

# UNIVERSIDAD DE CUENCA



**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**“PREVALENCIA DE *CANDIDA ALBICANS*, *MALASSEZIA PACHIDERMATIS* Y  
*ASPERGILLUS FUMIGATUS* EN CONJUNTIVA OCULAR DE PERROS  
ATENDIDOS EN DOS CLÍNICAS VETERINARIAS DE LA CIUDAD DE CUENCA”**

Tesis de Grado previo a la obtención del  
Título de Médico Veterinario Zootecnista

AUTORA: Laura Daniela Erráez Carrión

DIRECTOR: Dr. Fredi Carpio

Cuenca - Ecuador

2016



## RESUMEN

La presente investigación estudia la prevalencia de *Candida Albicans*, *Malassezia Pachidermatis* y *Aspergillus Fumigatus* en asociación con la conjuntivitis en 87 perros, las muestras fueron tomadas de pacientes con y sin signos clínicos de conjuntivitis. Para la identificación de los microorganismos se siguió protocolos estándar con el uso de agar Sabouraud dextrosa. Además para *C. albicans* se utilizó agar harina de maíz para identificar blastosporas junto con pruebas de filamentación precoz y azúcares. Para *M. pachidermatis* se hicieron pruebas de catalasa, ureasa, azúcares y tween. Para medir *A. fumigatus* se utilizó el micrómetro ocular. Finalmente se realizó el análisis de prevalencia, la prueba de chi cuadrado, la prueba exacta de fisher y estimación de riesgo, considerando para que caso es necesario cada análisis; los resultados obtenidos indican que no existe asociación entre los hongos estudiados y la conjuntivitis clínica en pacientes caninos y como agregado a esta investigación se encontró que los perros con patrón facial braquiocefálico, tienen un 74.44% de riesgo de padecer conjuntivitis.

**PALABRAS CLAVES:** *CANDIDA ALBICANS*, *MALASSEZIA PACHIDERMATIS*, *ASPERGILLUS FUMIGATUS*, CONJUNTIVITIS, PATRÓN FACIAL, PERROS.



## ABSTRACT

This investigation, studies the “prevalence” of *Candida albicans*, *Malassezia pachidermatis* and *Asperigillus fumigatus* in association with conjunctivitis in 87 dogs, the samples were taken of patients with and without clinical signs of conjunctivitis. For the identification of the microorganisms, standars protocols were followed with the use of Sabouraud Dextrose Agar. Also in the case of *C. albicans* cornmeal agar was used to identify blastospores along with early filamentation and sugar test. For *M. pachidermatis* catalase, urease, sugars and tween test were used. For measure *A. fumigatus* ocular micrometer was used. Finally Prevalence Analysis, Chi square and Fisher's exact test and risk estimation were performed, considering wich case each test is required. The obtained results indicates that it does not exist any association between the studied fungae and the clinical conjunctivitis in canine patients and in addition to this research it was found that dogs with Brachycephalic facial pattern have a 74.44% risk of developing conjunctivitis.

**KEYWORDS:** CANDIDA ALBICANS, MALASSEZIA PACHYDERMATIS, ASPERGILLUS FUMIGATUS, CONJUNCTIVITIS, FACIAL PATTERN, DOGS.



## ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCION.....	11
1.1 OBJETIVOS:.....	20
1.1.1 Objetivo General.....	20
1.1.2 Objetivos Específicos: .....	20
1.1.3 Pregunta de Investigación:.....	20
2. REVISIÓN DE LITERATURA .....	21
2.1. Anatomía del ojo.....	21
2.2. Estructuras oculares .....	21
2.2.1. Cornea.- .....	21
2.2.2. Iris.-.....	21
2.2.3. Retina.-.....	21
2.2.4. Párpados.....	22
2.2.5. Tercer Párpado.- .....	22
2.2.6. Conjuntiva.....	22
2.3. Conjuntivitis.....	25
2.4. Flora Fúngica .....	32
2.5. Flora Fúngica Anormal.....	32
2.5.1. <i>Candida Albicans</i> .- .....	32
2.5.2. <i>Malassezia pachidermatis</i> .....	34
2.5.3. <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	36



