrgico

Debemos tener en cuenta que la mayor parte de los pacientes que sufren una AI tienen un estado de inmunosupresión y/o bien sufren una enfermedad primaria que complica su tratamiento quirúrgico, por lo tanto es el clínico el que debe evaluar la posibilidad de realizar tal intervención. Teniendo esto en cuenta, el tratamiento quirúrgico de la Aspergilosis Invasora está indicado en caso de existir una lesión localizada que no remite con el tratamiento antifúngico <sup>26,123,372</sup>. Otro factor importante a la hora de tomar la decisión de intervenir es la localización de la lesión fúngica; así por ejemplo la intervención debe realizarse de emergencia cuando la lesión aspergilar se halla próxima a una arteria pulmonar, con el fin de evitar una hemoptisis masiva, que como hemos indicado anteriormente, suele causar la muerte en algunos pacientes de AI <sup>26</sup> o para evitar daños encefálicos irreversibles <sup>278</sup>.

En ocasiones, una terapia mixta, quirúrgica y medicamentosa, da buenos resultados <sup>18</sup>  
377 .

### c. Inmunoterapia

Debido a la escasa efectividad de los tratamientos de la AI, se han venido desarrollando estudios en los que se utilizan sustancias moduladoras del sistema inmune como ayuda al tratamiento tradicional con antifúngicos. El principal objetivo de tales tratamientos consiste en aumentar el número de células fagocíticas y/o permitir que realicen su función correctamente <sup>176</sup>. Así se han realizado estudios en los que distintas citoquinas incrementan la producción de neutrófilos y algunas de ellas logran modular su actividad biológica <sup>212,280,284,285</sup>, sirviendo así de ayuda al tradicional tratamiento antifúngico <sup>119</sup>





## **B. MATERIALES Y MÉTODOS**



## **1. PLAN GENERAL DE TRABAJO**

Uno de los grandes problemas por resolver en el estudio de las Aspergilosis consiste en conocer de qué manera crece el hongo cuando invade tejidos y si las proteínas expresadas son las mismas que cuando crece “in vitro”. Para ello nos propusimos comparar distintos perfiles de extractos antigénicos de la cepa *A. fumigatus* 48238E (aislada a partir de una persona que sufría Aspergilosis Invasora y que forma parte de la colección de cultivos de GlaxoWellcome), de manera que pudiéramos conocer si el medio en que crece el hongo determina, de alguna forma, la expresión de distintas proteínas. Para ello inicialmente se deberían obtener antígenos de dicha cepa a partir tanto del micelio como de filtrado de cultivo, utilizando diferentes medios de cultivo. Con los extractos antigénicos así obtenidos se realizarían geles de poliacrilamida con el fin de estudiar las posibles diferencias en el perfil proteico de una misma cepa crecida en función de los distintos medios utilizados. Con este mismo objetivo, se intentaría la obtención de suero hiperinmune, inyectando el antígeno obtenido a algunos animales. Con estos sueros se podrían llevar a cabo análisis mediante ELISA en unas placas tapizadas con los diferentes antígenos obtenidos, con el fin de comprobar la reactividad del suero frente a los distintos extractos antigénicos.

Este estudio se completaría con el desarrollo de una técnica de Western-Blott para comprobar las fracciones antigénicas concretas a las que se unían los anticuerpos presentes en el suero hiperinmune de conejo.

A continuación nos proponemos hacer crecer esta misma cepa en un medio celular que contenga pneumocitos, y por tanto, con una mayor semejanza a lo que sucede “in vivo” que cuando utilizamos un medio de cultivo sintético. De esta forma se podría evaluar si la morfología del hongo es similar o no cuando crece en un medio sintético o en presencia de células.

Uno de los pasos claves a la hora de comprobar el efecto antifúngico de distintas sustancias es la capacidad de protección que tales sustancias proporcionan a animales infectados de manera experimental. En nuestro trabajo nos proponemos poner a punto un modelo de Aspergilosis Invasora pulmonar en ratón con el fin de evaluar tales productos. Para ello utilizaremos distintos protocolos variando tanto el método de inoculación, como la pauta de inmunosupresión, tamaño del inóculo, etc.

No obstante, no debemos olvidar que el seguimiento de la evaluación de la infección por *Aspergillus* que se puede llevar a cabo en los ratones resulta limitada debido al reducido tamaño de estos animales, por lo que consideramos la posibilidad de poner a punto un modelo de infección en rata que mimetice la evolución de la enfermedad en humanos. Con ello pretendemos conseguir una infección que no deteriore el estado del animal de forma drástica, de manera que permita unos periodos de supervivencia prolongados de animales infectados. Con ello perseguimos un doble objetivo; por un lado obtener un modelo parecido al que se da en humanos y por otro poder evaluar el efecto de algunos antifúngicos de manera más efectiva. Es por ello que intentaremos realizar dos aproximaciones, una de ellas con el modelo de infección intratraqueal, ya descrito y otra, más novedosa, mediante un modelo de infección transtorácica con el fin de restringir la infección a parte de uno de los pulmones, buscando así un menor deterioro de los animales.

Por último, y utilizando las muestras obtenidas de animales usados en estos modelos, realizaremos diferentes pruebas diagnósticas, como pueden ser cultivos microbiológicos, pruebas de detección de antígenos y ADN, diagnóstico por imagen, histopatología. Para ello dispondremos tanto de una población de animales infectados como de otra de animales control, no infectados. Todo ello irá encaminado, por un lado, a conocer si estas técnicas son útiles para realizar un seguimiento completo de la enfermedad en esos modelos, y por otro y quizás más importante, su posible aplicación diagnóstica, uno de los grandes retos pendientes en la Aspergilosis Invasora.

## **2. MATERIAL GENERAL DE LABORATORIO**

En el curso de nuestro trabajo utilizamos material considerado de uso habitual en un laboratorio de microbiología, al que nos iremos refiriendo a lo largo del desarrollo del capítulo de Métodos. En este apartado podríamos citar: Matraces de diferente tamaño, tubos de ensayo de diferente tamaño, guantes de látex, probetas de diferentes tamaños, embudos de porcelana y de vidrio, papeles de filtro, y un largo etcétera. Como material un poco más específico podíamos citar:

- Micropipetas monocanal de diversa calibración 200-1000  $\mu$ l, 50-200 $\mu$ l, 5-50  $\mu$ l y 0,5-10 y multicanal de 20-200  $\mu$ l (Gilson, Middleton, USA).
- Cabinas de bioseguridad: Tipo Bio-I o de flujo laminar (Telstar; Tarrasa, Barcelona) Tipo Bio-II (Telstar; Tarrasa, Barcelona)
- Microscopio Vanox AHTB-3 (Olympus; Tokio, Japón).
- Pipeteador para pipetas Powerpette (Jencons; Leighton Buzzard, Reino Unido).
- Centrífuga modelo Avanti 30 (Beckman, Fullerton CA, USA), con diversos rotores.
- Sonicador de disrupción de células por ultrasonidos modelo 450 (Branson Sonifer Connecticut, USA).
- Liofilizador Flexi-Dry (FTS-Systems; New York, USA)
- Agitador orbital (LAB-LINE Instruments; Melrose Park, USA).

## **3. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS ANTIGENICOS DE *Aspergillus fumigatus***

### **3.1. Medios de cultivo**

Los medios de cultivo utilizados en este trabajo durante el proceso de extracción de antígenos fúngicos fueron los siguientes:

- Agar Patata Dextrosa (Oxoid; Basingstoke, Reino Unido).
- Caldo de Czapek Dox + glucosa al 1% (Difco; Detroit, USA)
- Caldo de Sabouraud Dextrosa (Oxoid; Basingstoke, Reino Unido).
- RPMI-1640 Para cultivo celular (Bio-Whittaker; Walkersville, Maryland, USA)
- Medio Mínimo con glucosa, cuya composición es:

Glucosa (Difco; Detroit, USA).....	20 g
Base de nitrógeno para levaduras (Difco; Detroit, USA).....	10 g
Agua Destilada .....	1 L

### 3.2. Soluciones, tampones y reactivos

- Fosfato Buffer Salino (P.B.S.) 10x (solución de almacenamiento):

NaH <sub>2</sub> PO <sub>2</sub> (Sigma, St. Louis, USA).....	2'56 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -2H <sub>2</sub> O (Sigma, St. Louis, USA).....	11'94 g
Agua destilada .....	500 ml

A esta mezcla se añaden 87'6 g de NaCl y se enrasa a 1 litro con agua destilada. Ajustar el pH a 7'2 con NaOH o bien HCl<sub>2</sub>

Esta solución puede ser conservada a 4°C durante 6 meses.

- P.B.S. Solución de trabajo: diluir 1:10 en agua destilada la solución de almacenamiento, PBS 10X

- Solución salina con tween.

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -2H <sub>2</sub> O (Sigma, St. Louis, USA) .....	1'79 g
NaCl (Sigma, St. Louis, USA) .....	9 g
Polisorbato 20 (Tween 20) (Sigma, St. Louis, USA) .....	0'5 ml
Agua destilada .....	1 L

### 3.3. Cepa fúngica

*Aspergillus fumigatus* 48238E, aislada a partir de una persona afectada de Aspergilosis Invasora y obtenida a partir de la colección de cultivos de GlaxoWellcome, (Greenford, GlaxoWellcome Laboratories, Reino Unido)

### 3.4. Obtención de extracto antigénico miceliar

Sembrábamos el hongo miceliar en Agar Patata Dextrosa en pico de flauta, incubando a 37° C hasta que se producía abundante esporulación, lo que solía suceder en 4-5 días. Al cabo de este tiempo, añadíamos al tubo 3 ml de PBS con Tween 20 al 0'05% y

agitábamos hasta obtener una densa suspensión de esporas. De esta suspensión tomábamos 1 ml, con el que inoculábamos un matraz de medio Caldo de CZAPEK Dox- 1% glucosa que incubábamos a 37°C durante 4 días manteniendo en agitación a 150 rpm.

El primer paso tras la incubación es la inactivación del cultivo con formol al 0'5%, agitándose ligeramente y dejando reposar unos minutos con objeto de que el formol actúe.

A continuación se procedía a la filtración del cultivo, para lo que utilizábamos un papel de filtro colocado sobre un embudo de porcelana que colocábamos a su vez sobre un matraz aforado. Procedíamos a verter el contenido del matraz sobre el embudo, aplicando vacío con ayuda de una bomba conectada al matraz aforado.

Una vez filtrado todo el líquido, el micelio obtenido en el papel de filtro se lavaba 3 veces con PBS. A continuación, lo secábamos con ayuda de un papel de filtro, lo envolvíamos en papel de aluminio y lo congelábamos a -80°C durante 16 horas. En estas condiciones procedíamos a homogeneizar el micelio con la ayuda de un mortero que colocábamos en nieve carbónica para impedir la descongelación del micelio durante el macerado. Terminado este proceso añadíamos 10 ml de PBS sobre el macerado con objeto de facilitar su recogida completa. Posteriormente con el fin de lograr una mayor ruptura de las paredes del hongo procedíamos a sonicar el macerado bajo las siguientes condiciones:

- \* Frecuencia (Ciclos por segundo): 20.
- \* Tiempo (minutos): 4-5.
- \* Potencia (mV): 5.

Al cabo de este tiempo se comprobaba que la textura del producto obtenido era homogénea. En este punto se realizaba una preparación microscópica con el material sonificado teñido con azul de metileno. La visualización de al menos el 80% de rotura de hifas aseguraba la efectividad del proceso.

El material sonificado era entonces centrifugando bajo las siguientes condiciones:

- Velocidad de giro: 11.950 g (10.000 rpm).
- Tiempo: 30 minutos.
- Temperatura: 4°C.

Tras la centrifugación recogíamos el sobrenadante, en el que se hallan las proteínas en forma de solución, y lo filtrábamos a través de un filtro de acetato de celulosa con un tamaño de poro de 0'45  $\mu\text{m}$ , con el fin de eliminar posibles restos macroscópicos, y a continuación por otro filtro de acetato de celulosa de 0'22  $\mu\text{m}$ , con el fin de esterilizar el extracto. Este sobrenadante filtrado se introducía en un tubo de diálisis con un tamaño de exclusión molecular de 12 kDa, que se cerraba y se introducía en un recipiente con 2 litros



de agua destilada, manteniéndose a temperatura de refrigeración y en agitación durante 24 horas, cambiando el agua del recipiente a las 6 y 12 horas.

El extracto antigénico del tubo de diálisis era filtrado de nuevo a través de un filtro de acetato de celulosa de 0'22  $\mu\text{m}$ , introduciéndolo posteriormente en un kit de ultrafiltración de alto caudal con un tamaño de exclusión molecular de 10 kDa (Ultrafree-0.5 UFV5 BGC 25, Millipore, Bedford, Massachusetts, USA).

Este kit se colocaba en el interior de un tubo de centrifuga para proceder a la centrifugación en las siguientes condiciones:

- Tiempo: 50 minutos.
- Velocidad de giro: 3.000 g.
- Temperatura: 4°C.

Posteriormente, se recogía el extracto que quedaba atrapado en el interior de la membrana de ultrafiltración, y se pasaba a un tubo eppendorf. Este resultaba ser el extracto antigénico miceliar, que se congelaba a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante 16 horas, tras las que era liofilizado y conservado en refrigeración. Antes de ser utilizado el liofilizado era rehidratado con agua destilada estéril. Una vez recompuesto el extracto podía ser almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **3.5. Obtencion de extracto antigénico del filtrado de cultivo**

El cultivo del hongo se realizó de la misma forma que hemos expuesto anteriormente para la obtención del micelio, salvo que en este caso las condiciones de incubación fueron  $37^{\circ}\text{C}$  durante 21 días, en cultivo estático.

Tras la inactivación del cultivo con formol al 0'5%, filtrábamos de la misma forma indicada anteriormente para la obtención del extracto miceliar, desechando en esta ocasión el micelio y utilizando el filtrado del medio de cultivo. Con el fin de evitar la posible presencia de pequeñas cantidades de micelio, este filtrado se pasaba a través de un filtro de acetato de celulosa de 0'45  $\mu\text{m}$ . Posteriormente realizábamos un proceso de diálisis en las mismas condiciones indicadas anteriormente para el extracto antigénico miceliar.

Tras la diálisis, el líquido era filtrado a través de un filtro de acetato de celulosa de 0'22  $\mu\text{m}$ , y posteriormente centrifugado en el kit que contiene la membrana de ultrafiltración de alto caudal, en las mismas condiciones que se han indicado anteriormente. El extracto que quedaba dentro del kit es el denominado extracto antigénico del filtrado de cultivo, que se

congelaba a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante 16 horas, tras las que era liofilizado y conservado en refrigeración. Antes de ser utilizado, el liofilizado era rehidratado con agua destilada estéril. Una vez recompuesto el extracto podía ser almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### **4. DETERMINACION DEL CONTENIDO PROTEICO DE LOS EXTRACTOS ANTIGÉNICOS**

##### **4.1. Material**

- Patrón para realizar la curva tipo en la determinación de proteínas: Solución de albúmina sérica bovina a  $1.4\text{ mg/ml}$  (BioRad; Hercules, USA).
- Reactivo Dye concentrado (Bio-Rad; Hercules, USA).
- P.B.S. Solución de trabajo.

##### **4.2. Instrumento**

- Espectrofotómetro modelo 150-20 (Hitachi; Tokio, Japón).

##### **4.3. Metodología**

Para la determinación de proteínas empleábamos un método espectrofotométrico que sigue la sistemática del método de Bradford {Bradford 1900 ID: 510}.

En tubos de plástico estériles realizábamos la dilución en PBS, utilizado como blanco, de los correspondientes extractos antigénicos y del patrón. En todos los casos obteníamos un volumen final de  $100\ \mu\text{l}$ . A cada uno de los tubos le añadíamos  $3\text{ ml}$  de reactivo de Dye diluido al 1:5 en PBS. La lectura la realizábamos tras 30 minutos de reposo de la mezcla.

Como sustancia patrón utilizábamos una solución de albúmina sérica bovina (BSA), con una concentración inicial de  $1.4\text{ mg/ml}$ , de la cual realizábamos 4 diluciones sucesivas 1:1, obteniendo por tanto los siguientes valores patrón:  $1.4$ ,  $0.7$ ,  $0.35$ ,  $0.175$  y  $0.00875\text{ mg/ml}$ . Con estos valores se podía calcular la curva patrón.

Para el caso de nuestros extractos antigénicos realizábamos al menos dos diluciones 1:1.

Para la medida en el espectrofotómetro se fijaron las siguientes características:

- \* Longitud de Onda:  $595\text{ nm}$ .
- \* Tipo de Respuesta: Medium.
- \* Modo: Absorbancia.

Una vez cumplidos los 30 minutos para la lectura, realizábamos el calibrado del espectrofotómetro con los blancos. A continuación introducíamos los patrones y las muestras, efectuando su medida.

Con los resultados obtenidos con el patrón de BSA, confeccionábamos una curva patrón, y a continuación extrapolábamos los valores de absorbancia obtenidos en los extractos antigénicos, haciendo así la medida de la concentración de proteínas.

## **5. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA-DUODECILSULFATO SÓDICO (SDS-PAGE)**

### **5.1. Material**

- Patrón de peso molecular LMW (BioRad, Hercules, USA). Este marcador incorpora las siguientes proteínas:

Fosforilasa B.....	112.000 Da.
Albúmina Sérica Bovina.....	84.000 Da.
Ovoalbúmina .....	53.200 Da.
Anhidrasa carbónica .....	34.900 Da.
Inhibidor de la Tripsina de Soja .....	28.700 Da.
Lisozima .....	20.500 Da..

- Solución de acrilamida/bis (30% T, 2'67% C).

Acrilamida/bis (Bio-Rad; Hercules, USA) .....	87'6 g
N'N'-bis-metilen-acrilamida (Bio-Rad; Hercules, USA) .....	2'4 g
Agua destilada .....	300 ml

Filtrar y conservar a 4° C en oscuridad 30 días como máximo.

- 1'5 M Tris-HCl, pH 8'8.

Tris base (Sigma, St. Louis, USA) .....	27'23 g
Agua destilada .....	80 ml

Ajustar el pH a 8'8 con HCl concentrado y rellenar hasta 100 ml con agua destilada. Almacenar a 4° C.

- 0'5 M Tris-HCl pH=6'8.

Tris base (Sigma, St. Louis, USA).....6 g  
 Agua destilada..... 60 ml  
 Ajustar el pH a 6'8 con HCl concentrado y rellenar hasta 100 ml con agua destilada. Almacenar a 4° C.

- SDS 10 %.

Duodecilsulfato sódico (Sigma, St. Louis, USA).....10 g  
 Agua destilada..... 100 ml

Calentar para solubilizar. Almacenar a temperatura ambiente.

- Azul de bromofenol 0'05%.

Azul de bromofenol (Bio-Rad; Hercules, USA) ..... 0'05 g  
 Agua destilada..... 100 ml

- 5 x Running Buffer pH=8'3.

Tris base (Sigma, St. Louis, USA).....9 g  
 Glicina (Sigma, St. Louis, USA)..... 43'2 g  
 Duodecilsulfato sódico (Sigma, St. Louis, USA).....3 g  
 Agua destilada..... 600 ml

Almacenar a 4°C. Calentar a 37°C antes de usar si hay precipitado.

- Running Buffer para 2 geles (preparar en el momento).

5x Running Buffer ..... 120 ml  
 Agua destilada..... 480 ml

- Sample Buffer.

Agua destilada..... 4 ml  
 0'5M Tris-HCl pH 6'8..... 1 ml  
 Glicerol (Sigma, St. Louis, USA) ..... 0'8 ml  
 SDS 10% ..... 1'6 ml  
 2-mercaptoetanol (Sigma, St. Louis, USA) ..... 0'4 ml  
 Azul de bromofenol 0'05% ..... 0'2 ml

- Solución saturada de n-butanol: mezclar en un matraz n-butanol (Sigma, St. Louis, USA) y agua destilada.

Se agita, se deja decantar y finalmente se toma la fase superior con una pipeta.

- Solución de sacarosa 20%.

Sacarosa.....	20 g
Agua destilada.....	100 ml

- Persulfato amónico 10% (preparar en el momento de usar en un tubo eppendorf)

Persulfato amónico (Bio-Rad; Hercules, USA) .....	0'15 mg
Agua destilada.....	1'5 ml

- N,N,N',N'-tetrametiletilendiamino (Temed) (BioRad, Hercules, California).

- Solución de tñido.

Azul Coomassie R-250 (Bio-Rad; Hercules, USA).....	1 ml
Metanol.....	400 ml
Acido Acético.....	100 ml
Agua destilada.....	500 ml

- Solución de desteñido.

Metanol.....	400 ml
Acido Acético.....	100 ml
Agua destilada.....	500 ml

## 5.2. Instrumentos

- Secador de geles modelo 583 (BioRad; Hercules, USA).

- Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell (Bio-Rad; Hercules, USA).

- Fuente de voltaje modelo 200/2.0 Powel Supply (Bio-Rad; Hercules, USA).

- Escaner Image Master DTS (Amershan Pharmacia Biotec, Uppsala, Suecia)

### 5.3. Metodología

#### a. Preparación del gel de SDS-PAGE:

En nuestro estudio utilizábamos un gel de poliacrilamida al 15%, con un espesor de 0'5 mm. Para la preparación del gel, en un matraz kitasato se iban incorporando los siguientes componentes:

1'5M TRIS-HCl.....	2'5 ml
SDS 10% .....	0'1 ml
Solución de acrilamida/bis.....	5 ml
Agua destilada.....	2'5ml

Desgasificábamos esta solución, para lo que se tapaba el matraz y conectábamos a una bomba de vacío mediante un tubo de goma, manteniéndola a baja potencia durante unos 5 minutos.

A continuación añadíamos 50 µl de persulfato amónico al 10%, y 5 µl de Temed, mezclando cuidadosamente con la pipeta con objeto de no formar burbujas. Esta solución preparada era depositada entre los dos cristales situados en el portageles, hasta llegar aproximadamente a 1 cm del borde superior del cristal pequeño. Estos cristales habían sido montados siguiendo las explicaciones del fabricante del modelo mini-protean II (BIO-RAD).

Después rellenábamos con solución saturada de n-butanol con objeto de que la superficie del gel queda sin ondulaciones. Dejábamos reposar 45 minutos a temperatura ambiente, momento en que el gel estaba perfectamente solidificado, tras lo que procedíamos a lavar la parte superior del gel con agua destilada abundante, que era eliminada.

#### b. Preparación del Stacking-gel

-El Stacking-gel se preparó en un matraz Kitasato con los siguientes compuestos:

0'5M TRIS-HCl.....	2'5 ml
SDS 10% .....	0'1 ml
Solución de acrilamida/bis.....	1'3 ml
Agua destilada.....	6'1 ml

Tras desgasificar, añadíamos 50  $\mu\text{l}$  de persulfato amónico al 10% y 10  $\mu\text{l}$  de Temed. Mezclábamos cuidadosamente con la pipeta con objeto de impedir la formación de burbujas e íbamos añadiendo a la parte superior del gel anterior, rellenando hasta cerca del borde.

Luego introducíamos el peine de electroforesis con objeto de formar los pocillos donde posteriormente serían depositadas las muestras. Se dejaba reposar 45 minutos a temperatura ambiente, tras lo que se quitaba el peine, quedando el gel listo para su uso.

#### c. Preparación de las muestras

Mezclábamos los extractos antigénicos con el Sample Buffer, normalmente en la proporción de 7  $\mu\text{l}$  de muestra en 10  $\mu\text{l}$  de Sample Buffer. Esta proporción podía variar dependiendo de la cantidad de proteínas presentes en el extracto. Las muestras así preparadas en tubos eppendorf eran colocadas en agua en ebullición durante 5 minutos. Luego las dejábamos reposar hasta que alcanzaban la temperatura ambiente.

Paralelamente preparábamos el marcador de peso molecular LMW, mezclando 5  $\mu\text{l}$  del mismo con 5  $\mu\text{l}$  de Sample Buffer.

Finalmente añadíamos 5  $\mu\text{l}$  de Sacarosa al 20%, tanto a las muestras como al marcador de peso molecular.

#### d. Aplicación de las muestras

Los pocillos formados en la parte superior del gel eran lavados con Running-Buffer, eliminando el remanente de cada lavado. Finalmente se depositaban 3  $\mu\text{l}$  del mismo en cada uno de los pocillos, añadiendo posteriormente las muestras (13  $\mu\text{l}$ ) o los marcadores de peso molecular (10  $\mu\text{l}$ ).

A continuación rellenábamos todos los pocillos con Running Buffer, cuidando de no formar burbujas. Finalmente encajábamos los portageles en la pieza intermedia del mini-protean II, y rellenábamos el interior con Running Buffer. Llevábamos el conjunto al recipiente donde se efectuaba la electroforesis, que contenía también Running Buffer. Utilizábamos condiciones de 200 V durante 45 minutos para desarrollar el gel.

#### e. Visualización de las bandas proteicas

Una vez finalizada la electroforesis procedíamos a separar los cristales, obteniendo el gel, que se sumergía en la solución de tinte. Se dejaba de esta forma en reposo durante

toda la noche. A continuación, pasábamos el gel a la solución de desteñido, que cambiábamos 3 ó 4 veces a lo largo de un periodo aproximado de hora y media.

Una vez obtenida la perfecta visualización de las bandas proteicas, procedíamos al secado del gel. Para ello lo colocábamos entre dos láminas plásticas humedecidas y éstas a su vez entre dos papeles de filtro humedecidos, cuidando que no se formaran burbujas. El conjunto se colocaba en el aparato secador de geles, aplicábamos vacío y manteníamos a 80°C durante 1 h 30 min.

Pasado este tiempo, dejábamos reposar durante 20 minutos para que alcanzara la temperatura ambiente, se rompía el vacío y extraíamos las hojas plásticas que contenían el gel ya desecado. Finalmente, lo recortábamos y almacenábamos para su estudio.

Los geles fueron examinados con ayuda de un escáner.

## **6. OBTENCIÓN DE SUERO HIPERINMUNE EN CONEJO**

### **6.1. Material**

- Animales: Utilizamos conejos New Zealand macho de aproximadamente 2 kg de peso en el momento de inicio del experimento.
- Condiciones del habitáculo: Ciclo circadiano de luz: 12h luz/ 12 h oscuridad, gradual. 500-700 lux. Temperatura ambiente entre 20° y 22° C. Humedad relativa del aire: 55 ± 15 %. Renovaciones de aire: entre 15 y 20 renovaciones / hora.
- Extractos antigénicos obtenidos de la forma anteriormente descrita (apartado 3) y llevados a una concentración de 200µg/ml.
- Coadyuvante completo de Freund (Sigma, St. Louis, USA).
- Coadyuvante incompleto de Freund (Sigma, St. Louis, USA).
- Agujas de tamaños 21G y 19G (Terumo, Leuven, Bélgica)
- Jeringas de 2 ml (Becton Dicknson, Madrid, España)
- Paños quirúrgicos para la inmovilización del animal.
- Tubos falcon de 50 ml para recogida de la sangre durante el sangrado.
- Tubos para obtención de suero (Sarstedt, Granollers, España).
- Centrífuga modelo Avanti 30 (Beckman, Fullerton, USA).



## **6.2. Metodología**

### a. Preparación de la emulsión

Preparábamos la emulsión mezclando 0'5 ml de coadyuvante con 0'5 ml del extracto antigénico correspondiente, haciendo pasar la mezcla varias veces por una aguja de 21G para facilitar la emulsión. Para testar la calidad de la emulsión depositábamos una gota en un vaso de precipitado lleno de agua comprobando la escasa dispersión que se producía de la misma.

### b. Inyección de la emulsión

Inyectábamos la emulsión preparada anteriormente, con lo que el volumen inyectado era de 1 ml, dispersado en cuatro puntos a razón de 0'25 ml en cada punto. La inyección era administrada subcutáneamente en la zona posterior del lomo del animal, utilizando aguja de 21 G

### c. Número de inyecciones

Se realizaron un total de nueve inyecciones del extracto antigénico correspondiente, con un intervalo de una semana entre ellas. La primera inyección se realizó con una emulsión preparada con coadyuvante completo de Freund y el resto con una preparada con el incompleto.

### d. Extracciones sanguíneas

Se realizaron extracciones sanguíneas cada quince días, a partir de la arteria central de la oreja, mediante la utilización de una aguja de 19G. Cada día se extrajo un volumen aproximado de 2'5 ml

### e. Sangrado

El sangrado se realizó una semana después de la última inyección de extracto antigénico, a través de la arteria central de la oreja del animal. Éste fue posteriormente sacrificado mediante inyección intravenosa de 5 ml de pentobarbital sódico. La cantidad de sangre obtenida era aproximadamente de 100 ml.

El suero se obtuvo mediante centrifugación de la sangre a 3.000 g durante 10 minutos y a 4°C.

## **7. TÉCNICA DE ENZIMOINMUNOANÁLISIS (ELISA):**

### **7.1. Material necesario**

- P.B.S. Solución de trabajo: diluir 1:10 en agua destilada la solución de almacenamiento (descrita en el apartado 3.2).

- Solución salina con tween.

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -2H <sub>2</sub> O (Sigma, St. Louis, USA).....	1'79 g
NaCl (Sigma, St. Louis, USA).....	9 g
Polsorbato 20 (Tween 20) (Sigma, St. Louis, USA).....	0'5 ml
Agua destilada .....	1 L

- Buffer citrato 0.1M pH=4'5.

Solución A.

Acido cítrico (Panreac, Barcelona, España) .....	2'14 g
Agua destilada.....	100 ml

Solución B.

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -2H <sub>2</sub> O (Sigma, St. Louis, USA).....	3'56 g
Agua destilada.....	100 ml

Añadir B sobre A hasta obtener un pH=4'5.

- Solución bloqueante.

Albúmina Sérica Bovina (BSA) (Sigma, St. Louis, USA).....	0'3 g
PBS .....	10 ml

Esta solución debe ser preparada en el momento.

- Substrato.

Ortofenilendiamina (OPD) en comprimidos (Sigma, St. Louis, USA).....	30 mg
Buffer citrato .....	50 ml
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	0'25 ml

Esta solución debe ser preparada en el momento.

- Anti IgG de conejo conjugada con peroxidasa (Sigma, St. Louis, USA). Preparar en el momento una disolución 1:1000 en PBS.

- Acido sulfúrico 6N.

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (96%) (Fluka; Buchs, Suiza) ..... 160 ml

Agua destilada ..... 840 ml

Se procederá a medir el volumen de agua y depositarlo en el recipiente. El ácido sulfúrico se irá vertiendo sobre el agua, poco a poco y dejando resbalar por las paredes.

- Placas de 96 pocillos de fondo plano (Costar; Cambridge, USA)

- Parafilm (American National Can; Greenwich, USA)

- Lector de ELISA Reader MF (Labsystems iEMS; Helsinki, Finlandia)

## 7.2. Metodología

El primer paso consistía en tapizar los pocillos de la placa de 96 pocillos añadiendo a cada uno de ellos 100 µl del extracto antigénico a una concentración de proteínas de 5 µg/ml, tras lo que realizábamos una incubación de 72 horas a 4°C. Pasado este tiempo vaciábamos la placa y lavábamos 3 veces con PBS-T. Posteriormente añadíamos la solución bloqueante: 100 µl de BSA al 3% en PBS e incubábamos 30 minutos a temperatura ambiente.

Tras haber eliminado la solución bloqueante vaciando y lavando 3 veces los pocillos añadíamos los sueros, depositando 100 µl de una dilución 1/10.000 del suero de conejo en cada pocillo e incubando durante una hora a 37°C con la placa convenientemente tapada con parafilm. Tras esta incubación vaciábamos los pocillos, golpeábamos y lavábamos 3 veces, de la misma forma descrita anteriormente.

Posteriormente añadíamos 100 µl de Anti IgG de conejo conjugada con peroxidasa, en una dilución 1:1000 en PBS e incubábamos 1 hora a temperatura ambiente, tras lo que vaciábamos, golpeábamos y lavábamos 3 veces como hemos indicado anteriormente.

Finalmente, para conseguir la reacción de color, añadíamos 100 µl de sustrato (solución de OPD) en cada pocillo e incubábamos durante 20 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, tras lo que deteníamos la reacción con 50 µl de ácido sulfúrico 6N.

La lectura de la placa se realizaba a 492 nm en un lector ELISA.

## **8. WESTERN BLOT**

### **8.1. Materiales**

- Buffer de transferencia:

Glicina (Panreac, Barcelona, España) .....	11.26 g
Tris HCl. pH 7'4 (Sigma, St. Louis, USA).....	2.42 g
Metanol (Panreac, Barcelona, España) .....	200 ml

Enrasar hasta 1 litro con agua destilada.

- Solución de Tinción: Naftol (Sigma, St. Louis, USA)

- Solución de desteñido.

Metanol (Panreac, Barcelona, España) .....	400 ml
Acido Acético (Panreac, Barcelona, España).....	100 ml
Agua destilada .....	500 ml

- Tris Buffer Salino (TBS):

NaCl (Sigma, St. Louis, USA) .....	80 g
KCl (Sigma, St. Louis, USA) .....	2 g
Tris HCl pH 7'4 .....	30 g
Agua destilada .....	1 L

- Solución de lavado: TBS+Tween 20 al 0'1%.

- Solución bloqueante:

TBS (Sigma, St. Louis, USA) .....	100 ml
Azida sódica NaCl (Sigma, St. Louis, USA).....	1 ml
Leche desnatada .....	10 g

- Anti IgG de conejo conjugada con peroxidasa (Sigma, St. Louis, USA)
- Mini-PROTEAN II Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad; Hercules, USA)
- Membranas de nitrocelulosa para transferencia (Bio-Rad; Hercules, USA)
- Fuente de voltaje modelo 200/2.0 Powel Supply (Bio-Rad; Hercules, USA)
- Placas con pocillos para Western Blott (Costar; Cambridge, USA)
- Líquidos de revelado por intensidad lumínica ECL (Amersham; Bucking Hanshire, Reino Unido)
- Reveladora de películas de Rayos X modelo Hyperprocessor (Amersham; Bucking Hanshire, Reino Unido)
- Chasis de radiología modelo Monotec (Spectronics corporation; New York, USA)
- Películas para radiología (Eastman Kodak Company; New York, USA)
- Papel Watmann (Bio-Rad; Hercules, USA)

## **8.2. Metodología**

En primer lugar procedíamos a correr los extractos antigénicos en un gel de poliacrilamida, tal y como hemos indicado anteriormente en el apartado 5. A continuación se realizaba la transferencia, a partir del gel, a la membrana de nitrocelulosa. Para ello, primeramente, empapábamos dicha membrana en el Buffer de Transferencia, así como dos papeles Watmann de tamaño algo mayor que el gel y las esponjillas que contiene el kit de Mini-protean II.

A continuación se prepara el sándwich de transferencia de la siguiente manera: sobre la placa del polo negativo se coloca una de las esponjillas, luego una de las hojas de papel Watmann empapada y el gel de poliacrilamida. Sobre el gel se coloca la membrana de

nitrocelulosa empapada, a continuación se coloca otro papel Watmann y sobre él otra esponjilla. Finalmente se cierra el sándwich con la placa del polo positivo, teniendo cuidado de eliminar bien las burbujas entre el gel y la membrana para evitar que interfieran en la transferencia.

De esta manera nos asegurábamos las condiciones precisas para que las proteínas, cargadas negativamente, pasasen del gel a la membrana. Para ello colocábamos el sándwich en el kit de Mini-protean II tal y como indica el fabricante, llenábamos la cubeta con TBS y realizábamos la transferencia a 50 V durante 2 horas.

Una vez realizada la transferencia procedíamos a teñir la membrana con Naftol durante unos 20 min. Teñida la membrana procedíamos a señalar la situación de los marcadores y el carril de cada banda con pequeños orificios para conocer así su ubicación una vez desteñida, proceso que realizábamos introduciendo la membrana en la solución de desteñido hasta que desapareciesen las bandas. Siguiendo con el proceso bloqueábamos la membrana durante 16 horas a 4°C, introduciéndola en la solución bloqueante.

Una vez finalizado el bloqueo de la membrana procedíamos a lavarla con TBS 0'1% Tween 20, durante 15 minutos una primera vez y 5 minutos dos veces más.

A continuación, y si era necesario, cortábamos las calles que habíamos marcado anteriormente y las distribuíamos en pocillos de Western, donde eran incubadas durante 1 hora con los sueros de conejo diluidos en TBS, en una dilución 1/10.000, a temperatura ambiente. Tras la incubación lavábamos las tiras con solución de lavado durante 15 minutos una primera vez y 5 minutos dos veces más.

Seguidamente incubábamos con el conjugado anti-conejo, diluido en TBS al 1/1000 durante 1 hora a temperatura ambiente, tras lo que lavábamos las tiras con solución de lavado durante 15 minutos una vez y 5 minutos dos veces.

Finalmente realizábamos el revelado con ECL. Para ello, mezclábamos los líquidos ECL1 y ECL2 en una dilución 1:1 (3ml + 3ml), e inmediatamente poníamos la mezcla en contacto con la membrana de nitrocelulosa durante 1 minuto, tras lo que colocábamos la membrana en una bolsa de plástico para limpiar el exceso de mezcla, teniendo cuidado de no manchar la bolsa por fuera.

En un chasis de radiología colocábamos una película de rayos X y sobre ella la membrana dentro de la bolsa, cerrábamos el chasis y durante un minuto dejábamos exponerse la membrana a la película, tras lo que procedíamos a revelar la película en la reveladora. A continuación preparábamos una nueva exposición de la misma forma indicada anteriormente, pero en este caso exponíamos durante 5 minutos, revelando la nueva película. Aquellas bandas

en las que se ha unido el antígeno emitían una radiación luminosa que impresionaba la película de rayos X.

## **9. CRECIMIENTO DE *Aspergillus fumigatus* EN CULTIVO CELULAR DE PNEUMOCITOS**

### **9.1 Materiales**

- El manejo de las células y del hongo de este experimento se realizó en una zona limpia de acceso restringido de nuestro laboratorio y en cabinas de seguridad tipo BIO II (TDI; Madrid, España).
- Medio de crecimiento de las células: Al medio base, DMEM (4'5 g/l de glucosa) (Bio-Whittaker; Walkersville, Maryland, USA) se le añadió:
  - Glutamina (Sigma, St. Louis, USA) hasta una concentración del 1% en volumen.
  - Antibiótico: Penicilina / Estreptomina (Sigma, St. Louis, USA) hasta una concentración del 0'4% en volumen.
  - Suero Fetal Bovino (Sigma, St. Louis, USA), hasta una concentración del 10% en volumen.

El medio así obtenido se mantenía en refrigeración un máximo de tres semanas.

- Células: Se utilizaron pneumocitos tipo 2, correspondiente a la línea celular L2, procedente de pulmón de rata.
- Placas para cultivo celular de 25 cm<sup>2</sup> o de 75 cm<sup>2</sup> (Costar; Cambridge, USA).
- Solución Giemsa de almacenamiento: Añadíamos 0'85 g de polvo de Giemsa (0'15 g de azul de bromofenol, 0'30 g de azul de metileno, 0'36 g de Eosina y 0'04 g de Floxina B) en 60 ml de Glicerina y 40 ml de Metanol. Mezclábamos bien y manteníamos durante 16 horas a una temperatura de 55 - 58 ° C . Una vez preparada la solución será estable durante un año. La solución de trabajo se prepara mezclando 4 ml de esta solución de almacenamiento en 40 ml de PBS.

- Centrífuga modelo Avanti 30 (Beckman, Fullerton CA, USA),
- Tubos Falcon de 50 ml
- Etanol al 70% (Sigma, St. Louis, USA)
- Cepa de *A. fumigatus* 48238E, procedente de la colección de cultivos de GlaxoWellcome.
- Microscopio Vanox AHTB-3 (Olympus; Tokio, Japón).

## 9.2. Metodología

- Cultivo de células: Hasta el momento de su utilización, las células se mantenían en un contenedor de nitrógeno líquido, en viales que descongelábamos depositándolos directamente en un baño a 37°C. Una vez descongeladas las células, colocábamos el contenido del vial en un tubo Falcon con 10-15 ml de medio DMEM con 10% de suero, homogeneizando para lograr su disgregación, tras lo que procedíamos a centrifugarlas a 150 g durante 3 a 5 minutos. Una vez eliminado el sobrenadante, resuspendíamos el precipitado en un volumen de 5 ml de medio que hemos descrito en el apartado 8, para tapizar una placa de 25 cm<sup>2</sup>, o bien 15 ml si procedíamos a tapizar una de 75 cm<sup>2</sup>.

La incubación de estas placas se llevaba a cabo a 37°C, en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> y con el tapón de la misma abierto tres cuartos de rosca.

- Inoculación de *A. fumigatus* 48238: Sobre el cultivo celular preparado como acabamos de describir, añadimos una concentración final de 10<sup>4</sup> conidias de *A. fumigatus* por ml de medio e incubábamos en las mismas condiciones señaladas anteriormente (37° C, 5% CO<sub>2</sub>) durante 24 horas, tras las que examinábamos al microscopio la morfología del hongo al crecer en este medio.

- Tinción de Giemsa: Para poder visualizar las células y el crecimiento de las hifas del hongo se realizó una tinción de Giemsa en las placas; con el siguiente procedimiento:



1. Fijar con alcohol etílico
2. Teñir con la solución de trabajo Giemsa a temperatura ambiente durante hora y media.
3. Lavar en ácido acético diluído durante 2 segundos. (Acético diluído: 4 gotas de acético concentrado (aprox. 40 µl) en 100 ml de agua destilada durante 2 segundos.)
4. Sumergir (meter y sacar) en alcohol al 96% dos veces.
5. Lavar con alcohol isopropílico 3 veces durante 2 minutos cada vez.
6. Aclarar con Xileno.

Como resultado de la tinción observábamos los núcleos de las células de color violeta y el citoplasma de color azul. Las hifas toman un color azul oscuro.

## **10. PREPARACIÓN DE INÓCULO DE *A. Fumigatus***

En la realización del presente trabajo ha sido frecuente la preparación de una suspensión de conidias de *Aspergillus* en una concentración conocida

### **10.1. Materiales**

- Agar de Sabouraud ya preparado en placas (Difco; Detroit, USA), cuya composición es:

Extracto de patata .....	4 g/L
Dextrosa.....	20 g
Agar .....	20 g
Agua destilada.....	1 L

- Tubos de Agar Patata inclinado (Oxoid; Basingstoke, Reino Unido) cuya composición es:

Neopeptona .....	10g
Dextrosa .....	40 g
Agar .....	15 g
Agua destilada.....	1 L

- Recipientes contenedores Falcon de 50 ml

- Solución salina + Tween 80 al 0'05% (cuya composición se indicó en el apartado 3.2.)
- Asa de cristal, Etanol al 70% y Mechero Bunsen
- Tubos Eppendorf (Westbury, N.Y USA) de 1'5 ml para hacer las diluciones.
- Camara de Neubauer (Brand, Meriden, Connecticut, USA)
- Cabina de seguridad BIO II (Telstar; Tarrasa, Barcelona)
- Centrífuga modelo Avanti 30 con rotor C0650 (Beckman, Fullerton CA, USA)
- Agitador orbital (LAB-LINE; Instruments, Melrose Park, USA)

## **10.2. Metodología**

A partir de un vial donde el hongo se mantenía en solución salina y temperatura ambiente, sembrábamos 2 o 3 tubos de Agar patata inclinado, y los incubamos a 37° C durante 4 días, con lo que conseguíamos una abundante esporulación del hongo. Tras esta incubación añadíamos 5 ml de PBS-Tween 80 al 0'05%, cerrábamos bien el tubo y agitábamos con el agitador orbital hasta que el PBS tomase un color verde oscuro por la acumulación de conidias. La suspensión de esporas se filtraba a través de puntas P-5000 con gasa estériles, con el fin de eliminar impurezas. Centrifugábamos el filtrado a 4.500 rpm (2.083g) y 4° C. Eliminábamos el sobrenadante, y el precipitado lo resuspendíamos en 10 ml de Solución salina + Tween 20 y procedíamos a contar diluciones de la suspensión de esporas en la cámara de Neubauer. Una vez conocida la concentración de conidias por ml, ajustábamos el inóculo a la cantidad exacta que queríamos obtener, tras lo que contábamos de nuevo en la cámara de Neubauer, con el fin de asegurarnos, y sembrábamos tres placas de Agar de Sabouraud con el inóculo (previas diluciones 1:10 si se consideraba necesario). Para ello utilizábamos 100 µl, del inóculo por triplicado, para comprobar la viabilidad de las conidias y obtener así el inóculo real utilizado. Dichas placas se incubaban a 37 °C durante 24h antes

de realizar el recuento de los puntos a partir de los que se habían formado hifas, y que correlacionábamos con el número de conidias viables.

## **11. DETECCIÓN DE GALACTOMANANO MEDIANTE UN TEST DE AGLUTINACIÓN EN LÁTEX: (PASTOREX<sup>®</sup> ASPERGILLUS)**

### **11.1. Materiales**

Algunos de los materiales eran proporcionados por el fabricante, como los siguientes:

- Látex Aspergillus: partículas de látex recubiertas con un anticuerpo monoclonal antigalactomanano en tampón glicina.
- Control positivo: Galactomanano puro, obtenido a partir de *A. fumigatus*, a una concentración aproximada de 75 ng/ml
- Control negativo: Tampón glicina pH 8'2
- Reactivo de tratamiento de los sueros (EDTA)
- Tarjetas con fondo negro y bastoncillos desechables.

Había otros materiales que no eran proporcionados por el fabricante:

- Baño (LAB-LINE; Instruments, Melrose Park, USA)
- Centrífuga Avanti 30 (Beckman, Fullerton, CA, USA).

### **11.2. Condiciones en que se realizaba la técnica**

La realización de la prueba de Pastorex<sup>®</sup> se llevó a cabo en condiciones ambientales óptimas, tal y como indica el fabricante, en una habitación donde no se realizaban cultivos de *A. fumigatus*, evitando el contacto con el medio ambiente de los tampones, soluciones y material que entraba en contacto con las muestras. Dicho material era desechable y se encontraba en condiciones óptimas de limpieza y esterilización.

La prueba se realizaba siguiendo meticulosamente las indicaciones del fabricante del kit.

### **11.3. Metodología**

Inicialmente se realizaba un pretratamiento de los sueros con la solución de tratamiento (EDTA), lo que permite la disociación de los inmunocomplejos y la precipitación de las proteínas séricas que pueden interferir en la prueba. Para ello tomábamos 150 µl de suero y lo mezclábamos con 50 µl de solución de tratamiento en un tubo eppendorf de 1'5 ml,

homogeneizando y calentando durante 3 minutos a 100° C en un baño. A continuación centrifugábamos los sueros a 10.000 g durante 10 minutos

Sobre los círculos negros de las tarjetas colocábamos 40 µl del sobrenadante obtenido tras el pretratamiento de los sueros y 10 µl del látex. Mezclábamos bien con el bastoncillo y agitábamos manteniendo a 160 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente, tras lo que se leían los resultados.

Un resultado positivo viene determinado por la aglutinación de las partículas de látex. En cada prueba se realiza la determinación con el control positivo (galactomanano) y el control negativo (tampón glicina).

## **12. DETECCIÓN DE GALACTOMANANO MEDIANTE UN ELISA DOBLE SANDWICH: PLATELIA ASPERGILLUS TEST®**

### **12.1. Materiales**

Materiales proporcionados por el fabricante:

- 12 tiras de 8 pocillos tapizados con el anticuerpo monoclonal anti-galactomanano. Se trata concretamente del anticuerpo EBA-2 obtenido en rata.
- Solución de lavado concentrado 10X.
- Suero control negativo humano liofilizado, 0 ng/ml de galactomanano.
- Suero control valor umbral humano liofilizado, 1 ng/ml de galactomanano (límite de detección de la prueba)
- Suero control positivo humano, liofilizado, de 4 a 8 ng/ml de galactomanano.
- Conjugado: anticuerpo monoclonal anti-galactomanano (de rata, EBA-2) marcado con peroxidasa. Es el mismo anticuerpo monoclonal utilizado para tapizar los pocillos.
- Solución para tratamientos de sueros (EDTA).
- Tampón substrato para peroxidasa (0'009% H<sub>2</sub> O<sub>2</sub>)
- Cromógeno (TMB-DMSO)
- Solución de parada: ácido sulfúrico al 1'5N
- Hojas adhesivas para microplacas.

## 12.2. Metodología

La realización de la prueba de Platelia<sup>®</sup> se llevó a cabo en condiciones ambientales óptimas, indicadas por el fabricante, en una habitación donde no se realizaban cultivos de *A. fumigatus*, evitando el contacto con el medio ambiente tanto de los pocillos como de los tampones, soluciones y material que entraba en contacto con las muestras. Dicho material era desechable y se encontraba en condiciones óptimas de limpieza y esterilización.

La prueba se realizaba siguiendo las indicaciones del fabricante del kit, con excepción del volumen de suero y solución de tratamiento utilizado en el pretratamiento de las muestras, que era de la mitad de lo indicado por el fabricante, debido a la escasez de volumen disponible en algunos sueros. Tal modificación no afectaba a la prueba ELISA en sí.

Los sueros liofilizados suministrados por el fabricante se recomponían añadiendo 1ml de agua destilada ultrapura estéril y esperando 2 o 3 minutos para permitir la perfecta rehidratación del suero, tras la cual se mezclaba con la ayuda de una pipeta.

Realizábamos un pretratamiento de los sueros con la solución de tratamiento (EDTA), lo que permite la disociación de los inmunocomplejos y la precipitación de las proteínas séricas que pueden interferir en el ELISA. Para ello tomábamos 150 µl de suero y lo mezclábamos con 50 µl de solución de tratamiento en un tubo eppendorf de 1'5 ml, homogeneizábamos y calentábamos durante 3 minutos a 100 °C en un baño. A continuación centrifugábamos los sueros a 10.000 g durante 10 minutos .

En cada pocillo colocábamos 50 µl de conjugado y a continuación otros 50 µl del sobrenadante correspondiente obtenido tras el tratamiento de los sueros. Seguidamente cubríamos la placa con una hoja adhesiva procurando sellar cada pocillo, procediendo a su incubación a 37° C durante 90 minutos. Tras esta incubación lavábamos los pocillos 5 veces con la solución de lavado diluída 1/10, para pasar a añadir 200 µl por pocillo de la solución de cromógeno, preparada mezclando el cromógeno con el tampón sustrato en una dilución 1/50 e incubábamos a temperatura ambiente y en oscuridad durante 30 minutos. Finalmente añadíamos 100 µl por pocillo de la solución de parada (Ácido Sulfúrico 1'5N). La densidad óptica de la placa se establecía mediante una medición doble, a 450nm y 620nm.

Para interpretar los resultados se realizó el cálculo del índice denominado por el fabricante como “I”, del siguiente modo:

$i$  = densidad óptica de la muestra / densidad óptica del suero umbral

Se consideraba un resultado positivo si:  $i > 1.5$

Se consideraba un resultado dudoso si:  $1.0 < i < 1.5$

Se consideraba un resultado negativo si:  $i < 1.0$

### **13. REALIZACION DE UNA NESTED-PCR PARA DETECCIÓN DE ADN DE *Aspergillus* EN MUESTRAS CLÍNICAS.**

Para la realización de esta técnica nos basamos en la descrita por Yamakami, *et al.* En 1996 adaptada a las condiciones de nuestro laboratorio.

La realización de una prueba de Nested-PCR conlleva la utilización de dos parejas de cebadores, unos externos a una determinada secuencia y otros que amplifican una secuencia que está en el interior de la anterior.

Todos los pasos necesarios para realizar esta Nested-PCR eran llevados a cabo en condiciones que impidiesen la contaminación por esporas de *Aspergillus* que pudiese haber en el ambiente.

#### **13.1. Material**

- Puntas de micropipeta con filtro Sorenson (BioScience, Inc., Utah, USA), estériles con filtro y certificación de estar libres de RNasa y Dnasa. (Capacidades: 200-1000µl; 20-200µl; 1-30µl y 0.1-10 µl.)
- Juego de micropipetas P-1000, p-200, p-20 y p-2 (Gilson, Middleton, USA) de uso exclusivo para la realización de PCR.
- Cabinas de bioseguridad BIO II (Telstar; Tarrasa, Barcelona)
- Buffer de Lisis, (para 50 µl de reacción):

KCl (Sigma, St. Louis, USA) .....	100 mM
Tris-HCl (pH 8.3) (Sigma, St. Louis, USA).....	20 mM *
MgCl <sub>2</sub> (Sigma, St. Louis, USA) .....	5 mM
Gelatina (Sigma, St. Louis, USA).....	0.2 mg/ml
Polisorbato 20 (Tween 20) (Sigma, St. Louis, USA).....	0.9 %

\* Para preparar el Tris-HCL (pH 8'3) Pesábamos 2'422 g, diluíamos en 80 ml de agua destilada, ajustábamos el pH a 8'3 con HCl concentrado, rellenando hasta 100 ml.

En el momento de su utilización, a este buffer de lisis le añadíamos 60 µg/ml de proteinasa K (Boehringer Mannheim, Alemania)

- Tubos eppendorf pequeños para PCR (Perkin Elmer, Massachusetts, USA)

- Mezcla de PCR, para 50 µl de mezcla de reacción:

Agua milliQ.....	29 µl
Buffer 10x (Perkin Elmer, Massachusetts, USA) .....	5 µl
dNTP (Perkin Elmer, Massachusetts, USA) .....	4 µl
Cebadores 1/1 .....	1 µl*
Taq DNA polimerasa (Perkin Elmer, Roche) .....	0'5 µl
Muestra (molde) .....	10 µl

(\*0'5 µl de cada cebador diluido a 100 pmol.)

- Termociclador: GeneAmp PCR System 9600 (Perkin Elmer, Massachusetts, USA).

- Fuente de luz ultravioleta (Modelo 3-3502, New Berlin WI; USA)

- Cámara fotográfica modelo MP4 (Polaroid, Cambridge, USA)

- Citrato sódico (Sarstedt® Granollers España)

- EDTA tripotásico (Sarsted® Granollers España)

- Heparina (5% Rovi® Madrid España; cada 1 mg corresponden a 100 UI)

- Proteinasa K (Boehringer Mannheim; Mannheim Alemania)

## 13.2. Metodología

### a. Extracción de ADN de muestra

Para la obtención de ADN mezclábamos 20µl de muestra en 20 µl de Buffer de lisis, incubando a 55° C durante una hora.

A continuación se desactivaba la proteinasa K calentando a 95° C durante 10 minutos.

Finalmente se centrifugaba a 12.000 g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se utilizará para desarrollar la técnica PCR.

### b. Reconstitución de los cebadores

Los cebadores oligonucleótidos utilizados fueron los descritos por Yamakami *et al.* 1996, a partir de la comparación de la secuencia de la subunidad 18S del ARN ribosómico

de genes de distintas especies de *Aspergillus* y otros hongos en la base de datos GenBank, y sintetizados por Eurogentec (Bélgica).

La secuencia de dichos cebadores es la siguiente:

Cebadores internos:

Asp. 5 (5'GATAACCAACGAGACCTCGG3')

Asp. 8 (5'TGCCAACTCCCCTGAGCCAG3')

Tras la amplificación con estos cebadores obteníamos una banda de 384 pares de bases.

Cebadores externos:

Asp. 1 (5'CGGCCCTTAAATACGCCGGTC3')

Asp. 7 (5'CCTGAGCCAGTCCGAAGGCC3')

Tras la amplificación con estos cebadores obteníamos una banda de 357 pares de bases.

Para su uso los cebadores eran reconstituidos con H<sub>2</sub>O milliQ, normalmente a una concentración de 100 pmol/ml.

### c. Preparación de la mezcla de PCR

Preparábamos un volumen de mezcla suficiente para todas las muestras que íbamos a analizar, manteniendo las proporciones indicadas anteriormente. A continuación alicuoteábamos 40 µl de dicha mezcla en tubos eppendorf pequeños para PCR tras, los que se añadían los 10 µl de muestra a cada tubo.

Finalmente introducíamos las muestras en el Termociclador: GeneAmp PCR System 9600 (Perkin Elmer, Roche).

### d. Condiciones de la reacción de amplificación de la polimerasa:

La primera hibridación era realizada con los cebadores externos: Asp. 5 y Asp. 8, con las siguientes condiciones:

1. Desnaturalización inicial .....94°C 2'
2. 30 Ciclos compuestos de:
  - Desnaturalización .....94°C 1'
  - Hibridación.....50°C 1'
  - Extensión.....72°C 3'



3. Extensión final..... 72°C 10'
4. Atemperación: antes de obtener la muestra amplificada se mantenía a 4°C un mínimo de 7 minutos

Tras esta primera amplificación preparábamos una segunda mezcla en las mismas condiciones que la primera, pero utilizando los cebadores internos: Asp. 1 y Asp. 7. En este caso alicuoteábamos 49 µl de mezcla en los tubos eppendorf, y como molde, utilizábamos 1 µl del resultado de la amplificación anterior y aplicando las siguientes condiciones:

1. Desnaturalización inicial .....94°C 2'
2. 30 Ciclos compuestos de:
  - Desnaturalización .....94°C 1'
  - Hibridación.....65°C 1'
  - Extensión.....72°C 3'
3. Extensión final..... 72°C 10'
4. Atemperación: antes de obtener la muestra amplificada se mantenía a 4°C un mínimo de 7 minutos.

#### e. Preparación del gel de agarosa al 2%

Según el tamaño del gel a preparar, medíamos 50, 100 o 200 ml de TAE 1x en una probeta y los introducíamos en un recipiente del doble de esa medida. A continuación pesábamos Agarosa (2 g por cada 100 ml) y la incorporábamos al recipiente.

Seguidamente calentábamos la mezcla en un microondas y agitábamos periódicamente hasta su completa disolución, tras lo que dejábamos enfriar a temperatura ambiente, de manera que la temperatura no afectara al siguiente componente. Éste era una solución de Bromuro de Etidio al 1/20.000, del que añadíamos 50 µl. Agitábamos bien y vertíamos el contenido del recipiente en la cubeta. Se colocaba el peine en la cubeta, ajustándolo para que todos los pocillos quedasen a la misma altura, y dejábamos enfriar hasta su solidificación. En este momento se retiraba el peine, quedando el gel listo para su uso.

#### f. Colocación de las muestras

Mezclábamos 2 µl del Buffer de muestra con 20 µl de muestra. De esta mezcla se tomaban 20 µl que se introducían lentamente en su pocillo correspondiente. Una vez cargadas todas

las muestras en sus pocillos se cerraba la cubeta, y conectábamos los electrodos de manera que las muestras quedasen más próximas al cátodo.

Conectábamos la fuente de electroforesis a un voltaje dependiente de la distancia de electrodos, de manera que se permitiera una electroforesis correcta. Así por ejemplo para un gel de 50 ml se utilizaban 90 V, y para uno de 100 ml unos 130 V.

Dejábamos correr el gel hasta que el frente se quedaba a unos dos o tres centímetros del final del mismo.

#### g. Visualización del Gel

Para visualizar el gel lo colocábamos sobre una fuente de luz ultravioleta y era fotografiado para su posterior estudio. Para ello utilizábamos las siguientes condiciones: tiempo de exposición: 1s; apertura del diafragma: 4'5. Se utilizaba una cámara modelo MP4 land camera (Polaroid, Cambridge, USA)

#### h. Evaluación de anticoagulantes en la PCR

Citrato sódico (Sarstedt® Granollers España), EDTA tripotásico (Sarsted® Granollers España) y Heparina (5% Rovi® Madrid España; cada 1 mg corresponden a 100 UI)

## **14. OBTENCIÓN DE ADN GENÓMICO**

### **14.1. Materiales**

\* Buffer de extracción, para cada gramo de micelio se añadían:

100 mM Tris-HCl pH 9'0 (Sigma, St. Louis, USA).....	5 ml
SDS al 10 % (Sigma, St. Louis, USA) .....	1ml
Cloruro de benzoilo (Sigma, St. Louis, USA).....	3ml

\* Centrífuga modelo Avanti 30 (Beckman, Fullerton CA, USA)

\* NaOAc (Sigma, St. Louis, USA)

\* Fenol (Panreac, Barcelona, España)

\* Isopropanol (Panreac, Barcelona, España)

\* Alcohol Isoamílico (Panreac, Barcelona, España)

\* Etanol de 70° (Panreac, Barcelona, España)

\*Buffer TE, con la siguiente composición

Tris-HCl pH=8 (Sigma, St. Louis, USA) ..... 10 mM

EDTA pH=8 (Sigma, St. Louis, USA) ..... 1 Mm

\*Espectrofotómetro: Ultraspec 200 (Amersham-Pharmacia Uppsala, Suecia)

## 14.2. Metodología

Se obtenían conidias de la cepa *A. fumigatus* 48328 tal y como hemos indicado anteriormente en el apartado 10. Estas conidias eran sembradas en un matraz con  $10^7$  esporas/ml y se mantenían en agitación durante 16 horas a 37° C, tras lo cual, filtrábamos el contenido del matraz. El micelio se lavaba 5 veces con PBS. A continuación pesábamos el micelio (peso húmedo) Posteriormente este micelio era congelado (-80°C) y finalmente liofilizado. Una vez liofilizado lo machacábamos bien con una varilla de vidrio. A continuación añadíamos el buffer de extracción y agitábamos la mezcla manteniendo a 50° C durante 30 min. Posteriormente, añadíamos 3 ml 3M de NaOAc (pH 5'0) y manteníamos 15 minutos en hielo.

A continuación centrifugábamos a 6.000 g durante 15 minutos a 4°C y recogíamos el sobrenadante.

Con el fin de eliminar los restos celulares, añadíamos el mismo volumen que de sobrenadante recogido de una mezcla de fenol : cloroformo : isoamílico (25:24:1), agitando con precaución. Posteriormente centrifugábamos la mezcla a 3.800 g durante 10 minutos. Este sobrenadante obtenido se somete a este mismo proceso las veces precisas hasta limpiar totalmente la muestra de restos celulares, teniendo en cuenta que el último lavado se realizaba únicamente con Cloroformo : Isoamílico (24:1).

Tras este lavado, con el fin de precipitar el ADN, se añaden 0'7 volúmenes de Isopropanol, se mezclaba con precaución y se centrifugaba a 3.800 g durante 10 minutos. Eliminábamos el sobrenadante y lavábamos con Etanol de 70°, centrifugando a 3.800 g durante 4 minutos. Eliminábamos el etanol y lo dejamos secar en campana durante una hora.

Para disolver el ADN, utilizábamos una solución de RNasa 1/100 en TE, durante 12-18 horas.

La presencia del ADN se comprobaba mediante una electroforesis en Gel de Agarosa (al 0'7%)

La cuantificación y pureza de ADN en la solución de TE-RNasa se llevaba a cabo mediante espectrofotometría.

En lo que respecta a cuantificación, se realizaba una medida a 260 nm de la mezcla. Cada unidad de absorbancia correspondía a una concentración de 50 µg/ml de ADN. Si la medida de dicha absorbancia se situaba sobre 2 unidades, se hacían diluciones de la mezcla en TE hasta que dicha absorbancia se hallaba en un rango de 0'5 a 2 unidades de absorbancia.

La pureza de ADN en la solución de TE-Rnasa se llevaba a cabo mediante la relación de las absorbancias medidas a 260nm / 280 nm. El óptimo de dicha razón es 1'8; si el resultado es más alto significa que la solución contiene RNA y si es más bajo proteínas.

## **15. DETECCIÓN DE $\beta$ -D-GLUCANO**

### **15.1 Fundamento**

Este test de detección de (1-3)- $\beta$ -D-Glucano está basado en la capacidad de esta sustancia para poner en marcha la vía de coagulación de los amebocitos *Limulus*. Estos amebocitos son las células sanguíneas presentes en la linfa de cangrejos de herradura, como el *Limulus polyphemus*, que habita las costas del este de los Estados Unidos. Los amebocitos poseen dos vías de formación de coágulo, una de ellas activada por toxinas bacterianas (que activan el factor C de la coagulación) y otra por (1-3)- $\beta$ -D-Glucano, presente en la pared celular de los hongos. El test de detección de (1-3)- $\beta$ -D-Glucano, conocido comercialmente como Fungitec<sup>®</sup>, utiliza esta última vía, que activa el factor G de la cascada de la coagulación de estas células y que, mediante una reacción en la que se utilizan diazo reactivos, finalmente consigue una reacción de color que puede ser medida por colorimetría. Esta reacción aparece reflejada en la figura 1

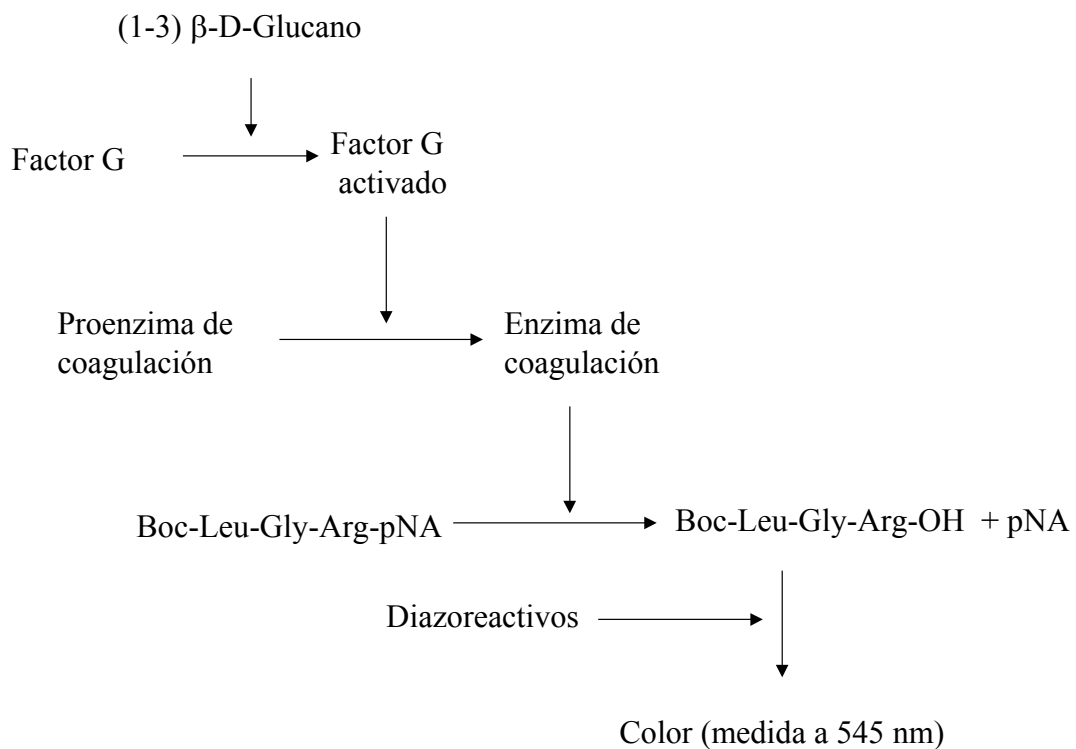


Figura 1: Reacción de activación de la cascada de coagulación del *Limulus* por el  $\beta$ -D-Glucano llevada a cabo en FUNGITEC®

## 15.2. Material

\* Todos los reactivos están contenidos en el kit para detección de  $\beta$ -D-Glucano Fungitec® (Seikagaku corporation; Tokio, Japón). Así mismo las puntas y los tubos para el pretratamiento de los sueros son específicos para el test, libres de endotoxinas y  $\beta$ -D-Glucano (Seikagaku corporation; Tokio, Japón).

\* Las pipetas y placas de 96 pocillos utilizadas fueron las de uso habitual en nuestro laboratorio, descritas anteriormente.