3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
3.1. Materiales.....	40
3.2. Métodos: .....	43
3.2.1 Diseño de la investigación .....	43
3.2.2 Lugar del ensayo.....	43
3.2.3 Población, muestra y muestreo de campo.....	43
3.2.4 Metodología para la investigación.....	44
- Toma, conservación, transporte y recepción de las muestras.....	44
- Tipificación de <i>Candida albicans</i> .....	47
- Tipificación de <i>Malassezia pachidermatis</i> .....	50
- Tipificación de <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	52
4. RESULTADOS .....	56
4.1. Análisis de agentes por presencia o no de conjuntivitis .....	57
4.2. Análisis del agente por procedencia de casos.....	59
4.3. Análisis del agente por condición genética.....	61
4.4. Análisis de conjuntivitis por condición genética .....	63
4.5. Análisis de agentes por rango de edad.....	64
4.6. Análisis de conjuntivitis por rangos de edad .....	66
4.7. Análisis de los agentes por patrón facial. ....	68
4.8. Análisis de conjuntivitis por patrón facial .....	70
5. DISCUSION.....	72
6. CONCLUSIONES.....	74
7. RECOMENDACIONES .....	75



8. BIBLIOGRAFÍA .....	76
9. GLOSARIO .....	81
10. ANEXOS .....	82
10.1 Matriz de conceptualización de variables .....	83
10.2 Árbol para el Planteamiento del Problema. ....	84
10.3. Muestreo por casos oftálmicos anuales. ....	85
10.4 Cálculo de recepción de muestras .....	85
10.5 Hoja de Campo .....	86
10.6. Anexo: Hoja de laboratorio para <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	88
10.7. Anexo: Hoja de laboratorio para <i>Candida albicans</i> .....	89
10.8. Anexo: Hoja de laboratorio para <i>Malassezia Pachydermatis</i> .....	90
10.9. Croquis de las Clínicas de recepción de muestras .....	91
10.10. Registro Fotográfico De La Investigación.....	92



## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1:</b> Árbol para el Planteamiento del Problema.....	84
<b>Gráfico 2:</b> Hoja de recolección de datos para toma de muestra de mucosa conjuntival. ...	87
<b>Gráfico 3:</b> Hoja de laboratorio para registrar <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	88
<b>Gráfico 4:</b> Hoja de laboratorio para registrar <i>Candida albicans</i> . ....	89
<b>Gráfico 5:</b> Hoja de laboratorio para registrar <i>Malassezia Pachydermatis</i> .....	90
<b>Gráfico 6:</b> Clínica Veterinaria Mora.....	91
<b>Gráfico 7:</b> Clínica Veterinaria Clinican.....	91



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Taxonomía de <i>Aspergillus fumigatus</i>	54
<b>Tabla 2:</b> Prevalencia, frecuencias observadas y esperadas de Chi cuadrado de agentes para conjuntivitis existente o no.	57
<b>Tabla 3:</b> Valores del Test de probabilidad exacta de Fisher por agente e interpretación	57
<b>Tabla 4:</b> Prevalencia del agente por procedencia de casos.	59
<b>Tabla 5:</b> Valores de test de probabilidad exacta de Fisher por procedencia de casos	59
<b>Tabla 6:</b> Prevalencia de agentes por condición genética.	61
<b>Tabla 7:</b> Valor de test de probabilidad exacta de Fisher por condición genética.	61
<b>Tabla 8:</b> Prevalencia, frecuencias observadas y esperadas de Chi cuadrado.	63
<b>Tabla 9:</b> Valores de Chi cuadrado para conjuntivitis por condición genética.	63
<b>Tabla 10:</b> Prevalencia de agentes por rango de edad.	64
<b>Tabla 11:</b> Valores de test de Fisher, de agentes por rangos de edad.	64
<b>Tabla 12:</b> Prueba de significación de conjuntivitis por rangos de edad.	66
<b>Tabla 13:</b> Valores de Chi cuadrado para conjuntivitis por rangos de edad.	66
<b>Tabla 14:</b> Prevalencia de agentes por estructura del patrón facial.	68
<b>Tabla 15:</b> Valores de test de Fisher para agentes por patrón facial.	68
<b>Tabla 16:</b> Prevalencia, frecuencias observadas y esperadas para a de Chi cuadrado.	70
<b>Tabla 17:</b> Valores de Chi cuadrado de conjuntivitis por patrón facial.	70
<b>Tabla 18:</b> Estimación de riesgo	70
<b>Tabla 19:</b> Matriz de conceptualización y operacionalización de las variables.	83
<b>Tabla 20:</b> Pacientes caninos en dos Clínicas de la ciudad de Cuenca.	85
<b>Tabla 21:</b> Muestras	86



## ÍNDICE DE IMÁGENES

<b>Imagen 1:</b> Tubo con agua destilada para recolección de muestras.....	92
<b>Imagen 2:</b> Toma de muestra a nivel de conjuntiva ocular.....	92
<b>Imagen 3:</b> Recepción de muestras.....	92
<b>Imagen 4:</b> Siembra de la muestra en ASD.....	92
<b>Imagen 5:</b> Observación de colonias de <i>Candida albicans</i> .....	93
<b>Imagen 6:</b> Observación de colonias de <i>Malassezia pachidermatis</i> .....	93
<b>Imagen 7:</b> Observación de colonias de <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	93
<b>Imagen 8:</b> Disolución de una colonia en el suero fisiológico.....	93
<b>Imagen 9:</b> Tinción de GRAM.....	93
<b>Imagen 10:</b> Tinción con azul de lactofenol para mohos filamentosos.....	93
<b>Imagen 11:</b> Observación de <i>Candida albicans</i> en el microscopio.....	93
<b>Imagen 12:</b> Prueba de azúcares para <i>C. albicans</i> .....	93
<b>Imagen 13:</b> Cultivo en AHM para filamentación precoz y presencia de clamidosporas...93	93
<b>Imagen 14:</b> Tubos con suero sanguíneo, para prueba de filamentación precoz.....	93
<b>Imagen 15:</b> Observación de filamentos con presencia de Clamidosporas de <i>C. Albicans</i> .93	93
<b>Imagen 16:</b> Observación en el microscopio de Clamidosporas de <i>C albicans</i> .....	93
<b>Imagen 17:</b> Tinción de Gram para filamentación precoz.....	93
<b>Imagen 18:</b> Observación de blastosporas de <i>M. pachidermatis</i> .....	93
<b>Imagen 19:</b> Pruebas de tipificación para <i>M pachidermatis</i> .....	93
<b>Imagen 20:</b> Prueba de Catalasa positiva <i>M. pachidermatis</i> .....	93
<b>Imagen 21:</b> Prueba positiva de hidrólisis de la urea, para <i>M. pachidermatis</i> .....	93
<b>Imagen 22:</b> Prueba de asimilación de azúcares positiva a <i>M. pachidermatis</i> .....	93



**Imagen 23:** Prueba de tween positivo para *M. pachidermatis*.....93

**Imagen 24:** Observación mediante microscopio. ....93

**Imagen 25:** Medición de *Aspergillus fumigatus* gracias al micrómetro ocular.....93



## CLAUSULA DE PROPIEDAD

Yo Laura Daniela Erráz Carrión, autora de la tesis titulada “**Prevalencia de *Candida albicans*, *Malassezia pachidermatis* y *Aspergillus fumigatus* en conjuntiva ocular de perros atendidos en dos clínicas veterinarias de Cuenca**”, declaro que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación, son de mi exclusiva responsabilidad.

Cuenca, 2016

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Laura Daniela Erráz Carrión".

Laura Daniela Erráz Carrión

CI: 0105569412



## CLAUSULA DE AUTORIZACIÓN

Yo Laura Daniela Erráez Carrión, autora de la tesis titulada “**Prevalencia de *Candida albicans*, *Malassezia pachidermatis* y *Aspergillus fumigatus* en conjuntiva ocular de perros atendidos en dos clínicas veterinarias de Cuenca**”, reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su reglamento de Propiedad Intelectual, para publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este un requisito para la obtención de mi título de **MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afectación alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autora.

Cuenca, 2016

Laura Daniela Erráez Carrión

CI: 0105569412



## CERTIFICACIÓN

El tribunal de tesis de grado certifica que fue aprobada la presente investigación titulada “**Prevalencia de *Candida albicans*, *Malassezia pachidermatis* y *Aspergillus fumigatus* en conjuntiva ocular de perros atendidos en dos clínicas veterinarias de Cuenca**”, realizada por la señora Laura Daniela Erráez Carrión.