\* Lector de ELISA Reader MF (Labsystems iEMS; Helsinki, Finlandia)

## 15.3. Metodología

En la figura 2 se muestra el esquema sobre el método de realización del kit FUNGITEC® para la detección de  $\beta$ -D-Glucano (En placa de 96 pocillos)

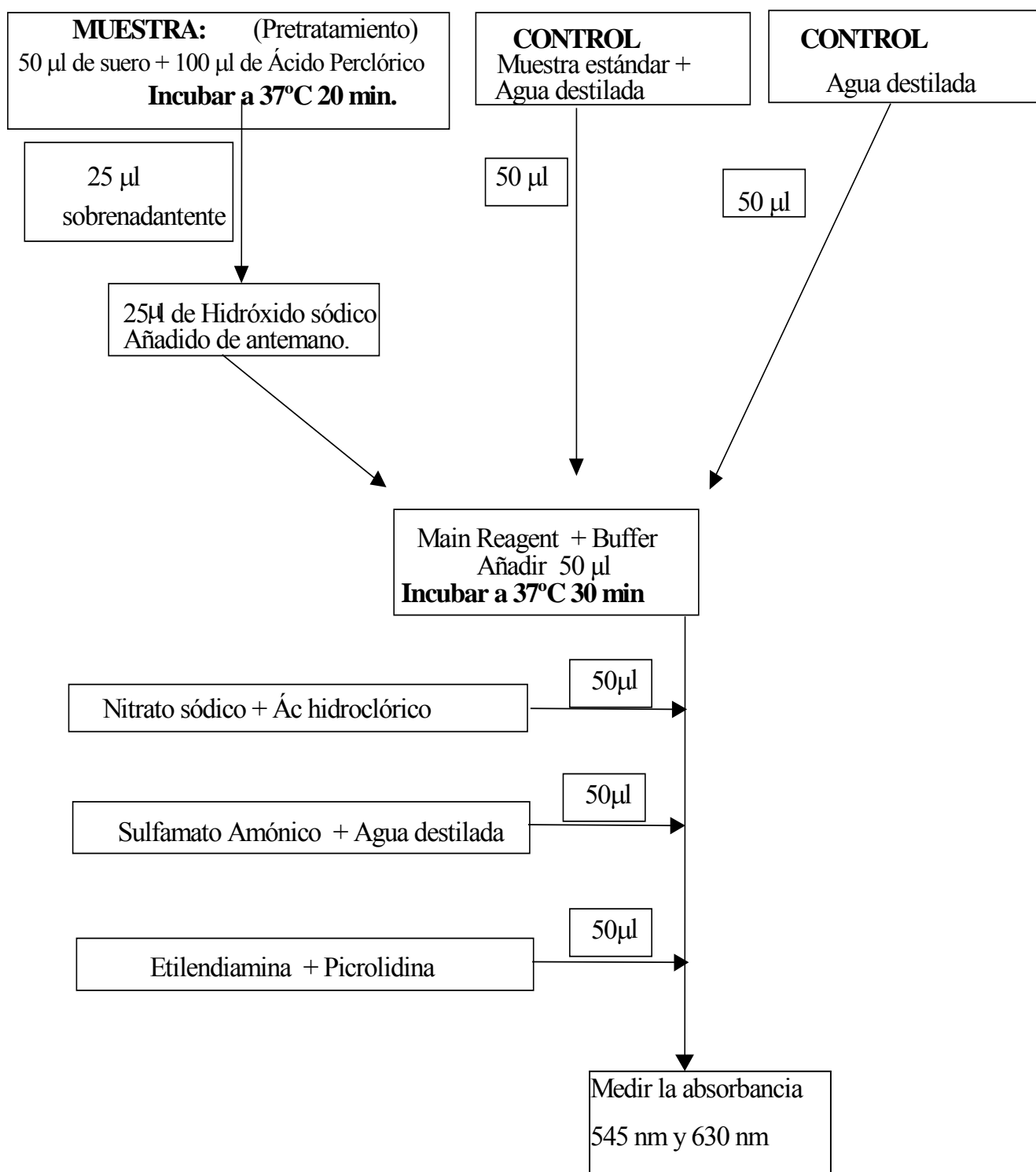


Figura 2: esquema sobre el método de realización del kit FUNGITEC® para la detección de  $\beta$ -D-Glucano (en placa de 96 pocillos)

La absorbancia de los pocillos se mide a 545 nm, utilizando como longitud de onda de referencia 630 nm. Para ello restaremos al valor obtenido a 545 nm, el obtenido a 630 nm, de forma que obtenemos lo que llamamos el valor de la absorbancia final.

El valor de la absorbancia final del blanco debe ser menor o igual a 0'07 para que la prueba quede validada.

Para calcular el nivel de (1-3)- $\beta$ -D-Glucano utilizábamos la siguiente fórmula:

$$C = \text{Concentración del patrón} \times \left( \frac{\text{Incremento de E de la muestra}}{\text{Incremento de E del Control}} \right) \times \text{dilución}$$

Siendo: la concentración del patrón (valor expresado en pg/ml) la cantidad de (1-3)- $\beta$ -D-Glucano contenida en la muestra patrón, utilizada como control positivo, cuyo valor varía según el lote de Fungitec<sup>®</sup> que se utilice.

C es la concentración final de (1-3)- $\beta$ -D-Glucano de cada muestra.

El incremento de E de la muestra se define como la absorbancia final de la muestra menos la absorbancia final del blanco.

El incremento de E de la muestra se define como la absorbancia final obtenida por el control positivo menos la absorbancia final del blanco.

Se multiplica por la dilución de la muestra.

El valor de referencia para dar un suero como positivo es 20 pg/ml de (1-3)- $\beta$ -D-Glucano. Si el valor está entre 10 y 20 pg/ml de (1-3)- $\beta$ -D-Glucano se considera un resultado dudoso y si es menor o igual de 10 pg/ml de (1-3)- $\beta$ -D-Glucano se considera negativo.

## **16. ESTUDIO HISTOLÓGICO E INMUNOHISTOQUÍMICO**

### **16.1. Materiales**

#### a. Anticuerpos primarios:

- Anti-CD3 humano desarrollado en conejo (Dako, CA, USA). Reconoce antígenos CD3 (marcador pan T) y da reacción cruzada con numerosas especies.
- Anti-IgG humana (cadenas lambda) desarrollado en conejo (Dako, CA, USA).

- Anticuerpo monoclonal MAC 387 (Dako, CA, USA), reacciona con el antígeno L1 expresado por monocitos, algunos macrófagos y por granulocitos.

b. Anticuerpos secundarios conjugados:

- Anti-Ig G de ratón biotinado desarrollado en cabra (Dako, CA, USA)
- Anti-IgG de conejo biotinado desarrollado en cabra (Vector, CA, USA)
- Complejo Avidina-biotina-peroxidasa (Vector, CA, USA).

c. Sueros no inmunes:

- Suero normal de cabra (Vector, CA, USA).

d. Cromógenos:

- Diaminobencidina (3,3', diaminobenzidine tetrahydrochloride) (Sigma, St. Louis, USA).

e. Tampones:

- Tampón fosfato salino (PBS) pH 7'2:

NaCl (Sigma, St. Louis, USA).....	80 g
KCl (Sigma, St. Louis, USA).....	2 g
Tris HCl pH 7'4 .....	30 g
Agua destilada .....	1 L

- Tampón Tris salino (TBS) pH 7'6:

NaCl (Sigma, St. Louis, USA).....	80 g
KCl (Sigma, St. Louis, USA) .....	2 g
Tris HCl pH 7'4.....	30 g
Agua destilada .....	1 L



f. Reactivos necesarios para las tinciones histológicas:

- Parafina para cortes histológicos (Panreac, Barcelona, España)
- Xilol (Panreac, Barcelona, España)
- Alcohol etílico puro (Panreac, Barcelona, España)
- Alcohol etílico al 96% (Panreac, Barcelona, España)
- Alcohol etílico al 70% (Panreac, Barcelona, España)
- Hematoxilina (Panreac, Barcelona, España)
- HCl concentrado (Sigma, St. Louis, USA)
- Eosina (Panreac, Barcelona, España)
- Ácido periódico al 0'5% (Panreac, Barcelona, España)
- Reactivo de Schiff (Panreac, Barcelona, España)
- Ácido Crómico al 4% (Sigma, St. Louis, USA)
- Disulfito Sódico al 1% (Panreac, Barcelona, España)
- Metanamina Plata (Panreac, Barcelona, España)
- Tiosulfito de Sodio al 2% (Sigma, St. Louis, USA)
- Reactivo de Verde Luz (Panreac, Barcelona, España)
- Microtomo modelo HM 325, (Microm, Wallford, Alemania)

## **16.2 .Metodología**

a Tinciones histológicas

Las muestras se fijaron mediante inmersión en formol tamponado al 10% y se incluyeron de forma rutinaria en parafina. De todas las muestras se realizaron cortes de 4 µm de grosor con un microtomo que se tiñeron con Hematoxilina-Eosina, ácido periódico de Schiff (PAS) y plata metanamina de Grocott para su estudio histológico.

- Tinción hematoxilina-eosina, se seguían los siguientes pasos

El Desparafinado e hidratado de la muestra conlleva la inmersión de la misma en los siguientes reactivos en los tiempos indicados:

- xilol.....15 minutos
- alcohol 100 %..... 5 minutos
- alcohol 96 %..... 5 minutos

-alcohol 70 %..... 5 minutos

-agua..... 5 minutos

A continuación se introducía la muestra en Hematoxilina durante 20 minutos, tras lo cual se realizaba un lavado mediante unas 10 inmersiones en agua destilada. Posteriormente se introducía la muestra en HCl y se sacaba inmediatamente, tras lo que se procedía a un lavado de 10 minutos a chorro con agua destilada. Posteriormente se introducía en eosina durante 7 minutos, tras lo que se lavaba mediante inmersión durante 1 minuto en agua destilada. A continuación procedíamos a la deshidratación de la muestra. Para ello, la introducíamos y la sacábamos rápidamente en Alcohol de 70 y posteriormente en Alcohol de 96. Luego la dejábamos un minuto en Alcohol de 100, la sacábamos y la introducíamos otro minuto en el mismo reactivo. Posteriormente hacíamos la misma acción, meter un minuto, sacar y meter otro minuto en Xilol.

Finalmente montábamos la muestra, colocando un cubreobjetos sobre la muestra.

#### - Tinción PAS

En primer lugar procedíamos a desparafinar e hidratar de la misma manera que se ha indicado para la tinción de hematoxilina eosina (apartado anterior) A continuación introducíamos la muestra en ácido periódico durante 10 minutos, tras lo que lavábamos introduciendo el portaobjetos con la muestra 1 minuto en agua destilada; posteriormente introducíamos el porta en Reactivo de Sachiff 20 minutos y volvíamos a lavar de la misma manera. Posteriormente introducíamos la muestra en Hematoxilina durante 15 minutos tras los que la introducíamos en HCl, sacándola inmediatamente. Volvíamos a lavar de la misma forma descrita y finalmente deshidratábamos y montábamos la muestra tal y como se ha descrito para la tinción anterior.

#### - Tinción Plata Metamina de Grocott

En primer lugar procedíamos a desparafinar e hidratar de la misma manera que se ha indicado para la tinción de hematoxilina eosina.

Posteriormente introducíamos la muestra en Ácido Crómico a 60° C durante 12 minutos, tras lo que realizábamos el lavado, introduciendo la muestra en agua destilada durante 1 minuto. Posteriormente introducíamos la muestra durante 1

minuto en Bosulfito Sódico al 1% durante un minuto y lavábamos de la misma forma. A continuación incubábamos la muestra en solución de Metamina Plata a 60°C durante 20 minutos y lavábamos de nuevo. Realizábamos una nueva incubación, esta vez a temperatura ambiente, en Tiosulfito Sódico al 2% durante un minuto y realizábamos otro lavado en las mismas condiciones mencionadas. Finalmente incubábamos en reactivo Verde luz durante un minuto más, procediendo a otro lavado. La deshidratación y montaje de la muestra se realizaba tal y como se ha descrito en la tinción de Hematoxilina eosina de este mismo apartado.

#### b. Preparación de las muestras para las tinciones histoquímicas

Para las técnicas inmunohistoquímicas utilizaremos cortes de 3 µm de grosor montados en portas previamente lavados con alcohol clorhídrico y tratados con poli-L-lisina al 10% con el objeto de evitar su desprendimiento. Además de ello se realizaba una digestión enzimática de las mismas, utilizando pronasa (Proteasa E, Sigma, St. Louis, USA) en los cortes histológicos previamente desparafinados, con la finalidad de desenmascarar antígenos. Los cortes son incubados durante 10 minutos a temperatura ambiente en la solución enzimática al 0,1 % en PBS.

#### c. Desarrollo de las técnicas inmunohistoquímicas

El protocolo para estas dos técnicas inmunohistoquímicas consiste en los siguientes pasos comunes:

- 1.- Desparafinado mediante tres baños en xilol de 10 minutos cada uno.
- 2.- Inicio de la rehidratación mediante dos baños de 5 minutos cada uno en alcohol etílico de 100°.
- 3.- Inhibición de la peroxidasa endógena mediante un baño en una solución de peróxido de hidrógeno al 3% en metanol durante 30 minutos.
- 4.- Finalización de la rehidratación mediante baños de 5 minutos cada uno en alcoholes de 96°, 70° y agua destilada.
- 5.- Lavado en PBS durante 5 minutos.

6.- Digestión enzimática con pronasa al 0'1% en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente.

7.- Tres lavados en PBS de 10 minutos.

8.- Incubación en cámara húmeda con suero normal de cabra al 5% en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente.

9.- Retirada del exceso de suero normal de cabra e incubación durante 18 horas en cámara húmeda a 4°C con el anticuerpo primario diluido en PBS y suero normal de cabra al 5%.

10.- Tres lavados de 5 minutos en PBS.

11.- Los cortes fueron incubados con el anticuerpo secundario conjugado con biotina, diluido en PBS y suero normal de cabra al 5% durante 30 minutos a temperatura ambiente.

12.- Dos lavados de 5 minutos en PBS.

13.- Incubación de los cortes con el complejo Avidina-biotina-peroxidasa (ABC) diluido 1:50 en PBS en cámara húmeda durante 1 hora y en oscuridad.

14.- Tres lavados de 8 minutos en TBS.

15.- La reacción fue revelada mediante un pase de 1 minuto en una solución fresca de diaminobencidina al 0'035% en TBS con presencia de peróxido de hidrógeno al 0'1% y sobre fondo blanco.

16.- Frenado de la reacción con agua corriente durante 10 minutos.

17.- Contratinción con hematoxilina durante 1 minuto, deshidratación y montaje DPX según el procedimiento habitual.

#### d. Controles negativos

Para detectar posibles reacciones inespecíficas en el desarrollo de las técnicas se emplearon controles negativos que fueron cortes seriados en los que los anticuerpos primarios fueron sustituidos por suero normal de cabra al 10% en PBS.

#### f. Controles positivos

Para asegurar que la técnica se ha desarrollado correctamente se emplearon cortes de ganglio linfático humano en los que previamente se había testado que todos los anticuerpos funcionaban correctamente.

### **17. ESTUDIO RADIOLÓGICO DE ANIMALES INFECTADOS.**

Para la realización del estudio radiológico en ratas infectadas, estas fueron trasladadas a la Unidad de Diagnóstico por Imagen de la Cátedra de Cirugía y Rehabilitación, departamento de Medicina y Cirugía Animal, de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid.

#### **17.1. Materiales**

- Las placas fueron realizadas con los animales anestesiados (200 µl de Ketamina 50 / Xilacina; 5/1 i.p.).
- Generador de Rayos X: DIAGNOST 93, (Philips Medical Systems Nederland).
- Casete (chasis) KODAK (Eastman Kodak Company, Health Imaging, Rochester, New York)
- Pantallas intensificadoras KODAK (Eastman Kodak Company, Health Imaging, Rochester, New York).
- Reveladora KODAK X-OMAT (Eastman Kodak Company, Health Imaging, Rochester, New York )

#### **17.2. Metodología**

Los valores de voltaje y amperaje utilizados en las radiografías en cada caso fueron los siguientes. Realizamos dos proyecciones de la región torácica de los animales:

Proyección latero-lateral: 42Kv 2'5mA

Proyección dorso-ventral: 44Kv 2'5mZ

## **18. MODELOS ANIMALES DE ASPERGILOSIS INVASORA**

### **18.1 Materiales:**

#### **a. Animales:**

- Ratas: Sprague Dawley macho de entre 180 y 200 gramos de peso al inicio de los experimentos (Harlan France, Gannat, Francia).
- Ratones: CD-1 machos de entre 18 y 20 gramos de peso al inicio de los experimentos (Harlan France, Gannat, Francia).

#### **b. Animalario:**

Instalaciones de laboratorios GlaxoSmithKline, (Tres Cantos, Madrid), que incluyen:

- Jaulas de estabulamiento (Tecniplast, Barcelona, España)
  - Para ratón, dimensiones: 42'5 x 26'6 x 15 cm con filtro de cobertura
  - Para rata, dimensiones: 48 x 27 x 20 cm con filtro de cobertura.
- Cama: De médula de maíz (Panlab, Barcelona, España), esterilizada en autoclave, libre de polvo.
- Dieta: De mantenimiento CRM- $\gamma$ -irradiada (Panlab, Barcelona, España)
- Las condiciones generales de estabulación en las que los animales se encontraban eran:
  - Ciclo circadiano de luz: 12h luz/ 12 h oscuridad, gradual, 500-700 lux.
  - Temperatura ambiental entre 20° y 22° C.
  - Humedad relativa del aire: 55  $\pm$  15 %.
  - Renovaciones de aire en las habitaciones: entre 15 y 20 renovaciones / hora.

#### **c. Inoculación**

- Cepa de *A. fumigatus* 48238E, que forma parte de la colección de cultivos de GlaxoSmithKline.
- Caldo de Sabouraud Dextrosa (Oxoid; Basingstoke, Reino Unido).
- Sabouraud Agar Dextrosa (Oxoid; Basingstoke, Reino Unido).
- Agar Patata (Oxoid; Basingstoke, Reino Unido).
- Caldo de Czapek Dox (Difco; Detroit, USA).
- Glucosa (Oxoid; Basingstoke, Reino Unido).

- PBS con tween al 0'05%.
  - Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-2H<sub>2</sub>O (Sigma, St. Louis, USA) ..... 1'79 g
  - NaCl (Sigma, St. Louis, USA) ..... 9 g
  - Polisorbato 20 (Tween 20) (Sigma, St. Louis, USA) ..... 0'5 ml
  - Agua destilada ..... 1 L
- Cámara de Neubauer (Brand, Meriden, Connecticut, USA)
- Juego de micropipetas P-1000, p-200, p-20 y p-2 y puntas (Gilson, Middleton, USA).
- Aguja con funda de teflón (Terumo, Leuven, Bélgica)
- Plano inclinado: Manufacturado por los servicios de mantenimiento de Glaxo Smith Kline.
- Ketamina 50 (Imalgene), (Rhône Merieux, Lyon, Francia)
- Xilacina (Rompún), (Bayer Wuppertal-Barmen, Alemania)
- Isoflorano; (Forane), (Abbott, Illinois, USA)

#### d. Toma de muestras

- Pentobarbital Sódico (Eutalender), (Abbott, Illinois, USA)
- Tubos para obtención de suero (Started, Granollers, España)
- Tubos para estudio hematológico con EDTA (Started, Granollers, España)
- Agujas de tamaños 21G y 19G (Terumo, Leuven, Bélgica)
- Jeringas (1ml, 2ml, 5ml y 10ml) (Becton Dicknson, Madrid, España)
- Material quirúrgico (Chifa Trimédica, Madrid, España)
- Fotografía: Cámara digital ePhoto 1680/PAL y software (Agfa, Tokyo Japón)
- Contador Hematológico (Serono System 9020, Menarini Diagnostics, Firenze, Italia)
- Centrífuga modelo Avanti 30 (Beckman, Fullerton CA, USA)
- Tubos eppendorf (1'5 ml) (Westbury, N.Y, USA)
- Formaldehído tamponado al 10% (Panreac, Barcelona, España)

#### e. Inmunosupresión y terapia antibiótica

- Dexametasona, ampollas de 1 ml (1g/ml) (Bayer Wuppertal-Barmen, Alemania)
- Ciclofosfamida (Genoxal, Prarfarma, Barcelona, España)
- Terramicina en polvo (Pfizer, New York, USA)

## 18.2. Métodos

### a. Preparación del inóculo fúngico:

#### a.1. Inóculo de conidias :

A partir de la cepa de *A. fumigatus* 48238, realizábamos una siembra en Agar de Sabouraud e incubábamos a 37°C durante cuatro días, tras los cuales resembrábamos en Agar Patata en tubo inclinado e incubábamos otros cuatro días a 37°C. Una vez crecido el micelio recogíamos las conidias mediante la adición de 15 ml de PBS con el 0'05% de Tween 20 y posterior agitación. Obtenidas las conidias realizábamos diluciones y contábamos en cámara hematológica (cámara de Neubauer) con el fin de ajustar el inóculo (como se explicó en el apartado 10.2)

#### a.2. Inóculo de hifas (micromicelios):

A partir de la cepa *A. fumigatus* 48238, realizábamos una siembra en Agar de Sabouraud e incubábamos a 37° C durante cuatro días, tras los cuales resembrábamos en Agar Patata en tubo inclinado e incubábamos otros cuatro días a 37°C. Una vez crecido el micelio recogíamos las conidias mediante la adición de 15 ml de PBS con el 0'05% de Tween 20 al tubo de Agar patata y posterior agitación. Obtenidas las conidias realizábamos una siembra en Czapek-Glucosa (4%) e incubábamos en agitación a 30°C durante 16 horas, tras las que eliminábamos el medio después de una centrifugación a 1000g durante 3 minutos. Los micromicelios eran resuspendidos en PBS con el 0'05% de Tween 20 y colocados en una placa de Petri. Con la ayuda de una lupa y mediante una pipeta p-20, recogíamos 20 µl de PBS con el 0'05% de Tween 20, en los que se encontraban entre 12 y 15 micromicelios, que contábamos al microscopio. Dichos micromicelios eran depositados en un tubo eppendorf, al que añadíamos 180µl de caldo de Czapek dox conteniendo un 40 por mil de Agar, a una temperatura de 50°C. Inmediatamente, con objeto de no dejar bajar la temperatura, recogíamos la mezcla en la punta de una jeringa de 1ml, dejando el resto superior de la jeringa lleno de aire. Una vez así dejábamos enfriar a temperatura ambiente antes de inocular.



## b. Inoculación en rata

### b.1. Inoculación intratraqueal:

El animal anestesiado con 200 µl de Ketamina 50 / Xilacina; 5/1 i.p. se colocaba sobre un plano inclinado (45°), sujeto por los dientes incisivos superiores en una barra metálica colocada en la parte superior de dicho plano. En la zona de la laringe e inicio de la tráquea, colocábamos la fuente de luz fría, de manera que al retirar la lengua de la cavidad bucal se pudiesen observar los cartílagos laríngeos. Introducíamos una sonda de rata en la tráquea del animal, de manera que pudiésemos introducir el inóculo a través de ella. El volumen inoculado era de 100 µl de la suspensión de conidias, que ocupaban la parte inferior de una jeringa de insulina, cuyo restante volumen estaba ocupado por aire. En el momento de la inoculación se vaciaba toda la jeringa, de manera que en primer lugar entrase el inóculo, que es totalmente expulsado de la jeringa por el aire.

### b.2. Inoculación transtorácica:

Consideramos la descripción de este método como resultado de este trabajo, siendo detalladamente descrito en dicho apartado.

Con el animal anestesiado y colocado en la misma postura en el plano inclinado que en el caso anterior, se procedía a introducir un vástago metálico en la tráquea del animal. A continuación se intubaba al animal con la parte de teflón de un catéter tipo 14G utilizando el vástago como guía. Una vez introducido el catéter en la tráquea, se retiraba el vástago y se colocaba al animal en posición horizontal y en decúbito supino. En ese momento, mediante la aplicación de una jeringa sobre el catéter, se forzaba una inspiración mediante la introducción de unos 4 cm<sup>3</sup> de aire, momento en el que se procedía a pinchar con la aguja en el hemitórax derecho del animal, como a un centímetro lateral al esternón y algo más craneal al cartílago xifoides. Previamente, en el cono de la aguja, tipo 23G, con que estamos pinchando, habíamos introducido una gota de solución salina, de manera que obturase dicho cono, de manera que cualquier diferencia de presión entre la punta de la aguja y el exterior, pudiera ser determinada mediante el movimiento de dicha gota. La presión positiva que existe dentro de la cavidad torácica arrojará la gota fuera del cono, de manera que nos estará indicando que la punta de la aguja se encuentra en dicha cavidad, donde procederemos a colocar el inóculo. Este inóculo tenía un volumen de 200µl y se hallaba en la parte inferior

de una jeringa de insulina (1ml) que tenía lleno de aire el resto de su capacidad. Se procedía a introducir el inóculo, que era empujado gracias al aire que hay en la jeringa.

### b.3. Protocolo de Inmunosupresión.

Este protocolo varía ligeramente en los diferentes modelos estudiados, de manera que aquí definiremos un protocolo general que queríamos seguir.

La inmunosupresión se realizaba mediante la adición de Dexametasona a 2 o 4 mg/l (según el modelo) en agua de bebida durante la semana anterior a la inoculación y de 2 o 4 mg/l (según el modelo) desde el día de la inoculación hasta el final del experimento.

### c. Inoculación en ratón.

#### c.1. Inoculación intratraqueal

Con el animal anestesiado con 50 µl de Ketamina 50 / Xilacina; 5/1 i.p. se realizaba una pequeña incisión en la piel de la zona ventral del cuello, y se disecaban los distintos músculos de la zona hasta hallar la tráquea, que es exteriorizada. Los 30 µl del inóculo de suspensión de conidias se introducen directamente en la tráquea pinchando con aguja y jeringa.

#### c.2. Inoculación intranasal

Con el animal anestesiado (anestesia inhalatoria: Isoflurano; Forane®) y en posición vertical, procedemos a introducir 30 µl de inóculo directamente en la fosa nasal del animal aprovechando el momento de la inspiración para hacerla penetrar. Para ello utilizamos una pipeta p-200 y sus puntas correspondientes. Una vez el animal ha inspirado el inóculo, introducimos 5µl de solución salina en la fosa nasal, con el fin de arrastrar la parte del inóculo que pudiera quedar en las fosas nasales.

#### c.3. Protocolo de Inmunosupresión:

Este protocolo varía ligeramente en los diferentes modelos estudiados, de manera que aquí definiremos un protocolo general.

La inmunosupresión en ratones se realizaba inyección intraperitoneal de 0'5 ml de Ciclofosfamida a una concentración de 200 mg/ml tres días antes de la inoculación y 100

mg/ml el día de la inoculación, y mediante la administración de Dexametasona a 2 mg/l en agua de bebida durante la semana anterior a la inoculación y de 4 mg/l desde el día de la inoculación hasta el final del experimento.

#### d. Sacrificio de los animales

Se lleva a cabo mediante inyección intraperitoneal de Pentobarbital sódico a dosis de 200 mg/kg (rata y ratón) y posterior dislocación cervical.

#### e. Toma de muestras y evaluación de variables:

##### e.1. Tiempo de supervivencia:

Se realizó la supervisión diaria de las jaulas, con evaluación de signos y síntomas clínicos, eliminación de cadáveres y sacrificio de moribundos.

##### e.2. Extracción de muestras:

- a) Sangre de animal vivo (Rata): Procedíamos a extraer entre 0'3 y 0'5 ml de sangre de la vena lateral de la cola de las ratas.
- b) Sangre de animal sacrificado (Rata o ratón): Punción cardíaca y sangrado. Parte era introducida en tubos con EDTA para su estudio hematológico y parte en tubos para la obtención de suero.
- c) Lavado Bronco alveolar: De los animales sacrificados extraíamos corazón y pulmones. A partir de estos realizábamos el lavado broncoalveolar, introduciendo 2'5 ml de PBS estéril, mediante una sonda, a través de la tráquea. A continuación se aspiraba con la jeringa y se volvía a introducir el volumen extraído; esta operación se repetía cinco veces. El volumen final extraído era colocado en el interior de un tubo eppendorf estéril para su posterior estudio.
- d) Orina. Por punción vesical en animal sacrificado y conservada en refrigeración en tubos eppendorf convenientemente rotulados.

- e) Visceras. Tras el sacrificio del animal se procedía a realizar la apertura de las cavidades abdominal, torácica y craneal. Los órganos extraídos en todos los animales sacrificados fueron: pulmones, corazón, bazo, hígado (o lóbulo hepático) riñones y encéfalo. El resto de órganos eran extraídos únicamente en caso de apreciar alguna lesión macroscópica.

### e.3. Procesado de las muestras:

- a) Procesado de la sangre: La sangre destinada al estudio hematológico era mezclada cuidadosamente con el anticoagulante presente en el tubo y procesada en el contador hematológico.

La sangre destinada a la obtención de suero, se dejaba reposar a temperatura ambiente durante dos horas (aprox.), tras lo que era refrigerada durante 18-24 horas y posteriormente centrifugada a 3000 g durante 10 minutos a 4°C. El suero (sobrenadante) era introducido, mediante una micropipeta, en tubos eppendorf convenientemente rotulados y refrigerado para su utilización inmediata. Para su posterior almacenamiento el suero era congelado a -20°C durante 24 horas y finalmente conservado a -70°C.

- b) Procesado macroscópico de las vísceras:

Todas las vísceras extraídas fueron fotografiadas y posteriormente sumergidas en formaldehído tamponado al 10% para su posterior estudio histopatológico.



## **C. RESULTADOS**



## **1. INFLUENCIA DEL MEDIO DE CULTIVO EN LA ESTRUCTURA ANTIGÉNICA DE *A. fumigatus***

### **1.1. Características del crecimiento**

Como ya hemos mencionado anteriormente, la cepa utilizada para la obtención de extractos proteicos fue, en todos los casos, la cepa de *Aspergillus fumigatus* 48238E, aislada a partir de un caso humano de Aspergilosis Invasora y obtenida a partir de la colección de cultivos de GlaxoWellcome.

Los medios en los que se sembró el hongo fueron los mismos tanto para la obtención de proteínas del micelio, como del filtrado del medio, es decir, Sabouraud, Czapek-Dox, RPMI, RPMI+Suero y Medio Mínimo, todos ellos medios líquidos.

En el caso de procederse al cultivo en agitación, con el fin de obtener el micelio del hongo, las características macroscópicas de las bolas de hifas (pellets) que se formaban eran diferentes en los distintos medios.

- \* En el caso del RPMI, el crecimiento fue escaso, tanto por el número de las bolas de hifas formadas como por su tamaño, que no superaba el milímetro tras los cinco días de incubación, había muy escaso número de ellas y de color verdoso claro.
- \* En RPMI+Suero (RPMI+S) el número de bolas que crecieron fue sensiblemente mayor, llegando a alcanzar los 2 o 3 mm de diámetro y de un color verde intenso.
- \* En Medio Mínimo (MM) el tamaño de las bolas fue similar al obtenido en RPMI+Suero, sin embargo su color era blanquecino y su número mucho mayor que en el caso de RPMI+Suero.
- \* Tanto en Sabouraud (SAB) como en Czapek (CZ) el crecimiento fue mayor que en cualquiera de los casos anteriores, tanto en número como en tamaño de las bolas, que eran de un color verdoso más intenso en el caso de Sabouraud. Como diferencias hemos de indicar que el número de bolas y su tamaño fue algo mayor en el caso de Sabouraud.

El crecimiento del hongo en estático, fue parecido en todos los medios, con mayor desarrollo del micelio fúngico en Sabouraud, seguido de Czapek, Medio Mínimo y RPMI+Suero, y por último RPMI, con muy escaso crecimiento por parte del hongo.



## 1.2. Contenido proteico.

Mediante el método de Bradford se determinaron las concentraciones de proteínas presentes en los distintos extractos, que se indican en la Tabla 1:

Tabla 1. Contenido proteico de los diferentes extractos antigénicos obtenidos.

Extractos miceliarios					Extractos del filtrado				
SAB	MM	CZ	RPMI	RPMI+S	SAB	MM	CZ	RPMI	RPMI+S
4'80	0'09	0'46	0'15	20'00	6'00	0'24	1'20	0'26	3'47

SAB : Sabouraud ; CZ : Czapek ; MM : Medio Mínimo y RPMI+S: RPMI + Suero

## 1.3. SDS-Page

Se realizaron los perfiles de los extractos obtenidos a partir del micelio del hongo crecido en RPMI+S, RPMI, MM, CZ y SAB, así como del filtrado del día 21 de los medios SAB y CZ. Las bandas obtenidas, así como su peso molecular en KiloDaltons se detallan en la Tabla 2; y los geles se reflejan en las figuras 1 y 2.

Tabla 2. Peso molecular (kDa) de las bandas presentes en el perfil proteico de los extractos antigénicos de *A. fumigatus* 48238 crecido en distintos medios.

<b><u>CZ-Micelio:</u></b>	89'2	79'0	62'7	58'4	52'4	42'2			
<b><u>CZ'- Micelio*:</u></b>	88'4	77'1	62'4	56'2	51'0	41'9			
<b><u>SAB-Micelio:</u></b>	89'2	61'6	74'1	60'7	56'5	52'7	47'3	43'6	42'5
	40'2	39'0	37'3	35'4	34'9	30'3	28'0	24'9	20'6
<b><u>RPMI+S-Micelio:</u></b>	94'1	83'1	65'4	57'1					
<b><u>RPMI-Micelio:</u></b>	56'3	27'9	21'6						
<b><u>MM-Micelio:</u></b>	90'7	72'7							
<b><u>SAB-Filtrado +21:</u></b>	196'0	115'0	96'6	91'3	80'3	65'8	59'1	55'0	41'5
	38'7	35'8	34'1	24'9	23'8				
<b><u>CZ-Filtrado +21:</u></b>	109	93'4	90'3	36'5					

\*Se realizó una segunda banda con el antígeno miceliar obtenido en Czapek-Dox

SAB : Sabouraud ; CZ : Czapek ; MM : Medio Mínimo y RPMI+S: RPMI + Suero

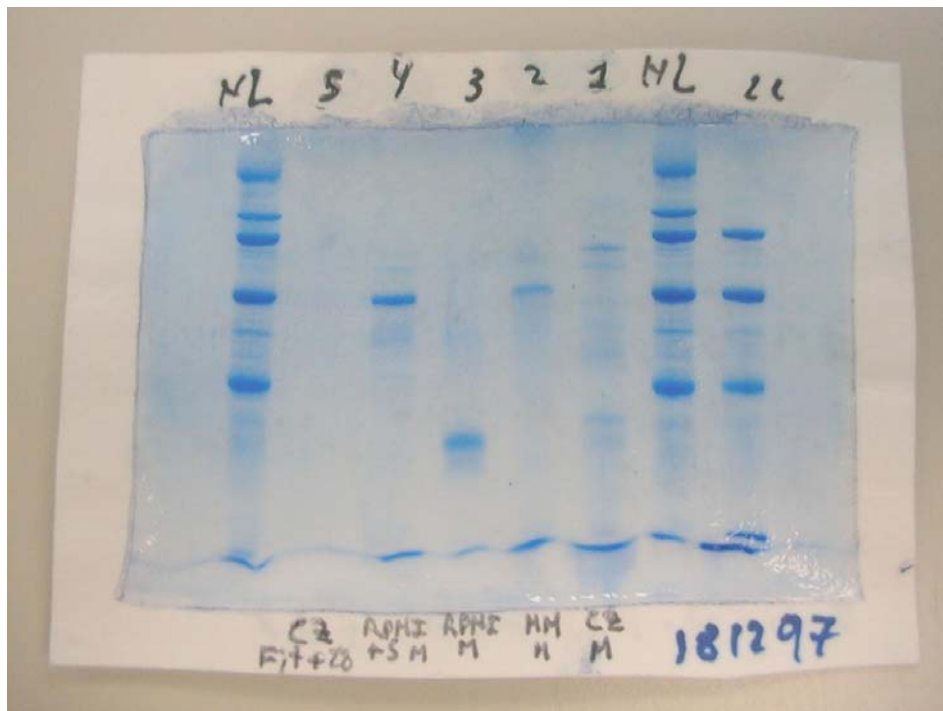


Figura 1, Gel de poliacrilamida 1. Antígenos contenidos en cada calle: 1. Miceliar en Czapek, 2. Miceliar en Medio Mínimo, 3. Miceliar en RPMI, 4. Micelio, RPMI+Suero y 5. Filtrado de 28 días, Czapek

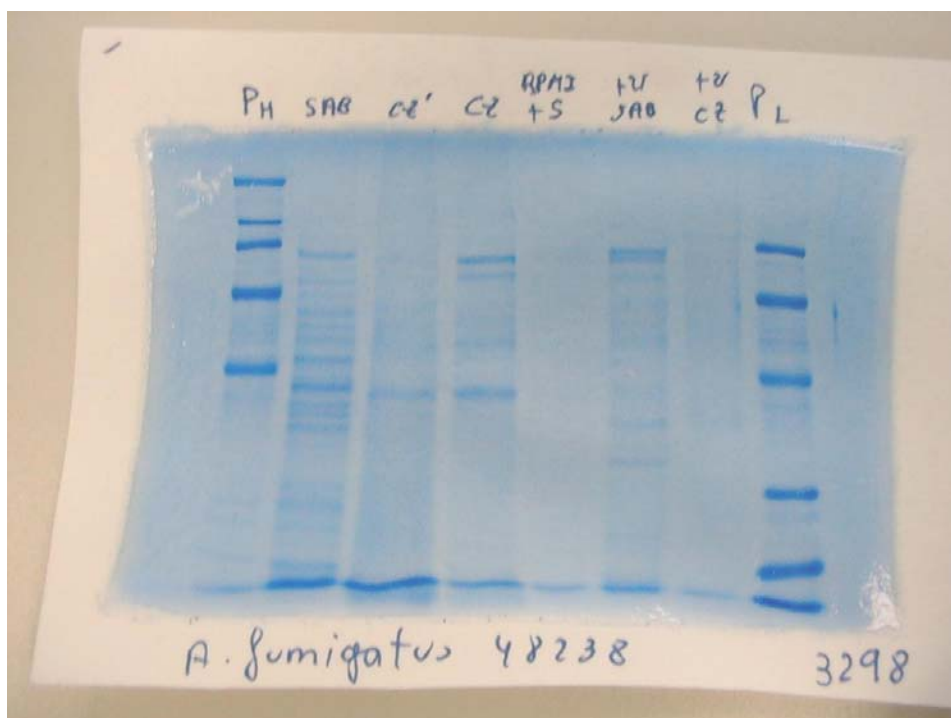


Figura 2, Gel de poliacrilamida 2. Antígenos contenidos en cada calle. SAB: Micelio de Sabouraud, CZ y CZ': Micelio de Czapek, RPMI+S: Micelio en RPMI+Suero +21SAB: Filtrado del día 21 en Sabouraud y +21 CZ: Filtrado de Czapek -Dox del día 21.

#### 1.4. ELISA con suero hiperinmune

A partir del suero hiperinmune obtenido en conejos mediante la administración de extractos proteicos de micelio de *A. fumigatus* 48238 crecido en medio Czapek (CZ) (Conejo 1) y en Sabouraud (Conejos 2, 3 y 4), se realizó una técnica ELISA indirecto con el fin de detectar la presencia de anticuerpos Anti-*Aspergillus* presentes en dicho suero. Los pocillos estaban tapizados con extractos antigénicos procedentes del micelio de esta misma cepa crecida en Medio Mínimo, Sabouraud, Czapek dox (CZ y CZ'), RPMI y RPMI+S. En la prueba se testaron los sueros que habían ido siendo extraídos a lo largo del periodo de inmunización, de manera que el suero extraído el día 0 procede del periodo anterior al comienzo de la inmunización. Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas 3, 4, 5 y 6, y en las Gráficas 1, 2, 3 y 4:

Tabla 3. En la siguiente tabla se muestran las densidades ópticas para Suero del Conejo 1 (CZ - Micelio) cuando se enfrenta a los diferentes antígenos en el ELISA:

<b>CONEJO 1</b>	<b>MM</b>	<b>SAB</b>	<b>CZ</b>	<b>RPMI</b>	<b>RPMIS</b>	<b>CZ'</b>
<b>dia 0</b>	0'053	0'044	0'044	0'048	0'049	0'091
<b>dia 15</b>	0'154	0'064	0'292	0'047	0'058	0'257
<b>dia 30</b>	0'042	0'045	0'050	0'044	0'054	0'048
<b>dia 45</b>	0'347	0'118	0'454	0'082	0'063	0'514
<b>dia 60</b>	0'554	0'216	0'686	0'117	0'069	0'605
<b>dia 75</b>	0'426	0'191	0'724	0'110	0'073	0'508

MM: Medio Mínimo; SAB: Sabouraud; CZ: Czapek dox procedente de una primera extracción, CZ': Czapek dox, procedente de una segunda extracción, RPMI: Medio RPMI y RPMIS: Medio RPMI con suero.

Tabla 4. En esta tabla se muestran las densidades ópticas para el suero del Conejo 2 (SAB-Micelio) cuando se enfrenta a los diferentes antígenos presentes en el ELISA:

<b>CONEJO 2</b>	<b>MM</b>	<b>SAB</b>	<b>CZ</b>	<b>RPMI</b>	<b>RPMIS</b>	<b>CZ'</b>
<b>dia 0</b>	0'046	0'049	0'046	0'049	0'059	0'086
<b>dia 15</b>	0'067	0'082	0'067	0'058	0'058	0'061
<b>dia 30</b>	0'044	0'043	0'040	0'054	0'049	0'048
<b>dia 45</b>	0'159	0'079	0'095	0'063	0'054	0'085
<b>dia 60</b>	0'195	0'112	0'102	0'069	0'057	0'102
<b>dia 75</b>	0'186	0'129	0'132	0'048	0'062	0'099

MM: Medio Mínimo; SAB: Sabouraud; CZ: Czapek dox procedente de una primera extracción, CZ': Czapek dox, procedente de una segunda extracción, RPMI: Medio RPMI y RPMIS: Medio RPMI con suero.

Tabla 5. En la siguiente tabla se muestran las densidades ópticas para Suero del Conejo 3 (SAB-Micelio) cuando se enfrenta a los diferentes antígenos en el ELISA:

<b>CONEJO 3</b>	<b>MM</b>	<b>SAB</b>	<b>CZ</b>	<b>RPMI</b>	<b>RPMIS</b>	<b>CZ'</b>
<b>dia 0</b>	0'000	0'005	0'019	0'002	0'000	0'006
<b>dia 15</b>	0'020	0'064	0'016	0'006	0'012	0'010
<b>dia 30</b>	0'313	0'172	0'220	0'005	0'009	0'220
<b>dia 45</b>	0'503	0'342	0'569	0'086	0'050	0'513
<b>dia 60</b>	0'678	0'419	0'674	0'114	0'103	0'621
<b>dia 75</b>	0'716	0'400	0'669	0'117	0'087	0'633

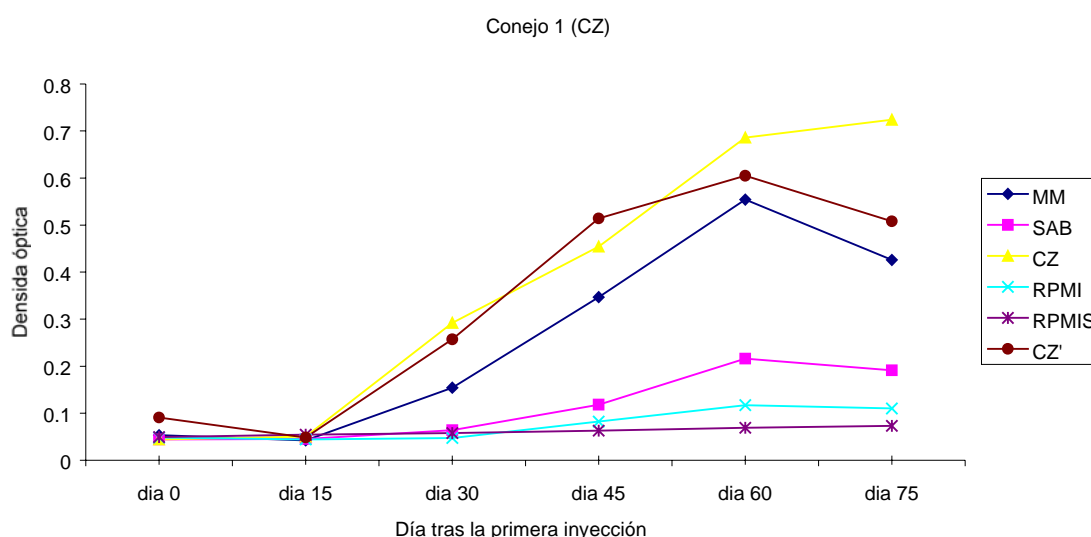
MM: Medio Mínimo; SAB: Sabouraud; CZ: Czapek dox procedente de una primera extracción, CZ': Czapek dox, procedente de una segunda extracción, RPMI: Medio RPMI y RPMIS: Medio RPMI con suero.

Tabla 6. Esta tabla muestra las densidades ópticas para Suero del Conejo 4 (SAB-Micelio) cuando se enfrenta a los diferentes antígenos en el ELISA:

CONEJO 4	MM	SAB	CZ	RPMI	RPMIS	CZ'
<b>dia 0</b>	0'008	0'009	0'004	0'004	0'009	0'009
<b>dia 15</b>	0'009	0'048	0'014	0'010	0'007	0'019
<b>dia 30</b>	0'078	0'046	0'051	0'005	0'005	0'046
<b>dia 45</b>	0'530	0'194	0'212	0'008	0'022	0'189
<b>dia 60</b>	0'700	0'291	0'422	0'023	0'035	0'324
<b>dia 75</b>	0'749	0'356	0'541	0'041	0'057	0'435

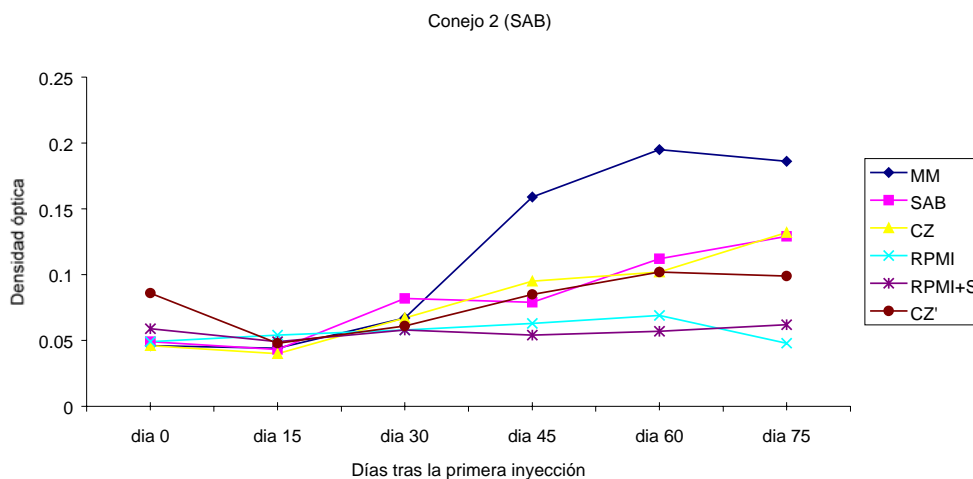
MM: Medio Mínimo; SAB: Sabouraud; CZ: Czapek dox procedente de una primera extracción, CZ': Czapek dox, procedente de una segunda extracción, RPMI: Medio RPMI y RPMIS: Medio RPMI con suero.

Gráfica 1: Evolución de las D.O. obtenidas por el suero hiperinmune procedente del Conejo 1 que fue inmunizado con extracto de micelio de *A. fumigatus* crecido en Czapek dox. El suero se testó por la técnica de ELISA indirecto en la que se emplearon tapizados procedentes de 6 extractos antigénicos de *A. fumigatus* crecido en diferentes medios.



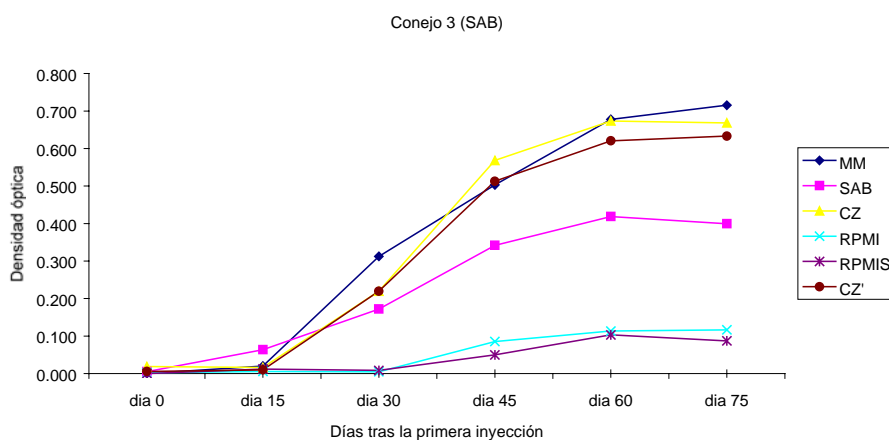
MM: Medio Mínimo; SAB: Sabouraud; CZ: Czapek dox procedente de una primera extracción, CZ': Czapek dox, procedente de una segunda extracción, RPMI: Medio RPMI y RPMIS: Medio RPMI con suero.

Gráfica 2: Evolución de las D.O. obtenidas por el suero hiperinmune procedente del Conejo 2 que fue inmunizado con extracto de micelio de *A. fumigatus* crecido en Sabouraud. El suero se testó por la técnica de ELISA indirecto en la que se emplearon tapizados procedentes de 6 extractos antigénicos de *A. fumigatus* crecido en diferentes medios.



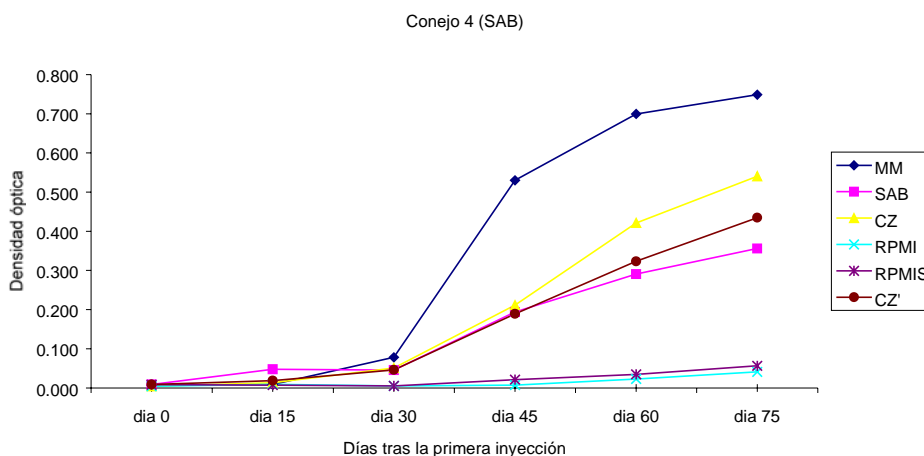
MM: Medio Mínimo; SAB: Sabouraud; CZ: Czapek dox de una primera extracción, CZ': Czapek dox, procedente de una segunda extracción, RPMI: Medio RPMI y RPMIS: Medio RPMI con suero.

Gráfica 3: Evolución de las D.O. obtenidas por el suero hiperinmune procedente del Conejo 3 que fue inmunizado con extracto de micelio de *A. fumigatus* crecido en Sabouraud. El suero se testó por la técnica de ELISA indirecto en la que se emplearon tapizados procedentes de 6 extractos antigénicos de *A. fumigatus* crecido en diferentes medios.



MM: Medio Mínimo; SAB: Sabouraud; CZ: Czapek dox procedente de una primera extracción, CZ': Czapek dox, procedente de una segunda extracción, RPMI: Medio RPMI y RPMIS: Medio RPMI con suero.

Gráfica 4: Evolución de las D.O. obtenidas por el suero hiperinmune procedente del Conejo 4 que fue inmunizado con extracto de micelio de *A. fumigatus* crecido en Sabouraud. El suero se testó por la técnica de ELISA indirecto en la que se emplearon tapizados procedentes de 6 extractos antigénicos de *A. fumigatus* crecido en diferentes medios.



MM: Medio Mínimo; SAB: Sabouraud; CZ: Czapek dox de una primera extracción, CZ': Czapek dox, procedente de una segunda extracción, RPMI: Medio RPMI y RPMIS: Medio RPMI con suero.

### 1.5. Western - Blot

A partir de los antígenos miceliares de *A. fumigatus* crecidos tanto en Sabouraud, como en las dos extracciones diferentes de Czapek dox y en RPMI adicionado de suero, se corrió un gel de poliacrilamida y se realizó la transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa. Sobre este soporte proteico se realizó el inmunoblot utilizando suero hiperinmune procedente del conejo 4, que había sido inmunizado con antígeno procedente del micelio de *A. fumigatus* crecido en Sabouraud. Todas las bandas presentes en la membrana de nitrocelulosa reaccionaron con el suero hiperinmune del animal, es decir, que todas las proteínas presentes en el extracto antigénico miceliar del hongo crecido en Sabouraud actúan como antígenos frente a los que se producen anticuerpos. En el caso de Sabouraud se pueden distinguir una gran cantidad de bandas, siendo especialmente intensas las obtenidas entre los 116 y 200 kDa y ligeramente por debajo de los 66 kDa. Además existe una banda intensa y amplia, que ocupa el espacio alrededor de los 116 kDa. La reacción del suero con el antígeno crecido en Czapek es muy intensa y no permite distinguir bandas. En el caso del RPMI

adicionado de suero, aparece una banda de especial intensidad cercana a los 200 kDa. Entre los 116 y los 97 kDa se distinguen otras cuatro bandas. De manera consecutiva de mayor a menor peso molecular distinguimos dos de ellas justo por debajo de los 116 kDa, intensas y bien delimitadas y otras dos más difusas y amplias.



Figura 3: Wester Blot en el que se enfrentó el suero hiperinmune procedente del conejo 4 a cuatro extractos antigénicos procedentes de *A. fumigatus*: SAB extracto miceliar procedente del micelio crecido en Sabouraud, CZ y CZ': extracto miceliar procedente del micelio crecido en Czapek dox (en dos extracciones diferentes, CZ y CZ') y RPMI+S: extracto miceliar procedente del micelio crecido en RPMI adicionado de suero.

## 2. CRECIMIENTO DE *A. fumigatus* EN CULTIVO CELULAR

En este experimento realizamos la inoculación de conidias de *A. fumigatus* en un cultivo celular con el fin de comprobar la morfología que adoptaba el hongo en estas condiciones. Para ello utilizamos una línea celular compuesta por pneumocitos de rata, células presentes en el pulmón de estos animales. Por lo tanto el hongo crecía en un medio celular parecido al pulmonar, pero carente de la estructura que proporciona el estroma de dicho órgano. El objetivo consistía en observar el crecimiento del hongo en estas condiciones a las 3, 6, 12 y 24 horas tras ser inoculado, con el fin de detectar las



distintas fases de este crecimiento. La inoculación del hongo se produjo a una concentración de  $10^4$  conidias/ml en placas de 12 pocillos donde crecían las células en una monocapa.

Los efectos del crecimiento del hongo no son visibles a las tres horas tras la inoculación.

A las seis horas se aprecian signos de daño y muerte tisular, con células picnóticas, células no adheridas al soporte y zonas sin crecimiento. Se observan escaso número de conidias germinadas e hifas.

La observación a las doce horas arroja un mayor daño tisular y el desarrollo de las hifas es todavía escaso.

A las veinticuatro horas se observa gran daño celular así como un considerable desarrollo de las hifas. Microscópicamente se observan hifas que se distribuyen en desordenadas madejas, formando escasas ramificaciones con distintos ángulos. A pesar de que no se observan conidióforos, en algunos puntos de las hifas se observan unas pequeñas ramificaciones de aspecto globoso, parecidas a un tipo de esporas especiales denominadas aleurioporas.

### 3. **MODELOS ANIMALES DE Aspergilosis INVASORA**

#### **3.1 Modelos en ratón**

##### **a. Inoculación intranasal e intratraqueal**

En nuestro laboratorio desarrollamos dos modelos de Aspergilosis Invasora pulmonar en ratón. En uno de ellos realizamos una inoculación intranasal, aprovechando la inspiración del animal mientras que en el otro realizamos la inoculación por inyección intratraqueal de conidias de *A. fumigatus*. Se inocularon, en ambos casos, 30  $\mu$ l de una suspensión de  $7.8 \times 10^5$  conidias de *A. fumigatus* 48238 por mililitro.

En ambos grupos se llevó a cabo el estudio del porcentaje de supervivencia de los animales, completado con el sacrificio periódico de algunos animales a los que se les extrajo sangre con el fin de realizar un estudio hematológico, así como para obtener suero para la detección de Galactomanano mediante un test ELISA Sandwich (Platelia<sup>®</sup>) Así mismo se extrajeron distintos órganos de los animales sacrificados, a partir de los que se realizaron cultivos microbiológicos cuantitativos.

La inmunosupresión se realizó mediante la adición de Dexametasona en agua de bebida, y Ciclofosfamida intraperitoneal. Con el fin de provocar irritación en las vías respiratorias de los animales, estos fueron introducidos en una campana que contenía paños humedecidos en éter.

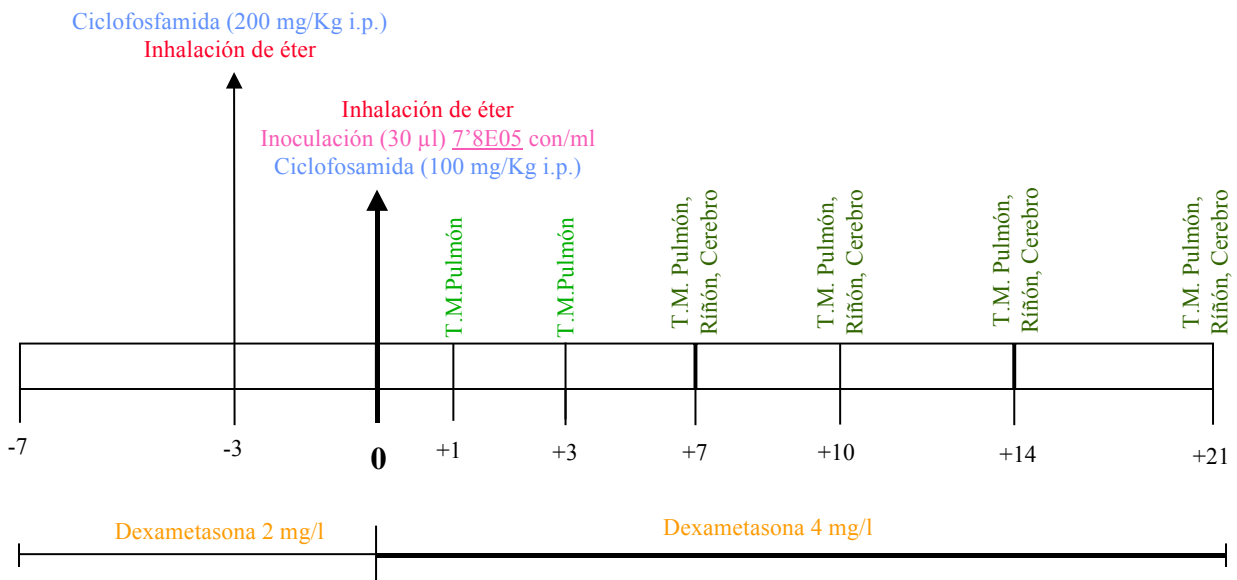
El grupo control, constituido por animales no inoculados, recibió igual inmunosupresión e inhalación de éter. La supervivencia de este grupo fue del 100% a los 21 días. No se encontraron cultivos positivos en los órganos de estos animales. De ellos no se realizó hematología ni detección de Galactomanano en suero.

El esquema de este experimento está indicado en la figura 1.

Los resultados de supervivencia de ambos grupos, así como del recuento de leucocitos en sangre periférica, lo que nos da una idea de la inmunosupresión alcanzada, se expresan en la gráfica 5 y la Tabla 7a.

Los resultados de recuentos en órganos se expresan en la tabla 7b y los de Galactomanano en suero de los sacrificados en la tabla 8.

Figura 1: Esquema del experimento de Aspergilosis Invasora en modelo de inoculación intranasal e intratraqueal en ratón:



T.M.: Toma de Muestras

Gráfica 5: SE refleja la supervivencia de los animales. IN: Inoculación intranasal, IT: Inoculación Intratraqueal.

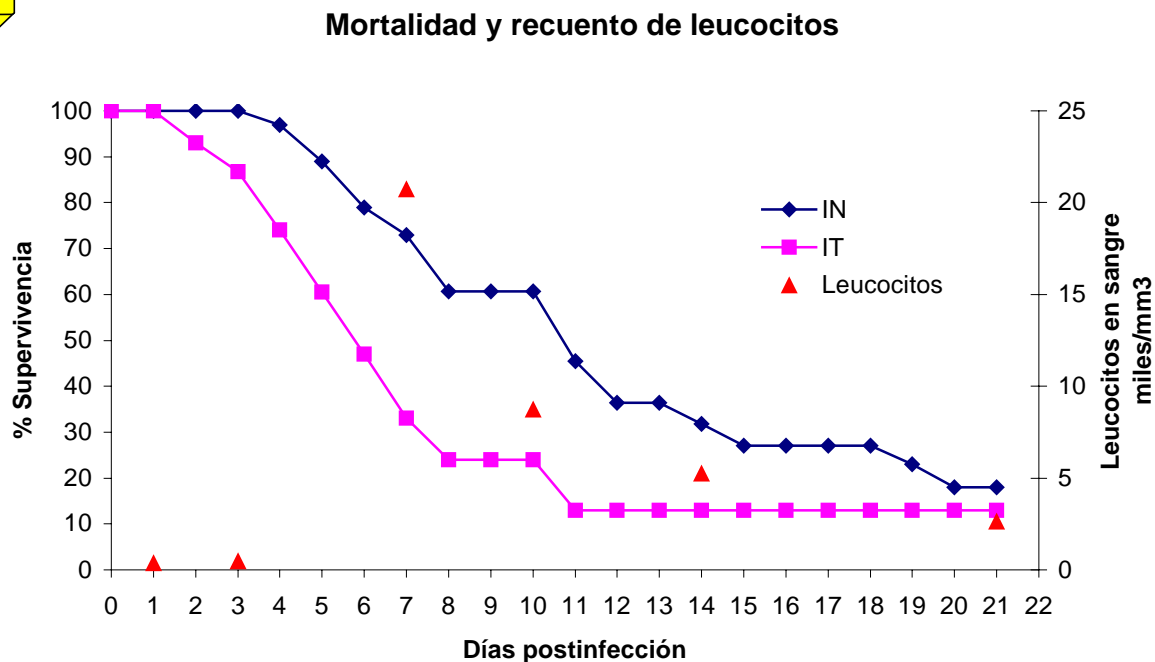


Tabla 7a: En la siguiente tabla se expone el porcentaje de probabilidad acumulada de supervivencia en intervalos de dos días:

Días post infección	Intranasal	Intratraqueal
<b>0-2</b>	100	95
<b>2-4</b>	95	80
<b>4-6</b>	85	65
<b>6-8</b>	75	49
<b>8-10</b>	75	49
<b>10-12</b>	55	38
<b>12-14</b>	50	38
<b>14-16</b>	45	38
<b>16-18</b>	45	38
<b>18-20</b>	40	38
<b>20-22</b>	40	38
<b>AREA bajo la curva</b>	<b>310</b>	<b>261</b>

\*El área estimada bajo la curva está calculada como el número de vivos al comenzar el intervalo menos los muertos en ese intervalo entre dos y multiplicado por el número de días del intervalo.

Tabla 7b: En esta tabla se detallan los resultados obtenidos en el recuento de micelios realizados a partir del macerado de órganos

Órgano	Día 1		Día 3		Día 7		Día 10		Día 14		Día 21	
	(a)	(b)	(a)	(b)	(a)	(b)	(a)	(b)	(a)	(b)	(a)	(b)
<b>pulmón IN</b>	3.2	(5/7)	3.0	(5/7)	3.0	(1/5)	3.1	(1/5)	2.7	(1/6)	2.3	(1/3)
<b>pulmón IT</b>	3.4	(6/7)	3.1	(4/6)	2.9	(1/3)	2.5	(1/3)	0	0	2.4	(1/3)
<b>cerebro IN</b>	0	(0/7)	0	(0/7)	< 1	(1/5)	0	(0/5)	0	(0/6)	0	(0/3)
<b>cerebro IT</b>	< 1	(1/7)	< 1	(1/6)	0	(0/3)	0	(0/3)	0	0	0	(0/3)
<b>riñón IN</b>	0	(0/7)	0	(0/7)	0	(0/5)	0	(0/5)	0	(0/6)	0	(0/3)
<b>riñón IT</b>	0	(0/7)	0	(0/6)	3.7	(1/3)	3.7	(1/3)	0	0	0	(0/3)

IN: Inoculación Intranasal; IT: Inoculación Intratraqueal. Días postinoculación. UFC: Unidades formadoras de colonias; (a): media de ufc/g de órgano; (b): (Animales positivos/animales sacrificados). < 1: media entre 0 y 1.

Tabla 8: Determinación de Galactomanano en suero, mediante un test de ELISA doble Sandwich (Platelia®). Resultados en número de animales, todos ellos inoculados.

Días postinoculación	1	3	7	10	14	21	<b>TOTAL</b>
<b>Intranasal</b>							
+	1	3	1	1	3	3	<b>12</b>
-	2	2	2	2	1	0	<b>9</b>
<b>d</b>	1	0	2	1	1	0	<b>5</b>
<b>Intratraqueal</b>							
+	2	3	2	1	---	3	<b>11</b>
-	1	1	2	1	---	1	<b>6</b>
<b>d</b>	1	0	0	0	---	0	<b>1</b>

+: Resultado positivo; -: Resultado negativo; **d**: Resultado dudoso. ---: No se obtuvieron sueros.

Es posible hallar Galactomanano en el suero de animales sacrificados en todos los días en los que se produjo el sacrificio de los mismos, aunque salvo en el día 21 tras la infección Intranasal, siempre se hallaron animales negativos. También es frecuente hallar dudosos, sobre todo en el modelo de inoculación Intranasal.

## b. Influencia del tipo de inmunosupresión y el tratamiento con Anfotericina B

Realizamos un modelo de Aspergilosis Invasora por infección intranasal en el que se utilizaban cuatro patrones distintos de inmunosupresión. Básicamente utilizamos la inmunosupresión realizada anteriormente (Figura 1), pero inyectando una tercera dosis intraperitoneal de 100 mg/kg de Ciclofosfamida. El momento en que era suministrada tal dosis era lo que diferenciaba los distintos grupos, así:

Grupo 1: 100 mg/kg el día tres tras la inoculación (Gráfica 7)

Grupo 2: 100 mg/kg el día cinco tras la inoculación (Gráfica 8)

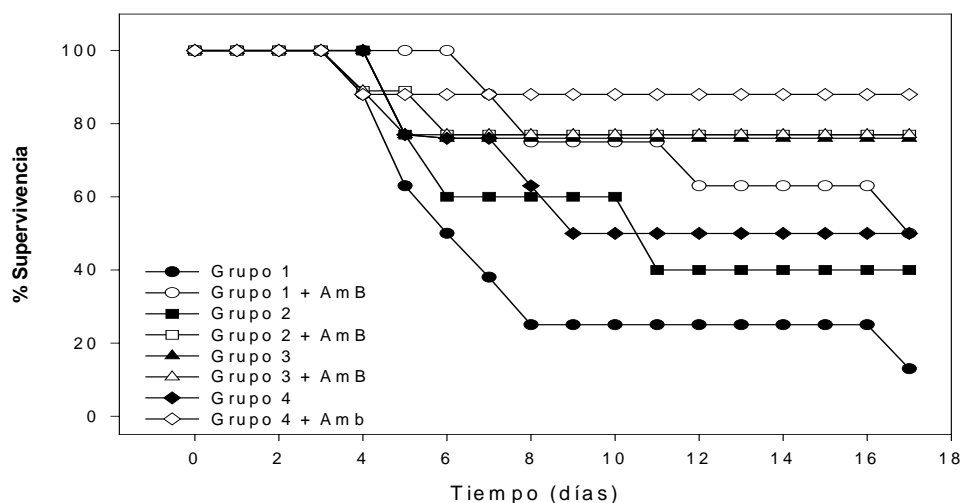
Grupo 3: 100 mg/kg el día siete tras la inoculación (Gráfica 9)

Grupo 4: 100 mg/kg el día diez tras la inoculación (Gráfica 10)

Además de estos grupos, había otros cuatro con el mismo patrón de inmunosupresión pero tratados diariamente con una dosis de 2'5 mg/kg (250 µl intraperitoneal) de Anfotericina B desoxicolato (Fungizona®) desde el día siguiente a la inoculación y durante una semana. Estos grupos se denominarán AmB más el número del grupo (del 1 al 4) según su inmunosupresión. Los animales control fueron tratados con 250 µl de solución salina por vía intraperitoneal cada 24 horas. La curva de supervivencia correspondiente a estos grupos se detalla en la Gráfica 6.

Los resultados obtenidos se muestran en las siguientes gráficas:

Gráfica 6: Curvas de supervivencia de las distintas pautas en animales control y curvas de supervivencia de las distintas pautas tratadas con Anfotericina B (Fungizona®) 250 µl intraperitoneal, a dosis de 2.5 mg/kg.



Resulta evidente que los animales tratados presentan mejores curvas de supervivencia que los animales no tratados. Este patrón se repite independientemente del protocolo de inmunosupresión realizado.

En la siguiente tabla, (Tabla 8a) se expresan las probabilidades acumuladas de supervivencia en cada uno de los grupos, expresadas en rangos de dos días a partir del día de la inoculación de los animales, así como el área bajo la curva total de supervivencia en cada grupo.

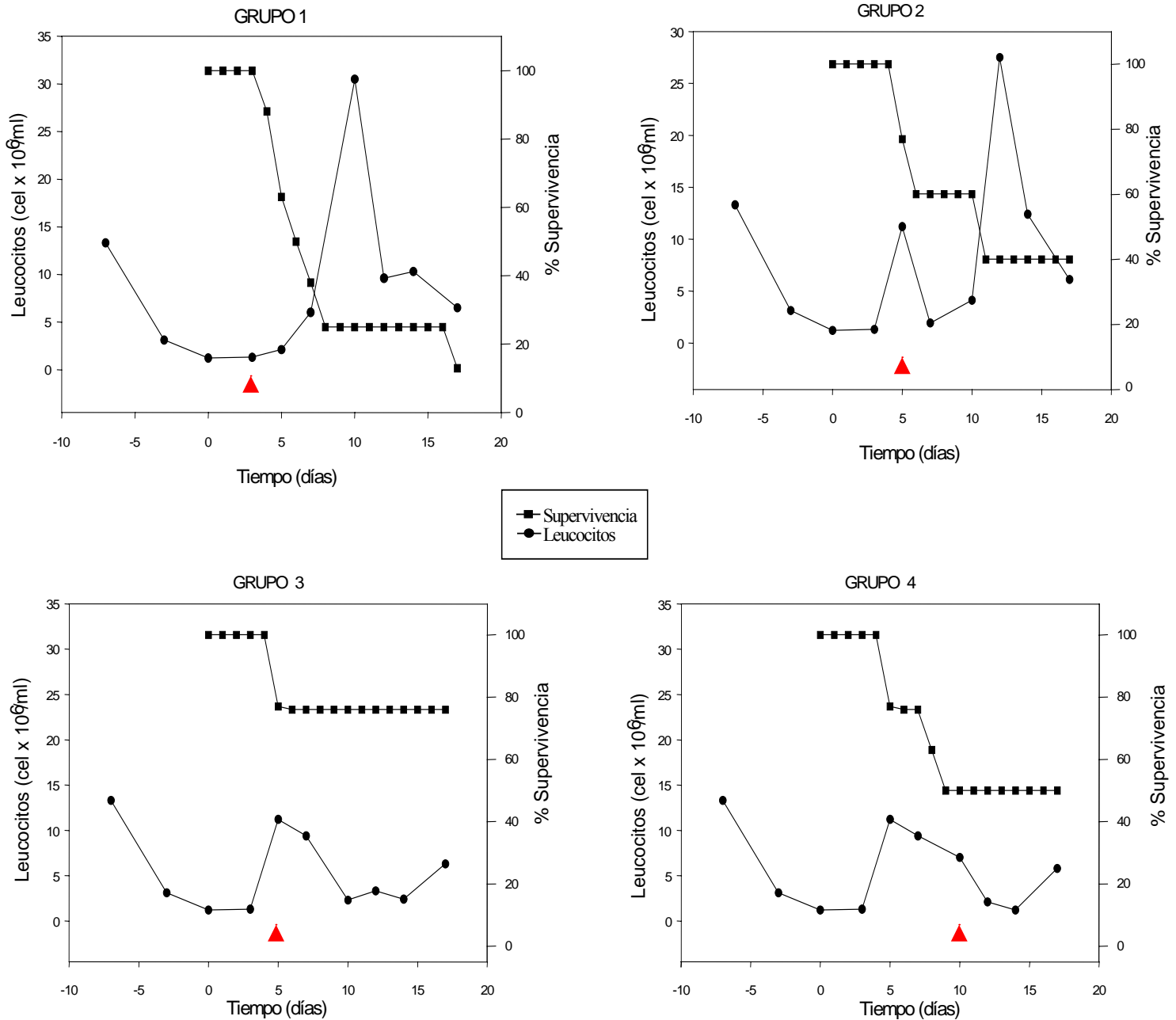
Tabla 8a: En esta tabla se detallan los porcentajes que expresan tanto las probabilidades acumuladas de supervivencia como el área total bajo la curva

Días p.i.	Grupo 1	G1 + AmB	Grupo 2	G2 + AmB	Grupo 3	G3 + AmB	Grupo 4	G4 + AmB
<b>0-2</b>	100	100	100	100	100	100	100	100
<b>2-4</b>	88	100	100	88	100	88	100	88
<b>4-6</b>	50	100	40	88	75	75	75	88
<b>6-8</b>	25	75	40	73	75	75	50	88
<b>8-10</b>	25	75	40	73	75	75	50	88
<b>10-12</b>	25	75	13	73	75	75	50	88
<b>12-14</b>	25	75	13	73	75	75	50	88
<b>14-16</b>	13	75	13	73	75	75	50	88
<b>16-18</b>	13	60	13	73	75	75	50	88
<b>AREA</b>	79	172	93	169	171	168	132	184

En todos los protocolos de inmunosupresión, el área bajo la curva de los grupos tratados es sensiblemente mayor que en los grupos no tratados, salvo en el protocolo 3, en el que no se halla prácticamente diferencia entre las curvas de mortalidad de tratados y no tratados. Es sin duda en el grupo 3 donde se hallan gráficas de supervivencia más benévolas de los animales no tratados. Salvo por esta observación, la administración de la segunda dosis de Ciclofosfamida se asocia a una mayor mortandad cuanto más cercana se halla de la primera.

**Gráficas de 7, 8, 9 y 10** (de izquierda a derecha y de arriba a abajo): Curvas de supervivencia de las distintas pautas en los animales control junto a las curvas del nivel de linfocitos en sangre periférica.

(▲ Administración de la tercera dosis de Ciclofosfamida)



La gráfica del grupo 1 presenta una dramática disminución de la supervivencia en la primera semana de infección, coincidiendo con bajos niveles de leucocitos en sangre. Esta disminución se ve frenada con el aumento de dichos leucocitos. La supervivencia

en el grupo 2 parece estar completamente acorde con las condiciones de leucocitos en sangre. Tras la primera dosis de Ciclofosfamida se observa una rápida bajada de la supervivencia, luego se estabiliza coincidiendo con el repunte de los leucocitos en sangre. La segunda dosis de Ciclofosfamida viene a bajar de nuevo los leucocitos en sangre, lo que se acompaña de una nueva bajada en la supervivencia, que finalmente se estabiliza cuando los leucocitos suben de nuevo.

La gráfica del grupo 3 presenta una caída en la supervivencia similar a la de los grupos anteriores durante los primeros días, pero al contrario que en dichos grupos, la estabilización de la supervivencia no se ve rota por la segunda dosis de Ciclofosfamida, no registrándose más muertes hasta el final del experimento. En la gráfica del grupo 4, sin embargo, se observan una caída en la supervivencia de los animales muy brusca hasta el día 3, que luego se detiene para volver a caer hasta el día 9. Los leucocitos en este grupo no llegan a mostrar el repunte ya señalado en los dos primeros grupos, a los tres días de la primera dosis de Ciclofosfamida. El efecto de la segunda dosis de Ciclofosfamida a los diez días de inyectar la primera, no repercute en una nueva oleada de muertes, aunque se observa una bajada de leucocitos en sangre.

Los supervivientes de los cuatro grupos fueron sacrificados y sus sueros utilizados para realizar una prueba de detección de Galactomanano mediante un ELISA Sandwich. Los resultados de esta prueba están indicados en la tabla 9.

Tabla 9: Resultados, del test de Galactomanano (Platelia®), en número de animales supervivientes a día 21 tras la inoculación:

<b>GRUPOS</b>	<b>POSITIVOS</b>	<b>DUDOSOS</b>	<b>NEGATIVOS</b>	<b>TOTAL (por grupo)</b>
Control 1	1	0	0	1
Control 2	1	1	0	2
Control 3	4	3	1	8
Control 4	1	1	2	4
<b>Total control</b>	<b>7</b>	<b>5</b>	<b>3</b>	<b>15</b>
AmB 1	4	0	0	4
AmB 2	4	1	0	5
AmB 3	3	2	0	5
AmB 4	2	2	1	5
<b>Total AmB</b>	<b>13</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>19</b>
<b>TOTAL (por resultado)</b>	<b>20</b>	<b>10</b>	<b>4</b>	<b>34</b>



En esta tabla denominamos control a los animales inoculados no tratados. Buena parte de los animales inoculados presentan resultado positivo o dudoso a la presencia de Galactomanano en suero durante los días que duró el experimento, si bien es cierto que hay negativos y que además estos son más abundantes en animales no tratados.

### c. Inoculación intraperitoneal:

En la puesta a punto de este modelo de infección se variaron los parámetros de tamaño del inóculo así como del tipo de inmunosupresión. En todos los casos las inoculaciones se llevaron a cabo con conidias de *A. fumigatus* 48238.

#### c.1. Influencia del tamaño del inóculo:

Se prepararon y ajustaron tres inóculos, para tres grupos de 10 animales cada uno:

Grupo 1:  $1 \times 10^6$  conidias/ml.


Grupo 2:  $1 \times 10^7$  conidias/ml.

Grupo 3:  $1 \times 10^8$  conidias/ml.

Se inocularon los animales intraperitonealmente con 250  $\mu$ l de dichos inóculos.

Durante los 18 días tras la infección, no se habían producido muertes en ninguno de los tres grupos de animales. Además, ningún animal presentó síntomas de enfermedad, excepto un par de animales del grupo 3, con pelo erizado y apatía. Se sacrificaron todos los animales en el día 18 postinfección, no observándose lesiones macroscópicas en los grupos 1 y 2. En el grupo 3 se encontraron adherencias entre las fascias abdominales y presencia de algunos nódulos verdosos, que fueron sembrados en placas de Rosa de Bengala e incubados durante 5 días a 37° C, obteniéndose crecimiento de *A. fumigatus* en los 10 animales supervivientes.

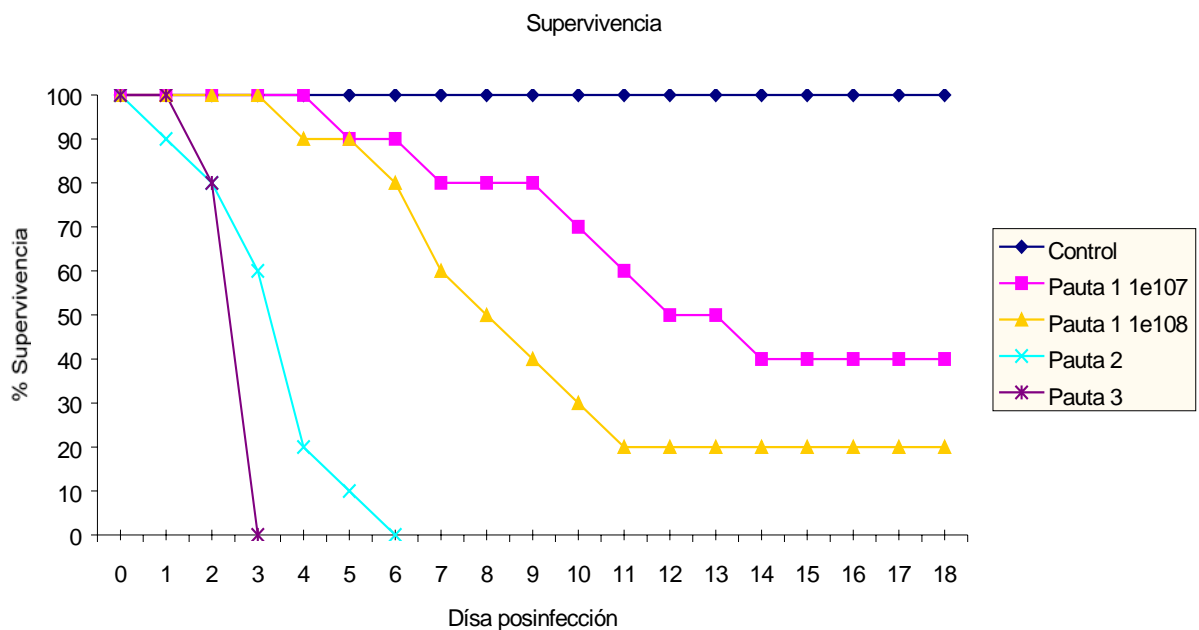
#### c.2. Influencia del tipo de inmunosupresión

Se inocularon 3 grupos de 10 animales cada uno con distinta pauta de inmunosupresión, intraperitonealmente, con 100  $\mu$ l de un inóculo de  $1 \times 10^8$  y en un caso también de  $1 \times 10^7$  conidias/mililitro. Los resultados se expresan en la gráfica 10 

Los tres tipos de inmunosupresión fueron:

- Pauta de inmunosupresión 1: Dexametasona en agua de bebida a dosis de 4 mg/l, desde una semana antes de la inoculación y hasta el final del experimento. Inóculos de  $1 \times 10^7$  y  $1 \times 10^8$  conidias/ml. También se inoculó un grupo de 10 animales con 250  $\mu$ l de  $1 \times 10^7$  conidias/ml.
- Pauta de inmunosupresión 2: Dexametasona en agua de bebida a dosis de 4 mg/l, desde una semana antes de la inoculación y hasta el final del experimento, más Ciclofosfamida a dosis de 100 mg/kg intraperitoneal, 6 horas antes de la inoculación.
- Pauta de inmunosupresión 3: Dexametasona en agua de bebida a dosis de 4 mg/l, desde una semana antes de la inoculación y hasta el final del experimento, más Ciclofosfamida a dosis de 100 mg/kg, intraperitoneal, 6 horas antes de la inoculación y 3 días después.

Gráfica 10: Mortalidad de ratones inoculados intraperitonealmente con *A. fumigatus* utilizando 3 pautas de inmunosupresión diferentes.



En el caso de la pauta de inmunosupresión 1, los animales enferman ostensiblemente, sufren erizamiento del pelo, apatía y muerte en goteo que termina en una supervivencia del 20 % en el día 18 postinfección, en el caso del inóculo de  $1 \times 10^8$  esporas/ml y del 40% en el caso de  $1 \times 10^7$  esporas/ml. En ambos casos se pudieron observar adherencias y nódulos amarillento-verdosos en las fascias abdominales de los animales supervivientes, a partir de las que se realizaron cultivos en Rosa de Bengala (incubadas a 37° C durante 5 días), obteniéndose crecimiento de *A. fumigatus* en todos los casos.

En el caso de la pauta de inmunosupresión 2, los animales enferman rápidamente y se produce la muerte del 100 % en 6 días.

En el caso de la pauta 3, los animales enferman rápidamente y se produce la muerte del 100 % de los animales el día 3, tras la segunda inyección de Ciclofosfamida.

### c. 3. Eficacia terapéutica de Anfotericina B

La inoculación de los animales se llevó a cabo con la inyección intraperitoneal de 100 µl de una suspensión de conidias de *A. fumigatus* 48238 a una concentración de  $1 \times 10^7$  conidias/ml. Se utilizaron dos lotes de animales, uno de ellos tratado con Anfotericina B desoxicolato (Fungizona®), a dosis de 2'5 mg/kg (250 µl, intraperitoneal), a partir de las 24 horas tras la inoculación y diariamente durante una semana. El otro grupo fue tratado con el mismo volumen de agua destilada.


La monitorización se realizó por supervivencia de los animales en 18 días (Gráfica 12) tras los que los animales supervivientes fueron sacrificados. Todos los animales presentaban zonas de adherencias en serosas intestinales, aunque éstas eran más abundantes en los animales control. En los cultivos (Rosa de Bengala 5 días 37°C) de dichas serosas, todos los animales infectados no tratados on resultado positivo y todos los tratados con Anfotericina B resultado negativo.

Gráfico 12: Este gráfico muestra la supervivencia de ratones que sufrían Aspergilosis intraperitoneal no tratados y tratados con Anfotericina B:

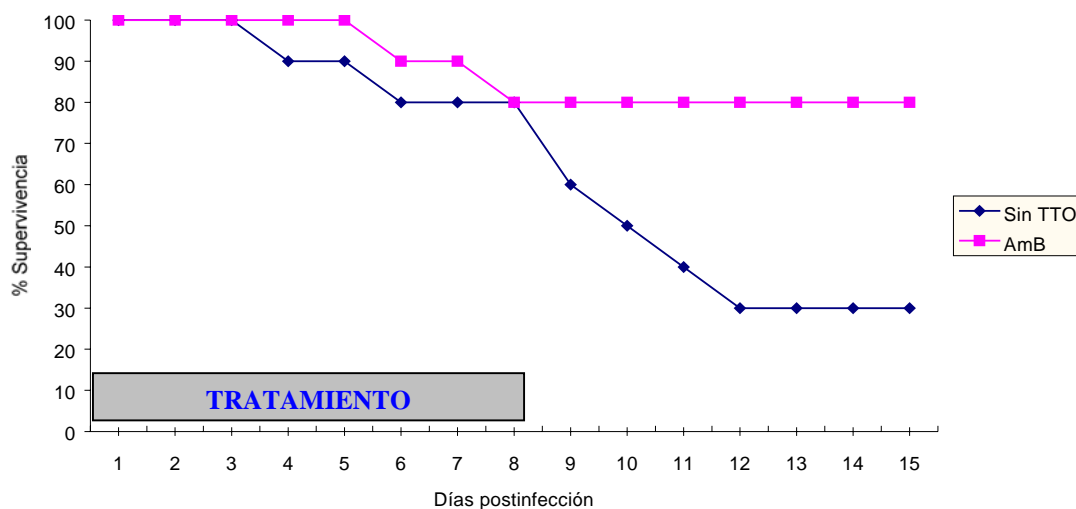


Tabla 9b: Que expresa el porcentaje de supervivencia acumulado en rangos de 5 días, en el modelo de infección intraperitoneal en raton tanto para animales tratados como en no tratados con Anfotericina B

<b>Días postinfección</b>	<b>Sin Tratamiento</b>	<b>Tratados (AmB)</b>
<b>0-5</b>	90	100
<b>5-10</b>	50	80
<b>10-15</b>	30	80
<b>Área bajo la curva</b>	80	130

Tanto el gráfico 12 como la tabla 9b dejan claro que los animales inoculados y tratados con Anfotericina B presentan una mejor supervivencia que los animales no tratados. La supervivencia de los animales tratados es del 80% y la de los no tratados del 30% al finalizar el experimento. Esta notable diferencia es también evidente si comparamos el porcentaje de supervivencia acumulado, que en todos los tramos es mejor para los tratados y el área bajo la curva, que es mucho mayor en los animales tratados, evidenciado una supervivencia también mayor. Hemos de destacar que durante el tratamiento, la supervivencia de ambos grupos es similar, llegando al día después de finalizar el tratamiento (día 8) con una tasa de mortalidad pareja. Sin embargo, a partir de este día existe un dramático descenso en la supervivencia de los inoculados no tratados, mientras que el grupo de los tratados dejaba de tener bajas.

### **3.2. Modelos de Aspergilosis en Rata. Descripción de un nuevo modelo de inoculación transtorácica.**

En Materiales y Métodos hemos descrito un modelo de infección transtorácico. Dicho modelo es el resultado de diversos trabajos en los que se modificaron las siguientes variables de infección:

- Inmunosupresión: Utilizamos Ciclofosfamida en inyecciones intraperitoneales y/o Dexametasona en agua de bebida.
- Fase de crecimiento del hongo: conidias o micromicelios (hifas).
- Vehículo del inóculo: Utilizamos solución salina (medio líquido) o bien una solución semisólida, compuesta por medio Czapek con Agar al 4 ‰.

#### a. Primer modelo preliminar: tipo de inóculo

##### \* Inmunosupresión:

Se llevó a cabo un protocolo combinado de Dexametasona a 2 mg/l en agua de bebida desde una semana antes de la inoculación y hasta el final del experimento, y Ciclofosfamida a dosis de 50 mg/kg intraperitoneal el mismo día de la inoculación. Esta inmunosupresión se administró a todos los animales infectados y a los controles no infectados.

##### \* Inoculación:

Realizamos cuatro combinaciones distintas de inóculo, lo que nos proporcionó 4 grupos de 15 animales cada uno y otros diez animales en el grupo control. De esta forma las inoculaciones fueron:

- Grupo control: Animales no inoculados pero inmunosuprimidos
- Grupo 1: Transtorácica con hifas en medio semisólido (10-14 micromicelios/animal)
- Grupo 2: Transtorácica con conidias en medio semisólido ( $1'4 \times 10^5$  conidias/animal)
- Grupo 3: Transtorácica con conidias en medio líquido ( $1'4 \times 10^5$  conidias/animal)
- Grupo 4: Intratraqueal con conidias en medio líquido ( $1'4 \times 10^5$  conidias/animal)

La monitorización del experimento se llevó a cabo por curvas de supervivencia de los animales (gráfica 13), y Curva acumulada de supervivencia (Tabla 9c), así como por las

lesiones macroscópicas en dos animales sacrificados por grupo el día 12 y al finalizar el experimento, el día 28, y mediante siembra (37°C, 7 días en Rosa de Bengala) del aspirado (con aguja gruesa) de dichas lesiones.

Gráfica 13: Supervivencia de Aspergilosis Pulmonar en Rata en modelo preliminar 1 de inoculación transtorácica de *A. fumigatus*.

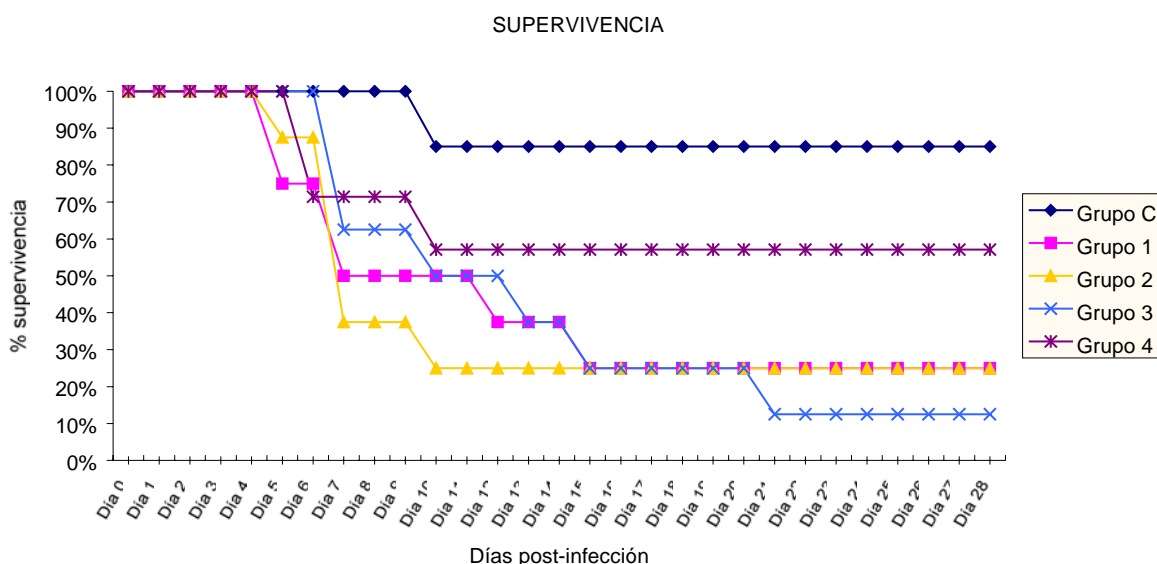


Tabla 9c: Probabilidad acumulada de supervivencia en intervalos de siete días y área estimada bajo la curva en modelo de infección intratraqueal y transtorácica en rata.

Primer modelo preliminar:

Días post infección	Control	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
0-7	100	95	50	60	70
7-14	80	80	40	40	60
14-21	80	65	30	30	60
21-28	80	49	30	20	60
Área bajo la curva	245	129'5	115'5	133	189

Los animales inoculados con el método transtorácico presentan unas probabilidades acumuladas de supervivencia bastante similares entre sí, independientemente de si se inoculan con hifas o con conidias. El área bajo la curva también es similar. Sin embargo los animales inoculados con el sistema transtorácico tienen mejor probabilidad de supervivencia.

A continuación se describen lesiones halladas en animales sacrificados. En ocasiones estas lesiones corresponden a animales que murieron en el transcurso del experimento, aunque hay que tener en cuenta que no siempre fue posible realizar necropsias sobre muertos debido a que sus compañeros de jaula solían devorarlos.

En cuanto a la descripción de las lesiones macroscópicas y resultados del cultivo de material obtenido a partir de las lesiones observadas en distintos órganos, podemos decir lo siguiente:

➤ Animales sacrificados el día 12 post infección:

- Grupo Control:

No se observaron lesiones macroscópicas en vísceras torácicas ni abdominales. Los cultivos de troceados de pulmones fueron siempre negativos.

- Grupo 1:

Lesiones muy similares en los dos animales sacrificados, consistentes en nódulos de 0'1-0'2 cm de diámetro, amarillentos, situados en pleuras, pericardio, diafragma, en pulmón derecho, pared costal interna y externa, entre el tejido subcutáneo y la capa muscular, coincidiendo con el trayecto de entrada de la aguja al inocular. En el punto de inoculación, en el pulmón derecho, existía una lesión de 0'5 cm de diámetro de color amarillento verdoso.

Realizamos el cultivo de algunos de estos nódulos, así como del aspirado de la lesión de mayor tamaño, obteniéndose crecimiento de *A. fumigatus* en todos los casos.

-Grupo 2:

En este día únicamente sobreviven dos animales, que no son sacrificados, ya que esperaremos a obtener resultados de la necroscopia en el día 28.

- Grupo 3:

Hallamos lesiones muy similares en ambos animales. En el pulmón derecho, en el punto de inoculación, encontramos una lesión no nodular, de 0'5 cm de diámetro, crepitante, con una zona central amarillenta y un halo hemorrágico que la delimita. En uno de los animales este halo hemorrágico era casi imperceptible. Existían adherencias entre las distintas pleuras pulmonares y con el diafragma.

En ambos animales hallamos el hígado con varias lesiones circulares, amarillentas y con una zona periférica más clara, de tamaños variables, desde 0'1 cm hasta 0'5 cm de diámetro. Existían otras lesiones no circulares, que comprendían amplias zonas apicales de lóbulos hepáticos.

Realizamos cultivos a partir de las lesiones pulmonares así como de las hepáticas, con resultado positivo a *A. fumigatus* en ambos órganos de los dos animales sacrificados.

- Grupo 4:

Lesiones similares en los dos animales que son sacrificados. Pulmones aumentados de tamaño, que no se colapsan del todo al abrir la cavidad torácica. Lesiones nodulares de 1mm de diámetro repartidas por ambos pulmones, de color verdoso. Existen puntos hemorrágicos en algunas zonas del pulmón así como zonas más o menos amplias de consolidación.

Al igual que en los casos anteriores realizamos cultivo de las lesiones, obteniendo crecimiento de *A. fumigatus*.

➤ Animales supervivientes tras 28 días de infección, que son sacrificados:

- Grupo Control:

No observamos lesiones macroscópicas en vísceras torácicas ni abdominales. Los cultivos de troceado de pulmones resultaron negativos.

- Grupo 1:

Lesiones similares en los dos animales supervivientes sacrificados. En ambos hallamos un nódulo en el pulmón derecho de 0'5 cm de diámetro, amarillento, en el lugar de la inoculación. Existían además otros nódulos amarillentos en el resto del pulmón, pericardio, mediastino y diafragma, de 0'1-0'2 cm de diámetro, especialmente abundantes en uno de los animales.

El resultado del cultivo del material procedente de las lesiones fue positivo, con aislamiento de *A. fumigatus* en todos los casos.



- Grupo 2:

En uno de los animales sacrificados observamos una lesión en pulmón derecho, en el punto de inoculación, de 0'7 cm de diámetro que presentaba un punteado compuesto por pequeños nódulos (de menos de 0'1 cm de diámetro cada uno) en una zona central amarillenta, rodeada de un halo periférico hemorrágico en uno de los animales sacrificados. En el otro animal la lesión en el punto de inoculación es algo menor (0'5 cm de diámetro) y sin ese punteado nodular en el centro. En el resto de la cavidad torácica de ambos animales existen otros nódulos amarillentos de 0'2 a 0'3 mm de diámetro, que también se encuentran en el diafragma.

El cultivo del material de estas lesiones fue positivo, con aislamiento de *A. fumigatus*.

El hígado se encontraba pálido y algo aumentado de tamaño, si bien en este caso el cultivo resultó negativo.

- Grupo 3:

Únicamente sobrevivió un animal, que es el que se sacrificó al cabo de estos 28 días. En el pulmón derecho hallamos un nódulo de entre 0'4 y 0'5 cm de diámetro en la zona de inoculación, así como otros nódulos de 0'2 cm de diámetro en ambos pulmones. Existían algunas zonas de apariencia hemorrágica. Hallamos adherencias entre las distintas pleuras pulmonares y con el diafragma.

El cultivo del material procedente de las lesiones resultó positivo.

Observamos lesiones nodulares en hígado con un tamaño que varía desde 0'2-0'3 cm a 1 cm de diámetro, y que al corte presentaron un contenido purulento encapsulado.

El cultivo de dicho contenido resultó positivo a *A. fumigatus*.

- Grupo 4:

Lesiones similares en los 5 animales supervivientes. Los pulmones estaban aumentados de tamaño. Observamos lesiones nodulares de 1mm de diámetro repartidas por ambos pulmones, de aspecto verdoso. Existían puntos hemorrágicos en algunas zonas del pulmón así como zonas de consolidación.

El cultivo de las lesiones fue positivo a *A. fumigatus*.

## b. Segundo modelo preliminar: tipo de inmunosupresión y tipo de inóculo

### \* Inmunosupresión:

Debido a la alta mortalidad en el primer modelo preliminar, decidimos en este segundo modelo inmunosuprimir a los animales utilizando únicamente Ciclofosfamida, que fue administrada a dosis de 150 mg/kg intraperitoneal el día 7 antes de la inoculación y a partir de aquí y cada tres días, 50 mg/kg intraperitoneal. Así mismo decidimos realizar inoculaciones en animales no inmunosuprimidos. En este caso incluimos un grupo control de animales no inoculados. Estos animales no presentaron síntomas, no hubo mortalidad en dicho grupo, no se presentaron lesiones ni aislamientos positivos en ninguno de ellos. Se sacrificó un animal control en cada día de sacrificio.

### \* Inóculo:

Debido a las lesiones hepáticas encontradas en el grupo 3 (vehículo de solución salina con conidias) del primer modelo preliminar, decidimos inocular, en todos los casos, hifas, contenidas en medio semisólido o bien solución salina.

### \* Grupos:

Cada uno de los grupos se compone de 20 animales. Los cuatro grupos experimentales fueron:

- Grupo 1: No inmunosuprimido, inóculo compuesto por hifas en solución salina.
- Grupo 2: Inmunosuprimidos, inóculo compuesto por hifas en solución salina.
- Grupo 3: No inmunosuprimido, inóculo compuesto por hifas en medio semisólido.
- Grupo 4: Inmunosuprimidos, inóculo compuesto por hifas en medio semisólido.

En todos los casos se inocularon 10-14 micromicelios/animal

La monitorización de la enfermedad fue realizada mediante curvas de supervivencia y cultivo de varios órganos procedentes de los animales sacrificados a lo largo de los 14 días en que se planificó la experiencia.

Gráfica 14: Supervivencia de animales en el Segundo modelo preliminar de inoculación transtorácica, para la evaluación de inmunosupresión y medio en el que se inoculan los micromicelios.

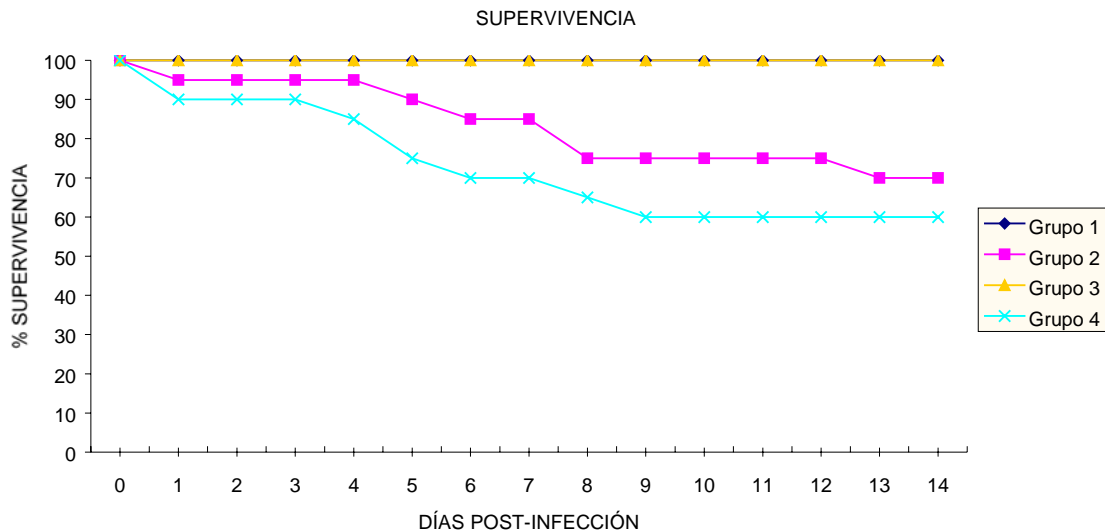


Tabla 9d: Probabilidad acumulada de supervivencia en intervalos de tres días y área estimada bajo la curva:

Días post infección	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
0-3	100	95	100	90
3-6	100	85	100	70
6-9	100	75	100	60
9-12	100	75	100	60
12-14	100	70	100	60
Área bajo la curva	240	205'5	240	180

Tanto en la gráfica como en la tabla podemos observar que la supervivencia en los grupos no inmunosuprimidos es mayor que en los inmunosuprimidos. La probabilidad acumulada de supervivencia de los animales inoculados con micromicelios en solución salina o en medio semisólido es mejor para aquella.

\* Descripción de las lesiones macroscópicas:

Se sacrificaron dos animales los días 1, 3, 7 y 14 tras la infección:

➤ Día 1:

- Grupo 1:

Lesiones similares en los dos animales sacrificados. En el pulmón derecho de ambos animales hallamos un nódulo de 0'5 cm de diámetro, con bordes mal definidos, y situado en el lugar de la inoculación. Así mismo hallamos pequeños nódulos de unos 2-3 mm en el trayecto de la aguja desde la piel hasta el parénquima pulmonar.

- Grupo 2:

Las lesiones que hallamos en estos animales son muy similares a las halladas en el Grupo 1. En uno de los animales hay una lesión hemorrágica entre la pleura y el nódulo situado en el parénquima pulmonar.

- Grupo 3:

En ambos animales hallamos un nódulo en el pulmón derecho de 0'5 cm de diámetro, amarillento y bien delimitado y rodeado de un pequeño halo rojizo. No existen lesiones macroscópicas en el trayecto de la aguja.

- Grupo 4:

Lesiones similares a las halladas en el grupo anterior, salvo porque en uno de los dos animales hallamos un nódulo amarillento de unos 2 mm de diámetro, situado en la pleura externa pulmonar, pegado a la pared costal.

➤ Día 3:

- Grupo 1:

Hallamos una amplia zona de inflamación en el pulmón derecho de los dos animales sacrificados, rodeando una aparente zona necrótica central. Hay nódulos amarillentos de unos 2 mm de diámetro en el trayecto que siguió la aguja durante la inoculación. En uno de los animales existen estos mismos pequeños nódulos en la pleura del pulmón derecho.

- Grupo 2:

Hallamos lesiones nodulares amarillentas con un centro aparentemente necrótico, en los pulmones derechos de los dos animales sacrificados, coincidentes con el lugar de inoculación. En ambos hallamos nódulos amarillentos de unos 2 mm de diámetro en la pleura del pulmón derecho, no coincidentes con el lugar de inoculación. También encontramos estas lesiones nodulares amarillentas de 2 mm de diámetro en la parte externa de la pared costal, coincidiendo con el trayecto de la aguja al inocular.

- Grupo 3:

En ambos animales hallamos un nódulo en el pulmón derecho de algo más de 0'5 cm de diámetro, amarillento, bien delimitado y rodeado de una amplia zona inflamatoria. No existen lesiones macroscópicas en el trayecto de la aguja ni en ninguna otra localización en cavidad torácica.

- Grupo 4:

Nódulo en pulmón derecho de ambos animales de aproximadamente 0'5 cm de diámetro, amarillento y bien delimitado, con escasa reacción inflamatoria. No existen otras lesiones.

➤ Día 7:

- Grupo 1:

Pulmón derecho inflamado, sobre todo alrededor de la lesión necrótica que corresponde a la zona de inoculación. En uno de los animales se hallan pequeños nódulos amarillentos de unos 2 –3 mm de diámetro tanto en la pleura del pulmón derecho como en la parte externa de la cavidad torácica.

- Grupo 2:

Grandes lesiones nodulares amarillentas de cerca de 1 cm de diámetro, en el lugar de inoculación de los pulmones derechos. Uno de los animales presenta otra lesión nodular algo menor (0'5 cm) adherida a la pleura pulmonar del pulmón derecho. Hay adherencias con la pared costal. No observamos más lesiones.

- Grupo 3:

En ambos animales hallamos un nódulo en el pulmón derecho de algo más de 0'5 cm de diámetro, amarillento, bien delimitado y rodeado de una amplia zona inflamatoria. No existen lesiones macroscópicas en el trayecto de la aguja ni en ninguna otra localización en cavidad torácica.

- Grupo 4:

Nódulo en pulmón derecho de ambos animales de aproximadamente 0'5 cm de diámetro, amarillento y bien delimitado, con escasa reacción inflamatoria. No existen otras lesiones.

➤ Día 14:

- Grupo 1:

Ambos animales presentan un nódulo en la zona de inoculación del pulmón derecho de 0'5 cm de diámetro. En ambos animales hay nódulos de 2-3 mm de diámetro en la pared costal en la zona de entrada de la aguja. Hay adherencias entre todas estas lesiones descritas, con contenido fibrinoso.

- Grupo 2:

Grandes lesiones nodulares amarillentas de cerca de 1 cm de diámetro, en el lugar de inoculación de los pulmones derechos de ambos animales. Existen adherencias con otras lesiones nodulares amarillentas de unos 2 mm de diámetro presentes en la pared costal, cercanas a la zona de entrada de la aguja y en uno de los animales también en la pleura del pulmón derecho.

- Grupo 3:

En ambos animales hallamos un nódulo en el pulmón derecho de algo más de 0'5 cm de diámetro, amarillento, bien delimitado y rodeado de una zona inflamatoria. No se observan más lesiones.

- Grupo 4:

Únicamente sobrevivió un animal, que presenta un nódulo de algo más de 1 cm de diámetro y escasa reacción inflamatoria. Además había algunos nódulos de 2 mm de diámetro, amarillentos, distribuidos por la pleura de ambos pulmones.

\* Resultados del cultivo de distintos órganos.

Los animales fueron sacrificados los días 1, 3, 7 y 14 tras ser inoculados. Se realizaron cultivos (Rosa de Bengala 7 días 37°C) del troceado del órgano completo. Los órganos extraídos fueron: pulmón derecho (en el que se realiza la punción al inocular), pulmón izquierdo, riñón y encéfalo.

- Pulmón: Los resultados se expresan mediante un valor numérico, según el siguiente baremo establecido por nosotros:

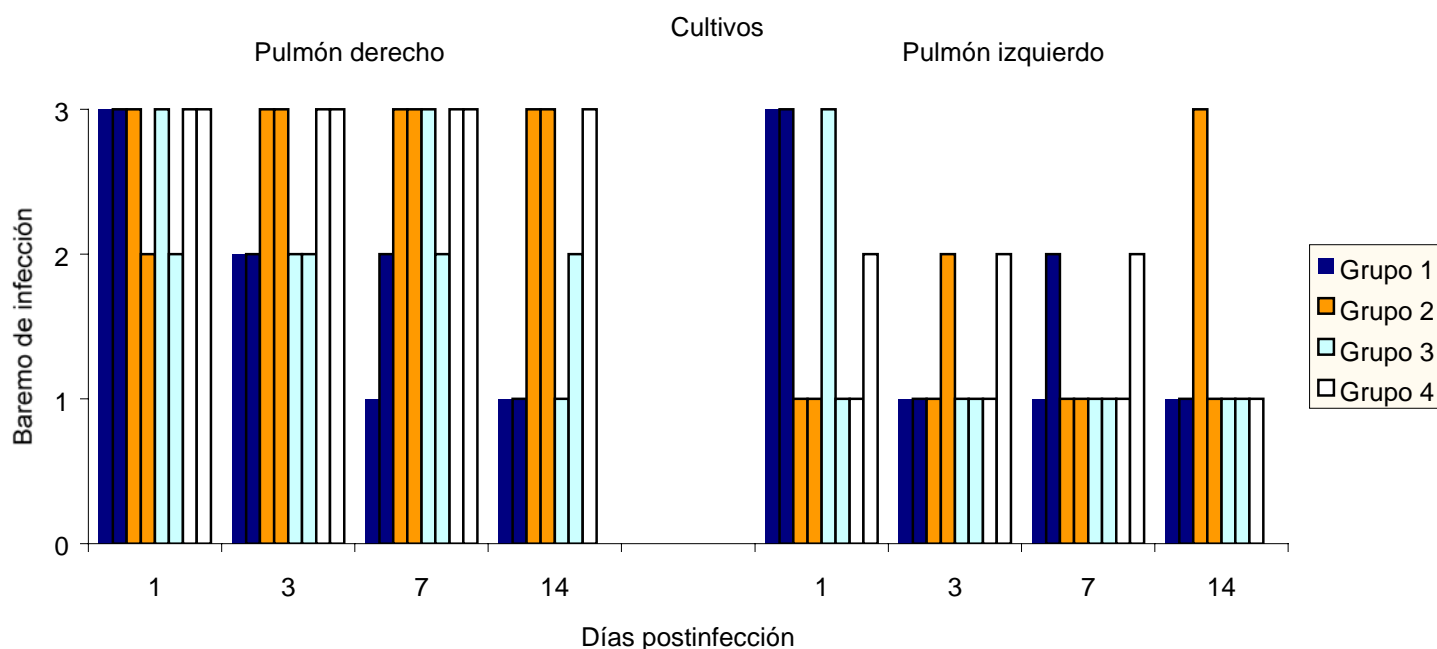
- 1: Ausencia de crecimiento: no hay crecimiento del hongo tras siete días de incubación.
- 2: Crecimiento escaso: a partir de un bajo número de pedazos del órgano.
- 3: Crecimiento intenso: a partir de la mayor parte de los pedazos del órgano.

- Encéfalo: No se apreció crecimiento del hongo en ninguno de los cultivos a partir del troceado del encéfalo.

- Riñones: En el troceado de los riñones, únicamente se apreció crecimiento en un animal del Grupo 2 sacrificado el día 7 (correspondiente a Baremo pulmonar: 1) y en un animal del Grupo 2 sacrificado el día 14 (correspondiente a Baremo pulmonar: 1).

En cuanto a los resultados de los pulmones, hemos de tener en cuenta que la infección se realiza mediante punción en el pulmón derecho, por lo que los resultados se expresan por separado para ambos pulmones en la siguiente gráfica:

Gráfico 15: Cultivos pulmonares en el segundo modelo preliminar. Las lesiones han sido valoradas según el siguiente baremo: 1. No hay crecimiento, 2. Crecimiento escaso, 3. Mucho crecimiento.



En esta gráfica vemos como los animales inoculados con solución salina (grupos 1 y 2) presentan aislamiento en el pulmón izquierdo (el derecho es en el que se inocula) en 6 animales, por 3 de los inoculados con medio semisólido. Por otro lado observamos diferencias significativas en cuanto al aislamiento del hongo entre grupos no inmunosuprimidos (1 y 3) y los inmunosuprimidos (2 y 4) en el pulmón derecho. Este hecho no es constatable en los aislamientos de pulmón izquierdo.

Si sumamos los puntos según este baremo de cada grupo obtenemos una visión más clara de este hallazgo:

Grupo 1: 15 de 24 posibles pulmón derecho, 13 de 24 del izquierdo. Total 28 de 48

Grupo 2: 23 de 24 pulmón derecho, 11 de 24 del izquierdo. Total 34 de 48

Grupo 3: 17 de 24 pulmón derecho, 10 de 24 del izquierdo. Total 27 de 48

Grupo 4: 21 de 21 pulmón derecho, 10 de 24 del izquierdo. Total 31 de 42



### c. Tercer modelo preliminar: tipo de inóculo

#### \* Inmunosupresión:

Como habíamos mencionado al inicio de estos experimentos diseñados con el fin de instaurar un nuevo modelo de Aspergilosis Invasora, nuestro principal objetivo es conseguir modelos en los que los animales permaneciesen vivos, pero infectados, largos períodos de tiempo. La necesidad de inyectar la Ciclofosfamida intraperitonealmente cada tres días a los animales, con el fin de mantener la inmunosupresión, durante estos largos períodos suponía un manejo extra considerable, con el componente de estrés que ello supone para los animales, así como las posibles lesiones que se pudiesen derivar de la inyección intraperitoneal repetitiva. Por ello decidimos administrar a los animales Dexametasona como inmunosupresor, a dosis de 2 mg/l en agua de bebida, junto con Terramicina a dosis de 1 g/l para evitar posibles infecciones bacterianas secundarias.

#### \* Inóculo y grupos:

Inoculamos hifas en solución salina o en Agar: 10-14 micromicelios/animal

Grupo 1: Hifas en Agar.

Grupo 2: Hifas en Solución Salina.

En este experimento utilizamos un grupo control al que se inyectó con solución salina estéril. Estos animales no presentaron síntomas ni lesiones ni hubo mortalidad y no se aisló ningún agente de sus pulmones.

La monitorización del modelo se llevó a cabo por supervivencia de los animales así como por cultivos (Rosa de Bengala, 37° C 7 días) del troceado de distintos órganos de animales sacrificados (pulmón derecho, pulmón izquierdo, riñones y encéfalo) los días 7 y 14 tras ser inoculados. Para la valoración del crecimiento del hongo en dichos cultivos se utilizó el mismo baremo utilizado en el modelo preliminar 2, ya indicado anteriormente y que se expresan en la gráfica 17.

La supervivencia de este modelo se expresa en la Gráfica 16 y la Probabilidad acumulada de supervivencia en la Tabla 9d.

Gráfica 16: Supervivencia en el tercer modelo preliminar de inoculación transtorácica de *A. fumigatus* en rata.

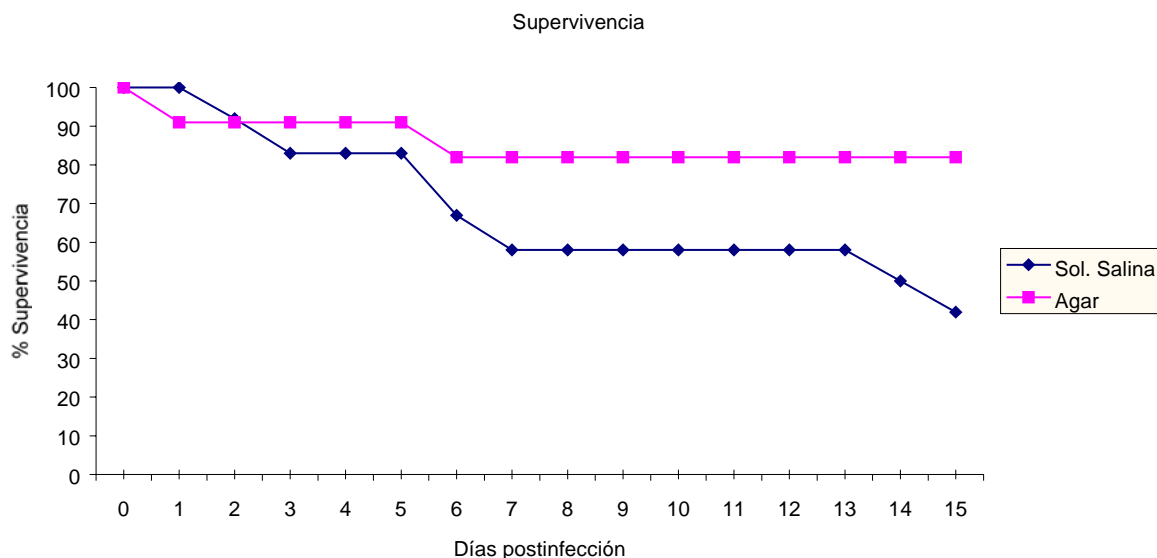


Tabla 9d: Probabilidad acumulada de supervivencia en intervalos de tres días y área estimada bajo la curva del tercer modelo preliminar de inoculación transtorácica en rata.

Días post infección	Sol. salina	Agar
0-3	80	90
3-6	70	80
6-9	60	80
9-12	60	80
12-14	40	80
Área bajo la curva	102	126

Tanto la Gráfica 16 como la tabla 9d dejan claro que la curva de supervivencia de los animales inoculados con Agar es mejor a la de aquellos que fueron inoculados con el vehículo de solución salina.

\* Descripción de las lesiones:

➤ Día 7: Sacrificamos dos animales por grupo este día

- Grupo 1:

Ambos animales presentaban un nódulo de aproximadamente medio centímetro de diámetro, amarillento, situado en el parénquima del pulmón derecho, rodeado de un halo inflamatorio. En uno de los animales existía otro nódulo en la pared costal cerca del esternón, de unos 3 mm de diámetro, amarillento, que fue cortado al abrir la cavidad torácica. No se observaron más lesiones en cavidad torácica ni en ningún otro órgano en ambos animales.

- Grupo 2:

En ambos animales había una lesión nodular en el pulmón derecho rodeada de un halo de inflamación. En uno de ellos existían adherencias con otro nódulo sito en la pared costal, pegado al nódulo pulmonar. En ambos animales hay además lesiones situadas en pleuras, parénquima pulmonar y pared costal de 2 a 3 mm de diámetro, amarillentas. No se observaron más lesiones.

➤ Día 14: Se sacrificaron todos los animales supervivientes este día

- Grupo 1:

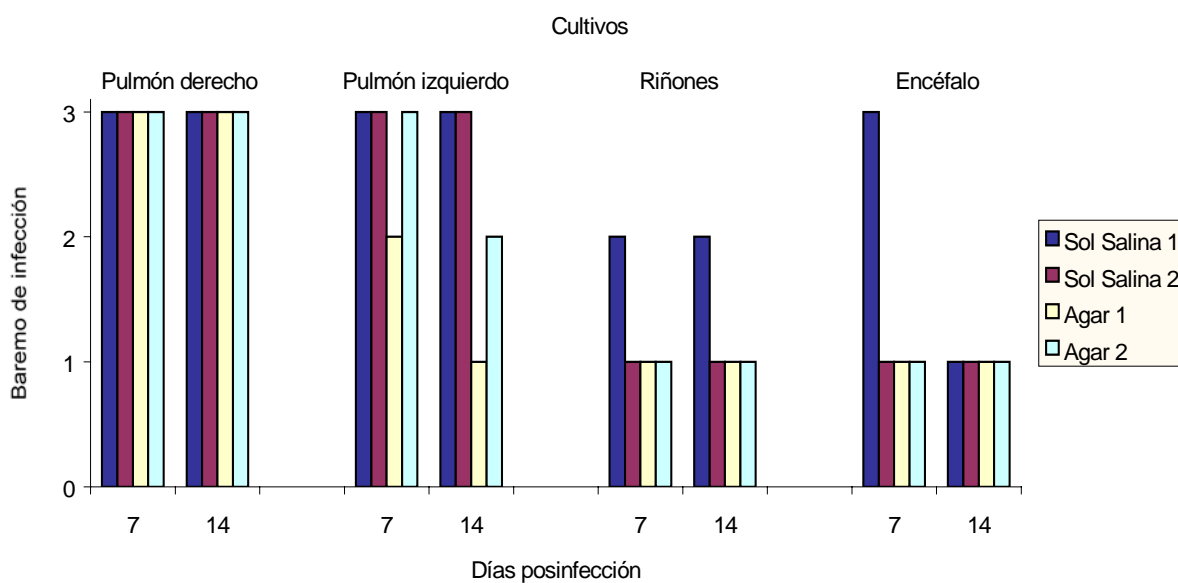
Las lesiones de los animales del grupo 1 eran muy similares. El nódulo en el pulmón derecho de medio centímetro de diámetro, estaba presente en todos los animales y en muchos de ellos se habían formado adherencias con la pared costal, de la que costaba trabajo separar. Un animal presentó, además, lesiones nodulares menores en la cavidad torácica. No se observaron lesiones en otros órganos.

- Grupo 2:

La lesión nodular en pulmón derecho presentaba una zona central de aparente necrosis y un halo de inflamación alrededor en todos los animales de este grupo. En todos ellos había además pequeños nódulos de 2 a 3 mm de diámetro en pleuras, ambos pulmones, mediastino, pared costal y trayecto de la aguja en la inoculación (parte externa de la

pared costal). Eran frecuentes las adherencias entre estas lesiones y las pleuras. No se observaron otras lesiones en otros órganos.

Gráfica 17: Cultivos y valoración según baremo del modelo preliminar 3, infección transtorácica en rata.



En esta gráfica observamos que existió abundante crecimiento de *A. fumigatus* en el pulmón derecho de todos los animales. Además en los animales inoculados con el hongo en solución salina, existe gran crecimiento en pulmón izquierdo, así como es posible hallar crecimiento en riñón y encéfalo. Por el contrario en el grupo inoculado con hongo en Agar, el crecimiento en pulmón derecho es más escaso y no se halló crecimiento ni en riñón ni en encéfalo.

e. Modelo definitivo de Aspergilosis Invasora por inoculación transtorácica

Concluidos los modelos experimentales previos de Aspergilosis Invasora, llegamos a la conclusión de que los animales debían ser inoculados de la siguiente forma:

- Inóculo formado por 10-12 micromicelios (hifas) en medio semisólido

- Inmunosupresión con Dexametasona en agua de bebida, administrada a dosis de 2 mg/l. Con esta pauta se infectaron animales en tres experimentos de diferente duración uno a 21, otro a 24 y el último a 42 días. Con una pauta de inmunosupresión de 1 mg/l en agua de bebida de Dexametasona se realizó un experimento durante 72 días.

En todos los experimentos realizados existía un grupo control no infectado, que era sometido al mismo tipo de inmunosupresión que los animales infectados. El porcentaje de mortalidad de este modelo durante la inoculación fue de entre un 5% y un 10% de los animales. Así mismo, y de modo paralelo, existía un grupo de animales infectados intratraquealmente mediante una técnica mínimamente invasora, descrita anteriormente por Cambrón *et al.*, cuyo porcentaje de muertes durante la inoculación fue menor del 1%. La finalidad de introducir este grupo de animales es comparar en cada caso el modelo intratraqueal con el transtorácico simultáneamente en animales en condiciones similares.

#### d. Modelo de infección a 72 días

En este modelo, los animales fueron inmunosuprimidos con una dosis de 1 mg/ml de Dexametasona en agua de bebida, y se mantuvieron infectados un total de 72 días, lo que hace de él el modelo de mayor tiempo de supervivencia de los realizados en este trabajo.

Utilizamos dos grupos:

Grupo 1, inoculado transtorácicamente (10-14 micromicelios por animal).

Grupo 2, inoculado intratraquealmente ( $1,4 \times 10^5$  conidias por animal)

Grupo Control, no inoculado.

En cada uno de estos dos grupos existían animales con tres finalidades distintas, lo que los dividía en subgrupos:

A) El primero de ellos tenía como fin la obtención de los porcentajes de supervivencia, detallados en la gráfica 18, y la evolución del peso de los animales infectados en la gráfica 19. Ambos grupos se componían de 10 animales y se evitó su manipulación a lo largo del experimento.

B) El segundo se componía de seis animales, con el fin de realizar extracciones sanguíneas los días 2, 7, 15, 21, 28, 36, 48 y 60. Los 6 animales inoculados transtorácicamente sobrevivieron los 72 días, tras los que fueron sacrificados. Sus órganos fueron analizados mediante técnicas histológicas, lo que confirmó lesiones causadas por la presencia del hongo en los seis animales. Sin embargo, de los 6 animales inoculados intratraquealmente únicamente sobrevivieron 4 al final del experimento. El análisis histopatológico de los órganos de estos animales refleja la presencia de lesiones provocadas por el hongo en tres de ellos, mientras que no se hallaron dichas lesiones en el cuarto.

C) Un tercer subgrupo de animales inoculados con ambos métodos, tenía como finalidad confirmar el establecimiento de la infección. De estos grupos sacrificamos dos animales cada 4 días durante los primeros 21 días. De estos animales realizábamos cultivos a partir de los aspirados de las lesiones pulmonares. Los resultados se reflejan en la tabla 11.

Los resultados de las nested PCR realizadas en los sueros tanto en el segundo como en el tercer subgrupo, y en los controles, se hallan en la tabla 12 y las de detección de Galactomanano (Platelia) en la tabla 13.

En la tabla 14 se expresan los resultados de la detección de  $\beta$ -D Glucano en suero de los animales sacrificados el día 72, que corresponden al subgrupo B.

En la tabla 14 están los resultados de los cultivos y detección de galactonamano mediante Platelia Aspergillus test® en el Lavado Broncoalveolar de los animales sacrificados a lo largo del experimento.

### e.1. Porcentaje de supervivencia y evolución del peso

Gráfica 18: Curva de supervivencia, modelo de infección transtorácica e intratraqueal a 72 días.

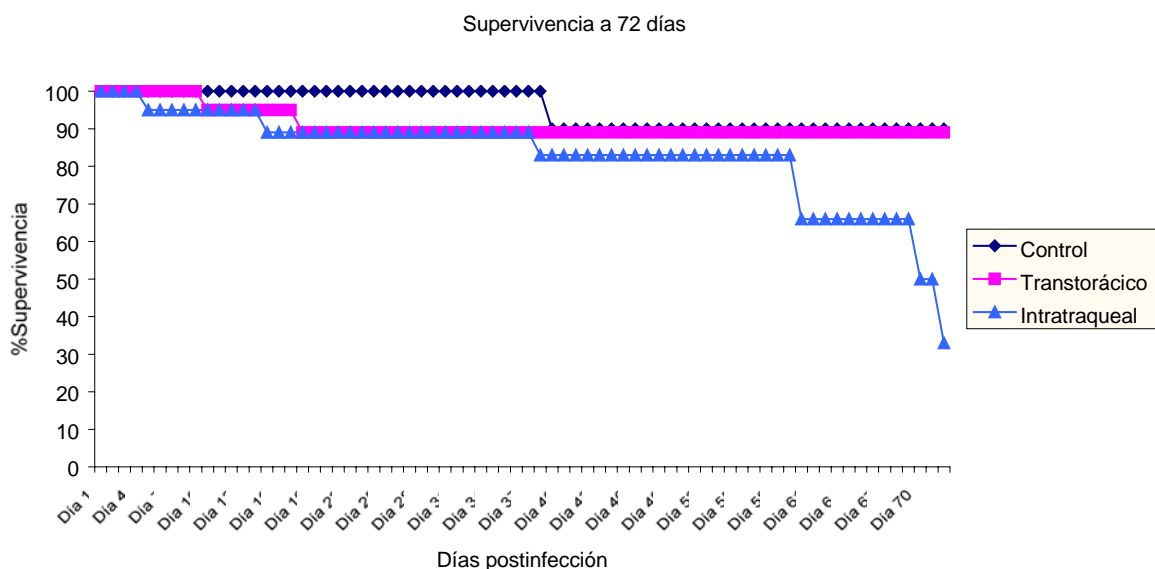
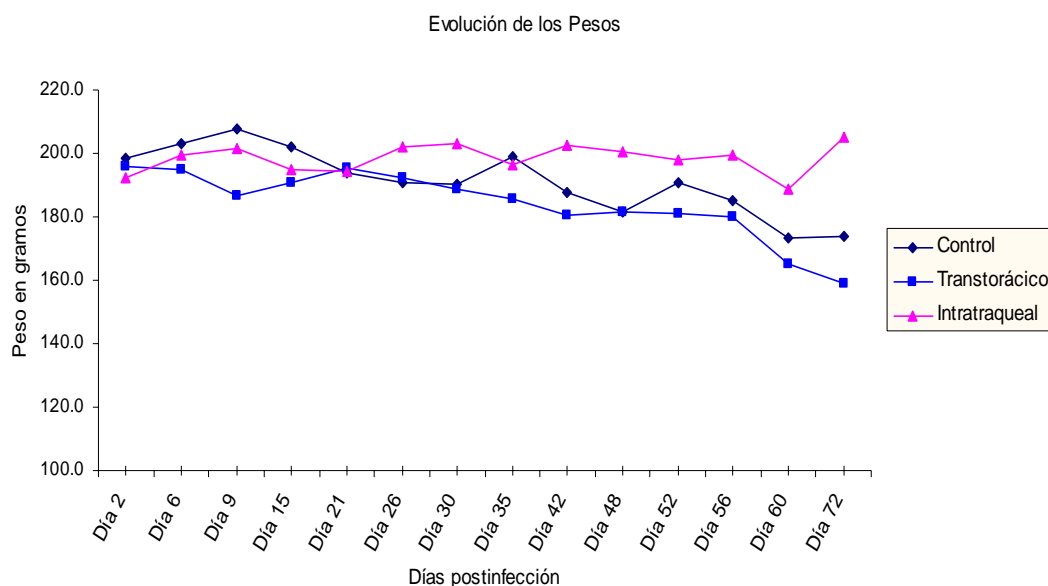


Tabla 10: Probabilidad acumulada de supervivencia, intervalos de siete días, y área estimada bajo la curva

Días post infección	Transtorácica	Intratraqueal	CONTROL
<b>0-7</b>	100	92	100
<b>7-14</b>	92	83	100
<b>14-21</b>	83	83	100
<b>21-28</b>	83	83	100
<b>28-35</b>	83	83	100
<b>35-42</b>	83	75	92
<b>42-49</b>	83	75	92
<b>49-56</b>	83	75	92
<b>56-63</b>	83	58	92
<b>63-72</b>	83	25	92
<b>Área bajo la curva</b>	784	657'5	830

Tanto en la gráfica 19 como en la tabla 10 observamos cómo la supervivencia de los animales en el grupo de inoculación transtorácica es alta hasta el final del experimento el día 72. Dicha probabilidad de supervivencia y el área bajo la curva en el grupo de animales inoculados intranasalmente es menor. El grupo control tiene probabilidades de supervivencia superiores al 90 % hasta el final del experimento.

Gráfica 18: evolución de los pesos de los animales infectados durante 72 días:



El peso medio de los animales de los tres grupos es bastante parecido durante todo el experimento, salvo un aumento del grupo de inoculados intratraquealmente al final del mismo, relacionado con la muerte en este grupo con animales de bajo peso.

## e.2. Resultados de pruebas diagnósticas

Tabla 11: Cultivos: Se realizaron cultivos, a partir del troceado de los pulmones presuntamente afectados, en rosa de Bengala (37° C, 7 días). Se evaluó el crecimiento o ausencia del mismo. En la tabla se presentan los resultados de estos cultivos para los animales sacrificados tanto para el grupo control como para los dos grupos, transtorácico (Grupo1) e intratraqueal (Grupo2), en los días en los que se realizó el sacrificio. A este fin se destinaron animales del subgrupo C de cada uno de los grupos:

<b>Grupo.animal</b>	Día 2	Día 6	Día 10	Día 15	Día 21	Día 72
<b>Control.1</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Control.2</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Control.3</b>	SR	SR	SR	SR	SR	-
<b>Control.4</b>	SR	SR	SR	SR	SR	-
<b>Grupo1.1</b>	+	+	+	-	-	-
<b>Grupo1.2</b>	+	+	+	+	+	-
<b>Grupo 1.3</b>	SR	SR	+	SR	SR	+
<b>Grupo 1.4</b>	SR	SR	SR	SR	SR	+
<b>Grupo 1.5</b>	SR	SR	SR	SR	SR	+
<b>Grupo 1.6</b>	SR	SR	SR	SR	SR	-
<b>Grupo 2.1</b>	+	+	-	+	+	-
<b>Grupo 2.2</b>	+	+	+	+	+	-
<b>Grupo 2.3</b>	SR	-	+	+	+	-
<b>Grupo 2.4</b>	SR	SR	SR	SR	SR	+

+: Positivo; -: negativo; SR  resultados (animales no sacrificados ese día)

Esta tabla muestra cómo no se producen aislamientos positivos de *A. fumigatus* en ninguno de los animales control, a lo largo del experimento. En ambos grupos de infectados es posible hallar cultivo positivo en algún período de la infección. Sin embargo, en ambos grupos hay pulmones procedentes de animales infectados a partir de los cuales no es posible obtener crecimiento, a partir del día 15 en el caso de infección transtorácica y el día 6 en la intratraqueal. En ambos grupos el día 72 se hallan altos porcentajes de negativos (50% en los inoculados transtorácicamente y el 75% en los inoculados intratraquealmente)



Tabla 12: Detección de ADN de *Aspergillus fumigatus* mediante nested PCR en suero en el modelo de infección durante 72 días en animales inoculados transtorácicamente (Grupo1) e intratraquealmente (Grupo2). Dicha detección se realizó en el suero de animales sacrificados en los días correspondientes (subgrupo C) y de los que se extraía sangre (subgrupo B); en estos últimos se mantiene la numeración de dichos animales a lo largo de las diferentes extracciones.

<b>SUEROS</b>	<b>Sacrificados (Subgrupo C)</b>					<b>Extracción (Subgrupo B)</b>									
	<b>Día p.i.</b>	2	6	10	15	21	2	7	15	21	28	36	48	60	72
<b>Control 1</b>	-	-	-	-	-	+		-	+		-	+		-	
<b>Control 2</b>	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-		-	+	+	-
<b>Control 3</b>				-			-	-	-	-	-	-	-	-	
<b>Control 4</b>							-		-	-		-			
<b>Control 5</b>									-	-					+
<b>Control 6</b>															-
<b>Grupo 1.1</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-			-
<b>Grupo 1.2</b>	-	+	+	+	-	-		+	-	+	-	-	+	-	+
<b>Grupo 1.3</b>							-	-	-	-	-	-	-		+
<b>Grupo 1.4</b>							-	-	-	-	-	-			+
<b>Grupo 1.5</b>							-	+	-	-	-	-	-	-	+
<b>Grupo 1.6</b>							-	-	-	+	-	-	+	+	-
<b>Grupo 2.1</b>	+	+	+	-	-	-		-	-	-	+	+		+	+
<b>Grupo 2.2</b>	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+
<b>Grupo 2.3</b>		-				+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
<b>Grupo 2.4</b>							-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Grupo 2.5</b>							-	-	-	-	-	-	-		
<b>Grupo 2.6</b>							-	-	-	+	-	-			

+: positivo; -: negativo. En blanco: sin resultado.