Dr. Saúl Landívar

**PRESIDENTE DEL TRIBUNAL**

Dra. Cristina Bernardi

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

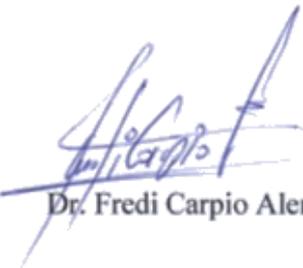
Dr. Jaime Maldonado

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**



## CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo de tesis titulado **“Prevalencia de *Candida albicans*, *Malassezia pachidermatis* y *Aspergillus fumigatus* en conjuntiva ocular de perros atendidos en dos clínicas veterinarias de Cuenca”**, ha sido elaborado de forma responsable por la señora Laura Daniela Erráez Carrión.



Dr. Fredi Carpio Alemán

DIRECTOR DE TESIS



## CERTIFICACIÓN

El delegado del Departamento de Estadística de la Facultad de Ciencias Agropecuarias certifica que la tesis titulada **“Prevalencia de *Candida albicans*, *Malassezia pachidermatis* y *Aspergillus fumigatus* en conjuntiva ocular de perros atendidos en dos clínicas veterinarias de Cuenca”**, realizada por la señora Laura Daniela Erráz Curi ha sido revisada y aprobada.

  
Dr. Guillermo Guevara Viera

**DELEGADO DEL DEPARTAMENTO DE ESTADÍSTICA**



## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios, por sus bendiciones, por brindarme el don de la fortaleza y por acompañarme en mis buenos y malos momentos, al apoyo de mi esposo y de mi hijo, por ser mi motivación a diario.

Dejo constancia de mi imperecedera gratitud a la Facultad de Ciencias Agropecuarias por facilitarme el espacio para mi investigación, a la Doctora María Estela Encalada y al Doctor Fredi Carpio por guiarme durante todo el proceso. A la doctora Cristina Bernardi, a los Doctores Saúl Landivar y Jaime Maldonado, por el tiempo y el apoyo brindado.

Agradezco a todos quienes pusieron su granito de arena, todo su apoyo me ayudó en la búsqueda de mi sueño.

Daniela



## DEDICADO

A mi madre Laura, mi ángel, mi ejemplo de lucha, perseverancia, honestidad e integridad, mi padre Alejandro que fomentó en mis hermanos y en mí, cumplir nuestros sueños, levantarnos de nuestras caídas y seguir hacia delante. A mis hermanos Christian, Joselo y Cristina, que han sido mi ejemplo a seguir, profesionales y excelentes personas. De manera especial a mi esposo Juan, a mi hijo Agustín y a los que vendrán, les dedico este logro que es el inicio de muchos más.

Daniela



## 1. INTRODUCCION

Las levaduras y mohos han tomado un papel muy importante en el diagnóstico clínico en Medicina Veterinaria pero debido a la escasa o nula información a nivel oftalmológico sobre el tema en el país y por investigaciones descritas en otros países en donde se ha encontrado más del quince por ciento de estos hongos a nivel de conjuntiva y por la frecuencia e importancia patológica, se eligió a *Candida albicans*, *Malassezia pachidermatis* y *Aspergillus fumigatus* como posibles agentes fúngicos causantes de conjuntivitis en perros (Oriá *et al.*, 2011).

Enfermedades inmunosupresoras, digestivas y sistémicas involucraron a *C. Albicans* en infecciones a nivel ocular, además de aparecer posteriormente a un tratamiento prolongado de antibiótico tópico del ojo (Linek, 2004). Otra levadura de gran importancia veterinaria es *M. pachidermatis* que apareció por primera vez en el ojo de un perro en 2004 y fue estudiada con mayor profundidad encontrando un positivo de treinta y ocho muestras cultivadas (Prado, 2008), abriendo una gran incógnita dentro de la rama oftalmológica. Por último el estudio un moho filamentoso de mucha importancia y patogenicia, por ser la segunda forma más común de infección por hongos es el *A. fumigatus* (Moye-Rowley, 2015), un hongo que se encuentra fácilmente en ambientes húmedos en frutas e incluso en la flora normal del saco conjuntival, de ahí la importancia de su estudio en este órgano (Verneuil, 2013).