Esta tabla muestra cómo es posible hallar ADN de *A. fumigatus* (PCR +) en suero procedente de animales no inoculados, estos positivos se producen en cualquier momento del experimento. Así mismo es frecuente hallar PCR negativas en animales que han sido bien inoculados por los dos métodos de inoculación aquí utilizados. Es interesante observar cómo los animales en los que se realizaba la extracción de sangre en diferentes días (Subgrupo B) presentan resultados positivos y negativos a esta prueba en ambos modelos, ya que se trata del mismo animal al que se le realizan extracciones sanguíneas en momentos diferentes tras la inoculación.

Tabla 13: Detección de galactomanano (GM) en suero mediante Platelia Aspergillus test® en suero en el modelo de infección durante 72 días en animales inoculados transtorácicamente (Grupo1) e intratraquealmente (Grupo2). Dicha detección se realizó en el suero de animales sacrificados en los días correspondientes (subgrupo C) y de los que se extraía sangre (subgrupo B); en estos últimos se mantiene la numeración de dichos animales a lo largo de las diferentes extracciones.

<b>SUEROS</b>	<b>Sacrificados (Subgrupo C)</b>					<b>Extracción (Subgrupo B)</b>									
	<b>Día p.i.</b>	2	6	10	15	21	2	7	15	21	28	36	48	60	72
<b>Control 1</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<b>Control 2</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Grupo1.1</b>	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	d	+	+		d
<b>Grupo 1.2</b>	-	+	-	-	-	-									
<b>Grupo 1.3</b>		-					+	d	+	-	-	-	+		+
<b>Grupo 1.4</b>							+	+	+	-	d	+	+		-
<b>Grupo 1.5</b>							d	-	-	+	-	-	-	-	+
<b>Grupo 1.6</b>							+	-	-	+	+	-	d	-	-
<b>Grupo 2.1</b>	-	-	-	+	-	-									
<b>Grupo 2.2</b>	-	-	-	-	-	-	d	+	+	+	-	-	-	-	-
<b>Grupo 2.3</b>		+		-	+		-	-	-	-	+	-	+	-	+
<b>Grupo 2.4</b>							+	-	-	-	-	-	+	+	-
<b>Grupo 2.5</b>							-	+	+	+	-	+	+		

+: positivo; -: negativo; d: dudoso. En blanco, sin resultado.

En esta tabla observamos que sólo hay un positivo a GM en suero de animales no inoculados (Controles) En cuanto a los inoculados, se hallan animales positivos y negativos en cualquier momento tras la inoculación tanto en los animales inoculados transtorácicamente (Grupo1) como intratraquealmente (Grupo2) En el caso de los animales inoculados por ambos métodos en los que se realizaron extracciones sanguíneas del mismo animal a lo largo del experimento (Subgrupo B), observamos como en el mismo animal es posible encontrar resultados positivos y negativos a esta prueba según el día en que se produce la extracción.

Tabla 14: detección de  $\beta$ -D-Glucano mediante el kit Fungitec™ en suero en los sacrificados el día 72 tras la inoculación

	Control			Grupo 1(TT)						Grupo 2(IT)			
	1	2	3	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4
Pg/ml	0'0	2'3	4'1	127'1	159'1	313'6	24'7	201'7	14'5	43'2	59'6	96'3	299'6
Interp.	-	-	-	++	++	+++	+	+++	-	+	+	+	+++

Interpretación: Consideramos una cruz para los positivos, más de 20, pero menos de 100. Dos cruces más de 100 y menos de 200 y tres cruces para más de 200 pg/ml. – Para los negativos.

En el caso de la detección de  $\beta$ -D-Glucano en el suero de los animales, tanto por el volumen del mismo necesario, como por la disponibilidad de los reactivos, únicamente se realizó el test en los animales sacrificados en día 72.

El grupo de animales no inoculados (Control) presentó resultado negativo para los tres animales testados. Tanto para los inoculados por el método transtorácico como Intratraqueal, se hallaron resultados positivos en todos los animales, salvo en uno (Grupo inoculado transtraquelamente) en el que el resultado fue negativo.

Tabla 15: Cultivo y detección de Galactomanano en Lavado Bronco alveolar mediante Platelia Aspergillus Test™ en los animales sacrificados a lo largo del experimento.

ANIMALES	Día 2		Día 6		Día 10		Día 15		Día 21		Día 72	
	Cult	GM	Cult	GM	Cult	GM	Cult	GM	Cult	GM	Cult	GM
<b>Control 1</b>	0	+	0	-	0	-	6	-	0	-	0	-
<b>Control 2</b>	0	+	0	-	0	-	6	-	0	-	0	-
<b>Control 3</b>	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	0	-
<b>Control 4</b>	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	0	-
<b>1.1</b>	0	+	0	+	0	-	0	-	0	-	0	-
<b>1.2</b>	0	+	1	+	1	-	1	-	0	-	0	-
<b>1.3</b>	SR	SR	0	-	42	+	SR	SR	SR	SR	1	+
<b>1.4</b>	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	2	-
<b>1.5</b>	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	1	-
<b>1.6</b>	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	0	-
<b>2.1</b>	1	+	3	+	0	+	38	-	0	-	0	-
<b>2.2</b>	7	+	0	-	4	+	1	+	8	-	0	-
<b>2.3</b>	0	+	6	+	SR	SR	9	+	0	-	0	-
<b>2.4</b>	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	6	+

Cult.: Siembra de 50  $\mu$ l de lavado broncoalveolar en Rosa de Bengala (37° C 5 días)

GM: Detección de galactomanano mediante: ELISA (Platelia®). SR: sin resultado.

En esta tabla se muestran, pareados, los resultados del cultivo y detección de GM en el líquido del lavado bronco alveolar. En el caso de los controles, no inoculados, la detección de GM siempre resulta negativa sin embargo en el cultivo de los sacrificados el día 15 tenemos positivos con GM negativo. En cuanto a los animales inoculados encontramos cultivos negativos en muchos de ellos, sobre todo en los últimos días del experimento. Algo similar ocurre con la detección de GM en estas mismas muestras. Cabe destacar que es posible hallar GM positivo con cultivos negativos de esa misma muestra de animales inoculados; 3 de 18 muestras en el modelo transtorácico y 2 de 18 muestras en el intratraqueal, y viceversa (crecimiento en cultivo y GM negativo); 4 de 10 en transtorácico y 2 de 18 en intratraqueal. Así mismo encontramos ambas pruebas con resultado negativo en 8 animales inoculados transtorácicamente y en 6 intratraquealmente de 18 testados en ambos casos.

### e.3. Descripción de las lesiones

En todos los animales se realizaron necropsias completas con extracción de órganos torácicos, abdominales y encéfalo. En las siguientes descripciones caso por caso, sólo se describen las lesiones halladas en dichos órganos. En algunas ocasiones se realizaron necropsias sobre animales muertos (no sacrificados) durante el experimento, aunque en ocasiones dichas necropsias no pudieron ser realizadas si los compañeros de jaula del animal muerto lo habían devorado.

Desde un punto de vista general cabe destacar que todos los animales sobre los que se realizaron las necropsias presentaban un estado de caquexia avanzado y pelo erizado.

En cuanto a la nomenclatura de los animales necropsiados, se les denominó con la letra A (para este experimento hasta 72 días tras la inoculación) y un número correlativo. De esta manera eran enviados a su análisis microscópico, sin ninguna otra nomenclatura. Además, en el caso de los análisis microscópicos se incluye el número de entrada en el laboratorio de histología donde se realizaron. Ambos números se mantienen en las siguientes descripciones, en las que se aclara así mismo a qué grupo de infección pertenecían.

## Inoculación transtorácica

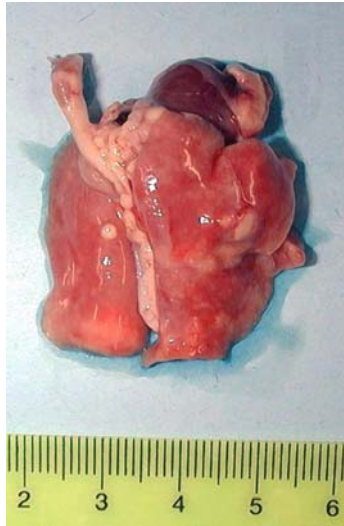
### A1

Existe una lesión amarillenta de 7 mm de largo por 5 de ancho, periforme, localizada en el lóbulo intermedio del pulmón derecho (zona de inoculación). Así mismo existen otras dos lesiones circulares en el lóbulo craneal, cerca del lóbulo medio, de 1mm de diámetro, próximas entre sí y amarillentas. Existen otras 3 lesiones amarillentas de 5mm de diámetro en el pericardio; la primera situada entre los lóbulos medio y diafragmático del pulmón derecho y el diafragma con el que forma fuertes adherencias. La segunda situada cerca de la zona diafragmática del pulmón derecho, formando así mismo adherencias entre pericardio, diafragma y pleura visceral del pulmón derecho; la última se encuentra asociada al diafragma y forma adherencias con diafragma y posiblemente con pleuras. El hígado está más pálido de lo normal. No se hallan lesiones ni en bazo ni en riñones ni encéfalo.



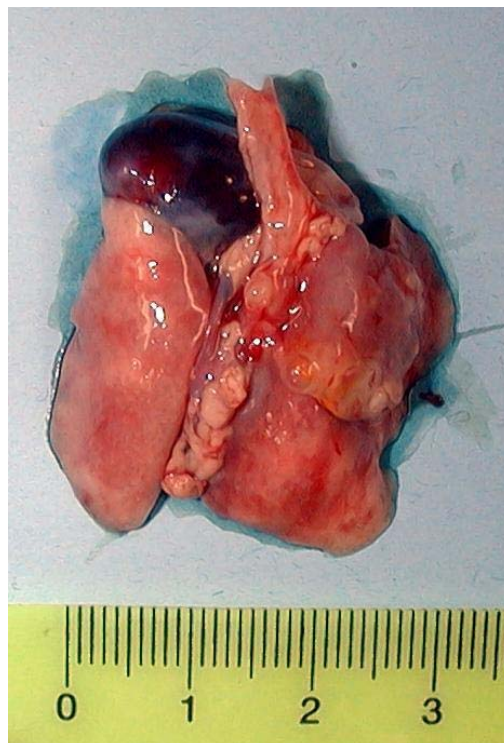
### A2

Existe una lesión amarillenta, circular, de unos 4 mm de diámetro, localizada en la cara dorsal del lóbulo intermedio del pulmón derecho (zona de inoculación). Existe otra lesión similar próxima a la anterior, pero situada en el lóbulo craneal y de 1 mm de diámetro. Existe otra lesión amarillenta en el pericardio, y que forma adherencias con el lóbulo diafragmático del pulmón derecho. Por último existe otra lesión nodular de 2 mm de diámetro en la cara dorsal zona media, del pulmón derecho. El hígado y ambos riñones presentan una coloración más pálida de lo normal.



A3

Amplia lesión situada en la cara dorsal y lateral del lóbulo medio del pulmón derecho (zona de inoculación). Existen fuertes adherencias entre esta lesión y la cara interna de la pared costal. La lesión es alargada, amarillenta, de aspecto seroso, de unos 10 mm de larga por 5 mm de ancha. Adherencias entre el pericardio, diafragma y pleuras. Nódulo de 2'5 mm en pericardio. Hígado muy pálido. En el riñón izquierdo existen lesiones puntiformes, amarillentas, de 0'5 mm de diámetro. El otro riñón tiene aspecto normal.



A4

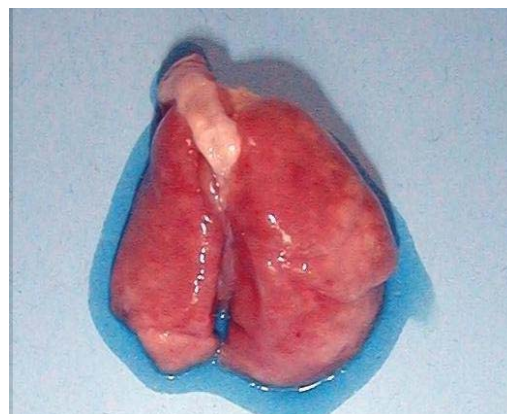
Lesión de unos 7 mm de diámetro, amarillenta, en la zona dorsal del lóbulo medio del pulmón derecho (zona de inoculación). En esta misma localización, pero un poco más mediales, existen otras dos lesiones de 4 y 2 mm de diámetro, amarillentas. También en esta zona, más ventral a la lesión descrita en primer lugar, existe una lesión de unos 7 mm de larga por 4 mm de ancha, formada por múltiples lesiones nodulares de 1 o 2 mm de diámetro. En la zona más apical del lóbulo diafragmático existe otra lesión amarillenta, por la cara diafragmática, de 6mm de larga por 4 de ancha. Existen adherencias entre el pericardio, las pleuras y el diafragma. Al corte del pulmón aparece un nódulo de 1 por 4 mm en el parénquima.

Lesión amarillenta en la cara ventral del riñón derecho cerca del hilio. Este riñón tiene una tonalidad más pálida de lo habitual. Al corte presenta un nódulo de 0'5 mm de diámetro entre la corteza y la médula. El otro riñón es aparentemente normal. Hígado más pálido de lo normal. Se recogen ambos riñones, bazo, hígado y encéfalo.



A5

No existen lesiones aparentes ni en las vísceras torácicas ni abdominales ni en el encéfalo. Al corte aparecen dos nódulos de 1 mm de diámetro en la parte ventral del pulmón izquierdo.



Inoculación intratraqueal:

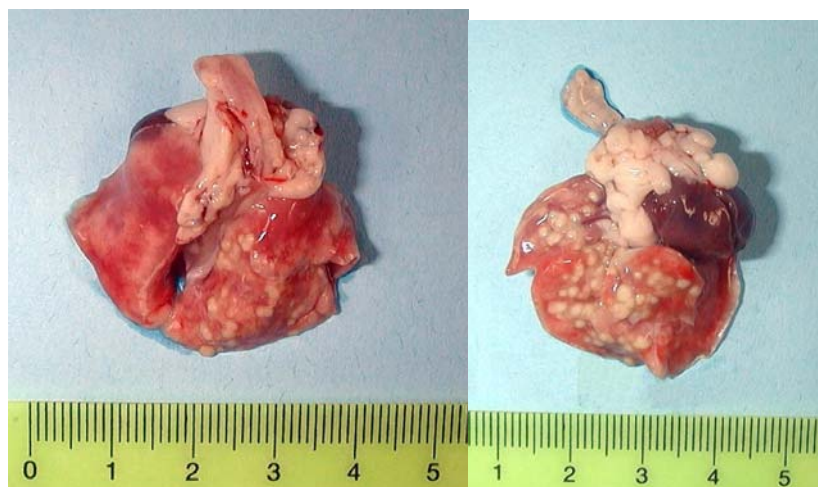
A6

Lesiones nodulares de 1 o 2 mm de diámetro, amarillentas, repartidas por ambos pulmones. Al corte aparecen múltiples nódulos en el pulmón izquierdo, que son más escasos en el derecho. Amplias zonas amarillentas en ambos riñones, que tienen una coloración más pálida de lo normal. Hígado más pálido de lo normal.



A7

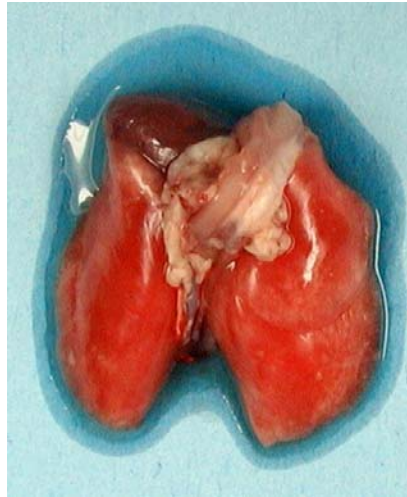
Gran cantidad de lesiones nodulares de 1 o 2 mm de diámetro en el pulmón derecho. La elasticidad del pulmón derecho está muy disminuida, presentándose duro al tacto. Zonas amarillentas en ambos riñones. Hígado muy pálido.





A8

No existen lesiones aparentes en ambos pulmones. Tampoco es posible observar lesiones cuando se realizan cortes en el parénquima pulmonar. Riñones e hígado algo más pálidos de lo normal.



A9

Cuatro lesiones nodulares de unos 3 mm de diámetro en la cara dorsal del pulmón izquierdo y otro par de lesiones muy similares en la cara cardíaca del mismo pulmón. Una sola lesión en la cara diafragmática del lóbulo intermedio del pulmón derecho. Al corte aparecen múltiples nódulos de 2 a 3 mm de diámetro en el parénquima pulmonar. Amplia lesión amarillenta en la zona más caudal de uno de los riñones. Ambos riñones presentan una coloración amarillenta, así como el hígado.



## LESIONES MICROSCÓPICAS:

### Inoculación transtorácica (Grupo 1):

#### A1 (233)

En el pulmón existen varias lesiones asociadas a la pleura, con una zona central de calcificación y extensas zonas de necrosis y varias hifas dentro. Poco infiltrado inflamatorio con escasos macrófagos, linfocitos, células plasmáticas y fibroblastos.

Existen otras lesiones dentro del parénquima pulmonar, que no aparecen contiguas a las anteriores, con gran infiltración de macrófagos, linfocitos, células plasmáticas y fibroblastos, sin presencia de cápsula.

Aparece invasión de arterias por algunas lesiones.

Lesión asociada a pericardio, con amplia zona de necrosis e hifas rodeadas de neutrófilos, linfocitos y células plasmáticas. Existe una amplia zona de fibrosis, o cápsula en formación.

Zonas hemorrágicas asociadas a la lesión.

Degeneración glucogénica en todo el hígado, posiblemente debida al prolongado tratamiento con Dexametasona.

En la superficie del hígado, en la cápsula, existe una lesión por *Aspergillus*. Las hifas han llegado a él desde el pulmón y atravesando el diafragma.

#### A2 (234)

Lesión pulmonar asociada a pleura, con una zona central de calcificación y extensas zonas de necrosis y varias hifas dentro. Poco infiltrado inflamatorio con escasos macrófagos, linfocitos, células plasmáticas y fibroblastos. Existen granulomas múltiples en el parénquima con gran infiltrado, sobre todo de células plasmáticas y escaso tejido de granulación. Trombosis ocasional, sobre todo cerca de los granulomas.

Lesión cardíaca asociada a pericardio, con tejido de granulación, fibroblastos, células plasmáticas y linfocitos, pero escasa inflamación.

Depleción de linfocitos T en las vainas linfoides. Presencia de megacariocitos en mayor proporción de lo normal. Esta presencia de megacariocitos se puede explicar porque este animal pertenece al grupo de los que han sido sangrados cada 15 días

Degeneración grasa perilobulillar moderada en hígado. No hay lesiones causadas *Aspergillus*.

No hay lesiones renales de ningún tipo.

En encéfalo meningoencefalitis. Lesión en corteza cerebral, que llega a afectar al hipocampo, con dos focos de necrosis por licuefacción en el centro de la lesión, presencia de hifas pero no muy numerosas, proliferación de células de microglía, neutrófilos, monocitos, linfocitos y células plasmáticas ocasionales.

Hemorragias petequiales en el encéfalo.

A4 (236)

Granuloma de gran tamaño asociado a la parte externa de la pleura del pulmón derecho, con numerosas hifas, necrosis, tejido de granulación y fibrosis, con escaso infiltrado inflamatorio. Las hifas atraviesan la pleura en algunos puntos, provocando pleuritis necrótica y alcanzando los alvéolos.

Existen numerosos nódulos de pequeño tamaño en el parénquima de ambos pulmones, con escasas hifas en su interior, no asociadas a necrosis ni fibrosis, con presencia de neutrófilos, macrófagos y escasas células gigantes multinucleadas. Debe tenerse en cuenta que el paso de macrófagos a células gigantes está mediado por Linfocitos; la Dexametasona impide la acción de estos, por lo que las células gigantes no resultan frecuentes en estas lesiones.

En varios bronquios aparecen hifas con tejido necrótico, exudado y neutrófilos, lo que explicaría la presencia de las múltiples lesiones debidas a una diseminación de la lesión asociada a pleura a través de las vías aéreas pulmonares.

Depleción muy severa de linfocitos T en las vainas linfoides del bazo. Megacariocitos abundantes y hemosiderina.

Pericarditis causada por un nódulo asociado al pericardio, con gran cantidad de hifas y necrosis en su interior y gran cantidad de tejido de granulación en su periferia, pero escaso infiltrado inflamatorio.


En el hígado hallamos degeneración glucogénica intensa. No hay infiltrado inflamatorio ni lesiones que se puedan asociar a la presencia del hongo.

Cilindros hialinos, infiltrado intersticial y glomerulonefritis membranosa en buena parte del riñón. Presencia del granuloma típico de una lesión reciente, con escasas hifas en su interior, sin tejido necrótico ni fibrosis, pero con presencia de macrófagos y células gigantes. Hay infiltrado de neutrófilos en el interior de algunos túbulos renales.

No hay lesiones en encéfalo.

A5 (237)

No existen lesiones en la superficie del pulmón, pero sí en el interior del parénquima. Son escasas y en general de pequeño tamaño, con escasa necrosis pero muchas hifas rodeadas de un abundante infiltrado de macrófagos y situados en la periferia, numerosos linfocitos y células plasmáticas.

No existen lesiones en el resto de los órganos. 

Inoculación intratraqueal (Grupo2)

A6 (238)

Presencia de múltiples granulomas intrapulmonares, de pequeño tamaño y distribuidos en todo el parénquima pulmonar de ambos pulmones y que suelen estar asociadas a bronquios terminales. Dichos nódulos presentan una zona central de necrosis con gran número de hifas y escaso infiltrado inflamatorio.

Depleción moderada de linfocitos T en las vainas linfoides del bazo.

Degeneración vacuolar glucogénica en hígado

Corazón y Riñón no presentaron lesiones.

A7 (239)

Presencia de gran número de granulomas de distinto tamaño en ambos pulmones, con calcificaciones en la zona de necrosis central (también hay calcificaciones en algunas zonas de la periferia de dichas lesiones). También existen algunos nódulos más recientes que presentan poca calcificación. Todos presentan gran cantidad de hifas rodeando las zonas calcificadas y escasa infiltración de células inflamatorias en la periferia (neutrófilos, macrófagos y linfocitos, del interior al exterior).

Depleción moderada de linfocitos en las vainas linfoides del bazo; linfocitos en mayor proporción de lo normal.

El resto de órganos no presenta lesiones microscópicas, excepto el hígado, que presenta una degeneración glucogénica no asociada a la presencia del hongo.

A8 (240)

No hay lesiones en ninguno de los órganos, excepto algunas petequias en el riñón, no achacables a la presencia del hongo (tal vez provocadas por estrés en alguna manipulación).

El bazo presenta una apariencia normal, prácticamente sin depleción de linfocitos en las vainas.

A9 (241)

En pulmón múltiples granulomas en el parénquima de ambos pulmones, con abundante necrosis e hifas (en algunas ocasiones se ven dilataciones de las hifas: aleuriosporas), rodeadas de escaso infiltrado inflamatorio, neutrófilos, macrófagos y linfocitos.

Existe un granuloma asociado a la serosa de la tráquea, con aspecto muy parecido a los presentes en el parénquima pulmonar, aunque con mayor presencia de tejido de granulación.

Depleción de linfocitos moderada en las vainas linfoides. Presencia de megacariocitos y hemosiderina.

El resto de órganos no presenta lesiones.

Una vez habíamos utilizado la inoculación transtorácica en un modelo de supervivencia a largo tiempo, decidimos realizar varios modelos de inoculación tanto transtorácica como intratraqueal con períodos de supervivencia inferiores a 72 días. La única diferencia con respecto al modelo de 72 días, además de la duración del mismo es que los animales fueron inmunosuprimidos con una dosis de 2 mg/ml de Dexametasona en agua de bebida, en vez de 1 mg/l como sucedía en el modelo a 72 días. En estas condiciones realizamos tres modelos a 24 y a 42 días. En ambos inoculamos animales por el método transtorácico a) (Grupo1 o TT), con 10-14 bolas de conidias por animal y b) intratraqueal (Grupo 2 o IT) con  $1'4 \times 10^5$  conidias por animal. La finalidad de estas nuevas inoculaciones era la obtención de nuevos resultados frente a distintas pruebas diagnósticas que nos permitiesen definir mejor este nuevo modelo con respecto a dichas pruebas.

f. Modelo de infección a 42 días:

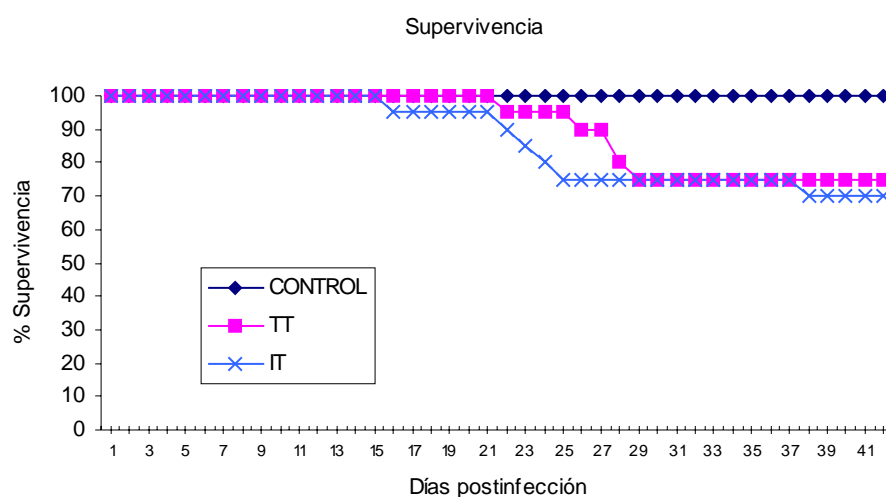
En el modelo de supervivencia a 42 días, inoculamos 32 animales del Grupo 1, transtorácico, y 25 animales del Grupo 2, intratraqueal y 15 controles. 5 de estos animales por grupo se dedicaron a realizar un seguimiento radiológico semanal. De los restantes realizamos sacrificio de algunos animales por grupo (Grupo 1, Grupo 2 y Control) los días 7, 14, 21 y 28.

El día 42 fueron sacrificados todos los animales supervivientes. Para las curvas de supervivencia sólo se tuvieron en cuenta los animales no sacrificados a lo largo del experimento.

Los resultados obtenidos en el modelo de infección a 42 días se detallan en los siguientes gráficos y tablas:

f.1. Porcentaje de supervivencia y evolución del peso

Gráfica 20: Curva de supervivencia del modelo de infección por *A. fumigatus* a 42 días.



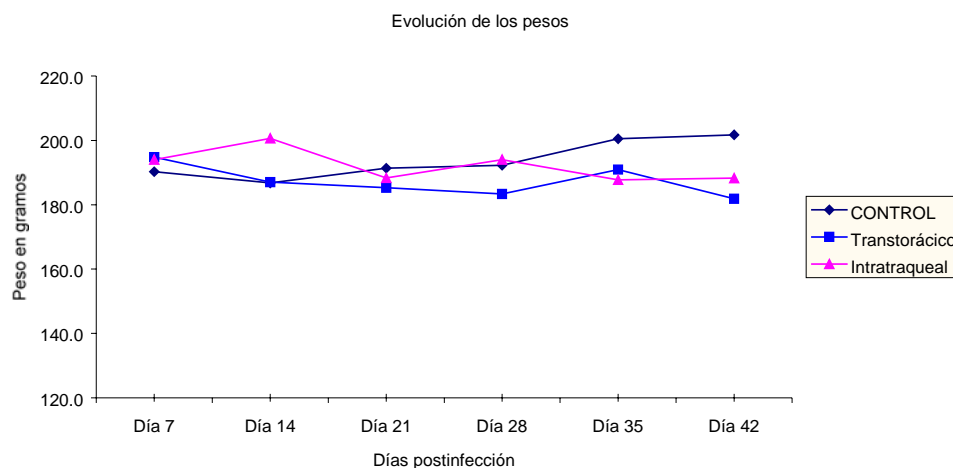
TT, inoculación transtorácica, e IT: inoculación intratraqueal

Tabla 16: Probabilidad acumulada de supervivencia a intervalos de siete días y área estimada bajo la curva

Días post infección	Transtorácica	Intratraqueal
<b>0-7</b>	100	100
<b>7-14</b>	100	100
<b>14-21</b>	100	93
<b>21-28</b>	73	67
<b>28-35</b>	67	67
<b>35-42</b>	67	60
<b>Área bajo la curva</b>	549'5	532

Tanto las curvas de supervivencia como el área bajo la curva y la probabilidad acumulada de supervivencia en los distintos intervalos, nos indican que la mortalidad en ambos tipos de inoculación es bastante similar durante todo el experimento.

Gráfica 21: Evolución de los pesos de los animales en el modelo de supervivencia a 42 días.



La evolución del peso medio de los animales control y de los inoculados por ambos métodos son muy similares a lo largo de todo el experimento

## f.2. Resultados de pruebas diagnósticas

Tabla 17: Resultados de la siembra del troceado de órganos. Se realizaron cultivos en rosa de Bengala (37° C, 5 días), a partir de las lesiones de los órganos afectados.

	Control	Grupo 1 (TT)	Grupo 2 (IT)
Día 5	-	+ <sup>(1)</sup> , +	+, +
Día 12	-	+, +	+
Día 19	-	+	+ <sup>(2)</sup> , +
Día 24	-	+, +	+, +

Cada símbolo indica los resultados en un animal sacrificado.

(1): Sembrados también cerebro, resultado +, y pleura con resultado +.

(2): Sembrados también riñón con resultado +, e hígado con resultado -.

No se aisló *A. fumigatus* de ningún animal control sacrificado. En los animales inoculados por ambos métodos, siempre se aisló *A. fumigatus* a partir de las lesiones de todos los órganos que tenían lesiones. No se realizaron cultivos a partir de órganos sin lesiones macroscópicas en animales inoculados.

Tabla 18: Resultados de las pruebas diagnósticas realizadas tanto en suero como en LBA, en los animales sacrificados en los diferentes días en el modelo de infección a 42 días.

	LBA				Suero				Lesiones (Asp)
	Cultivo	PCR	Platelia	Pastorex	PCR	Platelia	Pastorex	β-D-Glu	
<b>Día 7</b>									
Control	0	-	-	-	-	-	-	2'2 -	-
11	0	-	+	+	-	-	-	53'27 +	++
12	0	+	+	+	+	-	-	33'06 +	+
13	0	-	-	-	-	-	-	49'96 +	+
14	0	-	+	+	+	-	-	54 +	+
21	2	+	+	+	+	-	-	29'02 +	+
22	9	-	+	+	+	+	-	43'35 +	++
<b>Día 14</b>									
Control	0	-	-	-	-	-	-	24'6 +	-
11	0	-	-	-	-	-	-	49'23 +	+
12	0	-	-	-	-	-	-	38'21 +	+
13	0	-	-	-	-	-	-	27'92 +	+
14	0	-	-	-	-	-	-	31'96 +	+
21	98	-	+	+	-	+	-	30'86 +	++
22	46	-	+	+	-	+	+	30'86 +	++
<b>Día 21</b>									
Control	0	-	-	-	+	-	-	22'04 +	-
11	186	-	+	+	-	+	+	21'67 +	+++
12	0	+	-	-	-	-	-	27'92 +	+
13	0	-	-	-	-	-	-	16'9 d	+
21	0	-	-	-	-	+	+	53'27 +	++d
22	0	-	-	-	-	+	+	62'45 +	++d
<b>Día 28</b>									
Control	0	-	-	-	-	-	-	14'33 d	-
11	0	+	+	+	-	+	+	44'45 +	+
12	2	-	+	+	-	-	-	19'1 d	+
13	0	-	-	-	-	d	-	23'51 +	+
14 (Muerta)	30	-	+	-	---	---	---	---	++
21	0	-	+	-	-	-	-	51'43 +	+
22	0	-	-	-	-	-	-	45'19 +	+d
<b>Día 35</b>									
Control 1	0	-	-	-	-	-	-	17'27 d	-
Control 2	0	-	-	-	-	d	-	33'8 +	-
11	0	-	d	+	-	-	-	24'98 +	+
12	0	-	-	-	-	-	-	20'94 +	+
13	0	-	-	-	-	-	-	27'55 +	+
14	0	-	+	-	-	-	-	13'59 d	+
15	0	-	+	-	-	-	-	29'02 +	++
16	0	-	+	-	-	-	-	38'57 +	+
21	0	-	+	-	-	-	-	34'53 +	+
22	0	-	+	-	-	-	-	14'33 d	+
23	2	+	+	-	-	+	+	37'47 +	+++
24	0	-	+	-	-	-	-	25'35 +	+



Día 42	Cultivo	LBA			Suero			β-D-Glu	Lesiones (Asp)
		PCR	Platelia	Pastorex	PCR	Platelia	Pastorex		
Control 1	0	-	-	-	-	-	-	17'27 d	-
Control 2	0	-	-	-	-	-	-	0'37 -	-
Control 3	0	-	-	-	-	-	-	2'94 -	-
Control 4	0	-	-	-	-	-	-	1'84 -	-
Control 5	0	-	-	-	-	-	-	4'78 -	-
Control 6	0	-	-	-	-	-	-	3'31 -	-
Control 7	0	-	-	-	-	-	-	2'57 -	-
Control 8	0	-	-	-	-	-	-	1'47 -	-
Control 9	0	-	-	-	-	-	-	3'31 -	-
11	0	-	-	-	-	-	-	4'41 -	+
12	2	+	-	+	-	+	-	0'37 -	+d
13	0	-	-	+	+	-	-	36'37 +	+
14	0	-	+	+	-	-	-	42'61 +	+
15	0	-	-	-	-	-	-	24'25 +	++
16	0	-	-	-	+	-	-	19'84 d	+
17	0	-	-	-	+	+	+	44'45 +	+
21	0	-	-	-	+	-	-	12'86 d	+
22	0	-	-	-	+	-	-	28'65 +	+
23	9	+	+	+	+	-	-	51'43 +	+++d
24	7	+	+	+	+	+	-	2'57 -	+
25	5	+	+	-	-	+	+	44'82 +	++d
26	0	-	+	-	-	-	-	68'33 +	-
27	2	-	+	-	+	d	-	40'41 +	+
28	0	-	-	-	-	-	-	13'59 d	+
29	0	-	-	-	-	-	-	30'12 +	+
210	0	-	-	-	-	-	-	24'89 +	++

+: Positivo; -: negativo; d: dudoso; ---: Sin resultados.

En caso del β-D-Glucano, se considera positivo a partir de 20 pg/ml, y dudoso entre 10 y 20 pg/ml. Los resultados cuantitativos de cada animal se expresan en la tabla así como su interpretación.

En el cultivo del lavado bronco-alveolar se indica el número de colonias que se aislaron en cada placa.

Así mismo indicamos en una columna las lesiones encontradas en los animales sacrificados y que se describen posteriormente. Los símbolos de esta columna califican a las lesiones se califican de la siguiente manera:

-: No hay lesiones, +: Lesiones leves, ++: Lesiones moderadas, +++: Lesiones graves.

La letra “d” indica diseminación a otros órganos no torácicos.

Tabla 19: Resultados de la detección de ADN de *A. fumigatus*,  $\beta$ -D-Glucano y Galactomanano en suero.

SUEROS	Material detectado:  Prueba:  Resultado:	ADN-Aspergillus		$\beta$ -D-Glucano	Galactomanano				
		Nested-PCR		FUNGITEC <sup>®</sup>	Platelia <sup>®</sup>			Pastorex <sup>®</sup>	
		+	-	Pg/ml Media y desv	+	d	-	+	-
Día 7	Control	0	1	2'2 -	0	0	1	0	1
	Grupo 1	2	2	47'57 (9'83) +	0	1	3	0	4
	Grupo 2	2	0	36'19 (10'13) +	1	0	1	0	2
Día 14	Control	0	1	24'6 +	0	0	1	0	1
	Grupo 1	0	4	36'83 (9'29) +	0	0	4	0	4
	Grupo 2	0	2	30'86 (0) +	2	0	0	1	1
Día 21	Control	0	1	22'04 +	0	0	1	0	1
	Grupo 1	0	4	22'16 (5'53) +	1	0	2	1	2
	Grupo 2	0	2	57'86 (6'94) +	2	0	0	2	0
Día 28	Control	0	1	14'33 d	0	0	1	0	1
	Grupo 1	0	3	29'02 (4'42) +	1	1	1	1	2
	Grupo 2	0	2	48'31 (6'98) +	0	0	2	0	2
Día 35	Control	0	2	25'53 (11'7) +	0	1	1	0	2
	Grupo 1	0	6	25'78 (8'4) +	0	0	6	0	6
	Grupo 2	0	4	27'92 (10'4) +	1	0	3	1	3
Día 42	Control	0	9	4'2 (5'1) -	0	0	9	0	9
	Grupo 1	2	4	24'61 (17'7) +	2	0	5	1	7
	Grupo 2	5	5	31'78 (19'9) +	2	1	7	1	9

+: Positivo; -: negativo; d: dudoso. Se indica el número de animales en cada grupo según su interpretación.

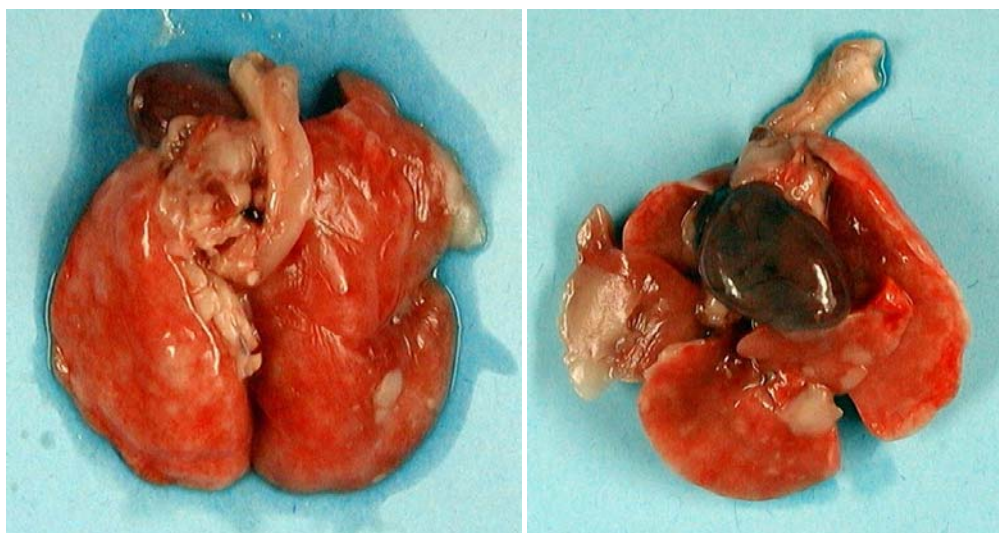
En caso del  $\beta$ -D-Glucano, se considera positivo a partir de 20 pg/ml, y dudoso entre 10 y 20 pg/ml. En este caso se indica la media aritmética de los animales de cada grupo así como la desviación estándar de dichos grupos entre paréntesis. El símbolo indica la interpretación del resultado de la media.

### f.3. Descripción de las lesiones

La denominación de los animales necropsiados y las muestras histológicas para este experimento, incluye la letra B, modelo a 42 días, para diferenciarla del modelo a 72 días, en el que usamos la A, seguida de un número. El número lo otorgamos de manera correlativa a los animales que íbamos necropsiando sin tener en cuenta del método con que los animales fueron inoculados. A los órganos que íbamos recogiendo de estos animales, para su análisis microscópico, les asignábamos la misma denominación. En algunos animales se describen, además de las lesiones, los síntomas antes del sacrificio, cuando considerábamos que eran de interés.

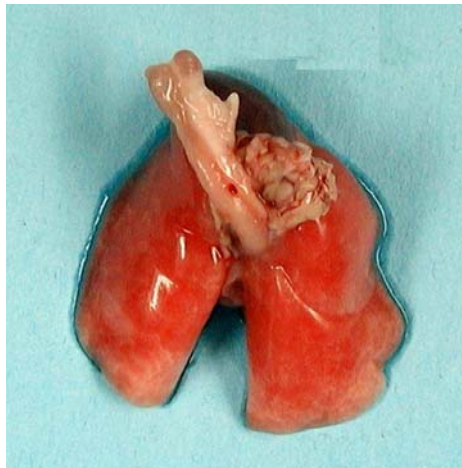
#### B1

Este animal fue inoculado con método transtorácico y necropsiado a los 7 días postinfección. Presentaba una lesión nodular amarillenta de 3 mm de diámetro en la cara dorsolateral del lóbulo diafragmático del pulmón derecho. Existía otra lesión que ocupa el borde lateral del lóbulo intermedio del pulmón derecho, y que se extiende por la cara ventral del mismo. Otra lesión del mismo aspecto y de 4 mm de diámetro, ocupaba el borde medial en la cara diafragmática del lóbulo diafragmático del pulmón derecho. En la cara diafragmática del lóbulo intermedio había dos lesiones amarillentas de 2 mm de diámetro. La necropsia se realiza post-mortem, unas dos horas tras la muerte del animal.



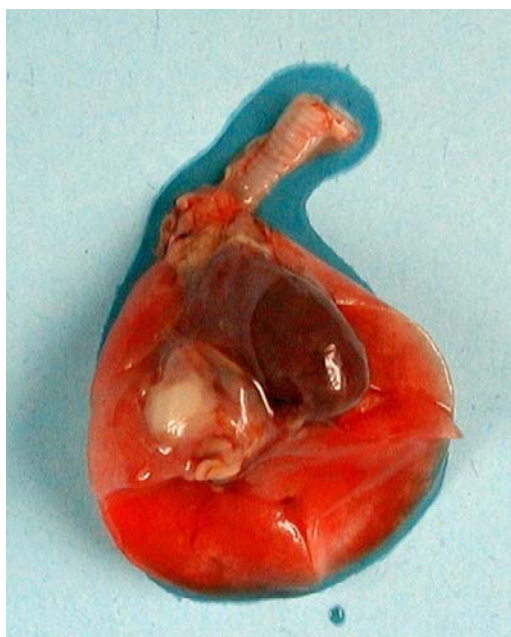
#### B2 y B3

Estos dos animales habían sido inoculados con el método intratraqueal y fueron sacrificados a los 7 días postinfección. No encontramos alteraciones macroscópicas en pulmones ni en vísceras abdominales. En B2 se observa una hemorragia focal en el hígado. En ninguno de los dos pulmones se observaron otras lesiones macroscópicas.



#### B4

Rata inoculada con el método transtorácico y sacrificada el día 14 postinfección. Presentaba una lesión nodular amarillenta de 6 mm de diámetro situada en el borde medial del lóbulo intermedio del pulmón derecho. Fuertes adherencias entre este lóbulo, el nódulo y el pericardio. Macroscópicamente no se llega a determinar si la lesión está incluida en el parénquima pulmonar o sólo afecta a la pleura. No hay lesiones macroscópicas en las vísceras abdominales.

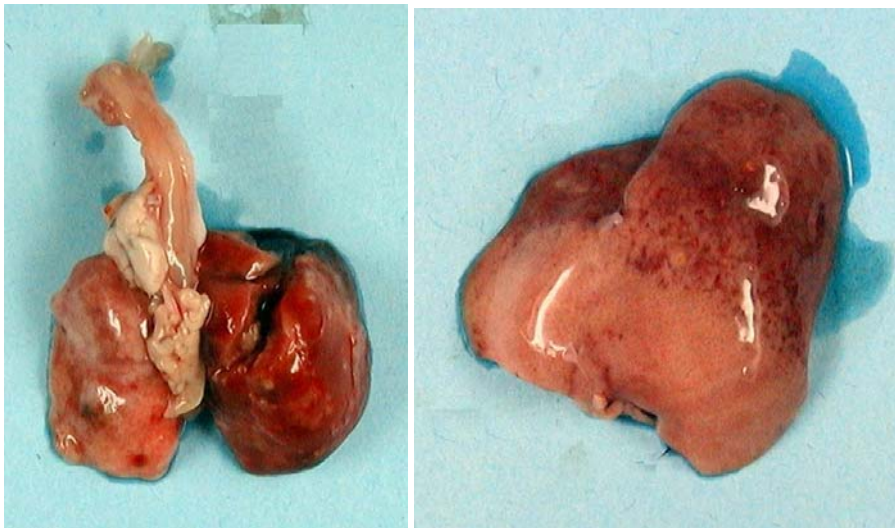


B5

Animal inoculado con el método intratraqueal y sacrificado el día 14 postinfección. El animal presenta estertores respiratorios incluso sin estrés, y un estado de caquexia avanzada, así como epistaxis poco severa

En la necropsia el pulmón derecho aparecía completamente hemorrágico, con nódulos amarillento-verdosos de 0'5 a 1 mm de diámetro en todo el parénquima. En el proceso de extracción de las vísceras torácicas el pulmón derecho sufre un desgarro debido a la pérdida de elasticidad del mismo, lo que también lo hacía duro al tacto. El pulmón izquierdo presentaba 3 zonas hemorrágicas y un pequeño nódulo amarillento de 0'5 mm en su cara dorsal. El lóbulo accesorio presentaba una zona hemorrágica. Cuando realizamos el corte del pulmón derecho observamos que el 90% de su volumen estaba compuesto por nódulos.

En cuanto a las vísceras abdominales, parte del hígado presenta aspecto hemorrágico y escasos nódulos de 1 mm de diámetro de color amarillento repartidos por el parénquima. No observamos lesiones en el resto de las vísceras abdominales, excepto petequias ocasionales al corte en los riñones.

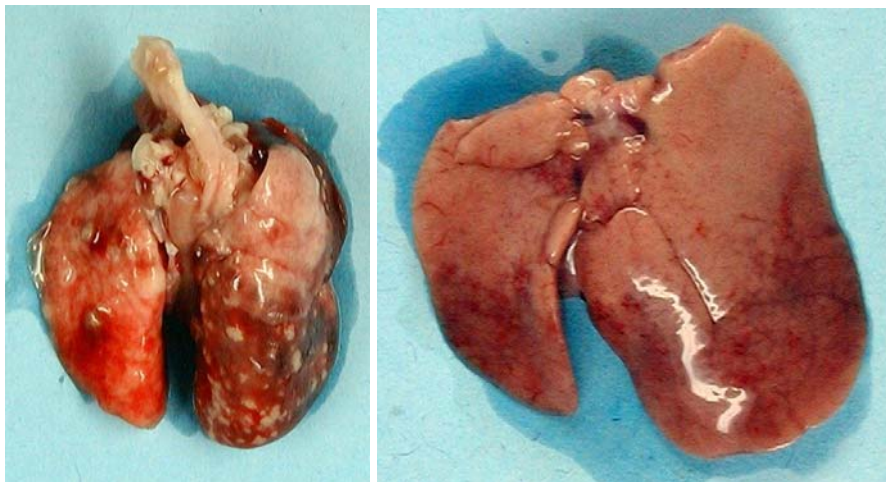


B6

Animal inoculado intratraquealmente y sacrificado el día 14 postinfección. Presentaba estertores respiratorios incluso sin estrés, así como un estado de caquexia avanzada y epistaxis poco severa.

Presentaba el pulmón derecho completamente hemorrágico, excepto el lóbulo craneal, con nódulos amarillento-verdosos de 0'5 a 2 mm de diámetro en todo el pulmón, que

confluyen unos con otros en algunos puntos. Existía una evidente pérdida de la elasticidad del pulmón, lo que lo hace duro al tacto. El pulmón izquierdo presentaba varios nódulos, menos abundantes que el pulmón derecho, de entre 0'5 y 2 mm de diámetro, así como una zona hemorrágica. En cuanto a vísceras abdominales, parte del hígado presenta aspecto hemorrágico. También hallamos esplenomegalia, y una lesión en la cara interna del bazo de 4 por 2 mm de diámetro. Al corte uno de los riñones presenta una zona de infarto.



B7

Este animal fue inoculado con el método transtorácico y hallado muerto el día 18 postinfección, tras lo que se le practicó la necropsia. Presentaba pericarditis y fuertes adherencias entre las pleuras y el pericardio. En este último hallamos una lesión amarillenta de 10 mm de larga por 5 mm. Las vísceras abdominales presentan un comienzo de estado de putrefacción, pero ninguna lesión compatible con Aspergilosis.



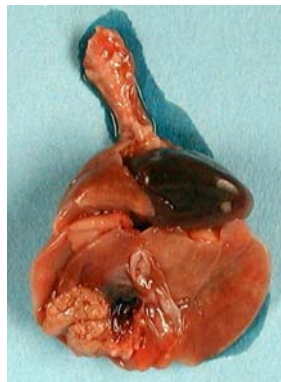
B8

Animal inoculado mediante inoculación transtorácica y hallado muerto el día 18 postinfección. Presentaba una lesión amarillenta de 10 mm de larga por 4 mm de ancha, situada en el borde caudal y medial del lóbulo diafragmático del pulmón derecho. La lesión apareció en la cara dorsal y en la cara diafragmática de dicho lóbulo, presentando, en esta, adherencias con el diafragma y una zona hemorrágica. Ambos riñones presentaban lesiones de límites difusos, amarillentas, ocupando extensas zonas de dichos órganos.



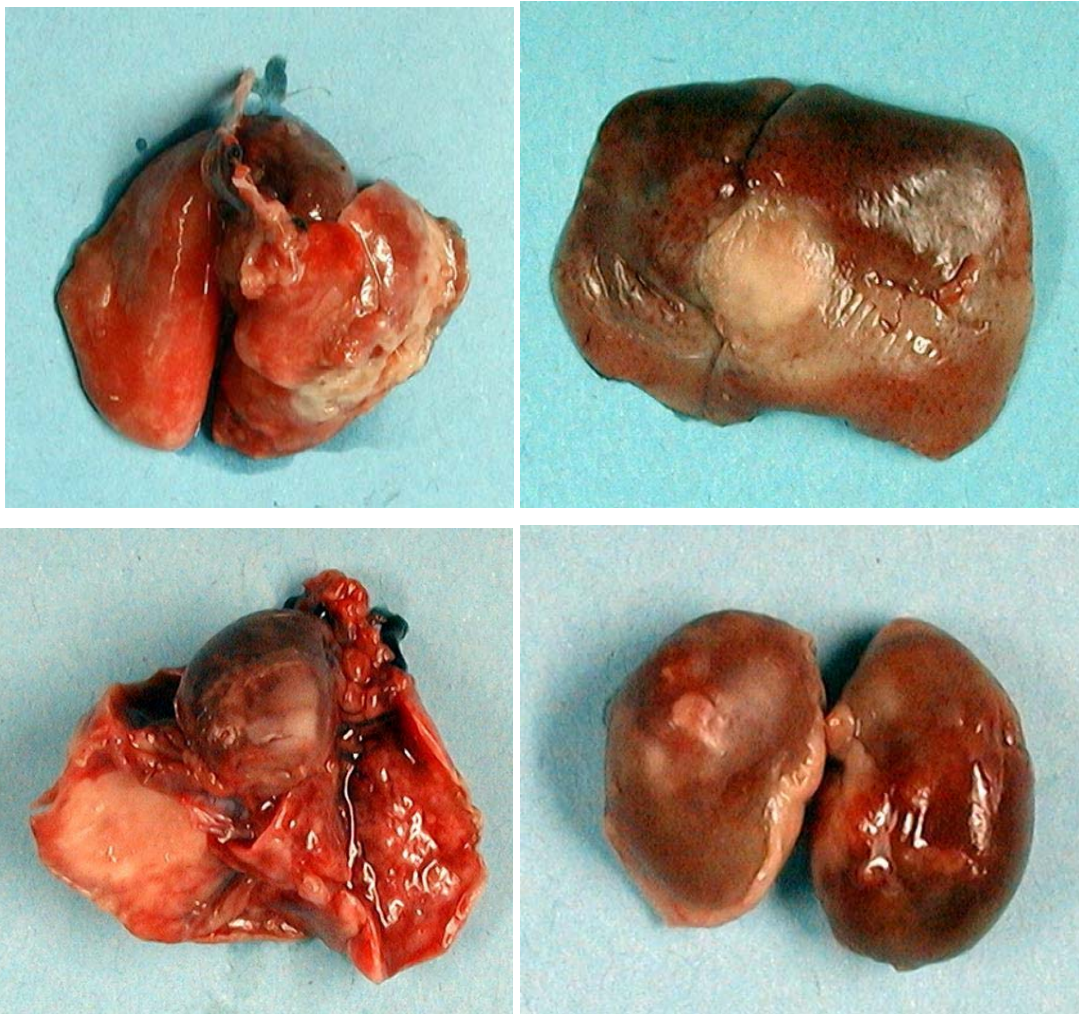
B9

Animal inoculado con el método transtorácico y hallado muerto el día 21 postinfección. En la necropsia se observó una lesión amarillenta de 7 mm de larga por 4 mm de ancha, situada en el borde caudal y medial del lóbulo diafragmático del pulmón derecho. Existen adherencias entre la zona de esta lesión y el diafragma. En el resto del pulmón derecho y en el pulmón izquierdo existían nódulos de 0,5 a 2 mm de diámetro no muy abundantes. Ambos riñones presentaban lesiones de límites difusos, amarillentas, ocupando extensas zonas de dichos órganos. También existía esplenomegalia.



B10

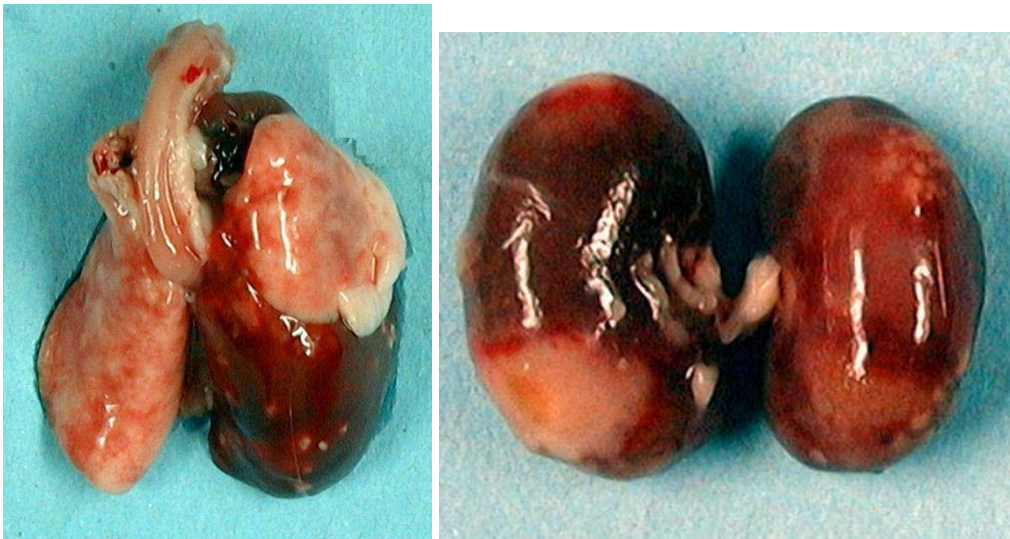
Animal inoculado transtorácicamente y sacrificado el día 21 postinfección. Presentaba una lesión de 20 mm de larga por 7 de ancha, que al corte evidencia una penetración 1 mm en el parénquima pulmonar. De color amarillento, afectaba al borde lateral del lóbulo diafragmático del pulmón derecho. Dicha lesión se continuaba en la pared torácica interna adyacente a la zona pulmonar donde se hallaba. Existían numerosas adherencias entre el pericardio, las pleuras y el diafragma. El hígado presentaba una lesión nodular de 8 mm de diámetro. Los riñones presentaban lesiones amarillentas de límites difusos en toda su superficie. Al corte aparece una zona grisácea necrótica de 3 por 4 mm de diámetro en el hemisferio izquierdo del cerebro.





B11

Animal inoculado intratraquealmente y sacrificado el día 21 postinfección. El lóbulo diafragmático del pulmón derecho presentaba zonas hemorrágicas con nódulos amarillentos de 0'5 a 1 mm de diámetro; al corte este pulmón presentaba gran cantidad de nódulos en el parénquima. En el pulmón izquierdo hay algunos de estos nódulos, pero en muy escaso número. Ambos riñones presentan lesiones amarillentas que ocupan grandes zonas de su superficie, que afectan también a la corteza y médula renales. Algunas de estas lesiones parecían estar formadas por la unión de otras más pequeñas. El hígado estaba más pálido de lo normal.



B12

Este animal fue sacrificado el día 21 tras su inoculación con el método intratraqueal. Hallamos multitud de nódulos amarillentos en ambos pulmones, de varios tamaños. Al corte el pulmón derecho presentaba nódulos en el parénquima. Se aprecia un nódulo de 2 mm en el pericardio. Ambos pulmones tenían una consistencia dura y firme a la palpación. También existían algunas zonas hemorrágicas de pequeño tamaño. El hígado presentaba lesiones nodulares de 2 a 3 mm de diámetro y otras no nodulares, amarillentas de mayor tamaño (10 mm x 7 mm) y que en ocasiones se situaban en los bordes de los lóbulos hepáticos. Los riñones poseían múltiples lesiones en toda su superficie, amarillentas y de diversos tamaños que, en ocasiones, hacían protuberancia sobre la superficie.



B13

Animal inoculado transtorácicamente y sacrificado el día 28 postinfección. Hallamos una lesión nodular amarillenta de 4 mm de diámetro situada en el borde lateral del lóbulo medio del pulmón derecho. Había otra lesión similar, de 2 mm de diámetro, en la cara diafragmática del lóbulo diafragmático. En este mismo lóbulo por la cara dorsal había una lesión amarillenta de 7 mm por 4 mm en el borde medial. Existían fuertes adherencias, compuestas por una masa amarillenta, entre esta última lesión y la pleura del pulmón derecho y pericardio y más débiles con diafragma. No existían lesiones macroscópicas en vísceras abdominales.




B14

Animal inoculado intratraquealmente y sacrificado el día 28 postinfección. Hallamos escasos nódulos de 1 mm de diámetro en pulmón izquierdo. No había lesiones en los órganos abdominales.



B15

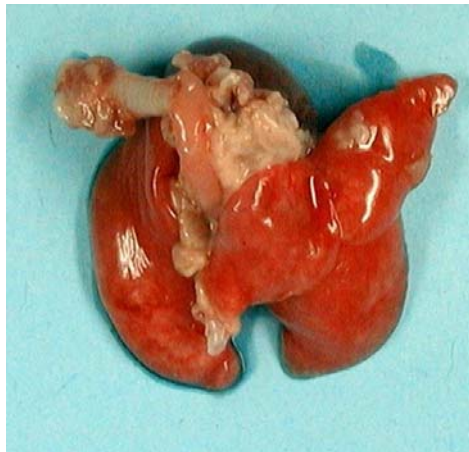
Este animal fue infectado con el método intratraqueal y hallado muerto el día 28 postinfección, por lo que se le realizó la necropsia.  Existían numerosas lesiones nodulares amarillentas de diversos tamaños en ambos pulmones. Debemos destacar una lesión en el lóbulo intermedio del pulmón derecho, formada por varios nódulos muy juntos y que ocupa la práctica totalidad del lóbulo; al corte, el 70% del parénquima de este pulmón está ocupado por dichos nódulos que además están acompañados de algunas zonas hemorrágicas. Todo este pulmón había perdido su elasticidad fisiológica y se hallaba muy endurecido.

Ambos riñones presentaban lesiones amarillentas que ocupaban gran cantidad de su superficie. En el caso de la zona craneal del riñón izquierdo la lesión hacía una protuberancia muy evidente.



B16

Animal inoculado con el método transtorácico y sacrificado 35 días después. En el lóbulo intermedio había varias lesiones nodulares amarillentas, una de 3 mm de diámetro en el borde lateral, otra en el borde medial de 2 mm de diámetro y tres de 1 mm de diámetro juntas. No hallamos lesiones en los órganos abdominales.



B17

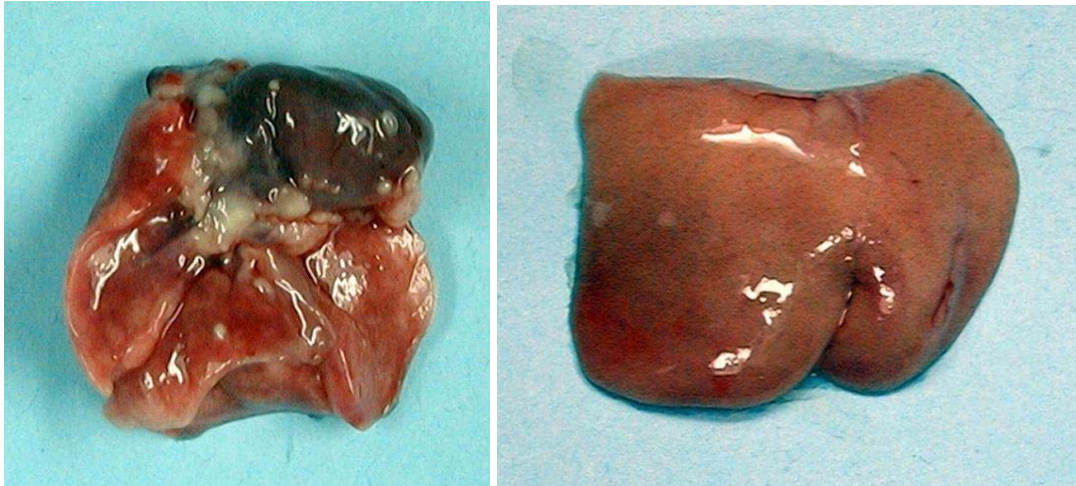
Descripción de las lesiones de un animal inoculado transtorácicamente y sacrificado el día 35 postinfección. En el lóbulo intermedio del pulmón izquierdo había cuatro lesiones amarillentas, una de 3 por 1 mm, otra de 2 mm de diámetro y dos de 1 mm de diámetro. En la parte dorso medial del lóbulo diafragmático había otra lesión de 6 por 4 mm y una de 4 mm de diámetro que hacía protuberancia. No se apreciaban lesiones macrocópicas en los órganos abdominales.



B18

Animal inoculado con el sistema transtorácico, sacrificado el día 35 postinfección. Existían numerosos nódulos amarillentos de 1 a 2 mm de diámetro en pericardio y uno de 1'5 mm en la cara dorsal del lóbulo craneal del pulmón derecho.

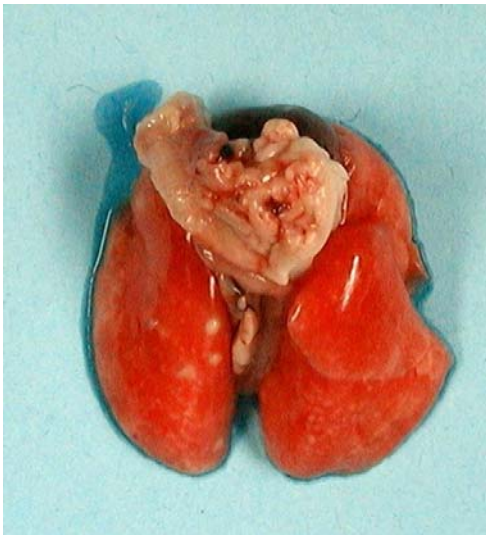
El hígado presentaba algunos nódulos (escasos) de 1 mm de diámetro, amarillentos, que no se encuentran en el interior del órgano cuando es cortado. No encontramos lesiones en los demás órganos.



B19

Animal inoculado intratraquealmente y sacrificado el día 35 postinfección. Hallamos escasos nódulos amarillentos de 2 mm de diámetro en la cara dorsal y medial del pulmón izquierdo y en la cara ventral y diafragmática de todos los lóbulos del pulmón derecho.

No encontramos lesiones macroscópicas en órganos abdominales.



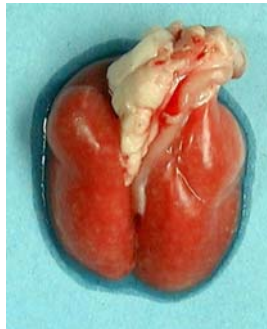
## B20

Animal inoculado intratraquealmente, sacrificado el día 35 postinfección. Existían numerosos nódulos amarillentos de diversos tamaños en ambos pulmones, aunque son más abundantes en el derecho. El hígado presentaba zonas más pálidas de lo normal. Al corte, uno de los riñones presentaba una lesión de 1 mm de diámetro. No se apreciaban lesiones macroscópicas en otros órganos.



## B21

Necropsia de un animal no inoculado, que formaba parte del grupo control y que fue sacrificado el día 42 postinfección. No encontramos lesiones en ningún órgano.



## B22

Animal inoculado transtorácicamente y sacrificado el día 42 postinfección. Hallamos una lesión amarillenta de 7 por 3 mm en la cara dorso medial del nódulo diafragmático del pulmón derecho. Existía otra lesión muy similar, junto a una zona hemorrágica en cuyo centro había otra zona amarillenta en la cara dorso medial del lóbulo craneal del pulmón derecho.

En el hígado había una lesión amarillenta de 5 mm de diámetro. Uno de los riñones presentaba una zona de infarto renal que se pone de manifiesto al corte. No hallamos más lesiones en los demás órganos.



### B23

Animal inoculado mediante el método transtorácico que fue sacrificado el día 42 tras esta inoculación. Existía una lesión amarillenta que ocupaba el borde lateral del lóbulo intermedio del pulmón derecho. Al corte aparecía un nódulo de 1 mm de diámetro en el lóbulo intermedio de este pulmón. No encontramos lesiones macroscópicas en los demás órganos.



### B24

Animal inoculado transtorácicamente y sacrificado el día 42 postinfección. Existía una lesión de 7 por 4 mm en la cara diafragmática del lóbulo intermedio del pulmón derecho, que creaba adherencias con el lóbulo diafragmático y el accesorio. Existía otra lesión similar, de 5 por 4 mm, en la cara diafragmática del lóbulo caudal del pulmón derecho.

No observamos más lesiones macroscópicas en el resto de los órganos.



B25

Animal inoculado transtorácicamente y sacrificado el día 42 postinfección. Hallamos una lesión nodular amarillenta de 2 mm de diámetro situada en la cara ventral del lóbulo medio del pulmón derecho. No hallamos más lesiones macroscópicas.

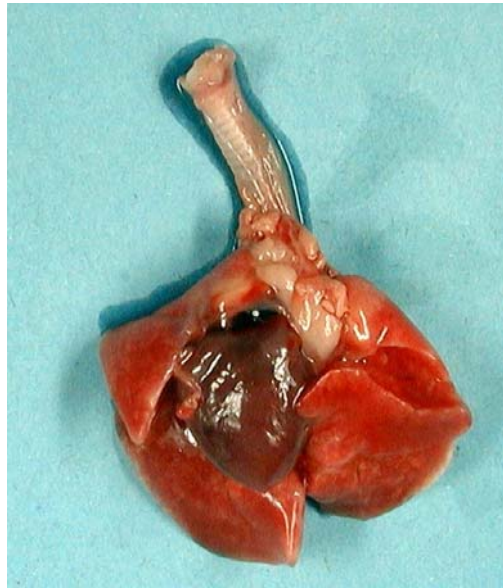


B26

Este animal fue inoculado con el método transtorácico y sacrificado el día 42 postinfección. Existía una lesión nodular amarillenta de 4 mm de diámetro, situada en el borde craneal del lóbulo craneal del pulmón derecho, que crea adherencias con el pericardio. Hallamos otra lesión amarillenta de bordes difusos en el borde craneal del pulmón izquierdo.

No observamos más lesiones macroscópicas.