La enfermedad ocular más comúnmente diagnosticada en la práctica general es la conjuntivitis, las etiologías de esta enfermedad son varias y entre los factores de riesgo están las sustancias químicas como medicamentos y desinfectantes, cuerpos extraños o



lesiones, que producen desestabilización en el ambiente conjuntival permitiendo la colonización de bacterias, virus y hongos (Garcia, 2011).

El desarrollo del tema de investigación “Prevalencia de *Candida albicans*, *Malassezia pachidermatis* y *Aspergillus fumigatus* en conjuntiva ocular de perros atendidos de dos Clínicas Veterinarias de Cuenca”, se basa en llegar a un diagnóstico acertado mediante cultivos y pruebas de laboratorio para emitir un tratamiento oportuno y prevenir así los efectos que producirían estos hongos en la conjuntiva ocular. Conociendo que la conjuntivitis es una de las enfermedades más comunes por la exposición permanente del ojo al medio ambiente.

Al tener una información limitada sobre los hongos como agentes causales de la conjuntivitis, se podrían emitir diagnósticos erróneos y tratamientos incorrectos, conociendo que estos mohos y levaduras son microorganismos en su mayoría oportunistas que colonizan la conjuntiva ocular, después de una inflamación e infección, es por esto que se propone incrementar el diagnóstico laboratorial para identificar mohos y levaduras a nivel oftalmológico en la Medicina Veterinaria local para prevenir así las conjuntivitis crónicas, los tratamientos antibióticos prolongados con reincidencias a causa de un diagnóstico inconcluso y de esta manera garantizar la integridad ocular del paciente.



Para el presente trabajo investigativo se han planteado los siguientes objetivos:

## **1.1 OBJETIVOS:**

### **1.1.1 Objetivo General**

Identificar *Candida Albicans*, *Malassezia Pachidermatis* y *Aspergillus Fumigatus* en perros con o sin conjuntivitis ocular por medio de cultivos micóticos, para conocer la prevalencia de estos patógenos oportunistas en dos Clínicas Veterinarias de la ciudad de Cuenca.

### **1.1.2 Objetivos Específicos:**

- Aislar y tipificar agentes fúngicos oportunistas de la mucosa conjuntival bulbar, palpebral y del tercer parpado, mediante métodos y técnicas micológicas
- Identificar la población de casos clínicos con conjuntivitis asociada a estos hongos de perros en las siguientes instancias: Clínica Veterinaria de especialidades Clinican y Clínica Veterinaria Mora
- Relacionar los casos positivos de levaduras y mohos filamentosos con raza, edad y en patrones faciales de perros braquicéfalos y no braquicéfalos, a partir de las muestras obtenidas de las dos clínicas veterinarias de la ciudad de Cuenca.

### **1.1.3 Pregunta de Investigación:**

- ¿La presencia de *Candida Albicans*, *Malassezia Pachidermatis* y *Asperigillus Fumigatus* es causa de conjuntivitis en pacientes caninos de dos clínicas de la ciudad de Cuenca?



## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Anatomía del ojo

El ojo es un órgano noble, debido a su exposición es propenso a riesgos de contaminaciones e infecciones. Anatómicamente el globo ocular está compuesto por: cornea, iris, retina, párpados, tercer párpado, conjuntiva, además de los anexos oculares, tales como los músculos y las glándulas, que actúan sobre el globo ocular funcional (Leite *et al.*, 2013).

### 2.2. Estructuras oculares

**2.2.1. Cornea.-** A la córnea se le considera la capa frontal de la túnica fibrosa, tiene la característica de ser transparente, se la conoce como la capa refractiva más poderosa del ojo. La transparencia y la curvatura regular que la caracterizan son esenciales para enfocar la luz sobre la retina. Por ésta razón, mantener intacta la integridad de la córnea es esencial. Esta estructura carece de vascularización, así que recibe nutrientes a través de los vasos del limbo y del líquido de la cámara anterior (Leite *et al.*, 2013).

**2.2.2. Iris.-** Está formado por una red de vasos sanguíneos, tejido conectivo, fibras musculares y los nervios. Como el iris se encuentra en contacto con el lente toma la misma forma curvada de su superficie anterior, también está presente un epitelio que a su vez posee una gran cantidad de pigmento de melanina. Este pigmento puede encontrarse en otras zonas del ojo solo frente a una patología o una alteración (da Cunha, 2008).