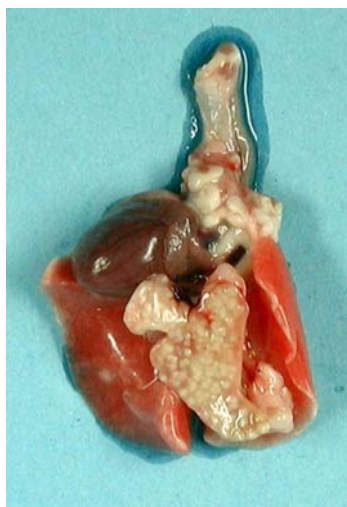




B27

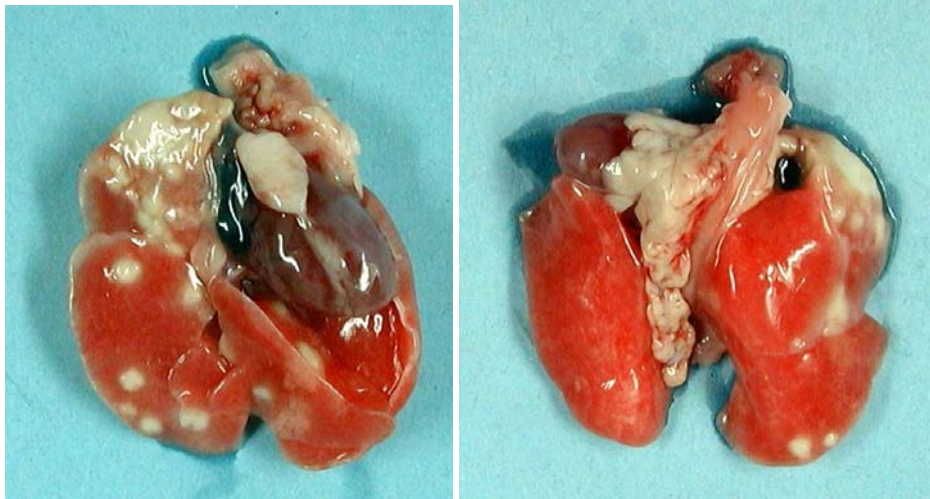
Animal infectado mediante el método de inoculación intratraqueal, del que se realiza la necropsia 42 días después. Observamos multitud de nódulos amarillentos de 1 a 3 mm de diámetro en el lóbulo accesorio del pulmón derecho. Al corte el 95% del volumen de este lóbulo aparecía ocupado por nódulos de 2 a 3 mm de diámetro. Además había un nódulo de 2 mm de diámetro en la cara diafragmática del lóbulo caudal del pulmón derecho.

No hallamos más lesiones macroscópicas.



B28

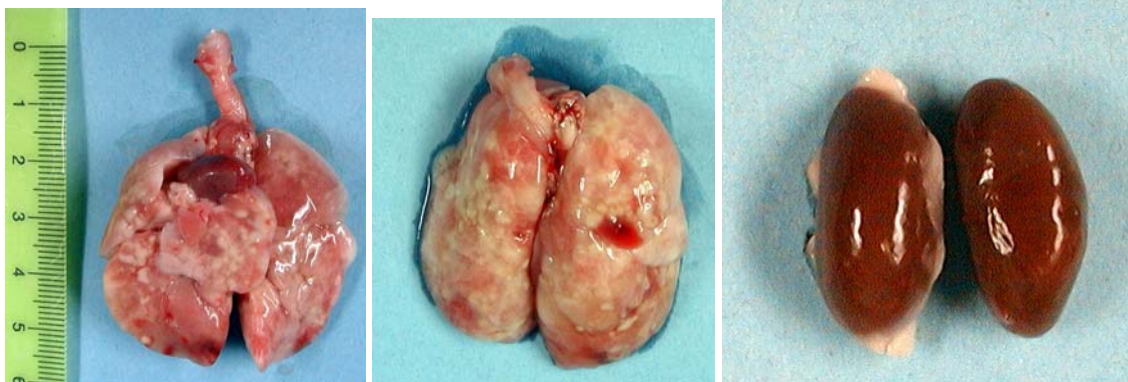
Animal inoculado con la metodología de inoculación intratraqueal. Eutanasiado el día 42 postinfección. Hallamos un nódulo amarillento de 10 por 7 mm en el borde lateral del lóbulo intermedio del pulmón derecho. En el resto de los lóbulos del pulmón derecho había nódulos de 2 a 3 mm de diámetro no muy numerosos que se encuentran tanto en la superficie como al corte. No había más lesiones macroscópicas en el pulmón izquierdo ni en el resto de órganos.



B29

Animal inoculado intratraquealmente y sacrificado el día 42 postinfección. Existían multitud de nódulos amarillentos de diversos tamaños en ambos pulmones, que presentaban una consistencia dura. Existían algunas zonas hemorrágicas repartidas por ambos pulmones. La de mayor tamaño se hallaba en el borde caudal de la cara dorsal del lóbulo intermedio del pulmón derecho.

En ambos riñones había lesiones nodulares amarillentas de 0'5 mm de diámetro no muy abundantes.



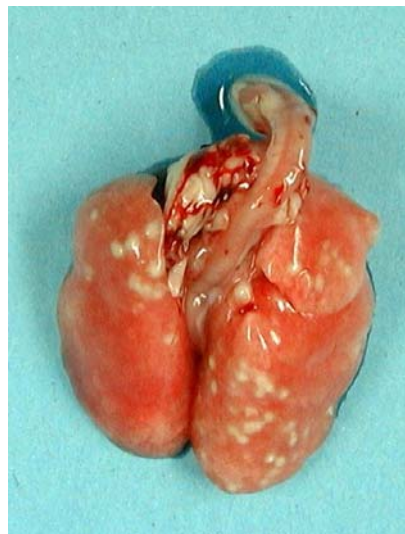
B30

Animal inoculado intratraquealmente y sacrificado el día 42 postinfección. Existen numerosas lesiones amarillentas nodulares situadas en todos los nódulos del pulmón derecho. El polo caudal del riñón derecho presentaba una lesión de 15 por 10 mm que hace protuberancia y que al corte evidenciaba un volumen aproximado del 50% de dicho órgano. No hallamos lesiones en el resto de órganos.



B31

Animal inoculado intratraquealmente y sacrificado el día 42 postinfección. Hallamos numerosas lesiones amarillentas nodulares situadas en ambos pulmones de 2 a 3 mm de diámetro que aparecen tanto en la superficie como al corte. No hallamos más lesiones en otros órganos.



Algunas de estas lesiones fueron analizadas histológicamente. La denominación de las muestras es la siguiente: En primer lugar la letra B y el número otorgado en la descripción macroscópica. A continuación el número otorgado en el laboratorio Histológico donde fueron procesadas. Tras dos puntos la letra d y un número, que corresponde al día en que el animal fue sacrificado (d7 sería día 7 postinoculación), y dos letras que corresponden a TT inoculación transtorácica e IT inoculación intratraqueal. En algunas se incluye, entre paréntesis, las letras Rx, que indican que ese animal fue sometido a estudio radiográfico.

B1 (242): d7, TT

- Pulmón:

Nódulo asociado a pleura, por su parte externa, sin necrosis ni infiltración celular. Las hifas están contenidas en una matriz (Agar). Estas hifas en algunos puntos, atraviesan la pleura y entran en el parénquima pulmonar, provocando zonas de necrosis a su paso.

- Bazo:

Depleción moderada de linfocitos en las vainas de linfoides. Megacariocitos.

- Hígado:

Degeneración grasa discreta. Por toda la superficie pulmonar se observan focos necróticos que no siguen un patrón centro ni perilobulillar, algunos de los cuales presenta infiltrado hemorrágico. En ninguno de ellos se observan hifas ni infiltrado de neutrófilos, y podrían estar causados por isquemia.

B2 (243): d7 IT

- Pulmón:

Tanto en el parénquima pulmonar como en los bronquiolos existen varios microgranulomas, compuestos por grupos de hifas asociadas a detritus celulares con hiperplasia de los pneumocitos si se hallan en los alvéolos. Existe un escaso infiltrado de neutrófilos y presencia de escasísimos macrófagos.

- Bazo:

Depleción linfoide moderada.

- Hígado:

Presencia de múltiples focos de necrosis no asociados a inflamación.

Degeneración glucogénica muy severa.

B3 (244): d7 IT

- Pulmón:

Presencia de microgranulomas, más escasos y menos desarrollados que en el caso anterior.

- Bazo:

Prácticamente no existe depleción de linfocitos en vainas linfoides (posible causa de la mejor respuesta y el escaso desarrollo, tanto en número como en madurez, de los nódulos).

- Hígado:

Degeneración glucogénica severa.

B4 (245): d14 TT

- Pulmón:

El gran nódulo sobre la pleura (parte externa) del pulmón derecho presenta en el centro gran cantidad de hifas, y una extensa zona de necrosis. Fuerte infiltración de neutrófilos y gran cantidad de tejido de granulación alrededor, que contiene neutrófilos, macrófagos y fibroblastos. En algunos puntos las hifas están atravesando la pleura, lo que provoca una gran cantidad de fibrina en el parénquima pulmonar.

- Corazón:

El nódulo asociado a la pleura está también asociado al pericardio, donde una gran cantidad de hifas provocan una zona de necrosis, con gran cantidad de fibrina y formación de tejido de granulación. Las hifas no llegan a invadir el miocardio.

- Bazo:

Depleción linfoide moderada.

- Hígado:

Degeneración glucogénica intensa y grasa moderada.

B5 (246): d14 IT

- Pulmón:

Múltiples lesiones granulomatosas con hifas y necrosis multifocal generalizada en parénquima pulmonar, con gran infiltración de neutrófilos. Hepatización en fase roja. Trombosis severa en buena parte de los vasos pulmonares con zonas de hemorragia, edema e infiltrado de fibrina en los alvéolos que no ocupan los granulomas.

Infección bacteriana secundaria no asociada a la inflamación.

- Bazo:

Depleción muy severa de los linfocitos de las vainas linfoides.

- Hígado:

Degeneración glucogénica severa, con focos de necrosis focales, de distintos tamaños y distribución anárquica, no asociados a infiltrado inflamatorio.

- Riñón:

Foco inflamatorio en médula renal, con gran infiltración de neutrófilos, y aunque no se llegan a ver las hifas, la lesión parece ser muy reciente y estar provocada por el hongo.

Cilindros proteináceos en algunos túbulos renales; esta lesión no está asociada al hongo.

B6 (247): d14 IT

- Pulmón:

Múltiples lesiones granulomatosas con hifas y necrosis multifocal generalizada en parénquima pulmonar, con gran infiltración de neutrófilos. Presencia de hifas que no están rodeadas de células inflamatorias. Hepatización en fase roja. Trombosis en algunos vasos pulmonares, zonas de hemorragia, edema e infiltrado de fibrina en los alvéolos que no ocupan los granulomas.

- Bazo:

Depleción severa de linfocitos.

- Riñón:

Presencia de hifas en riñón, aunque escasas, lo que provoca un infiltrado de neutrófilos intenso y muy extendido, de manera que afecta tanto a la corteza como a la médula renal.

Presencia de hifas en la grasa perirrenal, que provocan necrosis e infiltrado de neutrófilos.

Cilindros proteináceos en algunos túbulos.

- Hígado:

Zonas de necrosis no asociada a infiltración de células inflamatorias. Degeneraciones glucogénica y grasa no muy intensas.

B7 (248): d18 TT

- Pulmón:

Lesión de gran tamaño asociada a pleura, con gran cantidad de hifas y escasísima reacción inflamatoria. Las hifas han atravesado la pleura y se encuentran en gran número en el parénquima pulmonar, rodeadas de grandes zonas de necrosis pero con escasa reacción inflamatoria, que es sobre todo de neutrófilos, que no logran detener el avance de las hifas.

- Corazón:

El mismo nódulo que está asociado a la pleura está asociado al pericardio, provocando una pericarditis intensa. Las hifas, en gran cantidad, llegan hasta miocardio, provocando grandes zonas de necrosis, con infiltrado de neutrófilos no muy intenso y prácticamente sin presencia de tejido de granulación. Las hifas han llegado a invadir también los vasos del miocardio, provocando trombos, en algunos de los cuales se pueden observar gran cantidad de hifas. Las múltiples trombosis de los vasos del miocardio provocan zonas de infarto y necrosis. Las hifas alcanzan también el endocardio, provocando un enorme trombo en el ventrículo izquierdo que debe haber sido la causa de la muerte repentina de este animal.

- Hígado:

Degeneraciones grasa y glucogénica discretas. Los hepatocitos se hallan en cordones muy separados, lo que suele encontrarse en animales caquéticos.



(249): d18 TT

- Pulmón:

Nódulo en pleura, con gran cantidad de hifas que atraviesan la pleura e invaden el parénquima pulmonar y los vasos que allí se encuentran, provocando gran cantidad de trombos y amplias zonas de necrosis. La respuesta inflamatoria se limita a un infiltrado moderado de neutrófilos pero sin presencia de tejido de granulación.

- Bazo:

Depleción muy severa de los linfocitos en las vainas de mielina. Presencia de megacariocitos y hemosiderina.

- Hígado:

Degeneración grasa severa. El nódulo asociado a pleura está también asociado al diafragma, de manera que las hifas allí presentes atraviesan el diafragma y llegan a la cápsula del hígado, provocando necrosis y acumulo de fibrina. El diafragma está fuertemente invadido por las hifas y presenta amplias zonas de necrosis.

- Riñón:

En ambos riñones hay hifas en algunas zonas de la corteza y médula renales, que provocan zonas de necrosis e infiltrado de neutrófilos. Hay gran cantidad de hifas en pelvis renal.

#### B9 (250) d21TT (Rx)

- Pulmón:

Nódulo asociado a la pleura con amplias zonas de necrosis, con gran cantidad de hifas, que invaden el parénquima pulmonar, causando acumulación de neutrófilos y escasa reacción inflamatoria. Hay otros nódulos en el interior del parénquima, que no están asociados por contigüidad con el principal, son más recientes y poseen hifas en su interior y neutrófilos alrededor. Hay trombosis en diferentes vasos pulmonares.

- Bazo:

Depleción severa de linfocitos en vainas linfoides.

- Hígado:

Degeneración grasa moderada, focalmente intensa.

- Corazón:

Focos de necrosis en la fibra cardiaca con escasa infiltración de macrófagos.

- Riñón:

Zonas de necrosis ocupadas por hifas e infiltrado intersticial de neutrófilos, que se encuentran también en gran número en los túbulos, acompañados de fibrina.

#### B10 (251) d21TT



- Pulmón:

Lesión muy extensa en la superficie de la pleura con presencia de hifas que invaden el parénquima pulmonar, donde hay infiltrado de neutrófilos.

Existen otros pequeños focos con hifas en diversas localizaciones del pulmón, con escaso infiltrado de neutrófilos. Presencia de bacterias no asociadas a inflamación.

Las lesiones vasculares son poco abundantes y están asociadas a la invasión de las hifas del nódulo principal.

- Hígado:

Degeneración grasa muy severa.

- Encéfalo:

Necrosis por licuefacción, con presencia de hifas, que afecta un hemisferio y llega hasta los ventrículos. Trombosis y meningitis.

- Riñón:

Lesión que afecta a extensas zonas de corteza y médula, compuesta por infiltrado de neutrófilos en el espacio intersticial renal así como en los túbulos, causado por hifas que se encuentran en poco número. Trombosis y zonas de fibrina.

- Bazo:

Depleción severa de linfocitos en vainas linfoides. Presencia de hemosiderina.

#### B11 (252) d21 IT

- Pulmón:

Presencia de gran cantidad de nódulos compuestos por hifas en gran número, rodeadas de un infiltrado de neutrófilos, que forman una lesión poco delimitada, sin tejido de granulación. En algunos puntos hay invasión de los vasos sanguíneos y formación de trombos. Neumonía en fase de hepatización roja.

- Bazo:

Depleción linfocítica severa en las vainas linfoides. Presencia de megacariocitos.

- Riñón:

Lesiones con grandes zonas de necrosis, presencia de hifas y fuerte infiltrado de neutrófilos tanto en corteza como en médula. Gran cantidad de hifas en pelvis renal.

Hallamos trombosis causada por una infección bacteriana no asociada a respuesta inflamatoria.

B12 (253) d21 IT

- Pulmón:

Varios nódulos en parénquima pulmonar con presencia de hifas e infiltrado de neutrófilos.

Zonas de neumonía con infiltrado de neutrófilos, fibrina y exudado inflamatorio en los alvéolos.

Presencia de hifas y neutrófilos en bronquios y bronquiolos.

Presencia de bacterias no asociadas a inflamación.

- Corazón:

Foco de necrosis con escaso infiltrado de neutrófilos. No se visualizan hifas, a pesar de que la lesión es muy compatible con una diseminación de la enfermedad.

- Hígado:

Necrosis multifocal con presencia de vacuolas grasas. Presencia de bacterias no asociadas a inflamación pero sí a la necrosis. No se visualizan hifas.

- Riñón:

Nódulos en riñón causados por bacterias que provocan un infiltrado de neutrófilos intenso.

B13 (254) d28TT

- Pulmón:

Gran nódulo asociado a pleura, con zona central de necrosis e hifas, rodeado por un infiltrado de neutrófilos. En una zona más externa existe tejido de granulación, con fibroblastos, aunque escaso número tanto de linfocitos como de macrófagos.

En el parénquima pulmonar hay otro granuloma con hifas e infiltrado de neutrófilos, pero sin tejido de granulación.

- Bazo:

Depleción severa de linfocitos.

- Riñón:

Presencia de escasos cilindros proteináceos.

- Hígado:

Escasa vacuolización.

B14 (255) d28IT

- Pulmón:

Casi normal, excepto un pequeño nódulo apical, en el que se aprecian muy pocas hifas, con escaso infiltrado de neutrófilos que también se pueden encontrar en los bronquios cercanos.

- Bazo:

Muy escasa depleción linfoide.

- Hígado:

Degeneración glucogénica

B15 (256) d28IT

- Pulmón:

Presencia de varios nódulos mal delimitados, que contienen gran cantidad de hifas que invaden el parénquima pulmonar (algunas de ellas invaden pleura desde el parénquima), provocando infiltración de neutrófilos. Presencia de varios trombos.

- Corazón:

Presencia de un nódulo con una zona central necrótica rodeada de neutrófilos, muy sospechosa de ser causada por el hongo, a pesar de que no se visualicen las hifas.

- Bazo:

Depleción severa de linfocitos en las vainas de mielina. Presencia de hemosiderina.

- Hígado:

Degeneración grasa moderada.

- Riñón:

Lesiones con escaso número de hifas, con fuerte infiltrado de neutrófilos.

Presencia de bacterias no asociadas al infiltrado.

B16 (257) d35TT

- Pulmón:

Gran nódulo en la superficie del pulmón con una zona central de necrosis e hifas, con infiltrado de neutrófilos y en la periferia hay tejido de granulación, con presencia abundante de linfocitos.

Existen otros nódulos en parénquima pulmonar, con hifas e infiltrado de neutrófilos.

- Bazo:

Depleción moderada de vaina linfoide.

B17 (258) d35TT

- Pulmón:

Hay tres lesiones necróticas en la superficie del pulmón, con gran cantidad de hifas, infiltrado de neutrófilos y en la periferia hay tejido de granulación, con presencia de linfocitos y células plasmáticas.

Presencia de nódulos en parénquima pulmonar, en escaso número y con infiltrado de neutrófilos.

- Bazo:

Prácticamente no existe depleción de linfocitos en vainas linfoides.

- Hígado:

Degeneración glucogénica intensa.

B18 (259) d35TT

- Pulmón:

Presencia de escasos nódulos con hifas e infiltración intensa de neutrófilos en la superficie del pulmón. Hay algún nódulo en el interior del parénquima pulmonar.

- Bazo:

Depleción discreta de linfocitos.

Hígado:

Degeneración glucogénica.

- Riñón:

Pequeñas zonas hemorrágicas.

B19 (260) d35IT

- Pulmón:

Presencia de múltiples nódulos, con necrosis e hifas en la zona central, rodeadas de neutrófilos y con buena reacción inflamatoria alrededor, con buen número de linfocitos y macrófagos.

- Bazo:

Depleción linfocítica poco severa.

- Hígado:

Degeneración glucogénica.

#### B20 (261) d35IT

- Pulmón:

Presencia de varios, extensos y poco delimitados nódulos en parénquima pulmonar, con zona central de hifas y necrosis, con infiltrado de neutrófilos alrededor y escaso infiltrado de linfocitos y células plasmáticas. Trombosis en algunos vasos pulmonares.

- Bazo:

Depleción ligera de linfocitos.

- Hígado:

Degeneración vacuolar glucogénica.

- Riñón:

Presencia de pequeños nódulos con escasa presencia de hifas e infiltrado de neutrófilos.

#### B21 (262) d42 CONTROL.

No se encuentran cambios histopatológicos en pulmón, hígado, bazo, riñones, corazón y encéfalo de este animal.

#### B22 (263) d24TT

- Pulmón:

Presencia de escaso número de nódulos con necrosis e hifas y gran infiltrado de neutrófilos. El infiltrado linfocitario y de neutrófilos es menor y el tejido de granulación muy escaso.

Escasa trombosis.

- Bazo:

Depleción severa de linfocitos. Presencia de megacariocitos.

- Hígado:

Degeneración grasa severa generalizada y glucogénica focal. Presencia de nódulos que contienen hifas e infiltrado de neutrófilos. En algunos lugares hay presencia de hifas y casi ausencia de infiltrado de neutrófilos. Presencia de trombos.

- Riñón:

Pequeños focos compuestos por muchas hifas y escaso infiltrado de neutrófilos en el intersticio.

B23 (264) d42TT

- Pulmón:

Nódulo de gran tamaño en superficie pulmonar, con abundante necrosis e hifas, observándose un infiltrado de neutrófilos rodeado de mucho tejido de granulación.

En el interior del parénquima existen nódulos con necrosis, hifas e infiltrado de neutrófilos, aunque con escaso tejido de granulación.


- Bazo:

Depleción severa.

- Hígado:

Degeneración glucogénica moderada.

- Riñón:

Zonas rosáceas sin infiltrado ni hifas 

B24 (265) d42TT

- Pulmón:

Gran lesión asociada a la pleura, mal delimitada, compuesta por hifas que invaden el parénquima pulmonar hasta un bronquio. Hay gran cantidad de hifas y necrosis, rodeadas de neutrófilos y tejido de granulación con fibroblastos pero con escaso número de linfocitos.

Existen otros granulomas en el interior del parénquima pulmonar no asociadas a pleura, pero en este caso están bien delimitadas, con zona interna de hifas y necrosis, rodeada de neutrófilos, macrófagos, linfocitos y células plasmáticas.

- Bazo:

Depleción muy discreta de linfocitos.

B25 (266) d42TT

- Pulmón:

Pequeños y escasos nódulos en el parénquima, con escasa necrosis e hifas, rodeadas de neutrófilos y buena cantidad de macrófagos, linfocitos y células plasmáticas.

- Bazo:

Se aprecia una ligera depleción de linfocitos.

B26 (267) d42TT

- Pulmón:

Dos nódulos, uno de ellos de gran tamaño, asociados a la pleura, con escasa cantidad de hifas y tejido necrótico, rodeadas de neutrófilos y gran cantidad de linfocitos y macrófagos y abundante tejido de granulación. La invasión de las hifas del parénquima pulmonar es escasa. El nódulo de gran tamaño está asociado a pericardio, pero no llega a invadir el miocardio.

- Bazo:

Se aprecia una ligera depleción de linfocitos.

- Hígado:

Degeneración glucogénica.

B27 (271) d42IT

- Pulmón:

Presencia de algunos granulomas poco abundantes, excepto en el lóbulo accesorio, donde los nódulos ocupan más del 90% de su volumen. Los granulomas presentan el aspecto de un granuloma típico, con una zona central de necrosis e hifas (aunque en

poco número), algunos neutrófilos y rodeándolos gran cantidad de macrófagos, linfocitos y células plasmáticas. Existen macrófagos en empalizada y células gigantes. Existen otros nódulos, sin embargo, poco delimitados con gran reacción inflamatoria. Estos granulomas presentan zonas internas de calcificación y necrosis, con un número variable de hifas, según lesiones, y rodeando cada lesión existen macrófagos, linfocitos y tejido de granulación (células plasmáticas).


Existe invasión de bronquios, aunque no de vasos ni hay formación de trombos.

- Bazo:

Depleción moderada de linfocitos.

- Hígado:

Degeneración glucogénica.

B28 (272) d42IT 

- Pulmón:

Existen varias lesiones mal delimitadas, con gran cantidad de necrosis e hifas rodeadas de gran cantidad de neutrófilos, pero con poca infiltración de linfocitos y macrófagos y nada de tejido de granulación. Presencia de trombos.

- Bazo:

Depleción severa de linfocitos, con presencia de hemosiderina y megacariocitos.

B29 (273) d42IT

- Pulmón:

Gran cantidad de nódulos de gran tamaño, que presentan necrosis abundante, con gran cantidad de hifas pero sin calcificaciones y con escasa reacción inflamatoria a su alrededor.

Existen otros nódulos de menor tamaño, que contienen menos cantidad de hifas y tejido necrótico, con una intensa reacción inflamatoria, neutrófilos, linfocitos, macrófagos y células plasmáticas.

Posiblemente estos dos tipos de nódulos se presenten por estar en distinta fase de desarrollo.

- Bazo:



Depleción evidente.

- Hígado:

Degeneración glucogénica evidente.

- Riñón:

Degeneración túbulo-nefrosis focal, pero sin evidencias de invasión fúngica. No es la lesión típica.

B30 (274) d42 IT

- Pulmón:

Gran cantidad de nódulos mal delimitados, con extensas zonas de necrosis y abundantes hifas, rodeadas de neutrófilos pero con escaso número de linfocitos y macrófagos alrededor. Las hifas llegan a invadir vasos, aunque no se observan trombos.

- Bazo:

Depleción moderada de linfocitos.

B31 (275) d42 IT

- Pulmón:

Presencia de varios granulomas de pequeño tamaño, formados por una zona central de necrosis e hifas rodeadas de escaso infiltrado de neutrófilos y también escaso infiltrado de linfocitos y macrófagos. En ocasiones hay fibroblastos alrededor.

- Bazo:

Depleción evidente de linfocitos.

- Hígado:

Degeneración glucogénica intensa.

#### f.4. Estudio radiológico

Como ya hemos mencionado anteriormente, realizamos seguimiento radiológico de dos grupos de animales durante cuatro semanas, uno de ellos inoculado por el método de inoculación transtorácica y el otro por el método de inoculación intratraqueal por trasiluminación. Realizamos proyecciones laterolateral y ventrodorsal de todos los animales semanalmente, de manera que fue posible realizar su seguimiento. Los hallazgos radiológicos se describen a continuación.

##### Modelo intratraqueal:

Durante las dos primeras semanas no se observan lesiones pulmonares (Figuras 4 y 5)

En el día 21 tras la inoculación aparecen áreas radiodensas en ambos pulmones, bien delimitadas, arriñonadas o redondeadas, de unos dos milímetros de tamaño, visibles tanto en la proyección laterolateral como en la ventrodorsal (Figuras 6 y 7)

En el día 28 tras la inoculación, las áreas radiodensas anteriormente descritas aparecen más definidas, algo más radioopacas y con un tamaño parecido al que tenían una semana antes (Figura 8)



Figuras 4 y 5: Radiografías torácicas en proyección laterolateral y proyección ventrodorsal de una rata inoculada por vía intratraqueal a la semana de la inoculación.



Figura 6: Radiografía torácica en proyección laterolateral de una rata tras 21 días de la infección por el método intratraqueal. Marcado por la flecha, una de las zonas nodulares radiodensas presentes.



Figura 7: Radiografía torácica en proyección ventrodorsal de una rata tras 21 días de la infección por el método intratraqueal. Marcado por la flecha, una de las zonas nodulares radiodensas presentes.

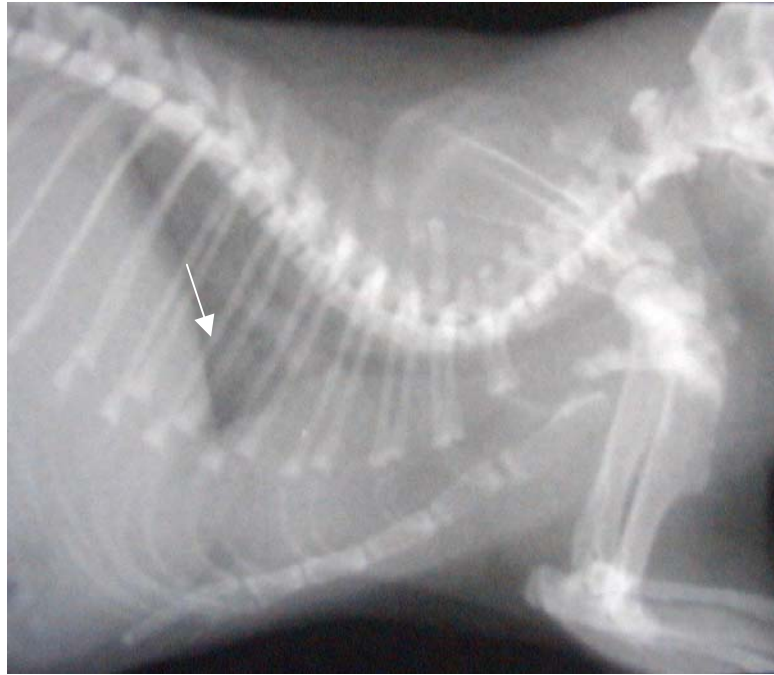


Figura 8: Radiografía torácica en proyección laterolateral de una rata tras 28 días de la infección por el método intratraqueal. Marcado por la flecha, una zona nodular radiodensa.

#### Modelo Transtorácico:

En el mismo día de la inoculación, las radiografías torácicas de los animales infectados, presentan imágenes de amplias zonas radiodensas. En las proyecciones laterolaterales, estas zonas radiodensas quedan superpuestas con la sombra cardiaca, impidiendo la visualización de la sombra cardiaca con claridad (Figuras 9 y 10) Así mismo podemos observar la presencia de líquido en el espacio interpleural en algunos animales (Figura 10)

En las proyecciones ventrodorsales observamos una zona radiodensa en el pulmón derecho, que, en ocasiones, provoca un marcado desplazamiento de la silueta cardiaca hacia la izquierda (Figuras 11 y 12)

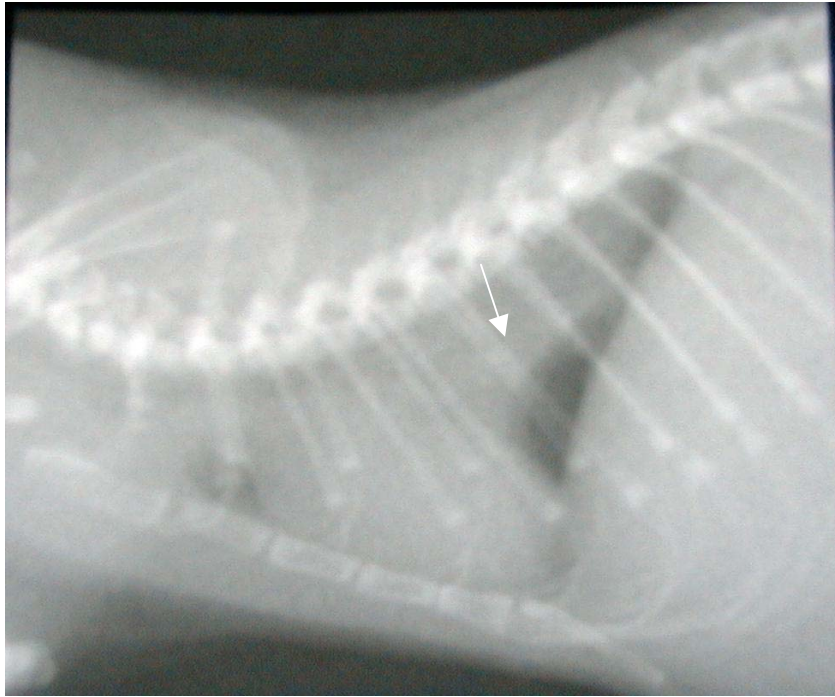


Figura 9: Radiografía torácica en proyección laterolateral de una rata el mismo día de la inoculación transtorácica. Se observa una zona radiodensa, marcada con la flecha blanca, que impide un buen perfilado de la silueta cardiaca

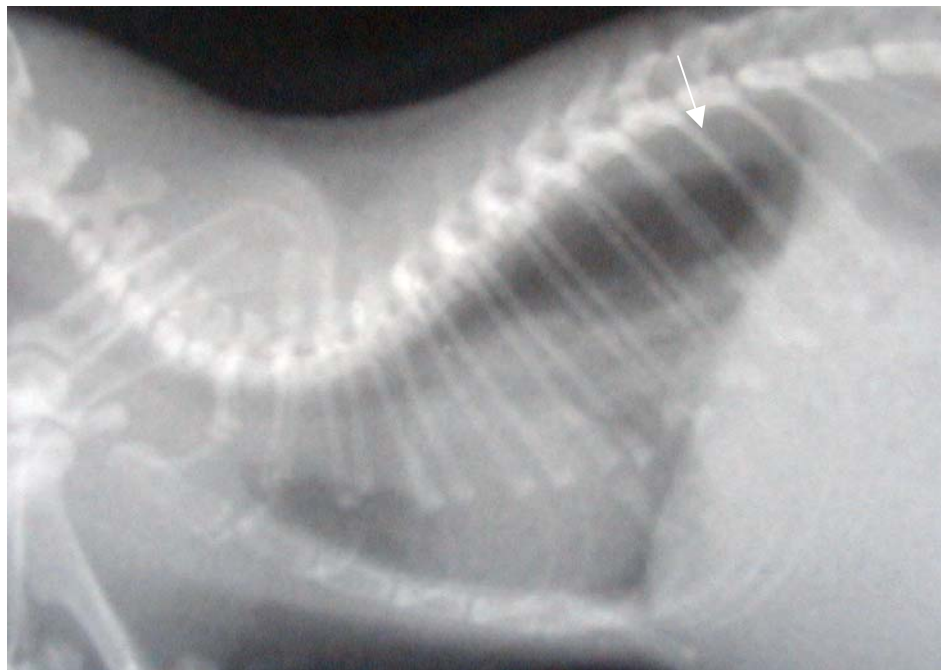
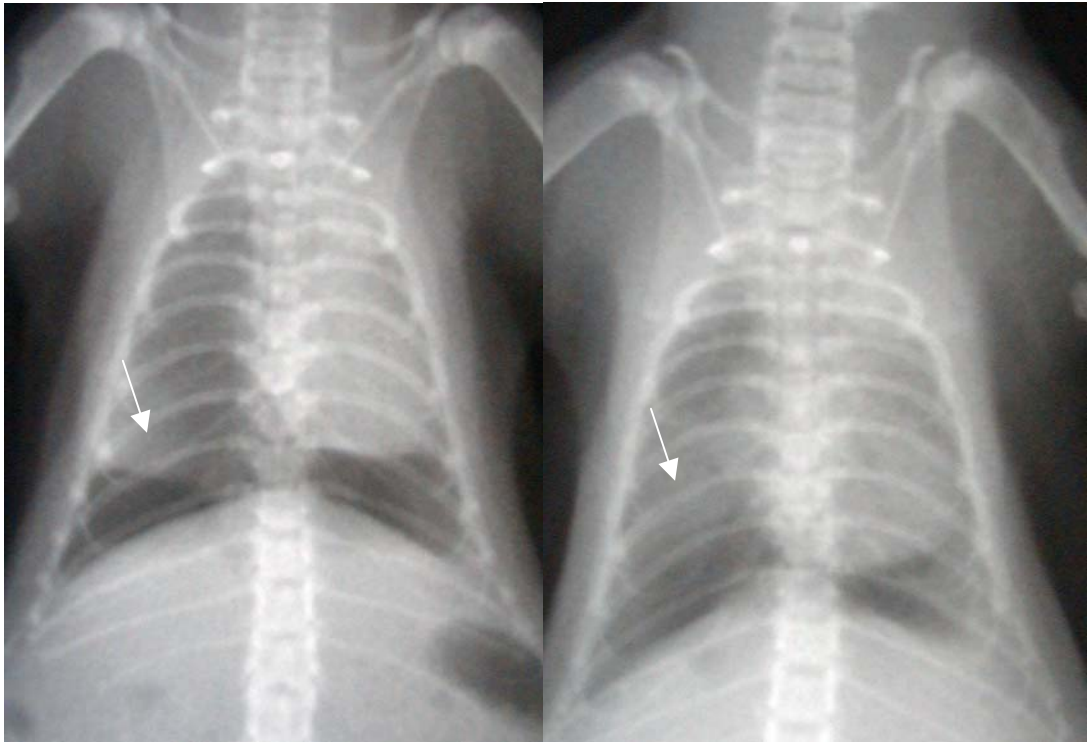


Figura 10: Radiografía torácica en proyección laterolateral de una rata el mismo día de la inoculación transtorácica. Se observa una zona radiodensa, dorsal a la silueta cardiaca, que impide un buen perfilado de la misma. Marcada con la flecha blanca aparece una zona radiodensa que delimita los bordes pulmonares, debida a la presencia de líquido interpleural.

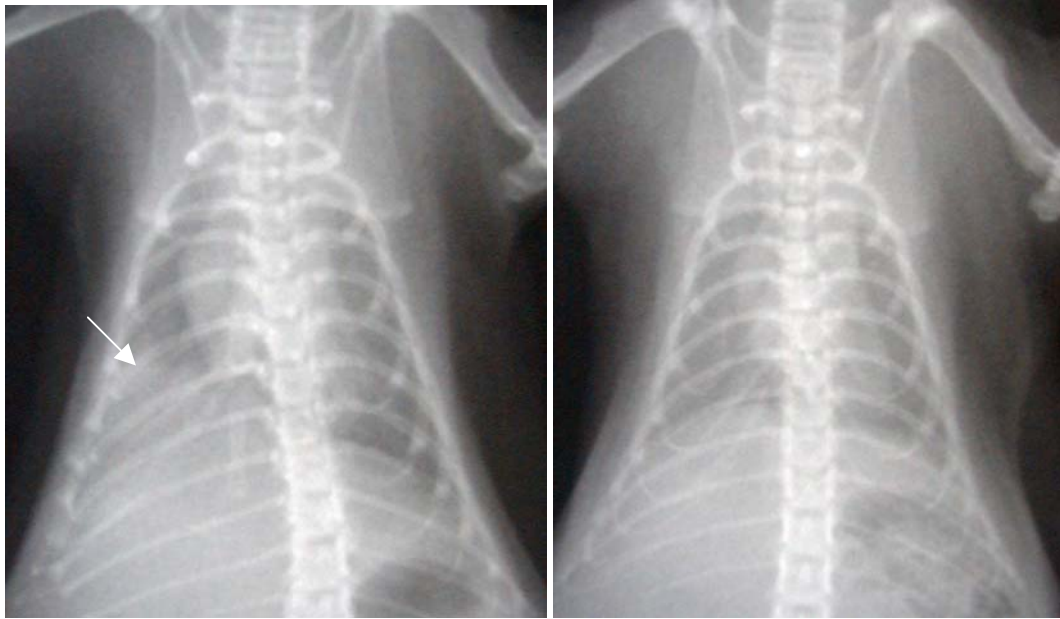


Figuras 11 y 12: Radiografías en proyección ventrodorsal de ratas el mismo día de la inoculación transtorácica. Se observa la presencia de una zona radiodensa entre el lóbulo medio y diafragmático del pulmón derecho (flecha blanca). Así mismo se aprecia un desplazamiento de la silueta cardíaca hacia la izquierda.

Una semana después de la inoculación transtorácica de los animales, la presencia de zonas radiodensas es menos evidente en las proyecciones laterolaterales, tal vez confundida con la sombra cardiaca (Figura 13). En las proyecciones ventrodorsales, el desplazamiento del corazón al lado izquierdo no es tan evidente como en el día de la inoculación y en ocasiones ni tan siquiera aparece desplazado. Tampoco son tan evidentes las zonas radiodensas, que en ocasiones no son distinguibles (Figuras 14 y 15)



Figura 13: Radiografía torácica en proyección laterolateral de una rata siete días tras la inoculación transtorácica. No es posible distinguir la presencia de nódulos.



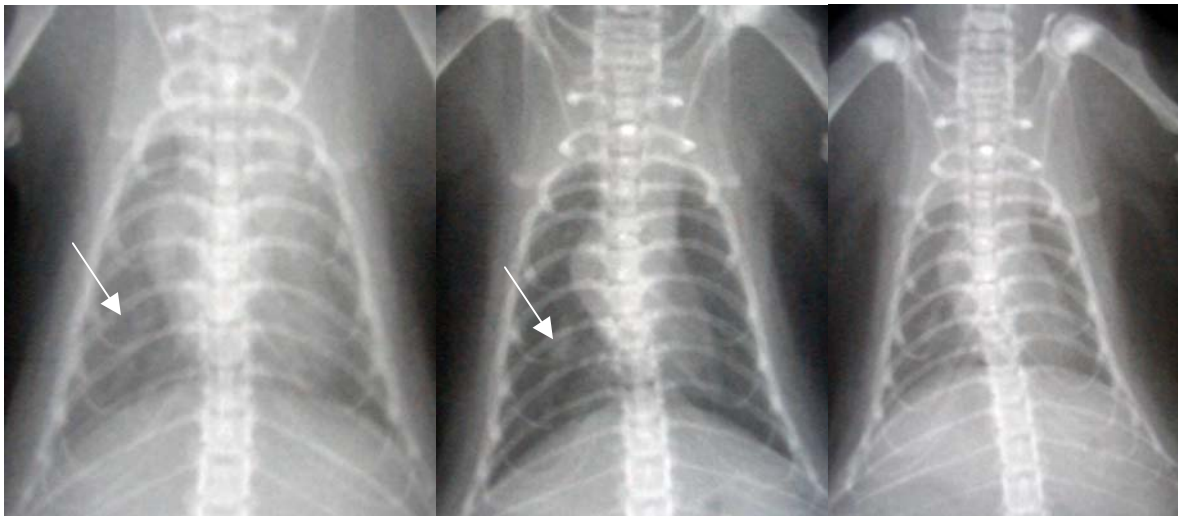
Figuras 14 y 15: Radiografías en proyección ventrodorsal de ratas siete días después de la inoculación transtorácica. En ocasiones se observa la presencia de zonas radiodensas (flecha blanca) en el pulmón derecho que no se observan en todos los animales.

Durante las siguientes semanas en las que se realizaron radiografías, hasta cuatro, las imágenes descritas para esta primera semana se repiten. Las proyecciones laterolaterales no muestran evidencia de lesión, a pesar de poder observar algunas zonas con apariencia algo más radiodensa de lo normal, pero que suelen confundirse con la sombra cardiaca. En las proyecciones ventrodorsales, hallamos la presencia de zonas radiodensas como las que hemos descrito anteriormente en algunos animales, pero que no siempre aparecen claramente. El desplazamiento a la derecha del corazón no es apreciable a partir de la segunda semana.





Figura 16: Radiografía torácica en proyección laterolateral de una rata veintiocho días después de la inoculación transtorácica. La imagen es prácticamente normal.




Figuras 17, 18 y 19 (de izquierda a derecha) correspondientes a radiografías torácicas dorsoventrales de ratas inoculadas por el método transtorácico, 14, 21 y 28 días, respectivamente tras el día de la inoculación. Las imágenes aparecen normales, excepto por la presencia de alguna zona más radioopaca en el pulmón izquierdo (flecha blanca) que no es evidente en todos los animales.

#### g. Modelo de infección a 24 días: Incremento del tamaño del inóculo

Llevamos a cabo un estudio de la influencia que tendría un aumento del tamaño del inóculo en rata. Este incremento del tamaño del inóculo llegó hasta unas diez veces, con el fin de comprobar la letalidad de una infección masiva de ambos pulmones por conidias de *A. fumigatus*. Llevamos a cabo el estudio sobre 2 grupos de animales:

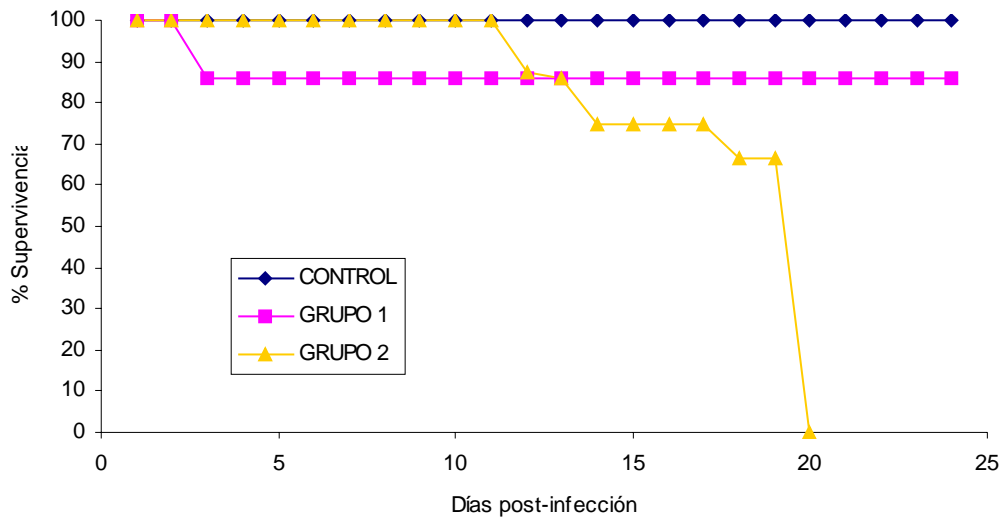
- a) El grupo 1 se inoculó mediante la técnica transtorácica con 10-14 micromicelios por animal.
- b) El grupo 2 se inoculó mediante la técnica intratraqueal con  $1'36 \times 10^6$  conidias por animal.

Inoculamos 15 animales por grupo, de los que 8 fueron sacrificados a lo largo del experimento, los días 5, 12, 19 y 24  ocasiones, en caso de hallar al animal recién muerto, y no devorado por sus compañeros de jaula, lo utilizábamos como uno de los sacrificados ese día. El grupo control se componía de 10 animales no inoculados de los que se sacrificó uno en cada día en los que estableció se iban a sacrificar los animales.

g.1. Porcentaje de supervivencia:

Los resultados aparecen reflejados en la gráfica 22 y en la tabla 20:

Gráfica 22: Curva de supervivencia del modelo de infección en rata a 24 días, en animales inoculados intratraquealmente y transtorácicamente.



La gráfica de supervivencia muestra una caída ligera en la curva de supervivencia del grupo de animales inoculados intratraquealmente a partir del día 10, que se hace drástica a partir del día 19. Los animales inoculados transtorácicamente sufren una baja al inicio del experimento, manteniéndose la supervivencia de los animales hasta el final.

Tabla 20: Probabilidad acumulada de supervivencia a intervalos de siete días y área estimada bajo la curva en el modelo de infección a 24 días.

Días post infección	Transtorácica Intratraqueal	
	Grupo 1	Grupo 2
0-5	80	100
5-10	80	100
10-15	80	67
15-20	80	0
20-24	80	0
Área bajo la curva	295'5	237'5

A pesar del dramático descenso en la supervivencia de los animales inoculados con el método intratraqueal, el área bajo la curva en ambos modelos es similar. Esto se debe a que en un

principio hubo muertes en el grupo de inoculados con método transtorácico mientras se mantenía una supervivencia del 100% en los intratraqueales.

## g.2. Resultados de pruebas diagnósticas

Los resultados aparecen reflejados en las Tablas 21, 22, 23 y 24

Tabla 21: Cultivos realizados, a partir de los órganos que presentaron lesiones, en rosa de Bengala (37° C, 5 días)

Órgano	Grupo Control		Grupo 1	Grupo 2
	Cornetes	Pulmón	Pulmón	Pulmón
Día 5	-	-	+ <sup>(1)</sup> , +	+, +
Día 12	-	-	+, +	+, +
Día 19	-	-	+, +	+ <sup>(2)</sup> , +
Día 24	-	-	+, +	-----

Cada símbolo indica los resultados en un animal.

(1): Sembrados también cerebro, resultado + y pleura con resultado +.

(2): Sembrados también riñón con resultado + e hígado con resultado -.

----: No sobrevivieron animales para realizar sacrificios.

No se obtuvo crecimiento de *A. fumigatus* en ninguna de las muestras del grupo control. De los animales inoculados, se realizó cultivo de los órganos con lesiones, obteniéndose de todos ellos crecimiento de *A. fumigatus*.

Tabla 22: Detección de ADN mediante nested PCR y de galactomanano mediante Platelia Aspergillus test<sup>®</sup>, en el suero de ratas inoculadas con método transtorácico (Grupo 1) e intratraqueal (Grupo 2)

Días p.i.	Día 3		Día 5		Día 7		Día 10		Día 12		Día 14		Día 17		Día 19		Día 21		Día 24	
	PCR	Plt	PCR	Plt	PCR	Plt	PCR	Plt	PCR	Plt	PCR	Plt	PCR	Plt	PCR	Plt	PCR	Plt	PCR	Plt
<b>Control</b>	-	n	-	n	-	n	-	n	-	n	-	n	+	n	-	n	-	d	-	n
<b>1.1</b>	+	p	-	d	+	p	+	p	-	p	+	p	+	P	-	n	-	p	+	n
<b>1.2</b>	+	p	+	p	+	p	+	d	-	n	+	p	+	P	+	p	-	p	-	p
<b>1.3</b>	+	p	+	p	-	p	-	p	-	n	-	p	+	P	+	p	-	p	-	p
<b>2.1</b>	+	p	+	n	-	p	+	p	-	p	-	p	-	P	-	p	---	---	---	---
<b>2.2</b>	+	p	+	n	+	p	+	p	-	p	+	p	+	P	-	p	---	---	---	---
<b>2.3</b>	+	p	+	p	+	p	-	n	-	n	-	p	+	P	---	---	---	---	---	---

PCR: +: Positivo; -: Negativo; ---: No realizado ya que no sobrevivieron animales hasta este día.

PLATELIA (Plt): p: Positivo; n: negativo; d: dudosos (detección de galactomanano)

Los días de sacrificio (5, 12, 19 y 24), los sueros pertenecen a los dos animales sacrificados y al suero obtenido de la sangre de uno de animales restantes.

Los animales control testados dieron resultado negativo en ambas pruebas salvo la PCR del día 17, que fue positivo y el platelia del 21 que fue dudoso. En los animales infectados hallamos muchos resultados positivos en ambas técnicas, sobre todo en los primeros días tras la infección. Destacaremos que en ambos casos hay animales inoculados que presentan resultados negativos en una o ambas pruebas.

Tabla 23: Detección de  $\beta$ -D-Glucano mediante Fungitec® en suero. Resultados en pg/ml. Inoculación transtorácica (Grupo 1) e intratraqueal (Grupo 2)

	Día 5	Día 12	Día 19	Día 24
CONTROL	0'0	0'0	4'18	7'80
1.1	0'0	0'0	6'69	6'69
1.2	0'0	0'0	11'15	<b>23'41</b>
2.1	0'0	----	<b>42'3</b>	----
2.2	0'0	<b>35'9</b>	<b>119'3</b>	----

Consideramos positivos los valores superiores a 20 y dudosos entre 10 y 20 pg/ml. Debido a las grandes cantidades de suero necesarias para la realización de esta prueba diagnóstica, únicamente la realizamos en algunos de los animales sacrificados.

Los resultados de los animales control fueron negativos a lo largo del experimento. En el grupo de los animales inoculados intratraquealmente los positivos no aparecen antes del día 12. En el grupo de los inoculados transtorácicamente únicamente aparece un positivo débil el día 24 y un dudoso el 19.

Tabla 24: Detección de ADN, cultivo y detección de galactomanano en el Lavado Broncoalveolar (LBA) Inoculación transtorácica (Grupo 1) e intratraqueal (Grupo 2)

	Grupo Control			Grupo 1			Grupo 2		
	PCR	Cult	GM	PCR	Cult	GM	PCR	Cult	GM
Día 5	-	0	-/+	-, -	3-0	+,-/+ ,+	+,-	1-1	+,-/+ ,+
Día 12	-	0	-/-	+	87	+/+	+,+	23-8	+,+ /+ ,+
Día 19	-	0	-/-	-,+	0-4	+,+ /+ ,+	-,+	1-10	+,+ /+ ,+
Día 24	-	0	-/+	+,+	0-7	+,-/+ ,+	-----	-----	-----

PCR: Detección de ADN en los lavados mediante PCR

Cult.: Siembra de 50  $\mu$ l de lavado broncoalveolar en Rosa de Bengala (37° C 5 días).

Resultado en número de colonias contadas a las 24 horas de la siembra.  
GM: Detección de galactomanano mediante: Aglutinación en látex (Pastorex®) / ELISA (Platelia®).

Salvo por el Platelia de los días 5 y 24, todas las pruebas realizadas al animal control sacrificado cada día, fueron negativas. En ambos grupos existen resultados claramente positivos para una o varias pruebas en los diferentes días de sacrificio de los animales.

### g.3. Descripción de las lesiones:

A continuación se describen las lesiones halladas en los animales de este grupo

#### Día 5:

- Grupo Control: No hay lesiones macroscópicas ni en cavidad torácica ni abdominal ni encéfalo ni cornetes nasales.

- Grupo 1: Aparece un animal con sintomatología nerviosa de SNC, cabeza girada, gira sobre sí mismo. Sialorrea, caquético. El animal es sacrificado. No se encuentran lesiones macroscópicas en el encéfalo. Nódulos amarillentos y adherencias en el diafragma, pleuras y pericardio.

Sacrificamos otro animal sin síntomas aparentes. En pulmones hallamos nódulos de 0'1-0'2 cm de diámetro, amarillentos. En el punto de inoculación, en el pulmón derecho, existe una lesión de 0'5 cm de diámetro de color amarillento verdoso.

- Grupo 2: Sacrificamos dos animales, uno de los cuales no presenta lesiones macroscópicas aparentes, resaltando únicamente una hemorragia pulmonar, no pudiendo determinar si tal aumento es ante o postmortem.

El otro animal sacrificado presenta lesiones nodulares en todo el parénquima pulmonar y pequeñas hemorragias.

En ambos casos los animales no presentaban síntomas.

#### Día 12:

- Grupo Control: No hay lesiones macroscópicas ni en cavidad torácica, ni abdominal, ni encéfalo ni cornetes nasales.

- Grupo 1: Dos animales son sacrificados sin síntomas previos. Lesiones parecidas en ambos casos, consistentes en una lesión de 0'5 cm de diámetro en el punto de inoculación (pulmón derecho), que provoca adherencias entre pleuras-diafragma y pericardio. En ambos casos existen nódulos de 0'1-0'2 cm de diámetro en pleuras y pericardio, así como en parénquima pulmonar.

- Grupo 2: Únicamente sacrificamos un animal con claros síntomas respiratorios en reposo y estado de caquexia avanzado. El resto de los animales presentan síntomas respiratorios de ligeros a moderados en el esfuerzo o sometidos a estrés. La necropsia pone de manifiesto en ambos pulmones multitud de nódulos en parénquima, zonas atelectásicas, hemorragias no muy severas ni abundantes y un estado bastante avanzado de fibrosis pulmonar que le da una consistencia carnosa y una coloración pálida al órgano.

#### Día 19:

- Grupo Control: No hay lesiones macroscópicas ni en cavidad torácica, ni abdominal, ni encéfalo ni cornetes nasales.

- Grupo 1: Los animales presentan caquexia no muy severa. En ambos casos existe una lesión de 0'3 - 0'4 cm de diámetro en el punto de inoculación (pulmón derecho), que provoca adherencias entre pleura y diafragma y pericardio. En ambos casos se observan un reducido número de nódulos de 0'1-0'2 cm de diámetro en pleuras y pericardio, así como en parénquima pulmonar. En el primer animal el hígado presenta una tonalidad más pálida de la normal.

- Grupo 2: Estado de caquexia en los animales, con epistaxis. Ambos animales sacrificados presentan lesiones nodulares de pequeño tamaño en ambos pulmones, acompañados de hemorragias severas y zonas de atelectasia. Así mismo se presenta una fibrosis generalizada en ambos pulmones, que se hace evidente a la palpación del órgano. Uno de los animales presenta lesiones en órganos abdominales, concretamente hígado, con una lesión difusa en

la zona apical de un lóbulo, y riñones, con una lesión nodular de 0'4 cm de diámetro en la zona cortical.

Día 24:

- Grupo Control: No hay lesiones macroscópicas ni en cavidad torácica, ni abdominal, ni encéfalo ni cornetes nasales. Los animales presentan un estado de caquexia bastante avanzado.

- Grupo 1: Dos animales sacrificados, sin síntomas aparentes. El primero de ellos presenta lesión nodular de 0'2 - 0'3 cm de diámetro en el punto de inoculación. Existe otra lesión en parénquima muy cercana a esta, de 0'1 a 0'2 cm de diámetro. Asimismo existen algunos nódulos de tamaño parecido al anterior en pleuras, así como adherencias entre pleuras, pericardio y diafragma.

El segundo animal sacrificado presenta una lesión en el punto de inoculación, pero no nodular, sino con una apariencia más difusa, con forma de disco con subnódulos, que se adentra en el parénquima pulmonar 2 ó 3 mm, de color amarillento verdoso. Existen numerosas y fuertes adherencias entre pleuras y pericardio.

- Grupo 2: El deterioro físico de este grupo ha sido muy evidente, así como los síntomas respiratorios y epistaxis en algunos animales. A estas alturas de la experiencia, todos los animales han sido sacrificados o han muerto.

#### 4. Apéndice de Imágenes

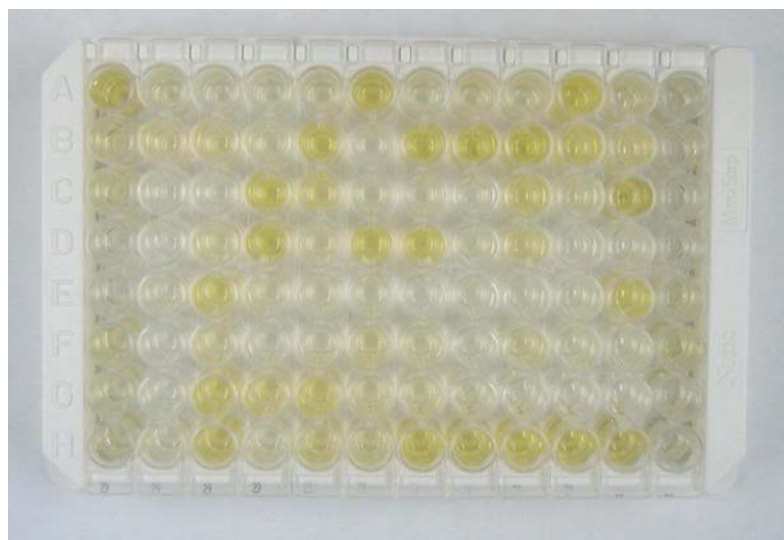


Figura 21, placa con resultados de ELISA Sandwich; Platelia

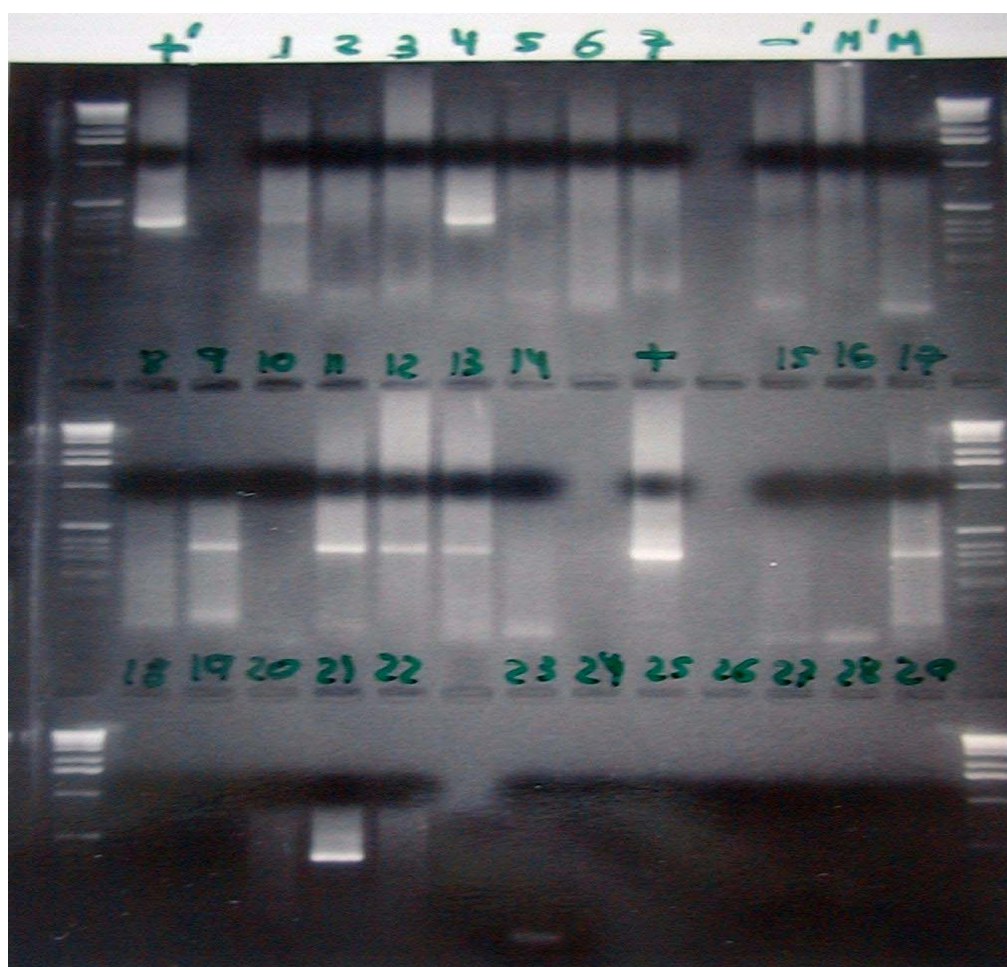


Figura 22: Gel de Agarosa al 2%. Diagnóstico en suero modelo de infección en rata a 72 días.