**2.2.3. Retina.-** “Junto con el nervio óptico derivan del prosencefalo y se conectan con la corteza visual mediante el quiasma óptico”. La retina está constituida por fotorreceptores localizados en una compleja capa de células especializadas llamadas



bastones y conos. Estas estructuras definen los colores monocromáticos que lo canes poseen, están presentes también los vasos retinales que provienen del sistema ciliar (García, 2011).

**2.2.4. Párpados.-** Los párpados son pliegues dorsales y ventrales de piel tapizados por conjuntiva palpebral estos forman la hendidura palpebral en la que se encuentra el globo ocular. En la mayoría de las especies el párpado superior es más móvil que el párpado inferior. Además de esto el párpado proporciona sostén, y además contienen músculos lisos y estriados, así como una rica vascularización e inervación (Turner, 2010).

El párpado es la extensión de piel de la cara y en la zona de la órbita forma una capa delgada que cubre el globo ocular, teniendo un párpado superior y uno inferior, estos protegen a los ojos de la incidencia de la luz solar y de otros factores externos como cuerpos extraños y sustancias que pueden producir irritación (Oriá *et al.*, 2011).

**2.2.5. Tercer Párpado.-** Es una membrana móvil llamada membrana nictitante, es de estructura semirrígida y cumple la función de protección, esta contiene una glándula superficial, resulta ser un pliegue cóncavo y es la continuación de la conjuntiva además produce líquido que servirá de película lagrimal precorneal (García, 2011).

Cuando encontramos eversión bilateral del párpado y tercer párpado se puede sospechar de una conjuntivitis refractaria que puede estar acompañada de queratitis ulcerativa. Los factores mecánicos que contribuyen a esto pueden ser el cabello aberrante, triquiasis, ditriquiasis o un cuerpo extraño (Martin, 2010).

**2.2.6. Conjuntiva.-** Se compone de tres zonas, la palpebral, bulbar y del tercer párpado, la conjuntiva es una parte muy importante del ojo a la que a menudo no se le presta la



suficiente atención. Las enfermedades de la superficie ocular son muy frecuentes en la práctica general y resulta fundamental conocer el grado de afectación de la conjuntiva con el fin de determinar si se trata de una simple lesión superficial, como una *conjuntivitis* (Turner, 2010).

Para el diagnóstico de una conjuntivitis se debe hacer un análisis de su historia, existencia de cirugías, uso de colirios, infección respiratoria reciente, traumatismos etc, registrados los antecedentes, se puede seguir con el estudio ocular en donde serán indicativos los signos clínicos presentes, además se realizarán pruebas físicas en donde se incluya luz, lupa, tinciones y también las pruebas de laboratorio como citologías, cultivos, biopsias entre otras (Martín, 2010).

La revisión se debe realizar de fuera a dentro, iniciando con los párpados en donde se puede encontrar secreción, eritema, costras, cierre y grado de exposición, una piel con vesículas cutáneas etc. Para revisar la conjuntiva es necesario evertir los párpados para buscar hiperemia, secreciones o cuerpos extraños. Al explorar la córnea se puede encontrar inyección ciliar y turbidez corneal; con fluorescencia y con una luz azul se puede apreciar erosiones, punteados, úlceras, etc. En la cámara anterior, el iris y la pupila serán revisadas mediante la verificación del reflejo fotomotor (Ruiz & Salguero, 2003).

A continuación se describirán algunas de las más importantes técnicas de diagnóstico de enfermedad ocular. Las distintas superficies conjuntivales deben ser examinadas por medio de la **luz difusa con ampliación**, método que nos ayudara a la observación de hiperemia, quemosis, un desarrollo folicular, presencia de exudación con su tipo de exudado, lesiones y otras estructuras afectadas como los anexos oculares (Fernández, 2012) (Zhao *et al.*, 2015).



Al encontrar los signos del llamado ojo rojo se puede utilizar el **Test de Schirmer** (STT) que servirá para evaluar la presencia de un ojo seco, y evitar o diagnosticar un problema más severo que la conjuntivitis como es la queratoconjuntivitis seca. Este método se aplica antes de instilar gotas tópicas o colirios (Martin, 2010).