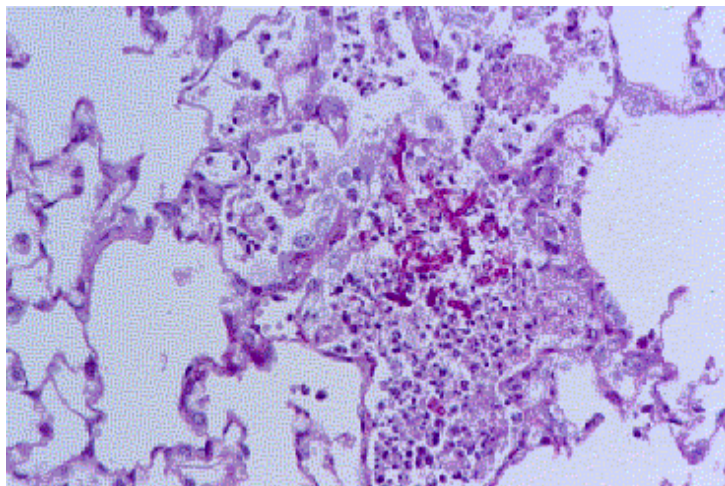
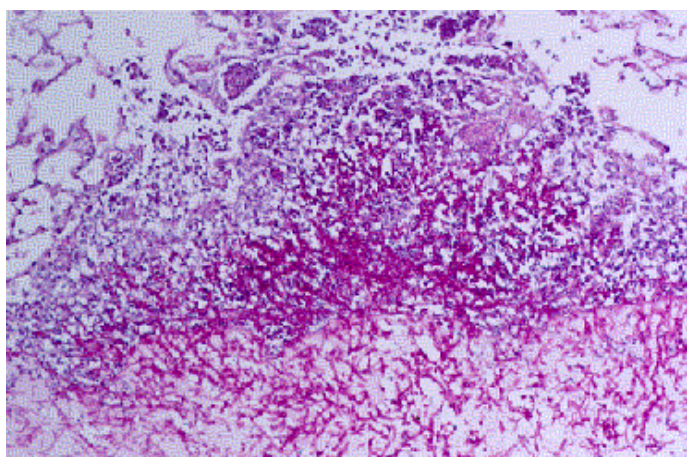
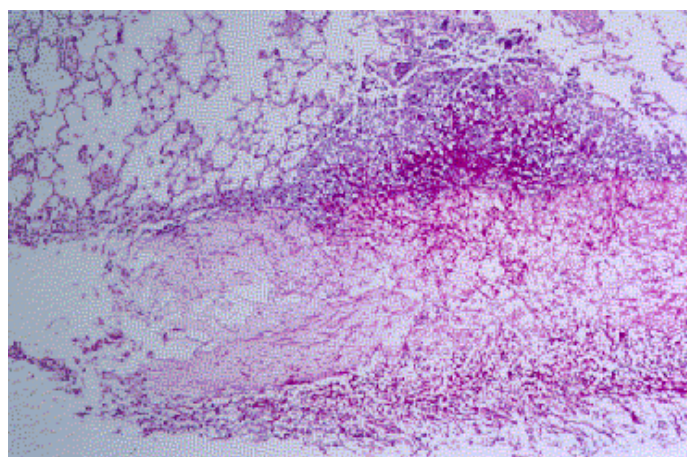
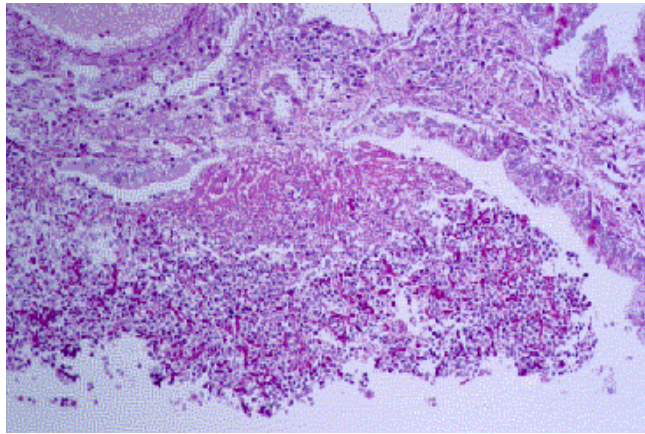
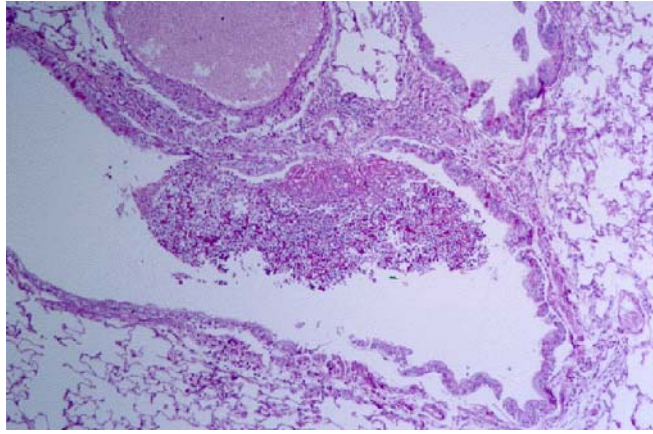


Figura 23: Parénquima pulmonar invadido por hifas de *A. fumigatus* en un modelo experimental de infección intratraqueal. La intensa reacción celular impide la invasión del tejido por las hifas. Hematoxilina eosina. (400x)



Figuras 24 y 25: Parénquima pulmonar invadido por hifas de *A. fumigatus* en un modelo experimental de infección transtorácica. Las hifas invaden el tejido a partir de la masa de agar en las que fueron inoculadas. Hematoxilina eosina (24: 40x y 25: 400x)



Figuras 26 y 27: Presencia de hifas y células de inflamación en un bronquiolo en un modelo de inoculación intratraqueal. Hematoxilina eosina (28: 40x, 29:400x)

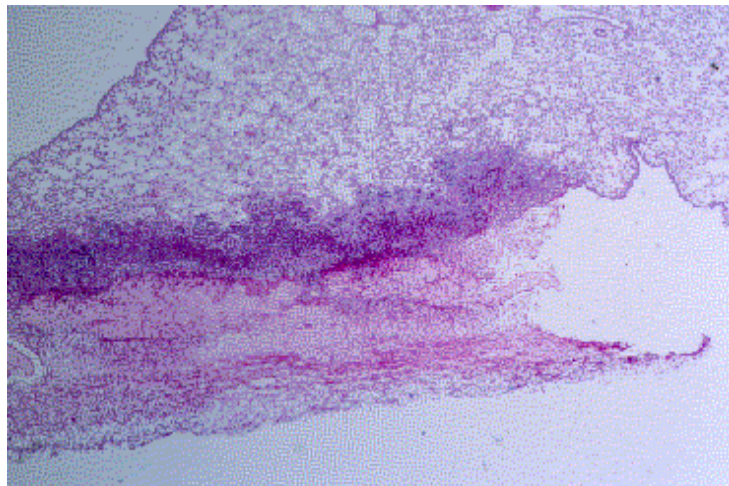


Figura 28: Zona de adherencia pulmón-pleura. Las hifas presentes en el Agar invaden tejido pulmonar adyacente. Modelo de inoculación transtorácica. Hematoxilina Eosina (40x)

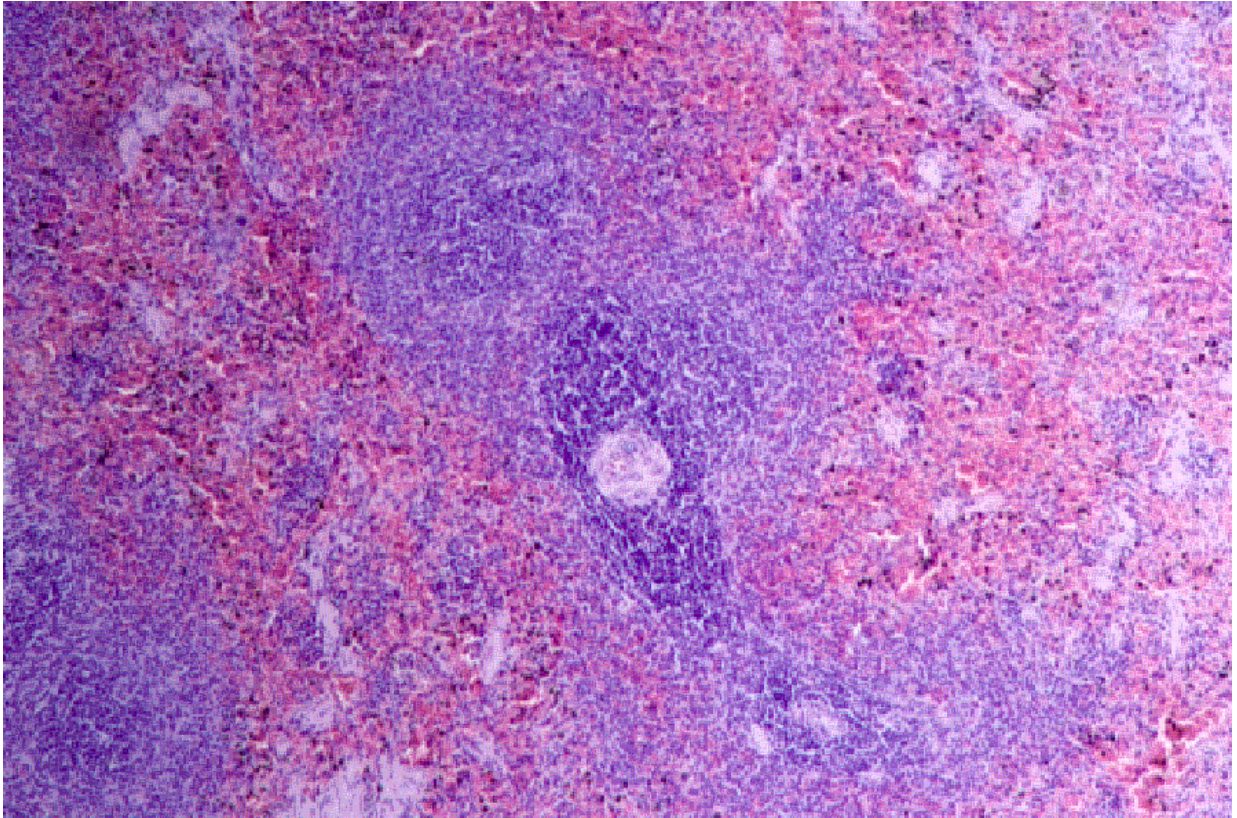


Figura 29: Bazo de rata inoculada mediante la técnica intratraqueal. En este caso no existe depleción de linfocitos, lo que suele condicionar una buena respuesta celular en el pulmón, que se traduce en menor número de granulomas y menos desarrollados, con mayor invasión de tejido por parte del hongo (400x)

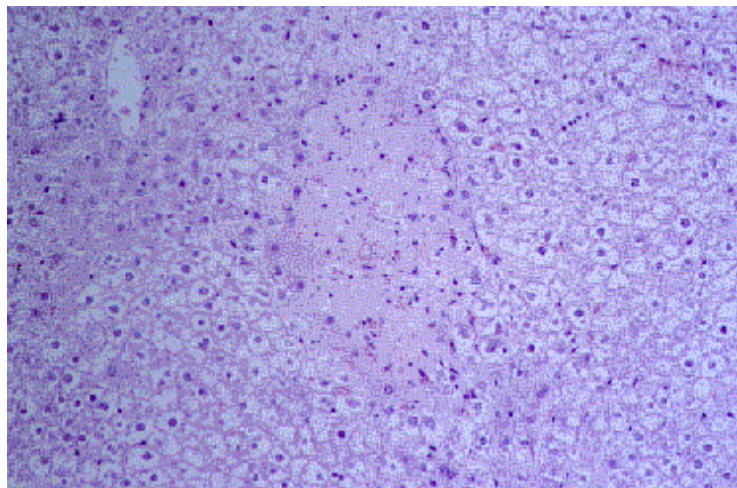


Figura 31: Riñón con foco inflamatorio en médula renal, con infiltración de neutrófilos. En algunos puntos del foco necrótico se distinguen pequeñas hifas (400x)

## **D. DISCUSIÓN**



## **1. INFLUENCIA DEL MEDIO DE CULTIVO EN LA ESTRUCTURA ANTIGÉNICA DE *A. Fumigatus***

Uno de los grandes problemas que surgen cuando se estudian los hongos patógenos es la complejidad de estos microorganismos. Dicha complejidad se traduce en la gran cantidad de proteínas diferentes que son capaces de producir, en comparación con otros microorganismos patógenos como bacterias y sobre todo virus <sup>62,92,115,133,135,157,174,187,269,331</sup>. Buena parte de estas proteínas son glicoproteínas, de las que se han descrito unas 100 con capacidad para unirse a inmunoglobulinas humanas<sup>375</sup>. Nos encontramos pues, frente a una gran cantidad de antígenos que resulta básico estudiar para comprender la patogenia de las Aspergilosis.

La obtención y estudio de extractos antigénicos de *Aspergillus fumigatus* ha sido uno de los objetivos de este trabajo. Tal y como ha sido descrito en la literatura, la variabilidad en los extractos antigénicos de *A. fumigatus* no parece estar relacionada con la cepa que se hace crecer ni con la temperatura de crecimiento, ya que se han descrito similares patrones con múltiples especies crecidas tanto a 25° C como a 37° C <sup>375</sup>, de manera que decidimos dejar fijos estos parámetros y hacer crecer una sola cepa de *A. fumigatus* a 37° C. De esta forma, las variaciones entre los diferentes extractos antigénicos han sido asignadas principalmente al periodo de incubación y composición del medio de cultivo donde se crece el hongo <sup>375</sup>. En este trabajo nos centramos en cultivar el hongo en distintos medios, fijando el tiempo de incubación.

Como ya hemos indicado en el apartado correspondiente de Materiales y Métodos, sembramos la cepa de *A. fumigatus* 48238 en distintos medios: Czapek, Sabouraud, RPMI, RPMI con suero y Medio Mínimo. Recogimos dos extractos diferentes, el procedente del micelio y el procedente del filtrado del medio en el que crecimos el hongo. Posteriormente realizamos una electroforesis unidimensional, utilizando geles de poliacrilamida. Las bandas obtenidas y su peso molecular aparecen detalladas en la Tabla 2 de materiales y Métodos.

Cabe destacar la ausencia de bandas obtenida con el filtrado de Medio Mínimo y la dificultad de diferenciación de bandas obtenidas tanto con RPMI como con RPMI con suero, encontrando en este último caso las bandas características del Suero con que se adicionó el medio.

Resultan, sin embargo, interesantes las bandas obtenidas a partir de los micelios de los hongos en todos los medios así como del filtrado de Sabouraud y Czapek. En primer

lugar destacaremos la presencia de bandas de alto peso molecular presentes en ambos filtrados, que no se hallan descritas en la literatura, de 196 y 115 kDa en el caso del filtrado de Sabouraud y de 109 kDa en el caso del filtrado de Czapek.

En todos los extractos antigénicos se describen una serie de bandas comprendidas entre los 88 y 94 kDa, con excepción del extracto miceliar crecido en RPMI. En dicho margen de peso molecular se hallan descritos gran cantidad de proteínas como una catalasa de 90 kDa<sup>375</sup> o una dipeptil peptidasa de 87 y 88 kDa .

Algunas de estas proteínas han demostrado su capacidad antigénica e incluso algunas, como una de 93 kDa<sup>375</sup> o 90kDa<sup>375</sup> han sido propuestas como posibles marcadores con potencial diagnóstico en enfermedades provocadas por *Aspergillus*.

El siguiente grupo de bandas lo encontramos hacia los 70 kDa, presentes en extractos miceliares salvo en RPMI y RPMI con suero.

A continuación encontramos bandas hacia los 60 kDa, los 55, los 40 y algunas otras.

Cabe destacar el gran número de bandas entre 40 y 20 kDa presentes en el extracto del micelio crecido en Sabouraud.

Tal vez las conclusiones más importantes que se puedan sacar vienen dadas por la intensidad y nitidez de las bandas y no tanto por su número.

Así tenemos que en el extracto crecido en medio RPMI con suero, aparece débil la banda de 90 kDa, y más fuerte y nítida la de 83 kDa, coincidiendo con la banda de la albúmina sérica bovina que corre en el patrón de peso molecular. Dicha banda no aparece en el extracto obtenido cuando crecimos el hongo en RPMI sin suero. En este caso la banda dominante tiene un peso molecular de unos 30 kDa.

En el caso de RPMI, aparece débilmente la mencionada banda de unos 90 kDa, pero más fuerte la de 72,7 kDa. Bandas de unos 73 kDa no han sido descritas por ningún autor.

Sí que aparecen como bandas dominantes las aparecidas en el grupo de los 90 kDa cuando el micelio del hongo es crecido tanto en Sabouraud como en Czapek, así como en el filtrado del medio líquido de Sabouraud y Czapek a día 21. En el caso del extracto del micelio crecido en Czapek tenemos otra gran banda dominante hacia los 52 - 53 kDa, que coincide con la descrita por Calvanico *et al.*<sup>176</sup>. En el caso del extracto de micelio crecido en Sabouraud, aparece una banda bastante intensa a los 55 kDa, que podría ser esta misma proteína.

Finalmente, destacaremos que en los extractos procedentes del filtrado del medio, tenemos bandas de alto peso molecular, de más de 100 kDa, no descritas en la

bibliografía. Tal y como hemos mencionado anteriormente, aparece el grupo de bandas de los 90 kDa como claramente dominantes. En el caso de este extracto procedente de Sabouraud, dicho grupo de bandas aparece compartiendo dominancia con las bandas situadas alrededor de los 55 kDa (como ya hemos mencionado) y los 37 kDa, banda descrita por López-Medrano *et al.* como una de las 4 mayoritarias que forman parte de la fracción del complejo citosólico, extracto obtenido para sus experimentos<sup>187</sup>.


Una visión general de estos resultados, unidos a los obtenidos por diversos autores que han estudiado extractos antigénicos procedentes de *A. fumigatus*, nos presenta un panorama de complejidad que resulta difícil desentrañar. Sin duda alguna, el medio en que se hace crecer el hongo es una de las causas más determinantes de esta diversidad, tal y como hemos mostrado en nuestro trabajo. Otro de los factores que ha sido apuntado como importante a la hora de marcar diferencias entre extractos, es el método de extracción<sup>176</sup>. En nuestro caso hemos optado por un método de disrupción del micelio por medios físicos y recogida de la fracción soluble en agua de los mismos en un Buffer de un pH próximo a 7.

Las complicaciones que conlleva la extracción de antígenos miceliares *in vitro* y la diversidad de extractos obtenidos cuando las condiciones del medio varían, nos hacen pensar que los antígenos expresados cuando el hongo crece *in vivo*, posiblemente no sean los mismos que cuando lo hace *in vitro*. Medios sin azúcares en los que el hongo únicamente dispusiese de colágeno y/o elastina como fuente proteica, imitando las condiciones presentes en el pulmón, cuando el hongo crece *in vivo*, serían los más adecuados para obtener extractos miceliares así como para hacer estudios de patogenicidad *in vitro*<sup>30</sup>.

## **2. ANTIGENICIDAD DE LOS EXTRACTOS PROTEICOS DE *A. fumigatus***

Como ya hemos comentado detalladamente en el apartado correspondiente de Materiales y Métodos, se inmunizaron 4 conejos, el primero de ellos a partir de micelio de *A. fumigatus* crecido en medio Czapek (CZ) y los otros 3 en Sabouraud y se realizó una técnica ELISA indirecto con el fin de detectar la presencia de anticuerpos Anti-*Aspergillus* presentes en el suero de los animales. Los pocillos estaban tapizados con extractos proteicos procedentes del micelio de esta misma cepa crecida en Medio Mínimo, Sabouraud, Czapek (CZ y CZ'), RPMI y RPMI+S. Los resultados muestran



cómo, en el caso del conejo 1, se obtienen las mayores D.O. con el suero testado en placas tapizadas con proteínas procedentes del hongo crecido en Czapek n embargo, los conejos 2, 3 y 4 obtienen mayores D.O. en las placas tapizadas con proteínas procedentes de micelio del hongo crecido en Medio Mínimo (MM), a pesar de haber sido inoculados con micelio del hongo crecido en Sabouraud. En principio el reconocimiento de antígenos sería mejor cuando conejos y placas coincidiesen en el antígeno utilizado, para la inmunización de aquellos y el tapizado de estas, ya que deberían existir anticuerpos en el suero hiperinmune frente a los determinantes antigénicos que también están presentes en la placa, pero no es así. Si observamos la cantidad de grupos de proteínas diferentes que, mediante geles de poliacrilamida, podemos diferenciar en el antígeno crecido en Sabouraud y Medio Mínimo, observamos que aquellos son mucho más numerosos que estos. Esta observación nos puede hacer pensar que en Medio Mínimo logramos una mayor concentración de proteínas antigénicas y que no todas las bandas obtenidas en Sabouraud serían igualmente antigénicas.

Para comprobar dicho punto, realizamos un Western Blot, utilizando el antígeno obtenido a partir del extracto miceliar crecido en Sabouraud y el suero del último sangrado del conejo 4, inoculado con este mismo antígeno.

El revelado del Western Blot muestra que el suero reacciona frente a todos los antígenos presentes en dicho antígeno, sin que aparezca reacción frente a la membrana de nitrocelulosa o ruido de fondo. Dicho suero también se enfrentó a antígeno del hongo crecido en Czapek y RPMI+S. La reacción frente a Czapek se da a lo largo de toda la banda de corrido de la muestra, que no podemos achacar a una posible reacción inespecífica frente a la membrana de nitrocelulosa ya que dicha reacción no se observa con los otros extractos. La banda en la que comienza dicha reacción tendría un peso molecular de cerca de 200 kDa, banda no definida en ninguno de los geles de poliacrilamida. Esto nos hace pensar en que, posiblemente, no se haya producido una buena separación en bandas de este extracto antigénico, ya que tras esta banda de reacción aparece una mancha continua que cubre la práctica totalidad del carril de corrimiento de dicho extracto. La reacción frente a RPMI+S es, por el contrario, bastante definida en las bandas, no obteniendo ruido de fondo.

## 2.1 Crecimiento de *A. fumigatus* en cultivo celular

Tal y como hemos mostrado en los puntos anteriores, existen diferencias entre los extractos proteicos de *A. fumigatus* cuando crece en los diferentes medios de cultivo. Sin embargo resulta complicado saber en cual de estos medios se obtiene un crecimiento del hongo más parecido al que se da en el pulmón, cuando el hongo crece causando enfermedad. Existen interesantes estudios sobre patogenicidad de cepas realizados en medios de cultivo en los que se añadían proteínas presentes en pulmón, como la elastina<sup>30</sup>. En nuestro trabajo optamos por inocular medios celulares con conidias de *A. fumigatus*. El análisis del crecimiento se realizó únicamente por análisis microscópico del crecimiento del hongo. Así observamos cómo se producía un efecto citolítico bastante acusado, existía una intensa destrucción celular, no sólo asociado al crecimiento de las hifas, sino de todo el tapizado celular. Esto nos hace pensar en que el hongo creció emitiendo sustancias tóxicas al medio de cultivo que terminaron por destruir las células. La morfología del hongo resultó altamente interesante ya que no se produjo el desarrollo de estructuras reproductivas, conidióforos, y por lo tanto no se produjo la producción de conidias. Sin embargo, las hifas desarrolladas emitían ciertas prolongaciones laterales, prácticamente perpendiculares a la hifa que la produce y que podemos identificar con las estructuras que algunos autores denominan Aleuriosporas, descritas por algunos anatomopatólogos como formaciones que algunos hongos producen cuando crecen invadiendo tejidos<sup>302</sup> y que se han descrito como típicas de *Actinomyces*<sup>85,274</sup>.

## 3. MODELOS ANIMALES DE ASPERGILOSIS INVASORA

Como hemos podido comprobar por los estudios *in vitro* de *A. Fumigatus*, existen grandes diferencias entre las proteínas expresadas por este microorganismo en los diferentes medios en los que lo hemos hecho crecer. Por lo tanto podemos deducir que el comportamiento del hongo cuando crece invadiendo tejido pulmonar puede ser, así mismo, diferente<sup>329</sup>. A pesar de que se han desarrollado métodos *in vitro* que mimetizan algunas de las características presentes en el pulmón<sup>163,197,308</sup>, consideramos que la mejor forma de trabajar con una Aspergilosis es mediante modelos de infección animal.

Fue por ello que nos propusimos utilizar un modelo de infección animal para el estudio de la Aspergilosis.

Sin embargo, si realizamos una búsqueda bibliográfica de los modelos de Aspergilosis y más concretamente de Aspergilosis Invasora, nos encontramos con una amplia variedad. Estos modelos difieren desde la especie en la que se realizan, hasta el método de infección de los animales, y sobre todo, en cuanto a los métodos de evaluación de los mismos. No existe, pues, un método universal y repetible consensuado por la comunidad científica en el estudio de Aspergilosis Invasora. La más que posible causa de esta diversidad hay que achacarla a que ninguno de estos modelos consigue mimetizar la enfermedad tal y como se da en pacientes humanos.

Nos propusimos, por tanto, la consecución de un modelo de infección animal que resultase una herramienta útil a la hora de realizar estudios, tanto de patogenia como de protección provocada por fármacos frente a la Aspergilosis Invasora.

Desde el primer momento nos fijamos como idea fundamental que el modelo debía reproducir el curso de la enfermedad tal y como se da en pacientes humanos, siendo factores secundarios la especie en que se llevase a cabo, la vía de infección y el inóculo. Así mismo consideramos fundamental poseer buenas herramientas de evaluación de la infección.

### **3.1. Modelos de infección en ratón**

El ratón es uno de los animales de experimentación más ampliamente utilizado en la investigación científica, incluidos los modelos experimentales de infección fúngica <sup>17,67,90,166,229,239,295,323,333,337,373,374</sup> debido a su sencillo manejo y manutención, así como a su gran susceptibilidad a la infección dentro de los animales de experimentación, sólo superado por el conejo <sup>296</sup>.

La mayor parte de los modelos de Aspergilosis Invasora en ratón han sido desarrollados con el fin de evaluar la protección y toxicidad que produce frente a la infección, la administración de algunos fármacos <sup>7,45,80,147,155,204,209,213,229,239,241,295,296,341,356,373,374</sup> siendo menos frecuente los estudios de patogenicidad <sup>1,51,62,90,127,163,166,169,174,191,356</sup> <sup>326</sup>.

En ratones se han descrito como vías de inoculación más frecuentes la intranasal, intravenosa e intraperitoneal <sup>296</sup>.

Ratones inoculados parenteralmente suelen ser utilizados como modelo de infección diseminada, que se da en pacientes humanos con infecciones nosocomiales, tras intervenciones quirúrgicas “a corazón abierto”, o bien mediante la entrada de las conidias por catéteres, a la que hemos denominado Aspergilosis iatrogénica o visceral en la introducción de este trabajo <sup>143,161</sup>. Estos modelos suelen ser utilizados para la evaluación de tratamientos antifúngicos <sup>67</sup>. Sin embargo no se ajustan al patrón de infección pulmonar que buscamos para mimetizar una Aspergilosis Invasora, de manera que optamos por realizar un modelo de infección intranasal. Al contrario de lo que ocurre en el caso del modelo de inoculación parenteral, la inoculación del ratón vía nasal requiere de un estado de inmunosupresión previo para lograr una infección de los animales, ya que un ratón inmunocompetente es capaz de eliminar hasta  $10^8$  conidias sin sufrir enfermedad <sup>261</sup>.

Para nuestro trabajo, decidimos no evaluar el modelo de infección parenteral, ya que el objetivo de nuestro estudio era establecer una Aspergilosis Invasora (AI) y no una Aspergilosis diseminada (AD).

Para el establecimiento de un modelo de Aspergilosis Invasora, en primer lugar, nos planteamos la posibilidad de establecer una vía de inoculación rápida y sencilla. En ratón es posible la inoculación intranasal. Con el animal anestesiado y aprovechando la inspiración del mismo, es posible introducir pequeños volúmenes de inóculo, tal y como describen varios autores <sup>7,90,166,198,209,296</sup>.


En primer lugar decidimos comparar dos modelos únicamente diferentes en la vía de inoculación: uno de inoculación intranasal y el otro intratraqueal.

Decidimos desarrollar ambos modelos con las mismas condiciones, es decir, el mismo inóculo, inmunosupresión, etc, variando únicamente la vía de inoculación.

La curva de supervivencia presenta tres etapas. En la primera, en los animales inoculados vía intratraqueal, las muertes comienzan el segundo día postinoculación y se mantiene en un 10% de animales muertos cada día. Por el contrario la curva de supervivencia del modelo intranasal comienza cuatro días postinoculación y se mantiene entre un 5 y un 10% diario. Esta primera etapa dura una semana, y coincide con unos niveles de leucocitos en sangre de los animales muy bajos. En la segunda etapa, en ambos modelos, hay tres días en los que no muere ningún animal, lo que coincide con un aumento, en el día 7, del nivel de leucocitos en sangre hasta niveles de  $20 \times 10^3$  por  $\text{mm}^3$ , superiores a los fisiológicos (el rango fisiológico de leucocitos en sangre de ratón viene a estar entre los  $2 \times 10^3$  y los  $10 \times 10^3 / \text{mm}^3$ , dependiendo de la edad, sexo y estirpe

de los animales (<http://www.criver.com/techdocs/baseline>), en lo que es un efecto rebote que ha sido descrito y ampliamente estudiado en ratones tratados con Ciclofosfamida a dosis subletales<sup>301</sup>. Este alto nivel de leucocitos baja de nuevo hasta límites fisiológicos en el día 10, dando comienzo a la tercera etapa, en la que vuelve a haber muerte de los animales. Esta etapa, en el modelo intratraqueal, muestra un 10% de muertes en el día 11 y una estabilización en la supervivencia de los animales en el 10% hasta el día 21, en que termina el experimento. Por el contrario, en el caso del modelo de inoculación intranasal, se produce una primera fase de dos días con una mortandad de un 20 %, dejando un 35% de supervivencia a día 11, tras lo que se produce una estabilización, con muertes puntuales hasta llegar a un 20% de supervivencia al final del experimento.

De la comparación de ambos modelos podemos decir que existe una mayor virulencia del hongo en el modelo de inoculación intratraqueal, ya que las muertes comienzan antes. A pesar de ello, las curvas de supervivencia transcurren de manera bastante paralela a lo largo del experimento. Consideramos que este comportamiento se debe a que el inóculo efectivo, es decir, el que llega a pulmón, es mayor en el caso de la inoculación intratraqueal, por lo que el comportamiento de ambos modelos es muy similar. Tal y como hemos descrito en el capítulo de Materiales y Métodos la inoculación intratraqueal precisa de una intervención quirúrgica, con exposición de la tráquea del animal, lo que dificulta enormemente dicha tarea. Por lo tanto creemos que resulta más práctico realizar el modelo de inoculación intranasal, que ha sido también utilizado por otros autores tanto en estudios de evaluación de fármacos antifúngicos como de patogenia de Aspergilosis Invasora<sup>7,82,90,121,166,198,209,296</sup>.

 curva de supervivencia obtenida en este tipo de modelos de infección intranasal en ratón, ha sido descrita como dependiente tanto del tamaño del inóculo como del tipo y pauta de inmunosupresión<sup>82</sup>. Usualmente la inmunosupresión descrita por diversos autores, está basada en la administración de Ciclofosfamida y Acetato de Cortisona<sup>7,82,121,198,209</sup>. En nuestro caso decidimos utilizar Ciclofosfamida y Dexametasona, al poder ser esta administrada en agua de bebida.

Con el fin de evaluar dichas pautas de inmunosupresión, realizamos una experiencia con el objetivo de tener una curva de supervivencia en la que no se produzca un aumento del nivel de leucocitos en sangre que, tal y como hemos descrito en el experimento anterior, puede estar correlacionada con una parada en la mortandad de los animales. Parece ser que la administración de Ciclofosfamida produce, efectivamente una bajada en el nivel

de leucocitos en sangre, que viene seguida de un “efecto rebote”, que hace aumentar este nivel sobre límites fisiológicos.

La pauta de inmunosupresión utilizada incluye 3 dosis de Ciclofosfamida de 100 mg/kg, que se administra los días 3 ó 5 ó 7 ó 10 tras la inoculación (según el grupo), a 4 grupos de ratones, respectivamente. Así mismo, realizamos estas mismas 4 pautas de inmunización en otros cuatro grupos de animales que además fueron tratados con Anfotericina B.

En este caso realizamos la evaluación del estado de inmunosupresión de los animales cada dos o tres días, mediante el recuento de leucocitos en sangre periférica. Gracias a este seguimiento encontramos que, tres días tras la última dosis de Ciclofosfamida, se produce un aumento de los leucocitos en sangre hasta límites superiores a los fisiológicos, lo que, parece ser, conlleva una parada en el ritmo de bajas de los grupos de animales.

Obtuvimos 4 diferentes curvas de supervivencia en las 4 pautas de inmunosupresión descritas, aunque únicamente en la primera de ellas (administración de Ciclofosfamida 3 días tras la inoculación) obtenemos un modelo en el que no se producen paradas en el ritmo de bajas. En este modelo, las muertes comienzan tres días tras la inoculación y se produce una curva de muerte que al día ocho se estabiliza en un 20% de supervivencia.

Este mismo modelo con la administración de tratamiento considerado de referencia en la Abergilosis Invasora, como es la Anfotericina B desoxicolato, muestra una probabilidad acumulada de supervivencia a día 15 del 75%, mientras que sin tratamiento es de 13%. Así mismo el área bajo la curva en el caso del grupo de animales no tratados es de 819'5 %/días, mientras que para los tratados es de 1477'5 % / días. Esto muestra que el tratamiento con Anfotericina B es efectivo en este modelo de infección.

En estos modelos de infección pulmonar con curva de muerte constante, sin paradas, la supervivencia a la semana de la inoculación no supera el 30%. Sin embargo la evaluación de nuevos antifúngicos puede necesitar de modelos menos agresivos, por lo que decidimos realizar un modelo en el que la enfermedad no se dé en el pulmón del animal, como en el caso de la inoculación intraperitoneal. Este tipo de inoculación ya ha sido descrita tanto en rata como en ratón <sup>195,296,336</sup>.

En primer lugar evaluamos distintos inóculos con animales no inmunosuprimidos. Sin embargo, a pesar de la gran concentración de conidias administradas, la supervivencia

fue del 100% en todos los diferentes tamaños de inóculo, no hallándose animales enfermos ni aislamiento del hongo, salvo en el inóculo de  $10^8$  conidias por ml. A pesar de ello, en ningún caso encontramos evidencia macroscópica de lesiones compatibles con una invasión de tejidos por el hongo, tal y como ya ha sido descrito en modelos con ratas inmunocompetentes<sup>336</sup>. Sin embargo, en el caso de ratones inmunocompetentes, se ha descrito un modelo de Aspergilosis intraperitoneal letal, con un inóculo de  $10^7$  conidias por ratón<sup>296</sup>. En nuestro caso decidimos realizar inmunosupresión de los ratones mediante Dexametasona y, en algunos casos, además con Ciclofosfamida.

Las pautas de inmunosupresión que incluyeron ciclofosfamida, presentaron una virulencia y mortalidad de los animales muy elevada, más incluso que en el caso de la Aspergilosis pulmonar que hemos descrito anteriormente.

Sin embargo, los modelos que utilizaban únicamente dexametasona como inmunosupresor, obtuvieron unas curvas de supervivencia mucho más suaves. Dentro de este modelo de inmunosupresión utilizamos dos inóculos, uno de  $10^8$  y otro de  $10^7$  conidias por mililitro, siendo en este último mayor el área bajo la curva de la supervivencia.

Este modelo de inoculación intraperitoneal e inmunosupresión con Dexametasona, fue utilizado en un experimento de protección frente con Anfotericina B, obteniendo una curva de supervivencia mucho mejor en el caso de los tratados (Gráfica 12 y Tabla 9b del apartado de Resultados)

La inoculación intraperitoneal de ratones, al igual que la intranasal, es un buen método para la evaluación de nuevos fármacos antifúngicos. La ventaja de la inoculación intraperitoneal frente a la intranasal es que no requiere anestesiarse a los animales. Sin embargo, este modelo intraperitoneal tiene la desventaja de que no se desarrolla una Aspergilosis Invasora pulmonar. Creemos pues, que debemos tener muy claro el objetivo de nuestro estudio en el antes de decidimos por cualquiera de estos modelos de infección en ratón. Así por ejemplo proponemos como adecuado el modelo intraperitoneal cuando se quiera comparar la acción de dos fármacos simultáneamente o bien del mismo a diferentes dosis. En estudios en los que se quiera tener una efectividad real pulmonar del fármaco, recomendamos el modelo de inoculación intranasal.

### 3.2 Modelos de infección en Rata

Los modelos desarrollados hasta el momento de Aspergilosis Invasora tienen un defecto común: la falta de parecido con la enfermedad desarrollada en humanos. Los modelos de ratón que hemos descrito, así como los descritos en la literatura, normalmente provocan el desarrollo de una enfermedad de curso hiperagudo y son obtenidos a partir de la inoculación de un alto número de conidias. Sin embargo la Aspergilosis Invasora que se da en pacientes humanos tiene un curso menos agudo y está provocada por la inhalación continuada de un bajo número de conidias <sup>176</sup>.

Para solucionar este problema se han planteado dos soluciones diferentes. Una consiste en disminuir el tamaño del inóculo, lo que conlleva un aumento en la inmunosupresión <sup>308</sup>. Sin embargo esto puede provocar la aparición de otras infecciones secundarias y una más difícil estandarización de los modelos <sup>176</sup>. El otro es la inoculación de los animales, vía intratraqueal, con conidias incluidas en bolas de Agar, de manera que queden aisladas del sistema inmune. La idea es que estas conidias germinen en las bolas de Agar y sea el micelio el que invada el tejido muscular <sup>229</sup>.

En este trabajo presentamos una tercera solución a este problema. En nuestra opinión, resulta arto complejo inocular a los animales de una manera parecida a como se hace en humanos, es decir, en bajas dosis pero de manera constante. Tal vez la única manera de realizar dicha inoculación sería mantener a los animales en un ambiente rico en esporas de *Aspergillus fumigatus*. Sin embargo, por dicho sistema no se puede tener la seguridad de obtener un modelo homogéneo y repetible, debido a la imposibilidad de controlar el número de esporas que, finalmente, llegan al pulmón de los animales. Posiblemente, desde un punto de vista epidemiológico, este patrón de infección poco homogéneo y poco repetible, ocurra también en humanos, pero creemos que es poco aceptable que en un modelo animal se tengan que inocular gran número de animales para obtener bajo número de infectados. Descartamos, pues, realizar una inoculación que mimetice las condiciones en las que se realiza en humanos y decidimos centrarnos en provocar en los animales el mismo patrón de lesiones que se describe en pacientes humanos.

Por otro lado creemos que buena parte del curso agudo de la infección que se produce en los modelos animales se debe a que la masiva infección de ambos pulmones provoca una severa inflamación de dicho tejido, que conlleva un rápido deterioro del estado de los animales.

Con el fin de evitar este rápido deterioro, decidimos realizar un modelo de infección en el que únicamente se viese afectado uno de los pulmones del animal.



La inoculación transtorácica de uno de los pulmones del animal cumplía las condiciones que habíamos marcado para un modelo de infección. Así mismo consideramos que el animal más adecuado para este modelo es la rata, ya que tiene un tamaño suficientemente grande como para plantearse una punción pulmonar y suficientemente pequeño como para inocular grupos de animales significativos sin que supusiese un exceso de espacio y coste tanto para nosotros como para futuros grupos que pudiesen reproducir este modelo en sus laboratorios.

En este punto nos planteamos la necesidad de que nuestro modelo fuese siempre realizado de manera simultánea junto con un modelo de inoculación transtraqueal, ya descrito en la bibliografía. De este modo podríamos comparar “in situ” nuestro nuevo modelo con uno ya presentado ante la comunidad científica. Estos modelos de inoculación transtraqueal han sido descritos tanto en conejos<sup>24,101</sup>, como en ratas<sup>180,215</sup>. Sin embargo, estos modelos conllevan la exposición de la tráquea de las ratas mediante una intervención quirúrgica. Dado el obligado estado de inmunosupresión al que debíamos llevar a los animales, pensamos que una intervención quirúrgica tan traumática supondría un problema añadido para los animales así inoculados y que las posibles comparaciones con nuestro modelo resultarían falseadas por este hecho. Un modelo de inoculación intranasal en ratas resulta imposible, debido a las características anatómicas de los cornetes nasales en estos animales. La solución a este problema consiste en la posibilidad de inocular ratas intratraquealmente, sin necesidad de exponer la tráquea de los animales, a través de la boca, y visualizando la cavidad orofaríngea gracias a una fuente de luz fría aplicada desde el exterior, como ya ha sido descrito<sup>49</sup>.

La descripción de la técnica de inoculación transtorácica ha sido realizada en el apartado de resultados de este trabajo. Una vez desarrollada esta metodología, y habituados a su puesta en práctica, procedimos a realizar tres modelos experimentales previos. En ellos deberíamos fijar una serie de parámetros fiables para su aplicación:

A Grado de inmunosupresión

B Tamaño del inóculo

- i. Estadío de desarrollo del hongo a inocular: hifas o conidias
- ii. Consistencia del inóculo, líquida o semisólida

El objetivo de nuestro modelo es no provocar una enfermedad de curso agudo, de manera que el problema inicial consistía en tratar de encontrar un protocolo de inmunosupresión y un inóculo que no favoreciese la diseminación del hongo por el resto

del organismo del animal en un plazo demasiado breve de tiempo. Debido al menor tamaño de las conidias que las hifas, consideramos más sencillo una disseminación por vías aéreas de aquellas.

Así mismo, con el fin de evitar que un vehículo líquido del inóculo pudiese facilitar su disseminación a los dos pulmones, en el caso de que una parte se depositase en una vía respiratoria de gran calibre, decidimos realizar la inoculación con un inóculo semisólido, que contenía un cuatro por mil de Agar.

El modelo que queremos desarrollar conlleva la utilización de un protocolo de inmunosupresión, ya que en caso contrario, no obteníamos mortalidad en los animales. Los protocolos de inmunosupresión realizados incluían la utilización de Ciclofosfamida y Dexametasona. En los grupos de animales en los que simultaneábamos ambos fármacos, las mortalidades fueron muy elevadas, con supervivencias acumuladas muy bajas a las dos semanas tras inoculación. La administración de Ciclofosfamida nos dio buenos resultados en el segundo modelo previo. Sin embargo la necesidad de inyectar la sustancia a los animales cada tres días, junto a la posibilidad de que este fármaco interfiriera en algunos de los métodos de evaluación que pensábamos utilizar en estos modelos, como ha sido descrito para los métodos de detección de galactomanano <sup>129,379</sup>, nos hizo decantarnos por la Dexametasona, que administrada como único agente inmunosupresor en agua de bebida, proporcionándonos una inmunosupresión acorde con nuestros fines.

En lo que respecta al inóculo, no hallamos diferencias significativas entre los grupos inoculados con conidias o los inoculados con hifas, tanto en las curvas de mortalidad como en la gravedad y disseminación de las lesiones. Es por ello que decidimos utilizar hifas.

En cuanto a la consistencia del inóculo, pudimos constatar que la disseminación de las lesiones es mayor en el caso de que se inocule con medios líquidos que semisólidos. La presencia de lesiones hepáticas, el aislamiento en el pulmón izquierdo y riñones, así lo constatan.

A la vista de nuestros resultados, proponemos pues el modelo de infección transtorácica como un modelo válido para el estudio de la Aspergilosis Invasora.

Una vez fijadas la metodología de infección, el sistema de inmunosupresión y el

inóculo, decidimos intentar mantener animales infectados durante 72 días. De esta manera podríamos evaluar el modelo en infecciones crónicas a largo tiempo, tal y como ocurre en pacientes humanos.

Como ya hemos comentado anteriormente, uno de los problemas de los modelos animales de Aspergilosis Invasora utilizados hoy día es la rapidez con que se desarrolla la enfermedad. Si éramos capaces de mantener un modelo de infección, con un patrón parecido al que se da en infectados humanos durante un largo período de tiempo, tendríamos una herramienta de la que hasta este momento no se disponía en el estudio de la Aspergilosis Invasora. Objetivo secundario de este modelo era obtener un amplio rango de muestras posibles para monitorizar a los animales infectados mediante los métodos diagnósticos más frecuentemente utilizados en medicina humana. Gracias a este modelo pudimos obtener muestras de animales infectados durante todo este período.

De manera simultánea realizamos la inoculación de los animales con el modelo intratraqueal, con el mismo protocolo de inoculación con el fin de obtener una comparación fiable entre ambos modelos.

El grupo de animales Control, no infectados, presenta mortalidad a partir de la quinta semana a partir de la inoculación de los animales, aunque únicamente de un 8% de los inoculados y debido, posiblemente, al largo período de inmunosupresión de los mismos. Todos los animales del grupo control presentaba estado general de caquexia. Asumimos, pues, un porcentaje cercano al diez por ciento de animales muertos por esta causa.

Sin embargo en ambos grupos de animales inoculados existe una mayor mortandad que en el grupo control. Las necropsias de los animales muertos así como de los sacrificados en estado terminal, demuestran que las lesiones pulmonares compatibles con una Aspergilosis Invasora son evidentes, y se consideraban por sí mismas causa probable de la muerte.


En cuanto a la comparación de las curvas de supervivencia de ambos grupos inoculados, vemos claramente cómo los animales inoculados transtorácicamente presentan mejor probabilidad acumulada de supervivencia, aún en intervalos de una semana, y un área bajo la curva, bastante menor.

La evolución del peso medio de los animales está influenciada por la muerte de los más

débiles, que normalmente, presentaban un estado de caquexia mayor, provocando picos, que en ningún caso creemos que nos sirva para sacar conclusiones.

Los cultivos realizados a partir de las lesiones de animales inoculados fueron siempre negativos en el caso de animales no inoculados. En animales inoculados se produjeron aislamientos de buena parte de los animales, encontrando sin embargo algunos pulmones de animales inoculados a partir de los que no obtuvimos aislamiento, a pesar de que las lesiones macroscópicas presentes eran muy similares a los pulmones con aislados positivos y compatibles con una Aspergilosis Invasora. Sin embargo consideramos este resultado dentro de lo normal ya que se ha descrito la presencia del hongo mediante técnicas inmunohistoquímicas a pesar de obtener cultivos negativos<sup>153</sup>; también se ha descrito la evidente falta de correlación entre el tamaño de las lesiones y los recuentos de cultivos pulmonares (339, Leenders). Dichos resultados han sido explicados como la falta de viabilidad del hongo que crece *in vivo* para crecer *in vitro* a partir de las lesiones<sup>71</sup>.

Los resultados obtenidos en las pruebas diagnósticas tanto a partir de sangre como a partir de LBA, serán discutidas en el último apartado de esta discusión.

Las lesiones descritas en este modelo corresponden, en todo caso, a animales sacrificados  día 72 tras la inoculación de los animales. De los cuatro animales necropsiados este día inoculados intratraquealmente, observamos que uno de ellos no presentaba lesiones macroscópicas ni microscópicas. Los otros tres presentaban claras lesiones macroscópicas en ambos pulmones. Sin embargo la descripción microscópica de dichas lesiones presentaba un patrón que se repite: lesiones pulmonares nodulares con gran cantidad de hifas en el centro de unas lesiones con escaso número de células inflamatorias. La disposición de dichas hifas es siempre centrada, nunca están atravesando el perímetro de células inflamatorias. Este tipo de lesiones ha sido descrita como típica tanto en pacientes humanos como en otros modelos de infección en los que los individuos infectados logran controlar la infección<sup>229,304</sup>. Normalmente, este patrón se acompaña con una depleción moderada del bazo.

En este modelo de infección intratraqueal, los animales que presentan este tipo de lesiones sólo son el 25% de los inoculados, de manera que en un 75% de los casos la infección provocó la muerte de los animales.

Las lesiones descritas en los animales inoculados vía transtorácica presentan hifas invadiendo tejidos pulmonares, pleuras e incluso pericardio. Por lo tanto nos hallamos

frente a una infección que parece más activa que en el caso anterior, en la que frecuentemente tenemos hifas en los nódulos atravesando las líneas celulares periféricas, descritas en pacientes con la infección no controlada<sup>71,105,229,304</sup>. Así mismo pudimos observar evidencias de diseminación tanto pulmonar, a través de vías respiratorias, con presencia de nódulos recientes (no calcificados), así como posiblemente sanguínea, con hifas en encéfalo en uno de los animales necropsiados.

Por lo tanto podemos decir que la infección de los animales inoculados transtorácicamente es más activa que en los animales inoculados intratraquealmente. A pesar de que la infección es activa, la mortalidad es muy baja, (a los 72 días la probabilidad acumulada de supervivencia es del 83%) en inoculados por vía transtorácica. Sin embargo los animales inoculados intratraquealmente presentan una mayor mortalidad debida a la intensa infección de ambos pulmones y en el caso de los animales que sobreviven hasta este día 72, es debido a que el sistema inmune logra controlar la infección, impidiendo la muerte de los mismos.

Estos resultados apoyan la tesis postulada anteriormente y que nos movió a desarrollar este modelo: el daño tisular en un solo pulmón provoca un desarrollo de enfermedad más crónico y constante que en el caso de realizar una inoculación de ambos pulmones. Sin embargo este modelo presenta muertes en la curva de supervivencia del grupo control de animales no inoculados, y a pesar de que creemos que dicha curva no invalida el modelo, buscamos modificaciones de este modelo con el fin de lograr una supervivencia del 100% en controles no infectados.

Para ello, realizamos modelos de Aspergilosis Invasora mediante inoculación transtorácica en la que manteníamos la infección durante períodos más cortos de tiempo que estos 72 días, pero con una dosis inmunosupresiva doble. A pesar de esta mayor dosis inmunosupresiva, la supervivencia del grupo control no inoculado fue del 100% durante los 42 días en que mantuvimos animales infectados, posiblemente por el menor tiempo que los animales estuvieron inmunosuprimidos.

Los animales inoculados estaban en dos grupos, uno de ellos inoculado intratraquealmente y el otro transtorácicamente. La curva de supervivencia presenta en este caso una imagen muy parecida entre ambos grupos, a pesar de que, tanto la probabilidad acumulada de supervivencia como el área bajo la curva, son mejores en el modelo de infección transtorácica.

En cuanto a la evolución de los pesos de los animales, no hallamos diferencias significativas entre ambos grupos de animales inoculados ni con el control.

El diseño de este modelo incluía el sacrificio de los animales con una cadencia semanal. De los animales sacrificados realizamos diversas pruebas diagnósticas, descripción de lesiones anatomopatológicas tanto macro como microscópicas, así como cultivo del troceado de órganos, que en todo caso confirmaron la ausencia de crecimiento fúngico en los pulmones de los controles y crecimiento en todos los inoculados.

Tal y como sucedía en el modelo de infección a 72 días, en este caso los síntomas que presentan los animales reflejan una evolución de la enfermedad en el grupo infectado transtorácicamente mucho más homogénea que en el caso de los inoculados intratraquealmente. Así hallamos animales aparentemente sanos junto a otros muy enfermos en los que la evolución de la enfermedad es muy rápida en el grupo intratraqueal.

Las lesiones macroscópicas confirman este hecho.

Los animales sacrificados a la semana de ser infectados por vía intratraqueal no presentan lesiones compatibles con una Aspergilosis Invasora. Sin embargo los dos animales sacrificados a las dos semanas postinfección de este grupo, presentan graves lesiones compatibles con Aspergilosis Invasora, severas hemorragias y lesiones en otros órganos como el hígado. Estos patrones de lesión tan severos se repiten, quizás con un mejor estado de los animales, durante las siguientes semanas, en las que siempre encontramos gran cantidad de nódulos en ambos pulmones y lesiones en otros órganos, como riñones e hígado. Las semanas cuarta y quinta postinfección, sin embargo, encontramos animales que, a pesar de tener lesiones compatibles con una infección por Aspergilosis Invasora, no son en absoluto severas, sin que exista evidencia ni macroscópica ni microscópica de diseminación a otros órganos. Es por tanto este un grupo bastante heterogéneo en el patrón de la infección.

Los animales inoculados transtorácicamente presentan, por el contrario, un patrón de infección bastante constante, con un estado de enfermedad parecido en todos los animales. No hallamos animales inoculados que no presenten lesiones provocadas por *A. fumigatus* compatibles con una Aspergilosis Invasora, tal y como confirma el estudio microscópico de las lesiones. En este grupo podemos definir un modelo de infección evolutivo, ya que encontramos lesiones de severidad mayor cuanto más tiempo están inoculados los animales, llegando a encontrar diseminación a otros órganos únicamente en las últimas semanas de infección.

Tal y como hemos indicado anteriormente, dejamos la discusión de los resultados de los estudios diagnósticos para el final de esta discusión, ya que tendremos en cuenta los resultados obtenidos en todos los modelos de infección en conjunto.

Únicamente haremos ahora una breve mención del estudio radiológico que realizamos en este experimento.

La aplicación de la radiología como método de evaluación de un modelo de Aspergilosis en un animal de pequeño tamaño, como es la rata, tiene el inconveniente de la resolución de la misma. Una lesión del suficiente tamaño como para ser detectada radiológicamente supone para la rata una invasión muy considerable en porcentaje del tejido del órgano que visualicemos. A pesar de todo consideramos interesante realizar esta técnica debido al excelente contraste que suponen los pulmones, completamente radiolúcidos, frente a las lesiones, más radiodensas, que tratábamos de provocar. Sin embargo, los resultados del estudio radiológico no revelaron información que proporcionase datos adicionales a los que podíamos obtener con otras técnicas.

Por lo tanto no consideramos de interés el estudio radiológico en el seguimiento de la evolución de la infección por *A. fumigatus* en estos modelos desarrollados en rata, debido al escaso interés de la información que proporciona, que en ningún caso justifica el estrés añadido que el desarrollo de esta técnica conlleva.

Por último realizamos un modelo de infección a 24 días, aumentando el tamaño del inóculo en el grupo de animales inoculados intratraquealmente, con el fin de evitar la aparición de animales no infectados. De este modo, además, podríamos obtener más información de ambos tipos de inoculación.

La curva de supervivencia muestra claramente que la infección de los animales inoculados intratraquealmente se produce de manera muy severa, hallando un 100% de muertos el día 20 postinfección. Tenemos en este caso, pues, una infección con un desarrollo agudo, poco válido como modelo de Aspergilosis Invasora. El estado clínico de los animales y las lesiones descritas ratifican este hecho.

Nuestra experiencia con el modelo de infección intratraqueal muestra que resulta altamente complicado establecer un modelo de infección crónico que presente un curso parecido en todos los animales inoculados. Tenemos por un lado infecciones con baja carga infectiva en las que aparecen animales extremadamente enfermos con lesiones muy severas, junto con animales prácticamente sanos con escaso desarrollo de lesiones. Y por otro lado tenemos grupos de animales infectados que presentan una enfermedad

aguda con severos síntomas respiratorios que llevan a la muerte en pocos días.

Por el contrario, tal y como se confirma en este modelo de infección a 24 días, los animales infectados transtorácicamente presentan un modelo de infección bastante parecido en todos ellos, con una evolución relativamente lenta de la infección y en la que la inmunosupresión es una variable efectiva para modular la severidad de la misma que podemos controlar muy fácilmente.

Consideramos por tanto el modelo de infección transtorácica como un modelo altamente válido de Aspergilosis Invasora, en el que conseguimos unas condiciones muy parecidas a la enfermedad descrita en pacientes humanos.

Han sido descritos en la bibliografía otros modelos que, mediante otras técnicas, trataban de lograr el mismo objetivo que nuestro modelo.

Una de las aproximaciones a este objetivo es la inoculación de conidias de *A. fumigatus* incluidas en pequeñas gotas de Agar, con lo que los autores buscaban proteger a las conidias de la acción de los macrófagos. Así, en uno de los modelos descritos, los autores infectan dos grupos de animales con este método, y los mantienen durante dos semanas sin inmunosuprimir. Tras este tiempo realizan inmunosupresión de uno de los grupos, en el que obtienen una Aspergilosis Invasora activa, con invasión por parte del hongo del tejido y gran mortandad de animales durante cuatro semanas. En el grupo no inmunosuprimido no se produjo invasión tisular y es propuesto por el autor como un modelo de Aspergilosis no Invasora parecida a la que se da en humanos <sup>229</sup>.

En nuestra opinión este modelo mitiga en parte la gravedad con que se dan las infecciones cuando las conidias no van incluidas en bolas de Agar. Sin embargo consideramos que no se produce una verdadera Aspergilosis Invasora en el grupo de animales infectados no inmunosuprimidos ya que las esporas no llegan a salir de las bolas de Agar, ni tampoco en el de inmunosuprimidos hasta que no se produce esta inmunosupresión. Sin duda alguna el hecho de que las esporas estén incluidas en bolas de Agar permite que éstas escapen con mayor eficiencia a la fagocitosis de los macrófagos alveolares, pudiendo así bajar el tamaño del inóculo. Sin embargo no consideramos que, una vez iniciada una verdadera Aspergilosis Invasora, este modelo presente grandes ventajas sobre los tradicionales con conidias en medio líquido.

Este tipo de inoculación mediante bolas de Agar ha sido utilizado por otros autores en la consecución de modelos para el estudio de la patogenia de la Aspergilosis Invasora <sup>304</sup>.



Otra de estas aproximaciones es la infección de tan sólo uno de los pulmones del animal por vía respiratoria. Para ello se llevaba la cánula hasta el bronquio izquierdo de ratas, donde se depositaba el inóculo <sup>179,22</sup>. Sin embargo, los resultados obtenidos por dicho modelo no son demasiado buenos, ya que en inóculos de entre  $1 \times 10^4$  y  $5 \times 10^5$  conidias por animal provocaban entre el 90 y el 100% de mortandad en 12 días <sup>22 179</sup>. Las necropsias de estos animales evidencian la invasión de ambos pulmones, así como un alto porcentaje de diseminación, con evidencias de infección del hígado en la mitad de los animales inoculados <sup>22</sup>. En todo caso los autores de este modelo lo proponen como una buena forma de mimetizar la diseminación que se suele producir en pacientes humanos de un pulmón a otro, con la posibilidad de estudiar la evolución de la invasión en el pulmón no inoculado <sup>179</sup>.

Este tipo de inoculación localizada ha sido descrito en modelos animales en ratón, en las que se consigue una infección localizada en una zona muy concreta del pulmón. Sin embargo esta técnica ha sido utilizada únicamente en modelos de patógenos bacterianos, como *Moraxella catarrhalis* <sup>337</sup>.

El método de inoculación en el modelo transtorácico, inyectando el inóculo a través de la pared costal de los animales, evita la vía de entrada habitual del hongo en pacientes humanos. No consideramos que este hecho inhabilite en manera alguna el modelo y consideramos que las ventajas obtenidas con él justifican sobradamente evitar esta entrada por vía aérea del hongo. Además consideramos que la tradicional inoculación intratraqueal, mediante un inóculo contenido en medio acuoso administrado directamente en la tráquea, evitando por tanto el paso del hongo a través de las vías aéreas superiores, <sup>22,61,168,179,215,231,240,297</sup>, no creemos que pueda considerarse que mimetiza fielmente la vía de entrada mediante la que *A. fumigatus* llega al pulmón de pacientes humanos.

Teniendo en cuenta todo lo descrito y discutido anteriormente, proponemos este modelo de infección transtorácica como un método altamente válido en estudios tanto de patogenia, como de protección (mediante la administración de tratamientos) de la Aspergilosis Invasora.

### 3.3 Descripción general de las lesiones

#### a. Inoculación transtorácica:

Tras la inoculación, las lesiones se encuentran asociadas a las serosas (pleuras y pericardio). A partir de este punto las hifas penetran en el parénquima pulmonar, alcanzando los bronquios, siendo frecuente la diseminación a través de las vías aéreas a otras localizaciones del mismo pulmón o del otro. A partir del día 21 podemos encontrar lesiones en el parénquima pulmonar más recientes que las que se hallan asociadas a pleura y en localizaciones alejadas.

La diseminación hematogena a otras localidades distintas a la pulmonar resulta poco frecuente, y suele darse en animales sometidos a un estrés extra (animales transportados a radiología). En caso de producirse, las hifas suelen encontrarse formando trombos en pulmón y en túbulo, intersticio y pelvis renales y encéfalo.

Otro tipo de diseminación que puede darse es local, no pulmonar. Consiste en la diseminación a partir de las hifas contenidas en el nódulo asociado a pleura invadiendo, por contacto, pericardio y diafragma.

La evolución de las lesiones pulmonares está directamente relacionada con el estado de depleción linfocitaria en el bazo. En el caso de que exista escasa depleción de linfocitos en bazo la reacción inicial de los neutrófilos se ve respaldada por la aparición de macrófagos, linfocitos y células plasmáticas y formación de tejido de granulación, que terminarán por aislar las hifas y frenar su invasión y diseminación.

En cualquier caso esta inoculación proporciona una lesión asociada a parénquima que no suele desaparecer a pesar de la buena reacción que pueda existir en el bazo y que suele contener hifas hasta incluso el día 72 postinfección. Un aumento en el estrés del animal puede provocar la diseminación de dichas hifas.

Normalmente la inoculación provoca una importante lesión en el pulmón derecho, donde el inóculo queda depositado. Con el tiempo las hifas comienzan a invadir el tejido pulmonar y se produce una reacción inflamatoria celular. En ocasiones las lesiones muestran adherencias a pleuras o lesiones no tan bien delimitadas.

La evolución de estas lesiones puede ser hacia la cronificación de la inflamación sin salida de las hifas de la zona, asociada a una buena respuesta inflamatoria y buen estado linfocitario del bazo. La otra forma de evolución es hacia una invasión generalizada del tejido pulmonar con escasa respuesta inflamatoria y una seria depleción linfocitaria del bazo. No es frecuente la diseminación a otros órganos.

Las lesiones en hígado se componen de dos tipos de degeneraciones, glucogénica, achacable a la acción catabólica de la Dexametasona, o grasa, achacable a períodos de ayuno provocados por el mal estado de los animales (episodios de fiebre, debilidad, etc.)

b. Inoculación intratraqueal:

Tras la inoculación, las conidias presentes en los bronquiolos y alvéolos germinan y las hifas penetran en el tejido pulmonar, provocando una reacción intensa por parte de los neutrófilos. Tal y como sucedía en el caso anterior, la evolución de las lesiones pulmonares está directamente relacionada con el estado de depleción linfocitaria en el bazo.

A pesar de ello, y a partir del día 35, podemos encontrar en un mismo pulmón lesiones más o menos controladas con una buena respuesta inflamatoria, y otras en las que las hifas siguen avanzando y la respuesta inflamatoria es débil.

En ambos tipos de inoculaciones, en lo que se refiere a las lesiones en hígado podemos decir que se hallan dos tipos distintos de degeneraciones, glucogénica, achacable a la acción catabólica de la Dexametasona, o grasa, achacable a períodos de ayuno provocados por el mal estado de los animales.

Las lesiones en hígado, como en el caso de inoculación transtorácica, se componen de dos tipos de degeneraciones, glucogénica, achacable a la acción catabólica de la Dexametasona, o grasa, achacable a períodos de ayuno provocados por el mal estado de los animales.

### 3.4. Evaluación de métodos diagnósticos laboratoriales en Aspergilosis Invasora

Resulta dramático que el diagnóstico de las Aspergilosis Invasoras siga constituyendo hoy día una difícil tarea, ya que está demostrado que el retraso en el inicio de un tratamiento eficaz suele ser fatal para el desenlace de la enfermedad<sup>72,103,199,275,282,342,355</sup>.

La amplia variedad de pacientes que pueden sufrir esta enfermedad (pacientes con trasplante de médula ósea y otros órganos, aquellos que sufren neutropenia durante

más de dos semanas, pacientes con anemias, pacientes con enfermedad crónica granulomatosa, con SIDA, etc., ...), la ausencia de síntomas clínicos suficientemente específicos, y la inexistencia de un método laboratorial que confirme el diagnóstico de una manera suficientemente eficaz, son las causas de dicho problema <sup>71</sup>.

Tal y como sucede en pacientes humanos, los animales infectados en nuestros modelos, tanto de rata como de ratón, presentaron síntomas bastante inespecíficos. Encontramos animales caquéticos y anoréxicos tanto en los infectados como en los controles, y con síntomas que en ocasiones sólo se presentaban al ser manipulados los animales. Ocasionalmente encontramos algún animal con una ligera epistaxis y/o hemoptisis, no relacionados con la fase de inoculación, tal y como se describen en pacientes humanos en Aspergilosis Invasora <sup>71,176,300</sup>.

Sin duda alguna las Técnicas de Diagnóstico por Imagen constituyen una valiosa herramienta para el clínico para el diagnóstico de la AI. Así, en el caso de la TC (Tomografía Computerizada), se ha descrito una lesión en la que una necrosis hemorrágica rodeada de lesión fúngica resulta en una imagen de halo bastante característica de AI <sup>91,207,361 162 64</sup>.

En nuestro trabajo realizamos el seguimiento radiológico de unos animales infectados. A pesar de que logramos describir lesiones nodulares en algunos animales, el pequeño tamaño de nuestros pacientes hacen que esta técnica sea mucho menos útil que en pacientes humanos. En pacientes humanos, se utiliza la radiología tanto para el diagnóstico de Aspergilosis Invasora Pulmonar, en la que se suele describir una lesión nodular uni o bilateral junto a áreas de atelectasia, o en Aspergilosis Invasoras no pulmonares <sup>72,77,244,247 64,102,106,109,118,207,230,234</sup>.

Como ya hemos comentado anteriormente, no existe una técnica laboratorial de referencia que sea utilizada internacionalmente como confirmación del diagnóstico de Aspergilosis Invasora. Usualmente el clínico utiliza toda una batería de pruebas, síntomas, diagnóstico por imagen, historial clínico compatible y varias técnicas laboratoriales, para llegar a un diagnóstico final. Nuestra situación era justamente la contraria. Nosotros teníamos un grupo de animales sanos, no infectados y otro de animales infectados con *A. fumigatus*, en los que habíamos reproducido una Aspergilosis Invasora Pulmonar; además conocíamos el momento exacto en que se produjo dicha infección. Sin duda alguna esta situación resulta ideal para evaluar

algunos de los métodos más frecuentemente utilizados en el diagnóstico de Aspergilosis Invasora en humanos, tal y como ya han realizado otros autores basándose en otros modelos de Aspergilosis Invasora<sup>22,44,215,340</sup>

Decidimos utilizar como muestras a testar por estas técnicas el Lavado Broncoalveolar (LBA) y el suero. No utilizamos orina debido a que los animales solían descargar sus vejigas en las primeras manipulaciones que realizábamos sobre ellos.

Si bien es cierto que no en todos los pacientes inmunosuprimidos está indicada la realización de un LBA, se considera esta muestra mucho más interesante que el esputo<sup>39,309,345,355</sup>. Nosotros obtuvimos esta muestra únicamente en animales sacrificados.

El suero o el plasma constituyen, sin duda alguna, la muestra de más sencilla recolección en paciente vivo, útil para el diagnóstico de Aspergilosis Invasora<sup>38,259</sup>. Las muestras de sangre utilizadas en nuestros experimentos proceden tanto de animal vivo como recién sacrificado.

Los métodos diagnósticos que evaluamos y los protocolos laboratoriales que utilizamos han sido ampliamente descritos en el apartado de Materiales y Métodos de este trabajo. Con el fin de evaluar las pruebas diagnósticas utilizadas en este trabajo, decidimos agrupar los resultados por períodos de tiempo, de manera que pudiésemos trabajar con grupos de animales suficientemente grandes como para obtener resultados fiables. En el caso de algunas pruebas diagnósticas, nested PCR en suero y detección de galactomanano mediante Platelia Aspergillus Test® tanto para suero como para Lavado Bronco Alveolar (LBA), fue posible diferenciar 5 grupos, correspondientes a la primera, segunda, tercera, de la cuarta a la sexta y de la séptima a la décima semanas, respectivamente.

Sin embargo, para otras pruebas diagnósticas, decidimos que era más útil hacer un grupo con las tres primeras semanas, y otro de la cuarta a la décima semana (o bien a la sexta, si no se habían realizado estas pruebas más allá de dicha semana) con el fin de trabajar con un número de muestras amplio. De esta manera están tabulados los resultados obtenidos mediante PCR del LBA así como la detección de galactomanano mediante Pastorex® tanto en suero como en LBA, los cultivos de LBA en Rosa de Bengala y la detección de  $\beta$ -D-Glucano en suero.

La prueba diagnóstica confirmatoria es la histopatología, en caso de tenerla, o bien las lesiones macroscópicas compatibles apoyadas en el aislamiento del hongo a partir de troceado de pulmón. Las poblaciones de partida fueron, como positiva, la población de animales inoculados por las dos técnicas que hemos utilizado. La negativa se componía de animales control. Con el fin de confirmar si dichas poblaciones eran efectivamente positiva y negativa, realizábamos histopatología, descripción de lesiones y aislamiento a partir de troceado de pulmón. Las poblaciones de negativos fueron la de los animales no inoculados utilizados en los experimentos. En cuanto a las poblaciones positivas, consideramos enfermo todo animal inoculado por cualquiera de los métodos descritos, que presente lesiones compatibles con una Aspergilosis Invasora, demostradas mediante histopatología o bien del que podamos aislar *A. fumigatus* a partir del troceado del pulmón o bien a partir del material de la lesión.

Tabla 26: Detección de galactomanano en suero mediante el ELISA Platelia Aspergillus test® en Suero de ratas infectadas por el método transtorácico e intratraqueal y no infectadas (control)

	<b>Control</b>		<b>Transtorácico</b>		<b>Intratraqueal</b>	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Primera semana	0	11	23	5	13	11
Segunda semana	0	10	9	13	12	8
Tercera semana	2	5	11	8	10	4
4-6 semanas	1	16	11	18	7	19
7-10 semanas	0	5	7	5	4	4
<b>TOTAL</b>	<b>3</b>	<b>47</b>	<b>61</b>	<b>49</b>	<b>46</b>	<b>46</b>

Tabla 27: Detección de galactomanano en LBA mediante el ELISA Platelia Aspergillus test® en el Lavado Broncoalveolar de ratas infectadas por el método transtorácico e intratraqueal y no infectadas (control)

	<b>Control</b>		<b>Transtorácico</b>		<b>Intratraqueal</b>	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Primera semana	3	4	7	2	6	0
Segunda semana	0	2	3	7	6	1
Tercera semana	0	4	5	3	9	3
4-6 semanas	1	13	14	12	7	9
7-10 semanas	0	4	1	5	1	3
<b>TOTAL</b>	<b>4</b>	<b>27</b>	<b>30</b>	<b>29</b>	<b>29</b>	<b>16</b>

Tabla 28: Detección de ADN en suero de ratas infectadas por el método transtorácico e intratraqueal y no infectadas (control) mediante Nested PCR

	<b>Control</b>		<b>Transtorácico</b>		<b>Intratraqueal</b>	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Primera semana	2	12	12	16	15	12
Segunda semana	2	12	6	17	5	16
Tercera semana	2	7	3	15	4	7
4-6 semanas	1	18	9	25	14	21
7-10 semanas	3	5	6	6	8	4
<b>TOTAL</b>	<b>10</b>	<b>54</b>	<b>36</b>	<b>79</b>	<b>46</b>	<b>60</b>

Tabla 29: Detección de ADN en LBA mediante Nested PCR en LBA de ratas infectadas por el método transtorácico e intratraqueal y no infectadas (control).

	<b>Control</b>		<b>Transtorácico</b>		<b>Intratraqueal</b>	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
1 – 3 semanas	0	6	4	12	4	6
4 – 6 semanas	0	13	4	15	5	13
<b>TOTAL</b>	<b>0</b>	<b>19</b>	<b>8</b>	<b>27</b>	<b>9</b>	<b>19</b>

Tabla 30: Detección de Galactomanano en suero de ratas infectadas por el método transtorácico e intratraqueal y no infectadas (control) mediante Pastorex®

	<b>Control</b>		<b>Transtorácico</b>		<b>Intratraqueal</b>	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
1 – 3 semanas	0	3	0	10	2	3
4 – 6 semanas	0	12	2	15	2	14
<b>TOTAL</b>	<b>0</b>	<b>15</b>	<b>2</b>	<b>25</b>	<b>4</b>	<b>17</b>

Tabla 31: Detección de Galactomanano en LBA de ratas infectadas por el método transtorácico e intratraqueal y no infectadas (control) mediante Pastorex®

	<b>Control</b>		<b>Transtorácico</b>		<b>Intratraqueal</b>	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
1 – 3 semanas	0	6	8	7	9	3
4 – 6 semanas	0	12	7	12	2	14
<b>TOTAL</b>	<b>0</b>	<b>18</b>	<b>15</b>	<b>19</b>	<b>11</b>	<b>17</b>



Tabla 32: Detección de b-D-Glucano en suero de ratas infectadas por el método transtorácico e intratraqueal y no infectadas (control) mediante Fungitec®

	<b>Control</b>		<b>Transtorácico</b>		<b>Intratraqueal</b>	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
1 – 3 semanas	1	13	12	10	9	2
4 – 6 semanas	2	6	14	6	16	4
<b>TOTAL</b>	<b>3</b>	<b>19</b>	<b>26</b>	<b>16</b>	<b>25</b>	<b>6</b>

Tabla 33: Aislamiento de *A. fumigatus* a partir de LBA de ratas infectadas por el método transtorácico e intratraqueal y no infectadas (control)

	<b>Control</b>		<b>Transtorácico</b>		<b>Intratraqueal</b>	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
1 – 3 semanas	2	16	7	14	10	8
4 – 6 semanas	0	15	8	24	13	17
<b>TOTAL</b>	<b>2</b>	<b>31</b>	<b>15</b>	<b>38</b>	<b>23</b>	<b>25</b>

Uno de los métodos laboratoriales más ampliamente utilizados es el aislamiento del hongo a partir de LBA o esputo <sup>71,309,327,355</sup>. También se han descrito estudios de aislamientos en hemocultivos; sin embargo la mayor parte de estos se han dado en pacientes que sufren una Aspergilosis Diseminada, cuando el hongo entra directamente en torrente sanguíneo, en operaciones a corazón abierto o bien a través de catéteres <sup>75</sup>. La detección de antígenos o metabolitos procedentes del hongo en fluidos se ha propuesto como una posibilidad diagnóstica a la hora de realizar un diagnóstico temprano de la enfermedad <sup>174,176</sup>.

Algunos de estos antígenos, como el D-manitol o la quitina, han sido descartados bien por la inexistencia de una técnica de referencia o comercial, que facilite su medición en laboratorios de diagnóstico clínico, bien porque los pocos resultados obtenidos no son suficientemente buenos, normalmente por una gran inespecificidad para detectar hongos potencialmente patógenos <sup>101,182,242,271</sup>.

Quizás el método más utilizado en Europa sea la detección de Galactomanano (GM) mediante dos kits de diagnóstico, una aglutinación en Látex (Pastorex®) y un ELISA de tipo sándwich (Platelia Aspergillus test®), desarrollado más tarde buscando mejorar la detectabilidad de la aglutinación, lo que se traduce en una detección más precoz de la misma.<sup>15,130,146,176,196,215,282,317-320,340,350-353,375</sup>. Ambos métodos han sido evaluados por nosotros tanto en suero como en LBA de animales sanos e infectados.

Esta misma estrategia buscando antígenos circulantes procedentes del metabolismo fúngico, ha sido desarrollada por investigadores japoneses para la detección del  $\beta$  1-3 glucano. Esta molécula no es inmunogénica, tal como ocurría con el GM, con lo que el sistema de detección se basa en la activación de una cascada de coagulación proteolítica<sup>130,176,236,237,291,376,381</sup>. En nuestro trabajo hemos testado algunos sueros con esta técnica, pero la dificultad de adquirir estos kits en Europa, ha provocado que el número de muestras analizadas sea bajo, y nunca hayamos utilizado muestras de LBA.

Por último, nos planteamos la detección de ADN de *A. fumigatus* en fluidos circulantes, como una buena aproximación al diagnóstico. En este caso nos encontramos con una amplísima cantidad de técnicas descritas en la bibliografía, lo que dificultaba la elección de una de ellas para ser utilizada por nosotros. El primer parámetro que tuvimos en cuenta fue la especificidad de la técnica. Hallamos técnicas descritas tanto para la detección específica de *A. fumigatus*, como la de hongos del género *Aspergillus* o la de hongos de varios géneros, incluido *Aspergillus*. En nuestro caso, ya que habíamos inoculado nosotros mismos el hongo, nos interesaba utilizar una técnica bastante específica, ya que elegir una técnica que detectase hongos de otros géneros, únicamente nos llevaría a aumentar la inespecificidad en el diagnóstico.

En cuanto a la técnica en sí, se dispone de PCR, PCR anidada (o nested-PCR), PCR de competición y PCR en tiempo real o cuantitativa<sup>38-40,89,214,294,310,325,375,376</sup>. En nuestro caso, buscábamos una técnica de alta detectabilidad, que fuese capaz de amplificar cantidades muy pequeñas de ADN del hongo, con el fin de aumentar así la sensibilidad de la técnica y con ello la precocidad en el diagnóstico.

Elegimos la PCR anidada descrita por Yamakami *et al.* para la detección de hongos del género *Aspergillus*, capaz de amplificar cantidades de 50 picogramos de ADN en la primera amplificación, en la que obtenemos una banda de 384 pares de bases, y de hasta

50 ficogramos en la segunda, obteniendo una banda de 357 pb<sup>375,376</sup>. Consideramos que esta técnica reúne las dos cualidades que buscábamos en el diagnóstico. En ningún momento nos planteamos una PCR cuantitativa o en tiempo real debido a que no poseíamos la tecnología para su utilización en el momento de realizar este trabajo.

Utilizamos la PCR anidada o Nested PCR tanto en suero como en LBA.

La realización de las pruebas diagnósticas en las que utilizábamos el suero, conllevaba la obtención de una considerable cantidad de sangre, que no siempre era sencillo obtener en nuestras ratas, sobre todo si se obtenía de animales vivos. Por esta razón decidimos utilizar, en algunos casos, agujas heparinizadas, para evitar la coagulación de la sangre en las agujas. Sin embargo, en el caso de la detección de ADN, esta práctica resultó poco útil. Comprobamos cómo las muestras de sangre obtenidas de esta manera siempre resultaban negativas a la detección de ADN. Realizamos un pequeño experimento, descrito en el capítulo de materiales y método de este trabajo y cuyos resultados son, así mismo, descritos en el capítulo correspondiente. Mediante este experimento comprobamos que la presencia de heparina en el fluido que utilizamos como muestra a partir de la que pretendemos amplificar ADN, impide tal amplificación tal y como ha sido descrito en la bibliografía y publicado por nosotros<sup>43,104,366,380</sup>. A pesar de que han sido descritos métodos para revertir este efecto inhibitorio de la Heparina en la PCR<sup>262</sup>, nosotros no lo utilizamos con dichas muestras, ya que consideramos que teníamos suficiente cantidad de muestras no heparinizadas como para realizar este estudio.

El suero obtenido a partir de las muestras de sangre recogidas mediante agujas heparinizadas siempre ofreció resultados negativos en la detección de ADN mediante Nested-PCR.

Por ellos decidimos investigar la posible inhibición de dicha reacción de PCR.

Las muestras utilizadas en la reacción se prepararon de la siguiente manera. Se obtuvo sangre de dos ratas macho Sprague-Dawley mediante punción cardiaca. Dicha sangre fue rápidamente alicuoteada en cuatro tubos, de los que los tres primeros contenían Citrato sódico, EDTA tripotásico y Heparina (cada 1 mg corresponden a 100 UI) respectivamente, con el fin de obtener el plasma, quedando el último sin anticoagulante para la obtención de suero. Los tubos fueron centrifugados (3000 g 10'), a continuación

se alicuotearon 100µl de cada tipo de plasma o el suero, y a cada uno se le añadió 1 µl de una solución de ADN genómico (15mg/ml), de manera que en cada plasma y en el suero teníamos una concentración de 0'15 mg/ml.

La concentración de ADN inicial en la mezcla de PCR fue, en todos los casos, de 30 µg/ml (1'5 µg en los 50 µl de la reacción).

Las concentraciones de los distintos anticoagulantes, tanto en sangre como plasma y mezcla de PCR se detallan en la Tabla 25.

Tabla 25: Cantidades de anticoagulante presentes en las muestras.

<b>Anticoagulante</b>	<b>CITRATO SÓDICO</b>	<b>EDTA TRIPOTÁSICO</b>	<b>HEPARINA</b>	
	<b>(Molaridad)</b>	<b>(mg/ml)</b>	<b>mg/ml</b>	<b>UI/ml</b>
Concentración en Sangre	0'106	2	5	500
Concentración en Plasma *	0'2	4	10	1000
Concentración tras el tratamiento con Proteinasa K	0'1	2	5	500
Concentración en mezcla de PCR	0'02	0'4	1	100

Concentración de los distintos anticoagulantes en sangre, plasma y mezcla de PCR.

\* En la centrifugación de la sangre se obtuvieron valores de hematocrito próximos al 47%. Suponemos que la concentración en el plasma y en el plasma tratado con proteinasa K es la misma.

El ADN de las muestras fue extraído según el método utilizado por Tokimatsu *et al.* y ligeramente modificado por nosotros. En dicho método, 20 µl de las muestras son diluidas en 20 µl de un buffer que contiene 100mM de KCl, 20 mM de Tris-HCl (pH 8'3), 5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0'2 mg/ml de Gelatina y 0'9% de Polisorbato 20, al que se le añaden 60µg/ml de proteinasa K. Dicha mezcla es calentada a 55° C durante una hora, tras la que se procede a desactivar la proteinasa K a 95°C durante diez minutos. A continuación las muestras son centrifugadas (12.000 g 10 minutos) y el sobrenadante se

utiliza en la reacción de PCR.

La primera reacción de PCR se realizó a partir de 10  $\mu$ l de los plasmas tratados, en un volumen final de reacción de 50  $\mu$ l. La segunda reacción utiliza 1  $\mu$ l del resultado de esta primera.

Los productos de la Nested PCR fueron sometidos a electroforesis en un gel de Agarosa al 2%, que contenía bromuro de etidio, y los resultados fueron fotografiados (Figura 4)

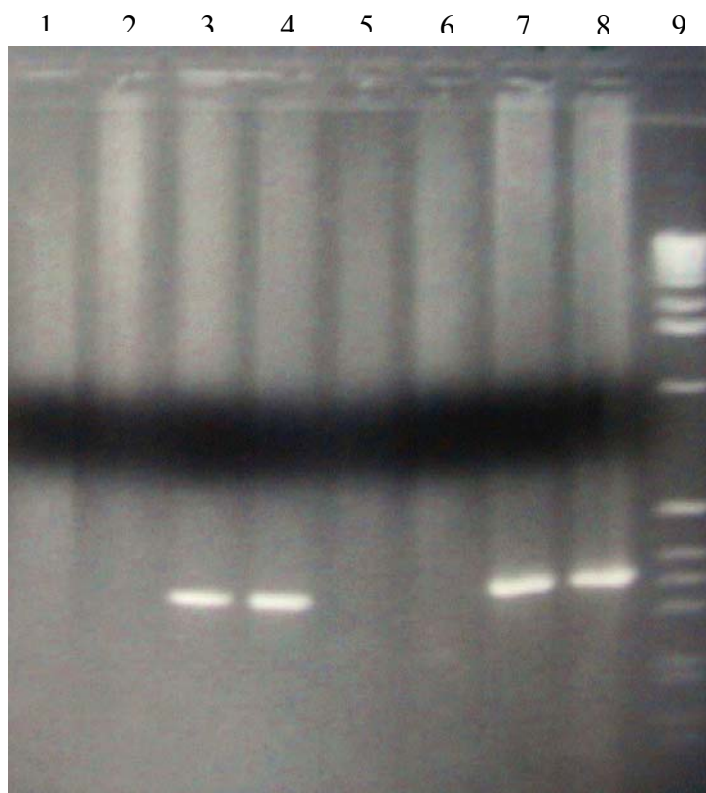


Figura 20: Electroforesis en gel de Agarosa 2% de muestras de ADN de *A. fumigatus* en sueros de dos ratas (A y B) conteniendo diferentes anticoagulantes:

1: Plasma de rata A, con Citrato; 2: Plasma de la rata B con Citrato; 3: Plasma de la rata A con EDTA, 4: Plasma de la rata B con EDTA; 5: Plasma de la rata A con Heparina; 6: Plasma de la rata B con heparina; 7: Suero de la rata A; 8: Suero de la rata B; 9: Patrón.

En la evaluación de estas pruebas diagnósticas teníamos unas muestras obtenidas a partir de animales infectados en diferentes modelos y en diferentes estados de la enfermedad.

Como ya hemos mencionado, contábamos de partida con dos poblaciones claramente diferenciadas, una infectada y otra no. A pesar de que nosotros mismos habíamos creado estas dos poblaciones por infección de los animales, decidimos utilizar alguna prueba diagnóstica confirmatoria tanto de la existencia como de la ausencia de infección. Así, la presencia de lesiones microscópicas compatibles con una Aspergilosis Invasora, con presencia de hifas, era la evidencia que utilizábamos para confirmar a los animales enfermos y la ausencia de las mismas, a los sanos. En caso de no realizarse el estudio histopatológico de los animales, también considerábamos positivos aquellos animales inoculados que presentaban lesiones macroscópicas compatibles con una Aspergilosis Invasora. En muchos de estos animales, además, obteníamos cultivos de LBA y/o de troceado de órganos positivos como pruebas confirmatorias adicionales de la ausencia o presencia de *A. fumigatus* en el pulmón de los animales.

Con este planteamiento obtuvimos los cuadros descritos en el apartado de Resultados de este trabajo, en las que, para cada prueba diagnóstica y según el número de muestras obtenidas y el momento en el que se obtuvieron, se expresan el número de positivos y negativos tanto en el grupo CONTROL, es decir, animales sanos, como en los grupos Transtorácico e Intratraqueal, compuestos por animales infectados con el método de infección homónimo.

Tal y como se puede observar en dichos cuadros, procuramos hacer una evaluación semanal de cada una de las pruebas diagnósticas. Agrupamos varias semanas cuando el número de muestras era bajo. En todos los casos realizamos una evaluación total de cada una de las pruebas diagnósticas en los experimentos realizados.

A partir de estas tablas y utilizando la Anatomía Patológica como prueba de referencia, resulta sencillo calcular la Sensibilidad, Especificidad, Valor predictivo Positivo y Valor predictivo Negativo de cada una de las pruebas tanto en los grupos de tiempo que hemos asignado a cada prueba, como al tiempo total, en suero y LBA.

Resulta obvio comentar que la especificidad de cada prueba ha sido calculada con respecto al grupo control. Sin embargo, la sensibilidad ha sido calculada con respecto a cada uno de los métodos de infección que hemos realizado, transtorácico e intratraqueal.

Los resultados se expresan en tanto por ciento obtenidos a partir de las siguientes fórmulas:

$$\text{SENSIBILIDAD DIAGNÓSTICA (Sen.)} = \text{VP}/(\text{VP}+\text{FN})$$

$$\text{ESPECIFICIDAD DIAGNÓSTICA (Esp.)} = \text{VN}/(\text{VN}+\text{FP})$$

$$\text{VALOR PREDICTIVO POSITIVO (Vp+):} \text{VP}/(\text{VP}+\text{FP})$$

$$\text{VALOR PREDICTIVO NEGATIVO (Vp-):} \text{VN}/(\text{VN}+\text{FN})$$

$$\text{PREVALENCIA:} \text{VP}+\text{FN}/\text{VP}+\text{FP}+\text{FN}+\text{VN}$$

Donde: VP = Verdaderos positivos VN = Verdaderos negativos FP = Falsos Positivos FN = Falsos Negativos TT = Modelo de infección Transtorácico IT = Modelo de infección Intratraqueal

Tabla 34: Sensibilidad y Especificidad para la detección de Galactomanano (GM) en suero y en LBA mediante el test ELISA Platelia Aspergillus test®

	En suero			En LBA		
	Esp.	Sen. TT	Sen. IT	Esp.	Sen. TT	Sen. IT
1 Semana	100	82	54	57	78	100
2 Semana	100	41	60	100	30	86
3 Semana	71	58	71	100	63	75
4-6 Semanas	94	38	27	93	54	44
7-10 Semanas	100	58	50	100	17	25
<b>TOTAL</b>	<b>94</b>	<b>55</b>	<b>50</b>	<b>87</b>	<b>51</b>	<b>64</b>

La tabla muestra cómo el ELISA comercial Platelia Aspergillus test® para la detección de GM presenta ciertos problemas de especificidad. La presencia de falsos negativos ha sido ampliamente descrita para esta técnica<sup>176 183</sup>. Los parámetros de sensibilidad no son aceptables en casi ningún caso, aunque es algo mejor en las primeras semanas de infección. Es posible que un nuevo cálculo de punto de corte, adaptado a estos modelos, mejorase este panorama, sin embargo, los resultados no demasiado buenos de

especificidad hacen pensar que esta mejora no sería extraordinaria. Si tenemos en cuenta tanto sensibilidad como especificidad, la sensación que obtenemos es que esta prueba difícilmente discierne entre la población infectada y no infectada de animales, independientemente del modelo de infección utilizado, tanto para suero como para LBA.

Tabla 35: Sensibilidad y Especificidad para la detección de ADN en suero y en LBA mediante Nested PCR

	En suero			En LBA		
	Esp.	Sen. TT	Sen. IT	Esp.	Sen. TT	Sen. IT
1 Semana	86	43	56			
2 Semana	86	26	24	100	25	40
3 Semana	78	17	36			
4-6 Semanas	95	26	40	100	21	28
7-10 Semanas	63	50	67	---	---	---
<b>TOTAL</b>	<b>84</b>	<b>31</b>	<b>43</b>	<b>100</b>	<b>23</b>	<b>32</b>

La especificidad de esta prueba es bastante aceptable, sobre todo para LBA, ya que no obtuvimos ningún falso positivo cuando trabajábamos con este tipo de muestra. La posibilidad de que los falsos positivos obtenidos en el suero se deban a posibles contaminaciones de muestras no nos parece demasiado lógica debido a las medidas de control que se tomaron durante todo el proceso de recogida, procesado y amplificación de dichas muestras. La sensibilidad es muy pobre en todos los casos. Parece que la capacidad de hallar ADN de *A. fumigatus* en los animales infectados con cualquiera de los modelos es paupérrima, aunque parece algo mejor para el modelo de infección intratraqueal. Resulta especialmente llamativo el 40% de sensibilidad durante las tres primeras semanas en el modelo intratraqueal para LBA. Hemos de tener en cuenta que los animales eran inoculados con conidias por vía respiratoria y que los lavados se realizaban sobre pulmón. Esto nos hace pensar en la posible presencia de inhibidores de la amplificación que pudiesen estar presentes en el LBA de los animales infectados y



que no fuimos capaces de eliminar en el procesado previo a la amplificación de las muestras.

Tabla 36: Sensibilidad y Especificidad para la detección de Galactomanano en suero y en LBA mediante Pastorex®

	En suero			En LBA		
	Esp.	Sen. TT	Sen. IT	Esp.	Sen. TT	Sen. IT
1-3 Semanas	100	0	40	100	53	75
4-6 Semanas	100	12	13	100	37	13
<b>TOTAL</b>	<b>100</b>	<b>7</b>	<b>19</b>	<b>100</b>	<b>44</b>	<b>39</b>

La detección de GM en suero y LBA mediante la aglutinación en látex Pastorex®, presenta una especificidad excelente. Los resultados de especificidad están en consonancia con lo descrito anteriormente<sup>130,196,340</sup>. Sin embargo, la sensibilidad de esta prueba es bastante mediocre en suero y LBA. Únicamente el 75% de sensibilidad en inoculados IT durante las tres primeras semanas tras la inoculación, es un resultado aceptable. El 53% de positivos en las mismas condiciones pero en inoculados intratraquealmente, nos parece así mismo lógico debido a la mayor accesibilidad al antígeno que cabría esperar en este modelo de infección respecto al transtorácico.

Tabla 37: Sensibilidad y Especificidad para la detección de  $\beta$ -D-Glucano en suero mediante Fungitec® y Cultivo en Rosa de Bengala de LBA

	Fungitec® En suero			Cultivo en LBA		
	Esp.	Sen. TT	Sen. IT	Esp.	Sen. TT	Sen. IT
1-3 Semanas	93	55	82	89	33	56
4-6 Semanas	75	70	80	100	25	43
<b>TOTAL</b>	<b>86</b>	<b>62</b>	<b>81</b>	<b>94</b>	<b>28</b>	<b>48</b>

El cultivo de LBA presenta una especificidad muy aceptable. De todas maneras hemos de tener en cuenta las especiales condiciones en las que se estabularon los animales en estos experimentos que hacían casi imposible la presencia de esporas ambientales de *A. fumigatus* en el tracto respiratorio, que se describe como posible causa de los falsos positivos en esta técnica con esta muestra <sup>176</sup>. La sensibilidad del cultivo es bastante mediocre en las condiciones estudiadas para ambos modelos.

La detección de  $\beta$ -D-Glucano en suero de animales infectados presenta buena especificidad sobre todo en las tres primeras semanas tras la inoculación. La sensibilidad es bastante aceptable en el modelo intratraqueal, siendo sensiblemente peor en el transtorácico.

Tabla 38: Valores predictivo positivo y negativo para la detección de Galactomanano en suero y en LBA mediante el test ELISA Platelia Aspergillus test®

	En suero				En LBA			
	Vp+TT	Vp+IT	Vp-TT	Vp-IT	Vp+TT	Vp+IT	Vp-TT	Vp-IT
1 Semana	100	100	69	50	70	67	67	100
2 Semana	100	100	43	56	100	100	22	67
3 Semana	85	83	38	56	100	100	57	57
4-6 Semanas	92	88	47	46	93	88	52	59
7-10 Semanas	100	100	50	56	100	100	44	57
<b>TOTAL</b>	<b>95</b>	<b>94</b>	<b>49</b>	<b>51</b>	<b>88</b>	<b>88</b>	<b>48</b>	<b>63</b>

La detección de Galactomanano mediante Platelia Aspergillus test® en suero de animales infectados por ambos modelos es del 100% durante las dos primeras semanas de vida. Esto quiere decir que esta técnica aplicada en los primeros momentos de la infección da una fiabilidad del 100% en sus positivos. Sin embargo los resultados negativos no tienen ningún valor diagnóstico, ya que son del 69% en el modelo transtorácico y del 50% en el intratraqueal. El valor predictivo de esta prueba en estas condiciones se mantiene en parámetros muy aceptables según avanza la infección. Así mismo, el valor predictivo negativo es siempre malo.

En el caso de utilizar LBA como muestra, el panorama se repite con excepciones. Ciertamente el valor predictivo positivo es bastante bueno durante todas las fases estudiadas, y el valor predictivo negativo bastante malo, salvo durante la primera semana en que es justo al contrario. No encontramos una explicación sencilla a este hecho. Quizá los animales en el momento de comenzar el experimento, podían portar algunas esporas en el tracto respiratorio que enmascarasen estos resultados.

Tabla 39: Valores predictivo positivo y negativo para la detección de ADN en suero y en LBA mediante Nested PCR

	En suero				En LBA			
	Vp+TT	Vp+IT	Vp-TT	Vp-IT	Vp+TT	Vp+IT	Vp-TT	Vp-IT
1 Semana	86	88	43	50				
2 Semana	75	71	41	43	100	100	33	50
3 Semana	60	67	32	50				
4-6 Semanas	90	93	42	46	100	100	46	50
7-10 Semanas	67	73	45	56	---	---	---	---
<b>TOTAL</b>	<b>78</b>	<b>82</b>	<b>41</b>	<b>47</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>41</b>	<b>50</b>

Tanto el valor predictivo positivo y negativo de la Nested PCR en suero en todas las etapas estudiadas no es bueno. Si bien es cierto que el valor predictivo positivo no es del todo desechable, en ambos modelos de infección, no pensamos que sea de utilidad en ningún caso con los valores que se indican. El valor predictivo negativo llega a ser pésimo, obteniendo resultados por debajo del 50%, es decir, que la prueba engaña más veces de las que dice la verdad, para nuestros modelos.

No ocurre lo mismo cuando utilizamos como muestra el LBA. En este caso el valor predictivo positivo para ambos modelos de infección es del 100%. Una vez más el valor predictivo negativo es pésimo. En todo caso consideramos que esta prueba podría ser un buen candidato a formar parte de un sistema diagnóstico compuesto por diferentes pruebas ya que tenemos la seguridad de que un positivo siempre corresponde con un infectado.

Tabla 40: Valores predictivo positivo y negativo para la detección de Galactomanano en suero y en LBA mediante el test Pastorex®

	En suero				En LBA			
	Vp+TT	Vp+IT	Vp-TT	Vp-IT	Vp+TT	Vp+IT	Vp-TT	Vp-IT
1-3 Semanas	100	100	23	50	100	100	46	67
4-6 Semanas	100	100	44	46	100	100	50	46
<b>TOTAL</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>38</b>	<b>47</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>49</b>	<b>51</b>

El valor predictivo de la detección de Galactomanano mediante Pastorex® es excelente en ambos modelos en los intervalos de tiempo estudiados tanto para suero como para LBA. Los valores predictivos negativos son bastante malos. La posibilidad de poseer una herramienta diagnóstica que asegure que un positivo corresponde a un infectado, resulta interesante, por ejemplo, a la hora de instaurar tratamientos. Además observamos cómo este buen valor predictivo positivo es válido para las primeras fases de la enfermedad.

Tabla 41: Valores predictivo positivo y negativo para la detección de b-D-Glucano en suero mediante Fungitec® y Cultivo en Rosa de Bengala de LBA

	<b>Fungitec®</b> En suero				<b>Cultivo</b> En LBA			
	Vp+TT	Vp+IT	Vp-TT	Vp-IT	Vp+TT	Vp+IT	Vp-TT	Vp-IT
1-3 Semanas	92	90	57	87	78	83	53	67
4-6 Semanas	88	89	50	60	100	100	38	47
<b>TOTAL</b>	<b>90</b>	<b>89</b>	<b>54</b>	<b>76</b>	<b>88</b>	<b>92</b>	<b>45</b>	<b>55</b>

Los valores predictivos positivos tanto para la detección de  $\beta$ -D-Glucano en suero como para cultivo en LBA son bastante aceptables en los intervalos estudiados. Una vez más los valores de valor predictivo negativo para ambas pruebas en las condiciones estudiadas, no son buenos, sobre todo en el intervalo de las 4 a las 6 semanas.

## DIAGNÓSTICO EN SUERO.

La detección de Galactomanano mediante Platelia Aspergillus test® en suero, contando con todas las muestras testadas, presenta una sensibilidad parecida en ambos modelos, rondando el 50%, y una especificidad del 94%.

El análisis de estos parámetros en cada uno de los grupos de tiempo post-infección que hemos establecido para esta prueba nos muestra que, en el modelo de infección transtorácico, la sensibilidad nunca es superior al 82%, valor que se da durante la primera semana de infección, que sin embargo baja hasta la mitad, 41%, en la siguiente semana, manteniendo valores similares en los otros intervalos que hemos establecido. Estos resultados, aparentemente, contrastan con los publicados en estudios con pacientes humanos, en los que la mayor concentración de GM coincide con las fases terminales de la enfermedad<sup>38,318,350,351</sup>.

En el caso de la infección intratraqueal la sensibilidad del Platelia® resulta baja y variable en los intervalos de infección que hemos establecido. Así varía de un 71 % en la tercera semana, bajando a un 27% durante las 4 a 6 semanas y subiendo hasta el 50% entre las 7 y 10 semanas. Esta gran variabilidad y la imposibilidad de determinar con ello un patrón lógico, puede ser explicada por los muy diferentes estados de la infección que hemos descrito en los animales infectados por este método. Como ya hemos mencionado, podemos encontrar animales en estado terminal en cualquiera de los intervalos descritos, y que suelen haber muerto en el siguiente, conviviendo con animales aparentemente sanos en estos mismos intervalos.

La detección de GM mediante Pastorex® en suero presenta una especificidad del 100%, no hay ningún animal no infectado que resulte positivo por este método. Sin embargo tampoco es capaz de encontrar ningún positivo entre los infectados mediante método transtorácico durante las tres primeras semanas y es tan sólo del 12% en las tres siguientes. Esta sensibilidad es mejor en el modelo de infección intratraqueal, siendo de un 40% en las tres primeras semanas, pero bajando hasta un 13% en las siguientes.

Sin duda alguna la menor detectabilidad del Pastorex® con respecto al Platelia®, ampliamente descrita en la bibliografía<sup>146,318,353</sup>, explica estos resultados. A pesar de ello existen modelos de infección de AIP en los que la detección de Galactomanano se realiza mediante Pastorex®, en los que se obtiene una sensibilidad para la prueba mucho mayor que la obtenida por nosotros<sup>130 340</sup>. Achacamos estas discrepancias a las diferencias en los modelos de infección realizados por los diferentes autores. Los

resultados de especificidad, sin embargo, son siempre superiores al 90% en los diferentes modelos <sup>130,340</sup>.

La detección de ADN en suero presenta un patrón similar al descrito para el Platelia: aceptable especificidad y baja sensibilidad a lo largo de los intervalos estudiados. En líneas generales, sensibilidad y especificidad son peores para PCR que para Platelia® en todos los intervalos estudiados.

Existen numerosas publicaciones en las que se utilizan técnicas de PCR para detectar ADN de *A. fumigatus* en suero o plasma de animales infectados por este hongo <sup>22,44,145,310,313</sup>, así como en pacientes humanos <sup>38,40,55,57,134,158,159,223,350,375,376</sup>.

Sin embargo comparar nuestros resultados con los obtenidos en otros modelos no siempre resulta sencillo debido a las diferentes técnicas PCR empleadas así como a los diferentes modelos en que se emplean. Esta misma falta de estandarización de las técnicas de PCR utilizadas en el diagnóstico de Aspergilosis, ha sido puesta de manifiesto por algunos autores como un grave problema a la hora de evaluar la utilidad de la misma en pacientes humanos <sup>4,55,68,223,269,313,347</sup>.

Así podemos encontrar modelos relativamente parecidos al nuestro, como el descrito por Becker *et al.*, <sup>22</sup>. Se trata de un modelo de Aspergilosis Invasora Pulmonar en ratas en las que infecta un solo pulmón, en el que describe una sensibilidad de su PCR en suero muy parecida a la nuestra ya que, en ningún caso supera el 41% en las dos semanas en que se desarrolla su modelo. El hecho de que utilicemos una PCR anidada justificaría una ligera mayor sensibilidad que hemos descrito para ambos modelos de infección. Este mismo autor, tal y como sucede en nuestro estudio, obtiene una sensibilidad del Platelia® superior a la de la PCR.

Einsele *et al.* <sup>89</sup>, por el contrario, describen una sensibilidad para la PCR utilizada por Becker, entre un 77 y un 100% en pacientes humanos con AIP. Este autor justifica esta gran sensibilidad por las mayores cantidades de muestra que pueden ser extraídas y utilizadas en pacientes humanos. Sin embargo el aumento de la cantidad de muestra no le sirve a Becker para encontrar más positivos, sino que al contrario, propone que un aumento en la cantidad de suero conlleva un aumento en la cantidad de inhibidores de PCR, aumentando los falsos negativos. Esta misma teoría fue apuntada posteriormente por otros autores como una de las posibles causas de la falta de sensibilidad de PCR anidada <sup>35</sup>.

El menor número de muestras testadas para la detección de  $\beta$ -D-Glucano mediante Fungitec® en suero, no nos permite realizar una buena comparativa de esta prueba con las ya descritas, sin embargo sí que podemos evaluar algunos puntos.

La especificidad de este método resulta mejor en fases iniciales de la infección. Nosotros achacamos este resultado a que los animales que han sufrido durante mucho tiempo un estado de inmunosupresión, pueden haber sufrido la proliferación de algunos microorganismos a los que la terapia antibiótica no ha afectado, como podrían ser ciertas levaduras. Esta molécula se halla presente en gran cantidad de hongos y levaduras<sup>176,217,218,292</sup>, lo que puede hacer disminuir la especificidad de su detección para el diagnóstico de una Aspergilosis.

La sensibilidad de Fungitec® parece aumentar en fases más tardías de la enfermedad, independientemente del método que hayamos utilizado para inocular los animales, lo que resulta compatible con los estudios en los que se ha descrito un aumento en la concentración del  $\beta$ -D Glucano en el medio de cultivo donde crece *A. fumigatus*<sup>217</sup>. Esto también ha sido descrito en otros modelos de infección<sup>215</sup>, en los que se describe un aumento en la cantidad de esta sustancia en suero de animales infectados, lo que aumenta la posibilidad de encontrar positivos.

La sensibilidad del Fungitec® resulta bastante peor en el modelo de infección transtorácica que en el intratraqueal, ya que en éste se supera el 80%. En el caso del modelo de infección intratorácica, los datos de sensibilidad que hemos obtenido para Fungitec®, son comparables con los obtenidos por Hasimoto *et al.*<sup>130</sup>, en su modelo de infección en ratas, que así mismo era un modelo más parecido al nuestro intranasal que al transtorácico.



Se ha descrito que los niveles de  $\beta$ -D Glucano en animales infectados aumentan de forma parecida a como lo hacen los de Galactomanano<sup>215</sup>, extremo que, a pesar de los escasos datos que tenemos nosotros, sí parecen apuntar nuestros resultados.

Tal y como sucede en los modelos de infección, la sensibilidad y especificidad de esta técnica en pacientes humanos varía bastante según los diferentes autores<sup>218,236,237,291</sup>.

## DIAGNÓSTICO EN LAVADO BRONCOALVEOLAR (LBA)

La detección de Galactomanano por Platelia® en LBA, tal y como ocurre en el caso del suero, presenta una especificidad muy alta. Si observamos los resultados en los intervalos de tiempo establecido, observamos especificidades que rondan el 100%. Si

observamos el resto de técnicas en las que hemos utilizado LBA, observamos también una altísima especificidad, que es del 100% en todos los intervalos estudiados tanto para PCR como para Pastorex®. Existen numerosos estudios realizados tanto en modelos animales como en pacientes humanos en los que se describen especificidades también próximas al 100% para diferentes técnicas de PCR <sup>214,294,310,83,138,266,303,332</sup> o incluso con la misma técnica que hemos utilizado nosotros <sup>376</sup>.

Esta alta especificidad de todas las técnicas de diagnóstico que hemos utilizado tiene su excepción durante la primera semana de infección para la detección de Galactomanano en LBA diante Platelia®, que es de un 57%. 

En animales infectados con *A. fumigatus*, tanto la capacidad de la PCR anidada para hallar ADN del hongo, como la del Pastorex® para hallar Galactomanano, son bastante escasas. Una vez más recurrimos a la escasa detectabilidad del Pastorex® para explicar estos resultados. Sin embargo en el caso de la PCR anidada esta explicación no es válida. Nuestra opinión al respecto es que pueden existir inhibidores de la PCR en el LBA que no somos capaces de eliminar en el proceso previo a la amplificación que realizamos con las muestras.

Esta baja sensibilidad que hemos obtenido para la PCR en LBA contrasta con los resultados obtenidos por otros autores <sup>36,83,138,140,294,303,309,327</sup>. Posiblemente la causa pueda ser la escasa accesibilidad al ADN del hongo que nuestro método de extracción nos haya proporcionado. De hecho los métodos descritos en la bibliografía para la obtención de muestras de ADN a partir de esporas resultan bastante más agresivos que los utilizados por nosotros sobre las muestras de LBA <sup>131,383</sup>.

Hemos de hacer notar que la sensibilidad de todas las pruebas diagnósticas cuando utilizamos LBA como muestra es mejor en los primeros estados de la infección y va empeorando según pasan las semanas. Es posible que a medida que el hongo crezca invadiendo tejidos, esta accesibilidad al ADN empeore.

La no presencia en el mercado de un kit para la detección de ADN de *A. fumigatus* hace que se hallan utilizado una gran diversidad de técnicas PCR y protocolos de obtención de ADN tanto de LBA como de suero, desarrolladas por diferentes autores. Esto hace que los resultados obtenidos sean difícilmente comparables. Los resultados tanto de sensibilidad como de especificidad de estas técnicas son sumamente dispares. En algunos casos se ha demostrado que esta disparidad se debe a la deficiente manipulación de las muestras o bien a fallos en los protocolos de extracción y amplificación <sup>40</sup>.



A la luz de nuestros resultados, consideramos que la evaluación de los modelos tanto intratraqueal como transtorácico, con las diferentes técnicas diagnósticas que hemos utilizado, no resulta excesivamente útil. Sin duda alguna la evaluación histológica de los tejidos afectados proporciona la información definitiva que permite evaluar el modelo. Como ya hemos mencionado anteriormente, quizá podría ser útil el reajuste del punto de corte de algunas de estas pruebas, tal y como han propuesto algunos autores en pruebas realizadas con pacientes humanos para pruebas de detección de galactomanano y  $\beta$ -D Glucano<sup>142 238</sup> o bien un profundo estudio de diferentes condiciones de procesado de las muestras para la Nested-PCR, con el fin de optimizarlas y adecuarlas a la evaluación de estos modelos.

## E. CONCLUSIONES



**PRIMERA:** Los perfiles antigénicos de *Aspergillus fumigatus* varían según el substrato en que crezca el hongo, lo que no es óbice para que presenten reacciones cruzadas cuando se emplea suero hiperinmune anti-*Aspergillus*.

**SEGUNDA:** Cuando *A. fumigatus* crece en un cultivo celular de pneumocitos de rata sus características morfológicas difieren de las obtenidas cuando crece en medios de cultivo, presentando algunas características similares al crecimiento del hongo in vivo, tal y como se puede observar en los cortes histológicos de tejidos.

**TERCERA:** Los modelos intranasal e intratraqueal de aspergilosis en ratón conllevan la infección de ambos pulmones, lo que se traduce en una enfermedad de curso rápido, con una severa disminución de la capacidad pulmonar, que suele provocar la muerte. Estos modelos podrían resultar válidos en la evaluación de fármacos antifúngicos, aun cuando no mimetizan la enfermedad que se produce en humanos.

**CUARTA:** El modelo de aspergilosis pulmonar por inoculación transtorácica en rata reproduce las características de la infección en humanos, permitiendo la supervivencia de los animales durante un largo período de tiempo. Proponemos este modelo como una herramienta útil en el estudio de la patogenia de la aspergilosis pulmonar, así como en la evaluación de fármacos antifúngicos y desarrollo de métodos diagnósticos.

**QUINTA:** Los sistemas de detección de antígenos y ADN de *A. fumigatus* en suero y lavado broncoalveolar constituyen una prometedora vía para el diagnóstico precoz de la enfermedad. Sin embargo será preciso su conjunción con situaciones de riesgo, variables clínicas y posibilidad de toma de muestras seriadas, para alcanzar una aplicación rutinaria a este tipo de procesos.

**SEXTA:** No resulta recomendable la utilización de plasma, en vez de suero, para llevar a cabo el diagnóstico de aspergilosis por PCR, por cuanto que pudiera existir un efecto inhibidor de la amplificación del ADN debido a la acción de los anticoagulantes.

**SÉPTIMA:** Todas las lesiones macroscópicas y microscópicas descritas en los animales infectados con *Aspergillus fumigatus* resultaban compatibles con una aspergilosis invasora, ayudada por el estado de inmunosupresión al que eran sometidos.

## F. BIBLIOGRAFÍA



1. Abe,F., Katoh,T., Kaneko,T. & Hotchi,M. Effects of endotoxin (lipopolysaccharides) on experimental aspergillosis in leukemic mice. *Mycopathologia* **99**, 95-97 (1987).
2. Addrizzo-Harris,D.J., Harkin,T.J., McGuinness, Naidich,D.P. & Rom,W.N. Pulmonary aspergilloma and AIDS. A comparison of HIV-infected and HIV-negative individuals. *Chest* **111**, 612-618 (1997).
3. Ainsworth,C. & Austwick,P. *Micosis de los animales de compañía*. Editorial Academia. León, España. (1973).
4. Alexander,B.D. Diagnosis of fungal infection: new technologies for the mycology laboratory. *Transplant Infectious Diseases*. **4 Suppl 3**, 32-37 (2002).
5. Alexopoulos,C. *Introducción a la Micología*. Barcelona; España (1985).
6. Allen,M.J., Harbeck,R., Smith,B., Voelker,D.R. & Mason,R.J. Binding of rat and human surfactant proteins A and D to *Aspergillus fumigatus* conidia. *Infection & Immunity* **67**, 4563-4569 (1999).
7. Allen,S.D., Sorensen,K.N., Nejdil,M.J., Durrant,C. & Proffit,R.T. Prophylactic efficacy of aerosolized liposomal (AmBisome) and non-liposomal (Fungizone) amphotericin B in murine pulmonary aspergillosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **34**, 1001-1013 (1994).
8. Allende,C; Lee,JW; Garret,K; Dollenberg,H; Berenguer,J; Lyman,C; Pizzo,PA; Walsh,TJ. Dose-Dependent Antifungal Activity and Nephrotoxicity of Amphotericin B Colloidal Dispersion in Experimental Pulmonary Aspergillosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **38**, 518-522 (1994).
9. Allendoerfer,R., Loerbenberg,D., Rinaldi,M. & Graybill,J. Evaluation of SCH51048 in an Experimental Model of Pulmonary Aspergillosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **39**, 1354-1348 (1995).
10. Allendoerfer,R.; Yates,R.R.; Marquis,A.J.; Loebenberg,D.; Rinaldi,M.G.; Graybill,J.R.. Comparison of SCH 39304 and its isomers, RR 42427 and SS 42426, for Treatment of murine cryptococcal and coccidioidal meningitis. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy* **36**, 217-219 (1992).
11. Amitani,R. *et al.* Purification and characterization of factors produced by *Aspergillus fumigatus* which affect human ciliated respiratory epithelium. *Infection & Immunity* **63**, 3266-3271 (1995).
12. Anaissie,E.J.; Mattiuzzi,G.N.; Miller,C.B.; Noskin,G.A.; Gurwith; MJ; Mamelok,R.D.; Pietrelli,L.A.. Treatment of invasive fungal infections in renally impaired patients with



- Amphotericin B colloidal dispersion. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy* **42**, 606-611 (1998).
13. Andriole, V.T. Current and future antifungal therapy: new targets for antifungal agents. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **44**, 151-162 (1999).
  14. Andriole, V. Infections with *Aspergillus* Species. *Clinical Infectious Diseases* **17**, S481-S486 (1993).
  15. Arrese, J., Delvenne, P., Van Cutsem, J., Franchimont, G. & Pierard, G. Experimental aspergillosis in guinea pigs: influence of itraconazole on fungaemia and invasive fungal growth. *MYCOSES* **37**, 117-122 (1994).
  16. Arvanitidou, M., Kanellou, K., Constantinides, T.C. & Katsouyannopoulos, V. The occurrence of fungi in hospital and community potable waters. *Letters in Applied Microbiology* **29**, 81-84 (1999).
  17. Austwick, P. & Sebesteny, A. Apparently spontaneous *Candida tropicalis* infection of a mouse. *Laboratory Animals* **8**, 133-136 (1974).
  18. Azzola, A.; Passweg, J.R.; Habicht, J.M.; Bubendorf, L.; Tamm, M.; Gratwohl, A.; Eich, G. Use of lung resection and voriconazole for successful treatment of invasive pulmonary *Aspergillus ustus* infection. *Journal of Clinical Microbiology*. **42**, 4805-4808 (2004).
  19. Bart-Delabesse, E., Marmorat-Khuong, A., Costa, J.M., Dubreuil-Lemaire, M.L. & Bretagne, S. Detection of *Aspergillus* DNA in bronchoalveolar lavage fluid of AIDS patients by the polymerase chain reaction [letter]. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* **16**, 24-25 (1997).
  20. Bartizal, K. Gill, C.J.; Abruzzo, G.K.; Flattery, A.M.; Kong, L.; Scott, P.M.; Smith, J.G.; Leighton, C.E.; Bouffad, A.; Dropinski, J.F.; Balkovec, J. *In vitro* preclinical pvaluation studies with the echinocandin antifungal MK-0991 ( L-743,872 ). *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*. **41**, 2326-2331 (1997).
  21. Bava, A.J. & Negroni, R. Comparative study of six antifungal treatments in an experimental model of murine cryptococcosis. *European Journal of Epidemiology* **8**, 422-426 (1992).
  22. Becker, M.J., de Marie, S., Willemse, D., Verbrugh, H.A. & Bakker-Woudenberg, I.A. Quantitative galactomannan detection is superior to PCR in diagnosing and monitoring invasive pulmonary aspergillosis in an experimental rat model. *Journal of Clinical Microbiology* **38**, 1434-1438 (2000).
  23. Bennett, J.E. Enfermedades infecciosas y sus agentes etiológicos. Cap. 236 Especies de *Aspergillus* pp. 2072-2075 (1988) Ed. Médica Panamericana.
  24. Berenguer, J.; Ali, N.M.; Allende, C.M.; Lee, J.; Garret, K.; Battaglia, S.; Psicitelli, S.C.; Rinaldi, M.G.; Pizzo, P.A.; Walsh, T.J. Itraconazole for Experimental Pulmonary

- Aspergillosis: Comparison with Amphotericin B, Interaction with Cyclosporin A, and correlation between therapeutic response and itraconazole concentrations in plasma. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **38**, 1303-1308 (1994).
25. Berenguer, J. Allende, C.M.; Lee, J.W.; Garret, K.; Lyman, C.; Ali, N.M.; Bacher, J.; Pizzo, P.A.; Walsh, T.J. Pathogenesis of Pulmonary Aspergillosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **152**, 1079-1086 (1995).
  26. Bernard, A.; Caillot, D.; Benoit, L.; Cassanovas, O.; Couaillier, J.; Favre, J.P. Aspergillose Invasive et chirurgie. *Journal of Mycology Medicine* **9**, 97-102 (1999).
  27. Bertout, S.; Bastide, J.M.; De Meeus, T.; Piens, M.A.; Lebeau, B.; Viviani, M.A.; Mallie, M.; Multilocus enzyme electrophoresis analysis of *Aspergillus fumigatus* strains isolated from the first clinical sample from patients with invasive aspergillosis. *Journal of Medical Microbiology* **49**, 375-381 (2000).
  28. Beuchat, L.R., Chmielewski, R., Keswani, J., Law, S.E. & Frank, J.F. Inactivation of aflatoxigenic *Aspergilli* by treatment with ozone. *Letters in Applied Microbiology* **29**, 202-205 (1999).
  29. Beyer, J. Barzen, G.; Risse, G.; Weyer, C.; Miksits, K.; Dullenkopf, K.; Huhn, D.; Siergert, W. Aerosol Amphotericin B for Prevention of Invasive Pulmonary Aspergillosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **37**, 1367-1369 (1993).
  30. Blanco, J.L. Hontecillas, R.; Bouza, E.; Blanco, I.; Pelaez, T.; Munoz, P.; Perez, Molina J.; Garcia, M.E. Correlation between the elastase activity index and invasiveness of clinical isolates of *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Clinical Microbiology*. **40**, 1811-1813 (2002).
  31. Blanco, J., Guedeja-Marrón, J., Caballero, J. & García, M. Aspergilosis: mecanismos de patogenicidad implicados y aproximación al diagnóstico de laboratorio. *Revista Iberoamericana de Micología* **15**, 10-15 (1998).
  32. Bohme, A., Karthaus, M. & Hoelzer, D. Antifungal prophylaxis in neutropenic patients with hematologic malignancies: Is there a real benefit? *Chemotherapy* **45**, 224-232 (1999).
  33. Bouchara, J., Tronchin, G. & Chabasse, D. Mecanismos et implications des phénomènes d'adhérence chez *Aspergillus fumigatus*. *Pathologie biologique* **42**, 640-646 (1994).
  34. Bouchara, J., Tronchin, G., Larcher, G. & Chabasse, D. The search for virulence determinants in *Aspergillus fumigatus*. *Trends in Microbiology* **3**, 327-330 (1995).
  35. Bounoux, M.-E. Dupont, C.; Mateo, J.; Saulnier, P.; Faivre, V.; Payen, D.; Nicholas-Chanoine, M.-H. Serum is more Suitable than whole blood for diagnosis of systemic candidiasis by nested PCR. *Journal of Clinical Microbiology* **37**, 925-930 (1999).

36. Boyd,A.E.; Modi,S.; Howard,S.J.; Moore,C.B.; Keevil,B.G.; Denning,D.W.; Adverse reactions to voriconazole. *Clinical of Infectious Diseases*. **39**, 1241-1244 (2004).
37. Brenier-Pinchart,M. Pelloux,H; Lebeau,B; Pinel,C; Ambroise-Thomas,P; Grillot,R Towards a molecular diagnosis of invasive aspergillosis? *Journal of Mycology Medicine*. **9**, 16-23 (1999).
38. Bretagne,S. Costa,J-M; Bart-Delabesse,E; Dhédin,N; Rieux,C; Cordonnier,C Comparasion of serum galactomannan antigen detection and comparative polymerase chain reaction for diagnosing Invasive Aspergillosis. *Clinical Infectious Diseases* **26**, 1407-1412 (1998).
39. Bretagne,S. Costa,J-M; Marmorat-Khuong,A.; Poron,F; Cordonnier,C; Vidaud,M; Fleury-Feith, A. Detection of *Aspergillus* Species DNA in bronchoalveolar lavage samples by competitive PCR. *Journal of Clinical Microbiology* **33**, 1164-1168 (1995).
40. Bretagne,S. Molecular diagnostics in clinical parasitology and mycology: limits of the current polymerase chain reaction (PCR) assays and interest of the real-time PCR assays. *Clinical of Microbiology and Infection*. **9**, 505-511 (2003).
41. Bromley,I.M. & Donaldson,K. Binding of *Aspergillus fumigatus* spores to lung epithelial cells and basement membrane proteins: relevance to the asthmatic lung. *Thorax* **51**, 1203-1209 (1996).
42. Caballero,J. Aspergilosis canina. Aproximación al diagnóstico inmunológico. 1997. Memoria de Licenciatura. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid.
43. Caballero,J. Blanco,J.L.; García,ME; Horcajada,R; Ferrer,S; Gargallo-Viola,D.. Efecto de diferentes anticoagulantes sobre la efectividad de una técnica PCR aplicada al diagnóstico de Aspergilosis Invasora. 2000. V Congreso Nacional de Micología. Cáceres. España.
44. Caballero,J. Martinez,A; García,ME; Horcajada,R; Blanco,JL; Gargallo-Viola,D. Galactomannan and *Aspergillus*-DNA Detection in experimental invasive pulmonary Aspergillosis in rats. 2000. 40th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC). Toronto (Canada).
45. Cacciapuoti,A. *et al.* Comparison of SCH 39304, Fluconazole, and Ketoconazole for treatment of systemic infections in mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **36**, 64-67 (1992).
46. Caillot,D. Casanovas,O; Bernard,A; Coualier,Jf; Durand,C; Cuisenier,B; Solary,E; Piard,F; Petrella,T; Bonnin,A; Couillault,G; Dumas,M; Guy,H. Improved management of invasive pulmonary Aspergillosis in neutropenic patients using early thoracic computed tomographic scan and surgery. *Journal of Clinical Oncology* **15**, 139-147 (1997).

47. Callister,M.E. Griffiths,M.J.; Nicholson,A.G.; Leonard,A.; Johnson,E.M.; Polkey,M.I.; Kerr,J.R. A fatal case of disseminated aspergillosis caused by a non-sporulating strain of *Aspergillus fumigatus*. *Journal of CLinical Pathology* **57**, 991-992 (2004).
48. Calvo,V. Borro,J.M.; Morales,P.; Morcillo,A.; Vicente,R.; Tarrazona,V.; Paris,F. Antifungal prophylaxis during the early postoperative period of lung transplantation. *Chest* **115**, 1301-1304 (1999).
49. Cambron,H., Latulippe,J.F., Nguyen,T. & Cartier,R. Orotracheal intubation of rats by transillumination. *Laboratory Animal Science* **45**, 303-304 (1995).
50. Carson,F.L., Fredenburgh,J. & Maxwell,J.E. Inconsistent detection of *Histoplasma capsulatum* with periodic acid oxidation in the Grocott methenamine-silver nitrate (CMS) fungus stain. *Journal of Histotechnology* **22**, 119-122 (1999).
51. Cenci,E. Perito,S.; Enssle,K.H.; Mosci,P.; Latge,J.P.; Romani; Bistoni,F. Th1 and Th2 cytokines in mice with invasive aspergillosis. *Infection & Immunity* **65**, 564-570 (1997).
52. Chandrasekar,P.H., Cutright,J.L. & Manavathu,E.K. Efficacy of voriconazole plus amphotericin B or micafungin in a guinea-pig model of invasive pulmonary aspergillosis. *Clinical of Microbiology and Infection*. **10**, 925-928 (2004).
53. Chauvin,M. Aspergillosis: advances in immunological diagnosis and therapeutic measures. *Nouveau Revu de Hématologie* **35**, 9-11 (1993).
54. Chazalet,V. Debeaupuis,J.P.; Sarfati,J.; Lortholary,J.; Ribaud,P.; Shah,P.; Cornet,M.; Vu,Thien H.; Gluckman,E.; Brucker,G.; Latge; JP. Molecular typing of environmental and patient isolates of *Aspergillus fumigatus* from various hospital settings. *Journal of Clinical Microbiology* **36**, 1494-1500 (1998).
55. Chen,S.C., Halliday,C.L. & Meyer,W. A review of nucleic acid-based diagnostic tests for systemic Mycoses with an emphasis on polymerase chain reaction-based assays. *Medical Mycology* **40**, 333-357 (2002).
56. Cheymol,G. & Poirier,J.M. [Prevention of aspergillosis with itraconazole in neutropenic patients: importance of drug monitoring]. *Bulletin de l Academie Nationale de Medecine* **183**, 371-380 (1999).
57. Chopra,R. AmBisome in the treatment of fungal infections: the UK experience. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **49 Suppl 1**, 43-47 (2002).
58. Christin,L. Christin,L.; Wysong,D.R.; Meshulam,T.; Haste,R.; Simons,E.R.; Diamond,R.D. Human platelets damage *Aspergillus fumigatus* hyphae and may supplement killing by neutrophils. *Infection & Immunity* **66**, 1181-1189 (1998).
59. Chryssanthou,E. & Sjolín,J. Post-antifungal effect of Amphotericin B and Voriconazole against *Aspergillus fumigatus* analysed by an automated method based on fungal CO<sub>2</sub>

- production: dependence on exposure time and drug concentration. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2004).
60. Chumpitazi,B.F.F.; Pinel,C., Lebeau,B., Ambroise-Thomas,P. & Grillot,R. *Aspergillus fumigatus* antigen detection in sera from patients at risk for invasive aspergillosis. *Journal of Clinical Microbiology* **38**, 438-443 (2000).
  61. Cicogna,C.E.; White,M.H.; Bernard,E.M.; Ishimura,T.; Sun,M.; Tong,W.P.; Armstrong,D. Efficacy of prophylactic aerosol amphotericin B lipid complex in a rat model of pulmonary aspergillosis. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy* **41**, 259-261 (1997).
  62. Clemons,K.V. Calich,V.L.; Burger,E.; Filler,S.G.; Graziutti,M.; Murphy,J.; Roilides,E.; Campa,A.; Dias,M.R.; Edwards,J.E.,Jr.; Fu,Y.; Fernandes-Bordignon,G.; Ibrahim,A.; Katsifa,H.; Lamaignere,C.G.; Meloni-Bruneri,L.H.; Rex,J.; Savary,C.A.; Xidieh,C. Pathogenesis I: interactions of host cells and fungi. *Medical Mycology* **38 Suppl 1**, 99-111 (2000).
  63. Cohen,J. Fungal Infection in the compromised patient. Warnock,D.W. & Richardson,M. (eds.), pp. 153-190 West Sussex, England,1991).
  64. Collins,J. CT signs and patterns of lung disease. *Radiol. Clin. North American***39**, 1115-1135 (2001).
  65. Cornet,M. Levy,V; Fleury,L; Lortholary,J; Barquins S; Coureul M-H; Deliere,E; Zittoun R; Brucker,G; Bouvet,A. Efficacy of prevention by high-efficiency particulate air filtration or laminar airflow against *Aspergillus* airborne contamination during hospital renovation. *Infection Control And Hospital Epidemiology* **20**, 508-513 (1999).
  66. Croft,J. & Varga,J. The genus *Aspergillus* from taxonomy and genetics to industrial application. Powell,K., Renwick,A. & Peberdy,J. (eds.), pp. 277-289 (Plenum Press, London, United Kindom, 1994).
  67. Dannaoui,E., Borel,E., Persat,F., Monier,M.F. & Piens,M.A. In-vivo itraconazole resistance of *Aspergillus fumigatus* in systemic murine aspergillosis. *Journal of Medical Microbiology* **48**, 1087-1093 (1999).
  68. de Marie,S. New developments in the diagnosis and management of invasive fungal infections. *Haematologica* **85**, 88-93 (2000).
  69. de Repentigny,L., Kilanowski,E., Pedneault,L. & Boushira,M. Immunoblot analyses of the serologic response to *Aspergillus fumigatus* antigens in experimental invasive Aspergillosis. *The journal of infectious diseases* **163**, 1305-1311 (1991).
  70. Debeaupuis,J.P., Sarfati,J., Chazalet,V. & Latge,J.P. Genetic diversity among clinical and environmental isolates of *Aspergillus fumigatus*. *Infection & Immunity* **65**, 3080-3085 (1997).

71. Denning,D.W. Invasive Aspergillosis. *Clinical Infectious Diseases* **26**, 781-803 (1998).
72. Denning,D.W. Early diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet* **355**, 2076 (1994).
73. Denning,D.W. Chronic forms of pulmonary aspergillosis. *Clinical of Microbiology and Infection*. **7 Suppl 2**, 25-31 (2001).
74. Denning,D.W. Aspergillosis in "nonimmunocompromised" critically ill patients. *American Journal of Respiratory Critical Care Medicine*. **170**, 580-581 (2004).
75. Denning,D.W. & Duthie,R. *Aspergillus* Fungemia: Report of two cases and review. *Clinical Infectious Diseases* **20**, 598-605 (1995).
76. Denning,D.W., Hall,L., Jackson,M. & Hollis,S. Efficacy of D0870 Compared with Those of Itraconazole and Amphotericin B in Two Murine Models of Invasive Aspergillosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **39**, 1809-1814 (1995).
77. Denning,D.W. Radford,SA; Oakley,KL; Hall,L; Johnson,EM; Warnock,DW Trial of Oral Itraconazole therapy for invasive aspergillosis. *American Journal of Medicine* **97**, 135-144 (1994).
78. Denning,D.W.; Radford,SA; Oakley,KL; Hall,L; Johnson,EM; Warnock,DW. Correlation between in-vitro susceptibility testing to itraconazole and in-vivo outcome of *Aspergillus fumigatus* infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **40**, 401-414 (1997).
79. Denning,D.W. & Stevens,D. Efficacy of cilofungin alone and in combination with Amphotericin B in a murine model of disseminated aspergillosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **37**, 1329-1333 (1991).
80. Denning,D.W. & Warn,P. Dose range evaluation of liposomal Nystatin and comparisons with Amphotericin B and Amphotericin B lipid complex in temporarily neutropenic mice infected with an isolate of *Aspergillus fumigatus* with reduced susceptibility to Amphotericin B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**, 2592-2599 (1999).
81. Diaz-Guerra,T.M.; Mellado,E.; Cuenca-Estrella,M.; Gaztelurrutia,L.; Navarro,J.I.V.; Tudela, J.L.R. Genetic similarity among one *Aspergillus flavus* strain isolated from a patient who underwent heart surgery and two environmental strains obtained from the operating room. *Journal of Clinical Microbiology* **38**, 2419-2422 (2000).
82. Dixon,D.M., Polak,A. & Walsh,T.J. Fungus dose-dependent primary pulmonary aspergillosis in immunosuppressed mice. *Infectious Immunity*. **57**, 1452-1456 (1989).
83. Dolan,C.K., Hall,M.A., Blazes,D.L. & Norwood,C.W. Pseudoporphyria as a result of voriconazole use: a case report. *Int. J. Dermatol.* **43**, 768-771 (2004).

84. Dupont,B., Huber,M., Kim,S.J. & Bennett,J.E. Galactomannan antigenemia and antigenuria in aspergillosis: studies in patients and experimentally infected rabbits. *Journal of Infectious Diseases* **155**, 1-11 (1987).
85. Edwards,M.R.; Salazar,M.E.; Samsonoff,W.A.; Cano,L.E.; Ostrander,G.A.; Restrepo,A.. Electron microscopic study of conidia produced by the mycelium of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycopathologia* **114**, 169-177 (1991).
86. Ehrenfreund-Kleinman,T.; Samsonoff,W.A.; Cano,L.E.; Ostrander,G.A.; Restrepo,A.. Synthesis and characterization of novel water soluble Amphotericin B-arabinogalactan conjugates. *Biomaterials* **23**, 1327-1335 (2002).
87. Ehrenfreund-Kleinman,T., Golenser,J. & Domb,A.J. Conjugation of amino-containing drugs to polysaccharides by tosylation: amphotericin B-arabinogalactan conjugates. *Biomaterials* **25**, 3049-3057 (2004).
88. Eichner,R., Al Samali,M., Wood,P. & Müllbacher, A. The effect of gliotoxin upon macrophage function. *International society for immunopharmacology* **8**, 789-797 (1986).
89. Einsele,H.; Hebart,H.; Roller,G.; Löffler,J.; Rothenhofer,I.; Muller,C.A.; Bowden,R.A.; van Burik,J.; Engelhard,D.; Kanz,L.; Schumacher,U.. Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. *Journal of Clinical Microbiology* **35**, 1353-1360 (1997).
90. Eisenstein,D.J., Biddinger,P.W. & Rhodes,J.C. Experimental murine invasive pulmonary aspergillosis. *American Journal of Clinical Pathology* **93**, 510-515 (1990).
91. Erdogan,E., Beyzadeoglu,M., Arpaci,F. & Celasun,B. Cerebellar aspergillosis: case report and literature review. *Neurosurgery* **50**, 874-876 (2002).
92. Esnault,K., el Moudni,B., Bouchara,J.P., Chabasse,D. & Tronchin,G. Association of a myosin immunoanalogue with cell envelopes of *Aspergillus fumigatus* conidia and its participation in swelling and germination. *Infection & Immunity* **67**, 1238-1244 (1999).
93. Espinel-Ingroff,A. & Shadomy,S. In vitro and in vivo evaluation of antifungal agents. *European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases* **8**, 352-361 (1989).
94. Falk,R., Domb,A.J. & Polacheck,I. A novel injectable water-soluble amphotericin B-arabinogalactan conjugate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**, 1975-1981 (1999).
95. Falk,R., Grunwald,J., Hoffman,A., Domb,A.J. & Polacheck,I. Distribution of amphotericin B-arabinogalactan conjugate in mouse tissue and its therapeutic efficacy against murine aspergillosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**, 3606-3609 (2004).
96. Fenelon,L.; Hamilton,AJ; Figueroa,JL; Bartholomew,MA; Allen,MH; McCarthy,P; Hay,RJ. Production of specific monoclonal antibodies to *Aspergillus* species and their use

- in immunohistochemical identification of *Aspergillus*. *Journal of Clinical Microbiology* **37**, 1221-1223 (1999).
97. Fink-Gremmels,J. Mycotoxins: their implications for human and animal health. *Veterinary Quarterly* **21**, 115-120 (1999).
  98. Fisher,N.C.; Singhal,S.; Miller,S.J.; Hastings,J.G.; Mutimer; DJ. Fungal infection and liposomal amphotericin B (AmBisome) therapy in liver transplantation: a 2 year review. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **43**, 597-600 (1999).
  99. Follows,G.A., Hutchinson,C., Martin,A. & Carter,C. *Aspergillus fumigatus* endophthalmitis in a patient with acute myeloid leukaemia. *Clinical & Laboratory Haematology* **21**, 143-144 (1999).
  100. Fontaine,T.; Simenel,C.; Dubreucq,G.; Adam,O.; Delepierre,M.; Lemoine,J.; Vorgias,C.E.; Diaquin,M.; Latge,J.P. Molecular organization of the alkali-insoluble fraction of *Aspergillus fumigatus* cell wall. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 27594-27607 (2000).
  101. Francis,P. Lee,JW; Hoffman,A; Peter,J; Francesconi,A; Bacher,j; Shelhamer,J; Pizzo,PA; Walsh,TJ. Efficacy of unilamellar liposomal Amphotericin B in treatment of pulmonary aspergillosis in persistently granulocytopenic rabbits: the potential role of bronchoalveolar D-Manitol and serum galactomanan as markers of infection. *The journal of infectious diseases* **169**, 356-368 (1994).
  102. Franquet,T.; Muller,N.L.; Gimenez,A.; Guembe,P.; de La,Torre J.; Bague,S. Spectrum of pulmonary aspergillosis: histologic, clinical, and radiologic findings. *Radiographics* **21**, 825-837 (2001).
  103. Füssle,R. Diagnosis of fungal infections. *MycoseS* **40**, 13-15 (1997).
  104. Garcia,M.E., Blanco,J.L., Caballero,J. & Gargallo-Viola,D. Anticoagulants interfere with PCR used to diagnose invasive aspergillosis. *Journal of Clinical Microbiology*. **40**, 1567-1568 (2002).
  105. Garcia,M.E. Caballero,J.; Toni,P.; Garcia,I.; Martinez,de Merlo; Rollan,E.; Gonzalez,M.; Blanco,J.L. Disseminated Mycoses in a dog by *Paecilomyces* sp. *Journal of Veterinary Medicine. Serie A*. **47**, 243-249 (2000).
  106. Garcia,M.E., Caro,A., Fragio,C., Blanco,I. & Blanco,J.L. A clinical case of canine mycotic pneumonia. *Journal of Veterinary Medicine. Serie A* **48**, 501-506 (2001).
  107. García,M. Estudio de la ruta biosintética de las aflatoxinas en *A. parasiticus* (descripción de un posible nuevo intermediario). 1992. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. España.



108. García,M.E.; Caballero J.; Blanco,J.L. Micosis sistémicas en animales de compañía. Recientes avances en su diagnóstico. *Laboratorio Veterinario* **2**, 2-9 (1995).
109. Garcia-Reija,M.F., Crespo-Pinilla,J.I., Labayru-Echeverria,C., Espeso-Ferrero,A. & Verrier-Hernandez,A. Invasive maxillary aspergillosis: report of a case and review of the literature. *Medicine Oral* **7**, 200-205 (2002).
110. Gargallo-Viola,D. Sordarins as antifungal compounds. *Current Opinion in Anti-infective Investigational Drugs* **1**, 297-305 (1999).
111. George,D., Kordick,D., Minitier,P., Patterson,T. & Andriole,V. Combination therapy in experimental invasive aspergillosis. *The journal of infectious diseases* **168**, 692-698 (1993).
112. George,D., Minitier,P. & Andriole,V. Efficacy of UK-109496, a new antifungal agent, in an experimental model of invasive aspergillosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **40**, 86-91 (1996).
113. George,D., Minitier,P. & Andriole,V.T. Efficacy of UK-109496, a new azole antifungal agent, in an experimental model of invasive aspergillosis. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy* **40**, 86-91 (1996).
114. Gigolashvili,T. Update on antifungal therapy. *Cancer practice* **7**, 157-159 (1999).
115. Girardin,H., Monod,M. & Latge,J.P. Molecular characterization of the food-borne fungus *Neosartorya fischeri* (Malloch and Cain). *Applied & Environmental Microbiology* **61**, 1378-1383 (1995).
116. Golenser,J., Frankenburg,S., Ehrenfreund,T. & Domb,A.J. Efficacious treatment of experimental leishmaniasis with amphotericin B-arabinogalactan water-soluble derivatives. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**, 2209-2214 (1999).
117. Goodley,J.M., Clayton,Y.M. & Hay,R.J. Environmental sampling for aspergilli during building construction on a hospital site. *Journal of Hospital Infection* **26**, 27-35 (1994).
118. Gotway,M.B., Dawn,S.K.; Caoili,E.M.; Reddy,G.P.; Araoz,P.A.; Webb,W.R. The radiologic spectrum of pulmonary *Aspergillus* infections. *Journal of Computered Assistance and Topography*. **26**, 159-173 (2002).
119. Graybill,J.R., Bocanegra,R., Najvar,L.K., Loebenberg,D. & Luther,M.F. Granulocyte colony-stimulating factor and azole antifungal therapy in murine aspergillosis - role of immune suppression. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy* **42**, 2467-2473 (1998).
120. Graybill,J.R., Hernandez,S., Bocanegra,R. & Najvar,L.K. Antifungal therapy of murine *Aspergillus terreus* infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**, 3715-3719 (2004).

121. Graybill,J.R., Kaster,S.R. & Drutz,D.J. Treatment of experimental murine aspergillosis with BAY n7133. *Journal of Infection Diseases* **148**, 898-906 (1983).
122. Gurwith,M. Clinical efficacy of amphotericin B colloidal dispersion against infections caused by *Aspergillus spp.* *Chemotherapy* **45**, 34-38 (1999).
123. Habicht,J.M., Reichenberger,F., Gratwohl,A., Zerkowski,H.R. & Tamm,M. Surgical aspects of resection for suspected invasive pulmonary fungal infection in neutropenic patients. *Annals of Thoracic Surgery* **68**, 321-325 (1999).
124. Hachem,R.Y.; Kontoyiannis,D.P.; Boktour,M.R.; Afif,C.; Cooksley,C.; Bodey,G.P.; Chatzinikolaou,I.; Perego,C.; Kantarjian,H.M.; Raad,I.I. *Aspergillus terreus*: an emerging Amphotericin B-resistant opportunistic mold in patients with hematologic malignancies. *Cancer* **101**, 1594-1600 (2004).
125. Hajdu,R.; Thompson,R.; Sundelof,J.G; Pelak,B.A.; Bouffard,F.A.; Dropinski,J.F.; Kropp,H. Preliminary animal pharmacokinetics of the parenteral antifungal agents MK-0991( L-743,872). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **41**, 2339-2344 (1997).
126. Hall, L.A. & Denning, D.W. Oxygen requirements of *Aspergillus* species. *Journal of Medical Microbiology* **41**, 311-315 (1994).
127. Hanazawa,R., Murayama,S.Y. & Yamaguchi,H. In-situ detection of *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Medical Microbiology* **49**, 285-290 (2000).
128. Hanson,L., Clemons,K., Denning,D.W. & Stevens,D. Efficacy of oral saperconazole in systemic murine aspergillosis. *Journal of Medicine Veterinary Mycology* **33**, 311-317 (1995).
129. Hashiguchi,K., Niki,Y. & Soejima,R. Cyclophosphamide induces false-positive results in detection of aspergillus antigen in urine. *Chest* **105**, 975-976 (1994).
130. Hashimoto,A. *et al.* Comparasion of PCR, (1-3)- $\beta$ -D-Glucan and galactomannan assays in sera of rats with experimental invasive aspergillosis. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* **12**, 275-262 (1998).
131. Haugland,R.A., Heckman,J.L. & Wymer,L.J. Evaluation of different methods for the extraction of DNA from fungal conidia by quantitative competitive PCR analysis. *Journal of Microbiological Methods* **37**, 165-176 (1999).
132. Haynes,K. & Rogers,T. Retrospective Evaluation of Latex Agglutination Test for Diagnosis of Invasive Aspergillosis of Immunocompromised Patients. *European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases***13**, 670-674 (1994).
133. Haynes,K. Tuinstra,P; Hughes,TA; Wijnands,LM; Rogers,TR; Allen,AK. Purification and characterization of a 93 kDa *Aspergillus fumigatus* antigen with diagnostic potential. *Journal of Medical and Veterinary Micology* **34**, 421-426 (1996).

134. Haynes,K., Wetereng,T., Fell,J. & Moens,W. Rapid detection and identification of pathogenic fungi by polymerase chain reaction amplification of large subunit ribosomal DNA. *Journal of Medical and Veterinary Micrology* **33**, 319-325 (1995).
135. Haynes,K.A., Latge,J.P. & Rogers,T.R. Detection of *Aspergillus* antigens associated with invasive infection. *Journal of Clinical Microbiology* **28**, 2040-2044 (1990).
136. Henry,T., Iwen,P.C. & Hinrichs,S.H. Identification of *Aspergillus* species using internal transcribed spacer regions 1 and 2. *Journal of Clinical Microbiology* **38**, 1510-1515 (2000).
137. Herbrecht,R. Posaconazole: a potent, extended-spectrum triazole anti-fungal for the treatment of serious fungal infections. *Int. J. Clin. Pract.* **58**, 612-624 (2004).
138. Herbrecht,R. Voriconazole: therapeutic review of a new azole antifungal. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.* **2**, 485-497 (2004).
139. Herbrecht,R., Letscher,V., Andres,E. & Cavalier,A. Safety and efficacy of Amphotericin B Colloidal Dispersion - An overview. *Chemotherapy* **45**, 67-76 (1999).
140. Higashiyama,Y. & Kohno,S. Micafungin: a therapeutic review. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.* **2**, 345-355 (2004).
141. Holdom,M.D., Lechenne,B., Hay,R.J., Hamilton,A.J. & Monod,M. Production and characterization of recombinant *Aspergillus fumigatus* Cu,Zn superoxide dismutase and its recognition by immune human sera. *Journal of Clinical Microbiology* **38**, 558-562 (2000).
142. Horiguchi,Y. The performance of (1, 3)-beta-D-glucan and *Aspergillus* galactomannan measurement for early diagnosis of invasive aspergillosis in patients with hematological diseases. *Kansenshogaku Zasshi* **78**, 566-573 (2004).
143. Hornef,M.W.; Schopohl,J.; Zietz,C.; Hallfeldt,K.K.; Roggenkamp; Gartner,R.; Heesemann,J. Thyrotoxicosis induced by thyroid involvement of disseminated *Aspergillus fumigatus* infection. *Journal of Clinical Microbiology* **38**, 886-887 (2000).
144. Hospenthal,D.R., Kwon-Chung,K.J. & Bennett,J.E. Concentrations of airborne *Aspergillus* compared to the incidence of invasive aspergillosis: lack of correlation. *Medical Mycology* **36**, 165-168 (1998).
145. Hue,F.X., Huerre,M., Rouffault,M.A., de & Bievre,C. Specific detection of *Fusarium* species in blood and tissues by a PCR technique. *Journal of Clinical Microbiology* **37**, 2434-2438 (1999).
146. Hurst,S.F., Reyes,G.H., McLaughlin,D.W., Reiss,E. & Morrison,C.J. Comparison of commercial latex agglutination and sandwich enzyme immunoassays with a competitive binding inhibition enzyme immunoassay for detection of antigenemia and antigenuria in

- a rabbit model of invasive aspergillosis. *Clinical & Diagnostic Laboratory Immunology* **7**, 477-485 (2000).
147. Ikeda,F. Wakai,Y.; Matsumoto,S.; Maki,K.; Watabe,E.; Tawara; Goto,T.; Watanabe,Y.; Matsumoto,F.; Kuwahara,S. Efficacy of FK463, a new lipopeptide antifungal agent, in mouse models of disseminated candidiasis and aspergillosis. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy* **44**, 614-618 (2000).
  148. Inselmann,G., Volkmann,A. & Theidemann,H.T. Comparison of the effects of liposomal amphotericin B and conventional amphotericin B on propafenone metabolism and hepatic cytochrome P-450 in rats. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**, 131-133 (2000).
  149. Iwen,P.C. Sigler,L.; Tarantolo,S.; Sutton,D.A.; Rinaldi,M.G.; Lackner,R.P.; McCarthy,D.I.; Hinrichs,S.H. Pulmonary infection caused by *Gymnascella hyalinospora* in a patient with acute myelogenous leukemia. *Journal of Clinical Microbiology* **38**, 375-381 (2000).
  150. Iwen,P.C. Tarantolo,S.R.; Sutton,D.A.; Rinaldi,M.G.; Hinrichs; S.H. Cutaneous infection caused by *Cylindrocarpon lichenicola* in a patient with acute myelogenous leukemia. *Journal of Clinical Microbiology* **38**, 3375-3378 (2000).
  151. Jackson,L.S. & Bullerman,L.B. Effect of processing on *Fusarium* mycotoxins. *Advances in Experimental Medicine & Biology* **459**, 243-261 (1999).
  152. Jaeger,E.E.M. *et al.* Rapid detection and identification of *Candida*, *Aspergillus*, and *Fusarium* species in ocular samples using nested PCR. *Journal of Clinical Microbiology* **38**, 2902-2908 (2000).
  153. Jensen,H.E., Salonen,J. & Ekfors,T.O. The use of immunohistochemistry to improve sensitivity and specificity in the diagnosis of systemic Mycoses in patients with haematological malignancies. *J. Pathol.* **181**, 100-105 (1997).
  154. Jensen,H. & Hau,J. Murine mycotic placentitis produced by intravenous inoculation of conidia from *Aspergillus fumigatus*. *In vivo* **4**, 247-252 (1990).
  155. Johnson,E.M.; Oakley,K.L.; Radford,S.A.; Moore,C.B.; Warn,P.; Warnock,D.W.; Denning,D.W. Lack of correlation of in vitro amphotericin B susceptibility testing with outcome in a murine model of *Aspergillus* infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **45**, 85-93 (2000).
  156. Kakushima,M.; Masuyoshi,S; Hirano,M; Shinoda,M; Ohta,A; Kamei,H; Oki,T. In vitro and in vivo antifungal activities of MBY-18864, a water-soluble pradimicin derivative. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **35**, 2185-2190 (1991).
  157. Kamei,K., Watanabe,A., Nishimura,K. & Miyaji,M. [Culture filtrate of *Aspergillus fumigatus* and its cytotoxic activity against leukocytes]. *Nippon Ishinkin. Gakkai Zasshi* **43**, 163-166 (2002).

158. Kami,M. Current approaches to diagnose invasive aspergillosis: application of real-time automated polymerase chain reaction. *Nippon Ishinkin. Gakkai Zasshi* **42**, 181-188 (2001).
159. Kawamura,S. Maesaki,S.; Noda,T.; Hirakata,Y.; Tomono,K.; Tashiro,T.; Kohno,S. Comparison between PCR and detection of antigen in sera for diagnosis of pulmonary aspergillosis. *Journal of Clinical Microbiology* **37**, 218-220 (1999).
160. Kern,M. Medical Mycology. Fifth edition. Philadelphia, Pennsylvania; USA (1991).
161. Khan,Z. Sanyal,SC; Mokaddas E; Vislocky,I; Anim,JT; Salama,AL; Shuhaiber,H. Endocarditis due to *Aspergillus flavus*. *Mycoses* **40**, 213-217 (1999).
162. Kim,Y. Lee,K.S.; Jung K-J; Han,J.; Kim,J.S.; Suh J.S. Halo Sing on High Resolution CT: Findings in Spectrum of Pulmonary Diseases with Pathologic Correlation. *Journal of computer Assisted Tomography* **23**, 622-626 (1999).
163. Kishor,U. Madan,T.; Sarma,P.U.; Singh,M.; Urban,B.C.; Reid,K.B. Protective roles of pulmonary surfactant proteins, SP-A and SP-D, against lung allergy and infection caused by *Aspergillus fumigatus*. *Immunobiology* **205**, 610-618 (2002).
164. Kobayashi,M.; Sonobe,H.; Ikezoe,T.; Hakoda,E.; Ohtsuki,Y.; Taguchi,H. In situ detection of *Aspergillus* 18S ribosomal RNA in invasive pulmonary aspergillosis. *Internal Medicine* **38**, 563-569 (1999).
165. Koizumi,T. Kubo,K.; Kaneki,T.; Hanaoka,M.; Hayano,T.; Miyahara,T.; Okada,K.; Fujimoto,K.; Yamamoto,H.; Kobayashi,T.; Sekiguchi,M. Pharmacokinetic evaluation of amphotericin B in lung tissue: lung lymph distribution after intravenous injection and airspace distribution after aerosolization and inhalation of amphotericin B. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy* **42**, 1597-1600 (1998).
166. Kolattukudy,P.; Lee,JD; Rogers,LM; Zimmerman,P; Celeski,S; Fox,B; Stein,B; Copelman,EA. Evidence for possible involvement of an elastolytic serine protease in aspergillosis. *Infectious Immunity* **61**, 2357-2368 (1995).
167. Kozel,T.R. Activation of the complement system by pathogenic fungi. *Clinical Microbiology Reviews* **9**, 34-46 (1996).
168. Kurtz,M.B.; Bernard,E.M.; Edwards,F.F.; Marrinan,J.A.; Dropinski; Douglas,C.M.; Armstrong,D. Aerosol and parenteral pneumocandins are effective in a rat model of pulmonary aspergillosis. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy* **39**, 1784-1789 (1995).
169. Kurup,V.P.; Choi,H.Y.; Murali,P.S.; Xia,J.Q.; Coffman,R.L.; Fink; JN. Immune responses to *Aspergillus* antigen in IL-4-/-mice and the effect of eosinophil ablation. *Allergy* **54**, 420-427 (1999).
170. Kurup,V.P. & Kumar,A. Immunodiagnosis of Aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews* **4**, 439-456 (1991).

171. Kusumoto,K., Nogata,Y. & Ohta,H. Directed deletions in the aflatoxin biosynthesis gene homolog cluster of *Aspergillus oryzae*. *Current Genetics* **37**, 104-111 (2000).
172. Lambros,M., Bourne,D., Abbas,S. & Johnson,D. Disposition of aerosolized liposomal Amphotericin B. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **86**, 1066-1069 (2000).
173. Langfelder,K.; Jahn,B.; Gehringer,H.; Schmidt,A.; Wanner,G.; Brakhage,A.A. Identification of a polyketide synthase gene (pksP) of *Aspergillus fumigatus* involved in conidial pigment biosynthesis and virulence. *Medical Microbiology & Immunology* **187**, 79-89 (1998).
174. Latge,J.P. The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. *Trends Microbiol.* **9**, 382-389 (2001).
175. Latge,J.P.; Kobayashi,H.; Debeaupuis,J.P.; Diaquin,M.; Sarfati; Wieruszkeski, J.M.; Parra,E.; Bouchara,J.P.; Fournet,B. Chemical and immunological characterization of the extracellular galactomannan of *Aspergillus fumigatus*. *Infection & Immunity* **62**, 5424-5433 (1994).
176. Latge,J.P. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews* **12**, 310-350 (1999).
177. Latge,J.P., Debeaupuis,J., Sarafati,J., Diaquin,M. & Paris,S. Cell wall antigens in *Aspergillus fumigatus*. *Archives of Medical Research* **24**, 269-274 (1993).
178. Latge,J.P.; Paris,S; Sarafati,J; Debeaupuis,JP; Diaquin,M; Girardin,H. Outils progrès et questions dans l'étude moléculaire de *Aspergillus fumigatus* et de l'aspergillose invasive. *Pathologie biologique* **42**, 632-639 (1994).
179. Leenders,A.C.; de Marie,S.; ten Kate,M.T.; Bakker,Woudenberg; IA; Verbrugh,H.A. Liposomal amphotericin B (AmBisome) reduces dissemination of infection as compared with amphotericin B deoxycholate (Fungizone) in a rat model of pulmonary aspergillosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **38**, 215-225 (1996).
180. Leenders,A.C., van Etten,E.W. & Bakker,W. Animal models of infection. Zak,O. & Sande,M. (eds.), pp. 693-696 Academic Press, London, (1999).
181. Leenders,A.C.A.P., Van Belkum,A., Behrendt,M., Luijendijk,A.D. & Verbrugh,H.A. Density and molecular epidemiology of *Aspergillus* in air and relationship to outbreaks of *Aspergillus* infection. *Journal of Clinical Microbiology* **37**, 1752-1757 (1999).
182. Lehmann,P. & White,L. Chitin assay used to demonstrate renal localization and cortisone-enhanced growth of *Aspergillus fumigatus* mycelium in mice. *Infectious Immunity* **12**, 987-992 (1975).
183. Letscherbru,V.; Cavalier,A.; Pernotmarino,E.; Koenig,H.; Eyer,D.; Waller,J.; Candolfi,E. *Aspergillus* galactomannan antigen detection with Platelia(R) *aspergillus* - multiple

- positive antigenemia without *aspergillus* infection. *Journal de Mycologie Medicale* **8**, 112-113 (1998).
184. Lin,D. Lehmann,P.F.; Hamory,B.H.; Padhye,A.A.; Durry,E.; Pinner,R.W.; Lasker,B.A. Comparison of three typing methods for clinical and environmental isolates of *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Clinical Microbiology* **33**, 1596-1601 (1995).
  185. Loeffler,J.; Hebart,H; Bialek,R; Hagemeyer,L; Schmidt,D; Serey,FP; Hartmann,M; Eucker,J; Einsele,H Contaminations occurring in fungal PCR assays. *Journal of Clinical Microbiology* **37**, 1200-1202 (1999).
  186. Loeffler,J.; Loeffler,J.; Henke,N.; Hebart,H.; Schmidt,D.; Hagemeyer,L.; Schumacher,U.; Einsele,H. Quantification of fungal DNA by using fluorescence resonance energy transfer and the Light Cycler system. *Journal of Clinical Microbiology* **38**, 586-590 (2000).
  187. López-Medrano,R., Ovejero,M., Calera,J., Puente,P. & Leal,F. Immunoblotting patterns in the serodiagnosis of aspergilloma: antibody response to the 90kDa *Aspergillus fumigatus* antigen. *European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases***15**, 146-152 (1996).
  188. Lorf,T.; Braun,F.; Ruchel,R.; Muller,A.; Sattler,B.; Ringe. Systemic Mycoses during prophylactical use of liposomal amphotericin B (Ambisome) after liver transplantation. *Mycoses* **42**, 47-53 (1999).
  189. Lortholary,O.; Ascoglu,S.; Moreau,P.; Herbrecht,R.; Marinus; Casassus,P.; De Pauw,B.; Denning,D.W. Invasive aspergillosis as an opportunistic infection in nonallografted patients with multiple myeloma. *Clinical Infectious Diseases* **30**, 41-46 (2000).
  190. Loudon,K., Coke,A., Burnie,J., Lucas,G. & Liu Yin,J. Invasive aspergillosis: clusters and sources? *Journal of Medical and Veterinary Micology* **32**, 217-224 (1994).
  191. Louria,D., Fallon,N. & Browne,H. The influence of cortisone on experimental fungus infections in mice. *New York Academy of Sciences* 1435-1449 (1960).
  192. Lucas,G.M., Tucker,P. & Merz,W.G. Primary cutaneous *Aspergillus nidulans* infection associated with a Hickman catheter in a patient with neutropenia. *Clinical Infectious Diseases* **29**, 1594-1596 (1999).
  193. Lucey,D.R., Clerici,M. & Shearer,G.M. Type 1 and type 2 cytokine dysregulation in human infectious, neoplastic, and inflammatory diseases. *Clinical Microbiology Reviews* **9**, 532-562 (1996).
  194. Lutz,J.E., Clemons,K.V., Aristizabal,B.H. & Evens,D.A. Activity of the triazole SCH 56592 against disseminated murine coccidioidomycosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **41**, 1558-1561 (1997).

195. Lyons,J.H. & Laubach,H.E. Seminal vesicle and coagulating gland growth induced by intraperitoneal inoculation of fungi in mice. *American Journal of Veterinary Research* **50**, 32-33 (1989).
196. Machetti,M. Feasi,M; Mordini,N; Van Lint,MT; Bacigalupo,A; Latge,JP; Sarafati,J. Comparison of an enzyme immunoassay and latex agglutination system for the diagnosis of invasive aspergillosis in bone marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplantation* **21**, 917-921 (1998).
197. Madan,T.; Kishore,U.; Singh,M.; Strong,P.; Hussain,E.M.; Reid,K.B.; Sarma,P.U. Surfactant proteins A and D protect mice against pulmonary hypersensitivity induced by *Aspergillus fumigatus* antigens and allergens. *Journal of Clinical Investigation* **107**, 467-475 (2001).
198. Madan,T.; Kishore,U.; Singh,M.; Strong,P.; Clark,H.; Hussain,E.M.; Reid,K.B.; Sarma,P.U.. Protective role of lung surfactant protein D in a murine model of invasive pulmonary aspergillosis. *Infectious Immunity*. **69**, 2728-2731 (2001).
199. Maertens,J. van Eldere,J.; Verhaegen,J.; Verbeken,E.; Verschakelen,J.; Boogaerts,M. Use of circulating galactomannan screening for early diagnosis of invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients. *Journal of Infection Diseases* **186**, 1297-1306 (2002).
200. Maertens,J.; Vrebois,M.; Boogaerts,M. Autopsy-Controlled prospective evaluation of serial screening for circulating galactomannan by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for hematological patients at risk for invasive aspergillosis. *Journal of Clinical Microbiology* **37**, 3223-3228 (1999).
201. Manavathu,E.K., Vazquez,J.A. & Chandrasekar,P.H. Reduced susceptibility in laboratory-selected mutants of *Aspergillus fumigatus* to itraconazole due to decreased intracellular accumulation of the antifungal agent. *International Journal of Antimicrobial Agents* **12**, 213-219 (1999).
202. Manavathu,E., Cutright,J. & Chandraseak,P. Comparative estudy of susceptibilities of germinated and ungerminated conidia of *Aspergillus fumigatus* to various antifungal agents. *Journal of Clinical Microbiology* **37**, 858-861 (1999).
203. Martin,M., Yates,J. & Hitchcock,C. Comparison of Voriconazole (UK-109,496) and Itraconazole in prevention and treatment of *Aspergillus fumigatus* endocarditis in guinea pigs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **41**, 13-16 (1997).
204. Martinez,A., Aviles,P., Jimenez,E., Caballero,J. & Gargallo-Viola,D. Activities of sordarins in experimental models of candidiasis, aspergillosis, and pneumocystosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**, 3389-3394 (2000).
205. Martinez,M., Lee,A.S., Hellinger,W.C. & Kaplan,J. Vertebral *Aspergillus* osteomyelitis and acute diskitis in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Mayo Clinic Proceedings* **74**, 579-583 (1999).



206. Martins,M.D. Rodriguez,L.J.; Savary,C.A.; Graziutti,M.L.; Deshpande,D.; Cohen; DM; Cowart,R.E.; Woodside,D.G.; McIntyre,B.W.; Anaissie,E.J.; Rex,J.H.. Activated lymphocytes reduce adherence of *Aspergillus fumigatus*. *Medical Mycology* **36**, 281-289 (1998).
207. Maschmeyer,G. Pneumonia in febrile neutropenic patients: radiologic diagnosis. *Curr. Opin. Oncol.* **13**, 229-235 (2001).
208. Matsuda,H. Kohno,S.; Maesaki,S.; Yamada,H.; Koga,H.; Tamura; Kuraishi,H.; Sugiyama,J.. Application of ubiquinone systems and electrophoretic comparison of enzymes to identification of clinical isolates of *Aspergillus fumigatus* and several other species of *Aspergillus*. *Journal of Clinical Microbiology* **30**, 1999-2005 (1992).
209. Matsumoto,S. Wakai,Y.; Nakai,T.; Hatano,K.; Ushitani,T.; Ikeda,F.; Tawara,S.; Goto,T.; Matsumoto,F.; Kuwahara,H. .Efficacy of FK463, a new lipopeptide antifungal agent, in mouse models of pulmonary aspergillosis. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy* **44**, 619-621 (2000).
210. McKinsey,D.S. Wheat,L.J.; Cloud,G.A.; Pierce,M.; Black,J.R.; Bamberger,D.M.; Goldman,M.; Thomas,C.J.; Gutsch,H.M.; Moskovitz,B.; Dismukes,W.E.; Kauffman,C.A. .Itraconazole prophylaxis for fungal infections in patients with advanced human immunodeficiency virus infection: Randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Clinical Infectious Diseases* **28**, 1049-1056 (1999).
211. Medeiros,C., Cunha,A., Pasquini & Cunha,C. Primary renal aspergillosis: extremely uncommon presentation in patients treated with bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation* **24**, 113-114 (1999).
212. Mehrad,B. & Standiford,T.J. Role of cytokines in pulmonary antimicrobial host defense. *Immunologic Research* **20**, 15-27 (1999).
213. Mehta,R.T., Hopfer,R.L., McQueen,T., Juliano,R.L. & Lopez-Berestein,G. Toxicity and Therapeutic Effects in Mice of Liposome-Encapsulated Nystatin for Systemic Fungal Infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **31**, 1901-1903 (1987).
214. Melchers,W.J. Verweij,P.E.; van den Hurk,P.; van Belkum,A.; De Pauw,B.E.; Hoogkamp-Korstanje,J.A.; Meis,J.F.General primer-mediated PCR for detection of *Aspergillus* species. *Journal of Clinical Microbiology* **32**, 1710-1717 (1994).
215. Mitsutake,K.; Kohno,S.; Miyazaki,T.; Yamamoto,Y.; Yanagihara; Kakeya,H.; Hashimoto,A.; Koga,H.; Hara,K. Detection of (1-3)-beta-D-glucan in a rat model of aspergillosis. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* **9**, 119-122 (1995).
216. Miyazaki,H.M. Kohno,S.; Miyazaki,Y.; Mitsutake,K.; Tomono,K.; Kaku,M.; Koga,H.; Hara,K. Efficacy of intravenous itraconazole against experimental pulmonary aspergillosis. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy* **37**, 2762-2765 (1993).

217. Miyazaki,T. Kohno,S.; Mitsutake,K.; Maesaki,S.; Tanaka,K.; Hara,K. (1-->3)-beta-D-glucan in culture fluid of fungi activates factor G, a limulus coagulation factor. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* **9**, 334-339 (1995).
218. Miyazaki,T. Kohno,S.; Mitsutake,K.; Maesaki,S.; Tanaka,K.; Ishikawa,N.; Hara,K. .Plasma (1-->3)-beta-D-glucan and fungal antigenemia in patients with candidemia, aspergillosis, and cryptococcosis. *Journal of Clinical Microbiology* **33**, 3115-3118 (1995).
219. Mondon,P., Dechamps,C., Donadille,A., Ambroisethomas,P. & Grillot,R. Variation in virulence of *Aspergillus fumigatus* strains in a murine model of invasive pulmonary aspergillosis. *Journal of Medical Microbiology* **45**, 186-191 (1996).
220. Monga,D. Studies on Experimental Aspergillosis in immunodeficient mice. *Zbl. Bakt. Hyg.* **254**, 552-560 (1983).
221. Morgenstern,G.R. Prentice,A.G.; Prentice,H.G.; Ropner,J.E.; Schey,S.A.; Warnock,D.W. A randomized controlled trial of itraconazole versus fluconazole for the prevention of fungal infections in patients with haematological malignancies. *British Journal of Haematology* **105**, 901-911 (1999).
222. Mori,T. Matsumura,M; Yamada,k; Irie,S; Oshimi,K; Suda,K; Oguri,T; Ichinoes,M. Systemic aspergillosis caused by an aflatoxin-producing strain of *Aspergillus flavus*. *Medical Mycology* **36**, 107-112 (1998).
223. Muller,F.M., Trusen,A. & Weig,M. Clinical manifestations and diagnosis of invasive aspergillosis in immunocompromised children. *European Journal of Paediatrics.* **161**, 563-574 (2002).
224. Mullins,J., Hutcheson,P.S. & Slavin,R.G. *Aspergillus fumigatus* spore concentration in outside air: Cardiff and St Louis compared. *Clinical Allergy* **14**, 351-354 (1984).
225. Muñoz,P. Burillo,A.; Bouza,E. Nosocomial invasive aspergillosis in a heart transplant patient acquired during a break in the HEPA air filtration system. *Transplant Infectious Diseases.* **6**, 50-54 (2004).
226. Murphy,M., Bernard,E., Ishimaru,T. & Armstrong,D. Activity of Voriconazole (UK-109,496) against clinical isolates of *Aspergillus* species and Its effectiveness in an experimental model of invasive pulmonary aspergillosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **41**, 696-698 (1997).
227. Myint,H. AmBisome: an overview of current use. *Hospital Medicine (London)* **60**, 123-126 (1999).
228. Mylonakis,E. Tamar,MD; Barlam,F; Timothy Flanigan,MD; Josiah,D; Rich,MD. Pulmonary aspergillosis and invasive disease in AIDS. *Chest* **114**, 251-262 (1998).

229. Nawada,R. Amitani,R; Tanaka,E; Niimi,A; Suzuki,K; Murayama,T; Kuze,F. Murine Model of invasive pulmonary aspergillosis following an earlier stage, noninvasive *Aspergillus* infection. *Journal of Clinical Microbiology* **34**, 1433-1439 (1996).
230. Nicod,L.P., Pache,J.C. & Howarth,N. Fungal infections in transplant recipients. *European Respiratory Journal* **17**, 133-140 (2001).
231. Niwano,Y. Kuzuhara,N.; Goto,Y.; Munechika,Y.; Kodama,H.; Kanai,K.; Yoshida,M.; Miyazaki,T.; Yamaguchi,H. .Efficacy of NND-502, a novel imidazole antimycotic agent, in experimental models of *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus* infections. *International Journal of Antimicrobial Agents* **12**, 221-228 (1999).
232. Nolard,N. Links between risks of aspergillosis and environmental contamination. Review of the literature. *Pathologie biologique* **42**, 706-710 (1994).
233. Noskin,G., Pietrelli,L., Gurwith,M. & Bowden,R. Treatment of invasive fungal infections with amphotericin B colloidal dispersion in bone marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplantation* **23**, 697-703 (1999).
234. Notani,K. Satoh,C.; Hashimoto,I.; Makino,S.; Kitada,H.; Fukuda,H. Intracranial *Aspergillus* infection from the paranasal sinus. *Oral Surgery. Oral Medicine Oral Pathology. Oral Radioogy Endodocy.* **89**, 9-11 (2000).
235. Oakley,K.L., Moore,C.B. & Denning,D.W. Comparison of in vitro activity of liposomal nystatin against *Aspergillus* species with those of nystatin, amphotericin B (AB) deoxycholate, AB colloidal dispersion, liposomal AB, AB lipid complex, and itraconazole. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy* **43**, 1264-1266 (1999).
236. Obayashi,T. Yoshida,M.; Mori,T.; Goto,H.; Yasuoka,A.; Iwasaki,H.; Teshima,H.; Kohno,S.; Horiuchi,A.; Ito,A. Plasma (1-->3)-beta-D-glucan measurement in diagnosis of invasive deep mycosis and fungal febrile episodes. *Lancet* **345**, 17-20 (1995).
237. Obayashi,T. Yoshida,M.; Tamura,H.; Aketagawa,J.; Tanaka,S.; Kawai,T. Determination of plasma (1-->3)-beta-D-glucan: a new diagnostic aid to deep mycosis. *Journal of Medical & Veterinary Mycology* **30**, 275-280 (1992).
238. Odabasi,Z. Yoshida,M.; Mori,T.; Goto,H.; Yasuoka,A.; Iwasaki,H.; Teshima,H.; Kohno,S.; Horiuchi,A.; Ito,A. Beta-D-glucan as a diagnostic adjunct for invasive fungal infections: validation, cutoff development, and performance in patients with acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome. *Clinical of Infectious Diseases.* **39**, 199-205 (2004).
239. Odds,F.C. Van Gerven,F.; Espinel-Ingroff,A.; Bartlett,M.S.; Ghannoum,M.A.; Lancaster,M.V.; Pfaller,M.A.; Rex,J.H.; Rinaldi,M.G.; Walsh,T.J. Evaluation of possible correlations between antifungal susceptibilities of filamentous fungi in vitro and antifungal treatment outcomes in animal infection model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **42**, 282-288 (1998).

240. Otsubo,T. Maesaki,S.; Hossain,M.A.; Yamamoto,Y.; Tomono,K.; Tashiro,T.; Seki,J.; Tomii,Y.; Sonoke,S.; Kohno,S. In vitro and in vivo activities of NS-718, a new lipid nanosphere incorporating amphotericin B, against *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy* **43**, 471-475 (1999).
241. Otsubo,T. Maruyama,K.; Maesaki,S.; Miyazaki,Y.; Tanaka,E.; Takizawa,T.; Moribe,K.; Tomono,K.; Tashiro,T.; Kohno,S. Long-circulating immunoliposomal amphotericin B against invasive pulmonary aspergillosis in mice. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy* **42**, 40-44 (1998).
242. Overdijk,B., Steijn,G. & Odds,F. Distribution of chitinase in guinea pig tissues and increases in levels of this enzyme after systemic infection with *Aspergillus fumigatus*. *Microbiology* **145**, 259-269 (1999).
243. Pahl,H.L.; Krauss,B.; Schulze-Osthoff,K.; Decker,T.; Traenckner,E.B.; Vogt,M.; Myers,C.; Parks,T.; Warring,P.; Muhlbacher,A.; Czernilofsky,A.P.; Baeuerle,P.A. The immunosuppressive fungal metabolite gliotoxin specifically inhibits transcription factor NF-kappaB. *Journal of Experimental Medicine* **183**, 1829-1840 (1996).
244. Palmer,L.B., Greenberg,H.E. & Schiff,M.J. Corticosteroid treatment as a risk factor for invasive aspergillosis in patients with lung disease. *Thorax* **46**(1), 15-20. (1991).
245. Paris,S. Boisvieux-Ulrich,E.; Crestani,B.; Houcine,O.; Taramelli,D.; Lombardi,L.; Latge,J.P.. Internalization of *Aspergillus fumigatus* conidia by epithelial and endothelial cells. *Infection & Immunity* **65**, 1510-1514 (1997).
246. Patel,R. & Paya,C.V. Infections in solid-organ transplant recipients. *Clinical Microbiology Reviews* **10**, 86-124 (1997).
247. Paterson,D.S.N. Invasive aspergillosis in transplant recipients. *Medicine* **78**, 123-138 (1999).
248. Patterson,J., Minitier,P., Ryan,J. & Andriole,V. Effect of immunosuppression and Amphotericin B on *Aspergillus* antigenemia in an experimental model. *The journal of infectious diseases* **158**, 415-422 (1988).
249. Patterson,T., George,D., Ingersoll,R., Minitier,P. & Andriole,V. EFFICACY OF SCH30304 IN TREATMENT OF EXPERIMENTAL INVASIVE ASPERGILLOSIS. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **35**, 1985-1988 (1991).
250. Patterson,T., George,D., Minitier,P. & Andriole,V. The Role of Fluconazole in the Early Treatment and Prophylaxis of Experimental Invasive Aspergillosis. *The journal of infectious diseases* **164**, 575-580 (1991).
251. Patterson,T., Minitier,P. & Andriole,V. Efficacy of Fluconazole in experimental invasive aspergillosis. *Reviews of infectious diseases*. **12 Suppl. 3**, S281-S285 (1990).

252. Patterson,T. Minitier,P; Dijkstra,J; Szoka,FC; Ryan,JL; Andriole,VT. Treatment of experimental invasive aspergillosis with novel Amphotericin B/Cholesterol-Sulfate complexes. *The journal of infectious diseases* **159**, 717-724 (1989).
253. Patterson,T., Minitier,P., Patterson,J., Rapoport,J. & Andriole,V. *Aspergillus* Antigen Detection in the Diagnosis of Invasive Aspergillosis. *The journal of infectious diseases* **171**, 1553-1558 (1995).
254. Paugman,A. Sarfati,J; Romieu,R; Viguier,M; Dupoy-Camet,J; Latge,JP. Detection of *Aspergillus* Galactomanan: comparasion of an enzyme-Linked Immunoassay a Europiu,-Linked Time-Resolved Fluoroimmunoassay. *Journal of Clinical Microbiology* **36**, 3079-3080 (1998).
255. Pauw, B.E. & Meunier, F. The Challenge of Invasive Fungal Infection. *Chemotherapy* **45**, 1-14 (1999).
256. Peña Yáñez J. *Micología Clínica*. Ed.Ciencia 3 (ed.), pp. 473-488 Madrid; España, (1983).
257. Perfect,J.R., Wright,K.A., Hobbs,M.M. & Durack,D.T. Treatment of Experimental Cryptococcal Meningitis and Disseminated Candidiasis with SCH39304. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy* **33**, 1735-1740 (1989).
258. Pfaller,M.A. Messer,S.A.; Hollis,R.J; Jones,R.N.; Doern,G.V.; Brandt,M.E.; Hajjeh,R.A. In vitro susceptibilities of *Candida* bloodstream isolates to the new triazole antifungal agents BMS-207147, Sch 56592, and Voriconazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **42**, 3242-3244 (1998).
259. Pinel,C., Monod,M., Ambroise-Thomas,P. & Grillot,R. Western blot detection of IgG anti-*Aspergillus fumigatus* elastase in sera of patients with aspergillosis. *Medical and Veterinary Mycology* **32**, 231-234 (1994).
260. Pitt,J.I. The current role of *Aspergillus* and *Penicillium* in human and animal health. *Journal of Medical & Veterinary Mycology* **32 Suppl 1**, 17-32 (1994).
261. Polak, A. Experimental models in antifungal chemotherapy. *Mycoses* **41**, 1-30 (1998).
262. Poli,F., Cattaneo,R., Crespiatico,L., Nocco,A. & Sirchia,G. A. Rapid and simple method for reversing the inhibitory effect of heparin on PCR for HLA class II typing. *PCR Methods and Applications* **2**, 356-358 (1993).
263. Poll,L.W. *et al.* CT appearance of a renal aspergilloma in a patient with the acquired immunodeficiency syndrome. *Urologia Internationalis* **62**, 110-113 (1999).
264. Rankin NE. Disseminated Aspergillosis and Moniliasis associated with agranulocytosis and antibiotic therapy. *British Medical Journal* **183**, 918-919 (1953).

265. Reddy,L.V., Kumar,A. & Kurup,V.P. Specific amplification of *Aspergillus fumigatus* DNA by polymerase chain reaction. *Molecular & Cellular Probes* **7**, 121-126 (1993).
266. Reeves,E.P., Messina,C.G., Doyle,S. & Kavanagh,K. Correlation between gliotoxin production and virulence of *Aspergillus fumigatus* in *Galleria mellonella*. *Mycopathologia* **158**, 73-79 (2004).
267. Reichenberger,F. Habicht,J.; Kaim,A.; Dalquen,P.; Bernet,F.; Schlapfer,R.; Stulz,P.; Perruchoud,A.P.; Tichelli,A.; Gratwohl,A.; Tamm,M. Lung resection for invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic patients with hematologic diseases. *American Journal of Respiratory & Critical Care Medicine* **158**, 885-890 (1998).
268. Reiss,E. & Lehmann,P.F. Galactomannan antigenemia in invasive aspergillosis. *Infection & Immunity* **25**, 357-365 (1979).
269. Reiss,E., Obayashi,T., Orle,K., Yoshida,M. & Zancope-Oliveira,R.M. Non-culture based diagnostic tests for mycotic infections. *Medical Mycology* **38 Suppl 1**, 147-159 (2000).
270. Rello,J. Esandi,ME; Mariscal,D; Gallego,M; Domingo,C; Valles,J. Invasive pulmonary aspergillosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease: report of eight cases and review. *Clinical Infectious Diseases* **26**, 1473-1475 (1998).
271. Rementería, A.; Abaitua, F.; García-Tobalina, R.; Hernando, F.; Pontón, J.; Sevilla, M.J. Resistance to candidiasis and macrophage activity in chitin-treated mice. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **19**, 223-230 (1997).
272. Repentigny,L.d., Kilanowski,E., Pedneault,L. & Boushira,M. Immunoblot Analyses of the Serologic Response to *Aspergillus fumigatus* Antigens in Experimental Invasive Aspergillosis. *The journal of infectious diseases* **163**, 1305-1311 (1991).
273. Repentigny,L.; Repentigny,L de; Petitbois,S; Boushira,M; Michalizskyn,E; Sénéchal,s; Gendron,N; Monplaisir,S. Acquired immunity in experimental murine aspergillosis is mediated by macrophages. *Infectious Immunity* **61**, 3791-3809 (1993).
274. Reponen,T.A., Gazonko,S.V., Grinshpun,S.A., Willeke,K. & Cole,E.C. Characteristics of airborne actinomycete spores. *Applies in Environmental Microbiology*. **64**, 3807-3812 (1998).
275. Ribaud,P.; Chastang,C.; Latge,J.P.; Baffroy-Lafitte,L.; Parquet,N.; Devergie,A.; Esperou,H.; Selimi,F.; Rocha,V.; Selimi; Derouin,F.; Socie,G.; Gluckman,E.. Survival and prognostic factors of invasive aspergillosis after allogeneic bone marrow transplantation. *Clinical Infectious Diseases* **28**, 322-330 (1999).
276. Rinyu,E., Varga,J. & Ferenczy,L. Phenotypic and genotypic analysis of variability in *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Clinical Microbiology* **33**, 2567-2575 (1995).
277. Rippon, J. Tratado de micología médica. Interamericana McGraw-Hill, Méjico DF; Méjico (1990).

278. Rodriguez,D.L. Lopez,C.A.; Cobos,E.B.; Blanco,A.J.; Fernandez,A.F.; Araujo,L.F. Invasive cerebral aspergillosis in a patient with aplastic anemia. Response to liposomal amphotericin and surgery. *Haematologica* **84**, 758-759 (1999).
279. Rodriguez,E.; Symoens,F.; Mondon,P.; Mallie,M.; Piens,M.A.; Lebeau,B.; Tortorano,A.M.; Chaib,F.; Carlotti,A.; Villard,J.; Viviani,M.A.; Chapuis,F.; Nolard,N.; Grillot,R.; Bastide,J.M.. Combination of three typing methods for the molecular epidemiology of *Aspergillus fumigatus* infections. *Journal of Medical Microbiology* **48**, 181-194 (1999).
280. Rodriguezadrian,L.J., Grazziutti,M.L., Rex,J.H. & Anaissie,E.J. The potential role of cytokine therapy for fungal infections in patients with cancer - is recovery from neutropenia all that is needed. *Clinical Infectious Diseases* **26**, 1270-1278 (1998).
281. Rogers,T.R., Haynes,K.A. & Barnes,R.A. Value of antigen detection in predicting invasive pulmonary aspergillosis. *Lancet* **336**, 1210-1213 (1990).
282. Rohrllich,P. *et al.* Prospective sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for serum galactomannan: early predictive value and clinical use in invasive aspergillosis. *Pediatr. Infecy. Dis.* **15**, 232-237 (1996).
283. Roilides,E., Robinson,T., Sein,T., Pizzo,P. & Walsh,T. In vitro and ex vivo effects of Cyclosporin A on phagocytic host defenses against *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **38**, 2883-2888 (1994).
284. Roilides,E., Dimitriadou-Georgiadou,A., Sein,T., Kadiltoglou,I. & Walsh,T.J. Tumor necrosis factor alpha enhances antifungal activities of polymorphonuclear and mononuclear phagocytes against *Aspergillus fumigatus*. *Infection & Immunity* **66**, 5999-6003 (1998).
285. Roilides,E.; Tsaparidou,S.; Kadiltoglou,I.; Sein,T.; Walsh; T.J. Interleukin-12 enhances antifungal activity of human mononuclear phagocytes against *Aspergillus fumigatus*: implications for a gamma interferon-independent pathway. *Infection & Immunity* **67**, 3047-3050 (1999).
286. Roilides,E., Uhlig,K., Venzon,D., Pizzo,P.A. & Walsh,T.J. Enhancement of oxidative response and damage caused by human neutrophils to *Aspergillus fumigatus* hyphae by granulocyte colony-stimulating factor and gamma interferon. *Infection & Immunity* **61**(4), 1185-1193. 1993.
287. Roilides,E., Uhlig,K., Venzon,D., Pizzo,P.A. & Walsh,T.J. Prevention of corticosteroid-induced suppression of human polymorphonuclear leukocyte-induced damage of *Aspergillus fumigatus* hyphae by granulocyte colony-stimulating factor and gamma interferon. *Infection & Immunity* **61**(11), 4870-4877. 1993.

288. Ruess,M., Greene,J., Vincent,A. & andin,S. Invasive *Aspergillus* involving the ethmoidal sinuses in cancer patients: report of four cases and review of yhe literature. *Infectious Diseases in Clinical Practice* **8**, 323-327 (1999).
289. Ruhnke,M., Eichenauer,E., Searle,J. & Lippek,F. Fulminant tracheobronchial and pulmonary aspergillosis complicating imported *Plasmodium falciparum* malaria in an apparently immunocompetent woman. *Clinical Infectious Diseases* **30**, 938-940 (2000).
290. Sabetta,J., Minitier,P. & Andriole,V. The diagnosis of invasive aspergillosis by an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for circulating antigen. *The journal of infectious diseases* **152**, 946-953 (1985).
291. Sakai,T., Ikegami,K., Yoshinaga,E., Uesgui-Hayakawa,R. & Wakizaka,A. Rapid, sensitive and simple detection of *Candida* deep mycosis by amplification of 18S ribosomal RNA gene; Comparison with assay of serum beta-D-glucan level in clinical samples. *Tohoku Journal of Experimental Medicine* **190**, 119-128 (2000).
292. Sakurai T, Kaise,T., Yadomae,T. & Matsubara C. Different role of serum components and cytokines on alveolar macrophage activation by soluble fungal (1-3)- $\beta$ -D-glucan. *European Journal of Pharmacology* **334**, 255-263 (1997).
293. Sanchez-Sousa,A., Alvarez,M.E., Maiz,L., Escobar,H. & Baquero. *Aspergillus fumigatus* susceptibility testing by colorimetric microdilution. *Journal de Mycologie Medicale* **9**, 103-106 (1999).
294. Sanguinetti,M.; Posteraro,B.; Pagano,L.; Pagliari,G.; Fianchi,L.; Mele,L.; La Sorda,M.; Franco,A.; Fadda,G.Comparison of real-time PCR, conventional PCR, and galactomannan antigen detection by enzyme-linked immunosorbent assay using bronchoalveolar lavage fluid samples from hematology patients for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *Journal of Clinical Microbiology*. **41**, 3922-3925 (2003).
295. Saxena,S., Khan,J. & Ghosh,C. Toxicity and therapeutic efficacy of amphotericin B delivered through cholesterol hemisuccinate vesicles in the treatment of experimental murine aspergillosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **42**, 635-642 (1998).
296. Schmidt,A. Animal models of aspergillosis - also useful for vaccination strategies? *Mycoses* **45**, 38-40 (2002).
297. Schmitt,H.J., Bernard,E.M., Hauser,M. & Armstrong,D. Aerosol amphotericin B is effective for prophylaxis and therapy in a rat model of pulmonary aspergillosis. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy* **32**, 1676-1679 (1988).
298. Schmitt,H., Edwards,F., Andrade,J., Niki,Y. & Armstrong,D. Comparasion of azoles against Aspergilli in vitro and in an experimental model of pulmonary aspergillosis. *Experimental Chemotherapy* **38**, 118-126 (1992).
299. Schwartz, S.; Behre,G.; Heinemann,V.; Wandt,H.; Schilling,E.; Arning,M.; Trittin,A.; Kern,W.V.; Boenisch,O.; Bosse,D.; Lenz,K.; Ludwig; WD; Hiddemann,W.; Siegert,W.;



- Beyer, J. Aerosolized amphotericin B inhalations as prophylaxis of invasive aspergillus infections during prolonged neutropenia: Results of a prospective randomized multicenter trial. *Blood* **93**, 3654-3661 (1999).
300. Schwartz, S.; Thiel, E. Clinical presentation of invasive aspergillosis. *Mycoses* **40**, 21-24 (1999).
301. Sefc, L., Psenak, O., Sykora, V., Sulc, K. & Necas, E. Response of hematopoiesis to cyclophosphamide follows highly specific patterns in bone marrow and spleen. *J. Hematother. Stem Cell Res.* **12**, 47-61 (2003).
302. Seligsohn, R., Rippon, J.W. & Lerner, S.A. *Aspergillus terreus* osteomyelitis. *Arch. Intern. Medicine* **137**, 918-920 (1977).
303. Serrano-Gomez, D.; Dominguez-Soto, A.; Ancochea, J.; Jimenez-Heffernan, J.A.; Leal, J.A.; Corbi, A.L. Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin mediates binding and internalization of *Aspergillus fumigatus* conidia by dendritic cells and macrophages. *Journal of Immunology* **173**, 5635-5643 (2004).
304. Shibuya, K.; Takaoka, M.; Uchida, K.; Wakayama, M.; Yamaguchi, H.; Takahashi, K.; Paris, S.; Latge, J.P.; Naoe, S. Histopathology of experimental invasive pulmonary aspergillosis in rats: Pathological comparison of pulmonary lesions induced by specific virulent factor deficient mutants. *Microbial Pathogenesis* **27**, 123-131 (1999).
305. Singh, N., Gayowski, T., Wagener, M.M. & Marino, I.R. Pulmonary infiltrates in liver transplant recipients in the intensive care unit. *Transplantation* **67**, 1138-1144 (1999).
306. Sivak, O., Bartlett, K. & Wasan, K.M. Heat-treated fungizone retains amphotericin B antifungal activity without renal toxicity in rats infected with *Aspergillus fumigatus*. *Pharmacology Respiratory.* **21**, 1564-1566 (2004).
307. Slight, J.; Nicholson, W.J.; Mitchell, C.G.; Pouilly, N.; Beswick, P.H.; Seaton, A.; Donaldson, K. Inhibition of the alveolar macrophage oxidative burst by a diffusible component from the surface of the spores of the fungus *Aspergillus fumigatus*. *Thorax* **51**, 389-396 (1996).
308. Smith, J.M.; Tang, C.M., Van Noorden, S. & Holden, D.W. Virulence of *Aspergillus fumigatus* double mutants lacking restriction and an alkaline protease in a low-dose model of invasive pulmonary aspergillosis. *Infectious Immunity.* **62**, 5247-5254 (1994).
309. Soubani, A.O. & Qureshi, M.A. Invasive pulmonary aspergillosis following bone marrow transplantation: risk factors and diagnostic aspect. *Haematologia (Budap.)* **32**, 427-437 (2002).
310. Spreadbury, C., Holden, D., Aufauvre-Brown, A., Bainbridge, B. & Cohen, J. Detection of *Aspergillus fumigatus* by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology* **31**, 615-621 (1993).

311. Staib,P.; Kretschmar,M.; Nichterlein,T.; Kohler,G.; Michel; Hof,H.; Hacker,J.; Morschhauser,J. Host-induced, stage-specific virulence gene activation in *Candida albicans* during infection. *Molecular Microbiology* **32**, 533-546 (1999).
312. Steinbach,W.J., Perfect,J.R., Schell,W.A., Walsh,T.J. & Benjamin,D.K., Jr. In vitro analyses, animal models, and 60 clinical cases of invasive *Aspergillus terreus* infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**, 3217-3225 (2004).
313. Stevens,D.A. Diagnosis of fungal infections: current status. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **49 Suppl 1**, 11-19 (2002).
314. Stevens,D.A.; Kan,V.L.; Judson,M.A.; Morrison,V.A.; Dummer,S.; Denning,D.W.; Bennett,J.E.; Walsh,T.J.; Patterson,T.F.; Pankey,G.A.. Practice guidelines for diseases caused by *Aspergillus*. *Clinical Infectious Diseases* **30**, 696-709 (2000).
315. Stevens,D.A.; Schwartz,H.J.; Lee,J.Y.; Moskovitz,B.L.; Jerome,D.C.; Catanzaro,A.; Bamberger,D.M.; Weinmann,A.J.; Tuazon,C.U.; Judson,M.A.; Platts-Mills,T.A.E.; DeGraff,A.C.; Grossman,J.; Slavin,R.G.; Reuman,P. A randomized trial of itraconazole in allergic bronchopulmonary aspergillosis. *New England Journal of Medicine* **342**, 756-762 (2000).
316. Stevens,D.A. Animal models in the evaluation of antifungal drugs. *Journal of Mycology Medicine* **6**, 7-10 (1996).
317. Stynen, D. Antigènes et anticorps spécifiques dans l'aspergillose invasive. *Phathologie biologie* **42**, 683-687 (1994).
318. Stynen, D.; Goris,A., Sarfati,J. & Latge,J. A New Sensitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay to detect galactofuran in patients with invasive aspergillosis. *Journal of Clinical Microbiolog.* **33**, 497-500 (1995).
319. Stynen,D. Sarafati,J; Goris,A; Prevost,MC; Lesourd,M; Kamphuis,H; Darras,V; Latge,JP. Rat monoclonal antibodies against *Aspergillus* galactomannan. *Infectious Immunity* **60**, 2237-2245 (1992).
320. Sulahian, A. Tabouret, M; Ribaoud, P; Sarfati, J; Gluckman, E; Latge, J.P; Derouin, F. Comparision of an Enzyme Immunoassay and Latex Agglutination Test for Detection of Galactomannan in the Diagnosis of Invasive Aspergillosis. *European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases.* **15**, 139-145 (1996).
321. Sutton, D.A., Sanche,S.E., Revankar,S.G., Fothergill,A.W. & Rinaldi,M.G. In vitro amphotericin B resistance in clinical isolates of *Aspergillus terreus*, with a head-to-head comparison to voriconazole. *Journal of Clinical Microbiology* **37**, 2343-2345 (1999).
322. Sutton,P., Newcombe,N., Waring,P. & Müllbacher,A. In vivo immunosuppressive activity of gliotoxin, a metabolite produced by human pathogenic fungi. *Infectious Immunity* **62**, 1192-1198 (1994).

323. Sutton,P., Waring,P. & Müllbacher,A. Exacerbation of invasive aspergillosis by the immunosuppressive fungal metabolite, gliotoxin. *Immunology and Cell Biology* **74**, 318-322 (1996).
324. Tamm,M. The lung in the immunocompromised patient - Infectious complications part 2. *Respiration* **66**, 199-207 (1999).
325. Tang,C.M., Holden,D.W., Aufauvre-Brown,A. & Cohen,J. The detection of *Aspergillus* spp. by the polymerase chain reaction and its evaluation in bronchoalveolar lavage fluid. *American Review of Respiratory Disease* **148**, 1313-1317 (1993).
326. Tang,C., Cohen,J., Krausz,T., Van Noorden,S. & Holden,D. The alkaline protease of *Aspergillus fumigatus* is not a virulence determinant in two murine models of invasive pulmonary aspergillosis. *Infectious Immunity* **61**, 1650-1656 (1993).
327. Tarrand,J.J.; Lichterfeld,M.; Warraich,I.; Luna,M.; Han,X.Y.; May,G.S.; Kontoyiannis, D.P. Diagnosis of invasive septate mold infections. A correlation of microbiological culture and histologic or cytologic examination. *American Journal of Clinical Pathology* **119**, 854-858 (2003).
328. Tattevin,P.; Bruneel,F.; Lellouche,F.; de Broucker,T.; Chevret,S.; Wolff,M.; Regnier,B. Successful treatment of brain aspergillosis with voriconazole. *Clinical of Microbiology and Infection*. **10**, 928-931 (2004).
329. Te Dorsthorst,D.T.; Mouton,J.W.; van den Beukel,C.J.; van der Lee,H.A.; Meis,J.F.; Verweij,P.E. Effect of pH on the in vitro activities of amphotericin B, itraconazole, and flucytosine against *Aspergillus* isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**, 3147-3150 (2004).
330. Thurnheer,R., Moll,C., Rothlin,M. & Krause,M. Chronic necrotizing pulmonary aspergillosis complicated by pneumothorax. *Infection* **32**, 239-241 (2004).
331. Tomee,J.F. & Kauffman,H.F. Putative virulence factors of *Aspergillus fumigatus*. *Clinical Experimental Allergy* **30**, 476-484 (2000).
332. Tresallet,C.; Nguyen-Thanh,Q.; Aubriot-Lorton,M.H.; Akakpo,J.P.; Al Jijakli,A.; Cardot,V.; Chigot,J.P.; Menegaux,F. Small-bowel infarction from disseminated aspergillosis.. *Diseases of Colon and Rectum* **47**, 1515-1518 (2004).
333. Tsai,H.F. Chang,Y.C.; Washburn,R.G.; Wheeler,M.H.; Kwon,Chung; KJ. The developmentally regulated *alb1* gene of *Aspergillus fumigatus*: its role in modulation of conidial morphology and virulence. *Journal of Bacteriology* **180**, 3031-3038 (1998).
334. Tsai,H.F., Washburn,R.G., Chang,Y.C. & Kwon-Chung,K.J. *Aspergillus fumigatus arp1* modulates conidial pigmentation and complement deposition. *Molecular Microbiology* **26**, 175-183 (1997).

335. Tsai,H.F., Wheeler,M.H., Chang,Y.C. & Kwon-Chung,K.J. A developmentally regulated gene cluster involved in conidial pigment biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Bacteriology* **181**, 6469-6477 (1999).
336. Turner,K.J., Hackshaw,R., Papadimitriou,J., Wetherall,J.D. & Perrott,J. Experimental aspergillosis in rats infected via intraperitoneal and subcutaneous routes. *Immunology* **29**, 55-66 (1975).
337. Unhanand,M.; Maciver,I.; Ramilo,O.; Arencibia-Mireles,O.; Argyle,J.C.; McCracken, G.H.,Jr; Hansen,E.J. Pulmonary clearance of *Moraxella catarrhalis* in an animal model. *Journal of Infectious Diseases* **165**, 644-650 (1992).
338. Van Burik,J.A., Myerson,D., Schreckhise,R.W. & Bowden,R.A. Panfungal PCR assay for detection of fungal infection in human blood specimens. *Journal of Clinical Microbiology* **36**, 1169-1175 (1998).
339. Van Cutsem J. Prophylaxis of *Candida* and *Aspergillus* infections with oral administration of itraconazole. *Mycoses* **37**, 243-248 (1994).
340. Van Cutsem,J., Meulemans,L., Van Gerven,F. & Stynen,D. Detection of circulating galactomannan by pastorex *Aspergillus* in experimental invasive aspergillosis. *Mycoses* **33**, 61-69 (1990).
341. van Etten,E.W., ten Kate,M.T., Stearne,L.E. & Bakker-Woudenberg,I.A. Amphotericin B liposomes with prolonged circulation in blood: in vitro antifungal activity, toxicity, and efficacy in systemic candidiasis in leukopenic mice. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy* **39**, 1954-1958 (1995).
342. Vanden Bossche, H. *Aspergillus* and Aspergillosis. Ed. Hardback; Book. New York; USA (1988).
343. VandenBergh, M.F.Q., Verweij,P.E. & Voss,A. Epidemiology of nosocomial fungal infections: Invasive aspergillosis and the environment. *Diagnostic Microbiology & Infectious Disease* **34**, 221-227 (1999).
344. Velegraki,A.; Kambouris,M; Sikiniotis G; Savala M; Mitroussia-Ziouva A; Legakis, NJ Identification of medically significant fungal genera by polymerase chain rection followed by restriction enzyme analysis. *Immunology and Medical Microbiology* **23**, 303-312 (1999).
345. Verweij,P.E., Dompeling,E.C., Donnelly,J.P., Schattenberg,A.V. & Meis,J.F. Serial monitoring of *Aspergillus* antigen in the early diagnosis of invasive aspergillosis. Preliminary investigations with two examples. *Infection* **25**, 86-89 (1997).
346. Verweij,P.E., Klont,R.R. & Donnelly,J.P. Validating PCR for detecting invasive aspergillosis. *British Journal of haematology*. **127**, 235-236 (2004).

347. Verweij,P.E. & Meis,J.F. Microbiological diagnosis of invasive fungal infections in transplant recipients. *Transplant Infectious Diseases*. **2**, 80-87 (2000).
348. Verweij,P.E., Oakley,K.L., Morrissey,J., Morrissey,G. & Denning,D.W. Efficacy of LY303366 against amphotericin B-susceptible and -resistant *Aspergillus fumigatus* in a murine model of invasive aspergillosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **42**, 873-878 (1998).
349. Verweij,P.E.; van den Bergh,M.F.; Rath,P.M.; De Pauw,B.E.; Voss; Meis,J.F. Invasive aspergillosis caused by *Aspergillus ustus*: case report and review. *Journal of Clinical Microbiology* **37**, 1606-1609 (1999).
350. Verweij,P., Brinkman,K., Kremer,H., Kullberg,B. & Meis,J. *Aspergillus* meningitis: diagnosis by non-culture-based microbiological methods and management. *Journal of Clinical Microbiology* **37**, 1186-1189 (1999).
351. Verweij,P. Erjavec,Z; Sluiter,W; Goessens,W; Rozenberg-Arska,M; Debets-Ossenkopp,YJ; Guiot,HFL; Meis,JFGM. Detection of antigen in sera of patients with invasive aspergillosis: intra- and interlaboratory reproducibility. *Journal of Clinical Microbiology* **36**, 1612-1616 (1998).
352. Verweij,P.; Latge,JP; Rijs,AJMM; Melchers,WJG; de Pauw,BE; Hoogkamp-Korstanje,JAA; Meis,JFGM. Comparison of antigen detection and PCR assay using bronchoalveolar lavage fluid for diagnosing invasive pulmonary aspergillosis in patients receiving treatment for hematological malignancies. *Journal of Clinical Microbiology* **33**, 3150-3153 (1995).
353. Verweij,P. Stynen,D; Rijs,AJMM; de Pauw,BE; Hoogkamp-Korstanje,JAA; Meis,JFGM. Sandwich enzyme-Linked immunosorbent assay compared with Pastorex latex agglutination test for diagnosing invasive aspergillosis in immunocompromised patients. *Journal of Clinical Microbiology* **33**, 1912-1914 (1995).
354. Vinas,F.C., King,P.K. & Diaz,F.G. Spinal *Aspergillus* osteomyelitis. *Clinical Infectious Diseases* **28**, 1223-1229 (1999).
355. von Eiff,M. Roos,N.; Schulten,R.; Hesse,M.; Zuhlsdorf,M.; van de Loo,J. Pulmonary aspergillosis: early diagnosis improves survival. *Respiration* **62**, 341-347. 1995.
356. Wallace,T.L. Paetznick,V.; Cossum,P.A; Lopez-Berestein,G.; Rex,J.H.; Anaissie,E. Activity of Liposomal Nystatin against disseminated *Aspergillus fumigatus* Infection in Neutropenic Mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **41**, 2238-2243 (1997).
357. Waller,J.; Letscher-Bru,V; Rey,D; Herbrecht,R; Koening,H; Mautort,E; Candolfi,E; Lang,JM Aspects mycologiques d'un abcès rénal à *Aspergillus fumigatus* chez un sidéen. *Journal of Mycology Medicine* **9**, 30-35 (1999).

358. Walsh,T. Lee,J; Lecciones,J.; Kelly,P.; Peter,J; Thomas,V.; Bacher,j; Pizzo,PAS. CH-39304 in prevention and treatment o disseminated candidiasis in persistently granulocytopenic rabbits. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **34**, 1560-1564 (1990).
359. Walsh,T.J.; Hiemenz,J.W.; Seibel,N.L.; Perfect,J.R.; Horwith,G.; Lee,L.; Silber,J.L.; DiNubile,M.J.; Reboli,A.; Bow,E.; Lister,J.; Anaissie,E.J. Amphotericin B lipid complex for invasive fungal infectious: analysis of safety and efficacy in 556 cases. *Clinical Infectious Diseases* **26**, 1383-1396 (1998).
360. Walsh,T.J.; Shoham,S.; Petraitiene,R.; Sein,T.; Schaufele,R.; Kelaher,A.; Murray,H.; Mya-San,C.; Bacher,J.; Petraitis,V. Detection of galactomannan antigenemia in patients receiving piperacillin-tazobactam and correlations between in vitro, in vivo, and clinical properties of the drug-antigen interaction. *Journal of Clinical Microbiology*. **42**, 4744-4748 (2004).
361. Walsh,T. Garret,K; Feuerstein,E; Girton,M; Allende,M; Bacher,j; Francesconi,A; Schaufele,R; Pizzo,PA. Therapeutic monitoring of experimental invasive pulmonary aspergillosis by ultrafast computerized tomography, a novel, noninvasive method for measuring responses to antifungal therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **39**, 1065-1069 (1995).
362. Waring, P. DNA fragmentation induced in macrophages by gliotoxin does not require protein synthesis and is preceded by raised inositol triphosphate levels. *The Journal of Biological Chemistry* **265**, 14476-14480 (1990).
363. Wark,P., Gibson,P. & Wilson,A. Azoles for allergic bronchopulmonary aspergillosis associated with asthma. *Cochrane. Database. Syst. Rev.* **3**, CD001108 (2004).
364. Watts,J. & Chandler,F. Pathology of Infectious Diseases Volume II. Connor,H., Chandler,F., Schwartz,D., Manz,H. & Lack,E. (eds.), pp. 933-941 (Appleton & Lange, Stamford, Conneticut,1997).
365. Wiederhold,N.P.; Kontoyiannis,D.P.; Chi,J.; Prince,R.A.; Tam,V.H.; Lewis,R.E. Pharmacodynamics of caspofungin in a murine model of invasive pulmonary aspergillosis: evidence of concentration-dependent activity. *Journal of Infection Diseases* **190**, 1464-1471 (2004).
366. Willems,M., Moshage,H., Nevens,F., Fevery,J. & Yap,S.H. Plasma collected from heparinized blood is not suitable for HCV-RNA detection by conventional RT-PCR assay. *Journal of Virological Methods* **42**, 127-130 (1993).
367. Williamson, E.C.; Millar,M.R.; Steward,C.G.; Cornish,J.M.; Foot; AB; Oakhill,A.; Pamphilon,D.H.; Reeves,B.; Caul,E.O.; Warnock,D.W.; Marks,D.I. Infections in adults undergoing unrelated donor bone marrow transplantation. *British Journal of Haematology* **104**, 560-568 (1999).

368. Wingard,J.R.; Kubilis,P.; Lee,L.; Yee,G.; White,M.; Walshe,L.; Bowden,R.; Anaissie,E.; Hiemenz,J.; Lister,J. Clinical significance of nephrotoxicity in patients treated with amphotericin B for suspected or proven aspergillosis. *Clinical Infectious Diseases* **29**, 1402-1407 (1999).
369. Winston,D.J. Emmanouilides,C.; Bartoni,K.; Schiller,G.J.; Paquette,R.; Territo,M.C. Elimination of *Aspergillus* infection in allogeneic stem cell transplant recipients with long-term itraconazole prophylaxis: prevention is better than treatment. *Blood* **104**, 1581 (2004).
370. Working,P.K. Amphotericin B colloidal dispersion. Pre-clinical review. *Chemotherapy* **45 Suppl 1**, 15-26 (1985).
371. Wright, J.R.; Immunomodulatory functions of surfactant. *Physiological Reviews* **77**, 931-962 (1997).
372. Wu,Z.Y., Su,Q., Zhou,Y.L., Ni,Y.M. & Ye,D.S. The diagnosis and surgical treatment for 56 cases with pulmonary and pleural aspergillosis. *Zhonghua Wai Ke. Za Zhi.* **42**, 614-616 (2004).
373. Wyde,P.R., Wilson,S.Z., Gilbert,B.E. & Smith,R.H. Protection of mice from lethal influenza virus infection with high dose-short duration ribavirin aerosol. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy* **30**, 942-944 (1986).
374. Yamaguchi,Y. Animal Models in Medical Mycology. Edited by Miyaji, M., pp. 101-111 Boca Raton, Florida; USA, (1987).
375. Yamakami,Y., Hashimoto, A., Tokimatsu, I. & Nasu, M. PCR, Detection of DNA specific for *Aspergillus* species in serum of patients with invasive aspergillosis. *Journal of Clinical Microbiology* **34**, 2464-2468 (1996).
376. Yamakami,Y. Hashimoto,A; Yamagata,E; Kamberi,P; Karashima,R; Nagai,H; Nasu,M. Evaluation of PCR for detection of DNA specific for *Aspergillus* species in sera of patients with various forms of pulmonary aspergillosis. *Journal of Clinical Microbiology* **36**, 3619-3623 (1998).
377. Yamanoi,T.; Shibano,K.; Soeda,T.; Hoshi,A.; Matsuura,Y.; Sugiura,Y.; Endo,K.; Yamamoto,T.. Intracranial invasive aspergillosis originating in the sphenoid sinus: a successful treatment with high-dose itraconazole in three cases. *Tohoku Journal Experimental Medicine* **203**, 133-139 (2004).
378. Yamazaki,T., Kume,H., Murase,S., Yamashita,E. & Arisawa,M. Epidemiology of visceral Mycoses: Analysis of data in Annual of the Pathological Autopsy Cases in Japan. *Journal of Clinical Microbiology* **37**, 1732-1738 (1999).
379. Yeo,S.F. & Wong,B. Current status of nonculture methods for diagnosis of invasive fungal infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**, 465-484 (2002).

380. Yokota,M., Tatsumi,N., Nathalang,O., Yamada,T. & Tsuda,I. Effects of Heparin on Polymerase Chain Reaction for Blood White Cells. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* **13**, 133-140 (1999).
381. Yoshida,M. [Monitoring and prophylaxis]. *Nippon Ishinkin. Gakkai Zasshi* **42**, 205-210 (2001).
382. Yu,J.J., Woloshuk,C.P., Bhatnagar,D. & Cleveland,T.E. Cloning and characterization of *avfA* and *omtB* genes involved in aflatoxin biosynthesis in three *Aspergillus* species. *Gene* **248**, 157-167 (2000).
383. Zhu,H., Qu,F. & Zhu,L.-H. Isolation of genomic DNAs from plants, fungi and bacteria using benzyl chloride. *Nucleic Acids Research* **21**, 5279-5280 (1993).