Cuando se requiere hacer un diagnóstico etiológico específico se aplica la técnica del **Raspado conjuntival** que se realiza con una espátula, bastoncillo de algodón, o un cepillo de citología, luego se tiñen con Giemsa o bien con una tinción rápida para realizar la citología y la tinción de Gram (Fernandez, 2012).

Al hacer los **cultivos biológicos** se debe considerar que la toma de la muestra se debe realizar antes de que se le administre anestésicos tópicos al paciente debido a que estos medicamentos tienen una acción bactericida, por otro lado también evitar la toma de la muestra luego de aplicar la tinción de rosa de bengala debido a su acción viricida. Al tomar la muestra con los hisopos estériles, se deben colocar inmediatamente en el medio de transporte (Maggs *et al.*, 2009).

Cuando se han identificado los signos clínicos de conjuntivitis, se puede recurrir a un cultivo para conocer al agente causal de la inflamación o infección conjuntival, sobre todo en presencia de signos de secreción purulenta grave, que sea recurrente o crónica, cuando exista resistencia al tratamiento, en presencia de úlceras corneales y cuando exista un infiltrado corneal que sea sospechoso de la infección (Ruiz & Salguero, 2003).

La conjuntiva puede ser comprometida estructuralmente por una infección cuando hay “adherencia, penetración, invasión, persistencia y la replicación de microorganismos” que tienen un potencial de patogenicidad, esto se da por desórdenes del sistema inmunológico es decir cuando el mecanismo de defensa ha fallado ya sea por bacterias, cuerpo extraño o factores ambientales (Oriá *et al.*, 2011).



La superficie ocular es colonizada por microorganismos no patógenos que ayudan en su defensa y conjuntamente con factores humorales, impiden la colonización de microorganismos que si son patógenos. Sin embargo, pueden producirse cambios, principalmente por la disminución de la inmunidad local y sistémica del animal, provocando una inflamación o infección de la conjuntiva, ocasionadas por la misma flora normal, que darán paso a otros de tipo oportunista (Ferreira *et al.*, 2009).

Se puede encontrar una infección residual o persistente en las glándulas de Meibomio que se puede extender a la conjuntiva, por lo que se le considera una zona frecuente de irritación que puede llegar a provocar una conjuntivitis crónica. Por otro lado también se puede observar epífora crónica o una secreción mucopurulenta conjuntival de forma unilateral, misma que puede deberse a una obstrucción en los conductos lagrimales por lo que debería ser diferenciada de la conjuntivitis (Martin, 2010).

Un factor predisponente para afecciones conjuntivales es la anatomía craneal del perro, como es el caso de una investigación en donde encontraron algunas de las razas con predisposición a queratoconjuntivitis seca como el bull dog, pug, shitzu entre otras, las razas nombradas pertenecen al grupo de anatomía braquicéfala, que en su característica de interés ocular están sus ojos saltones que están expuestos a factores ambientales (Rodriguez *et al.*, 1991).

**2.3. Conjuntivitis.-** A la conjuntivitis se le describe como una inflamación no específica de la conjuntiva bulbar y/o párpado que puede ser causada por diversos agentes etiológicos. En los perros, las conjuntivitis son por lo general secundarias. “Los principales signos clínicos de conjuntivitis aguda son hiperemia conjuntival, quemosis, lagrimeo y



exudado”. Se pueden encontrar folículos linfoides hiperplásicos y engrosamiento de la conjuntiva en enfermedad crónica (da Cunha, 2008).

Esta inflamación puede ocurrir como una condición propia de la conjuntiva o junto con otras condiciones oculares más serias. Se puede observar en animales de cualquier edad y puede ser primaria, causada por una infección de microorganismos o secundaria asociada con el daño mecánico de entropión. La descarga que produce puede variar desde lagrimeo seroso hasta una secreción de material purulento. En su mayoría las conjuntivitis tienden a ser irritantes y con muy poco dolor o ausente de ello (Maggs *et al.*, 2009).

La conjuntivitis es una enfermedad ocular que se presenta con mayor frecuencia en las consultas médicas, siendo la conjuntivitis crónica la de mayor frustración en cuanto al tratamiento, ya que el diagnóstico etiológico suele ser presuntivo y no se basa en los resultados de laboratorio. La mayoría de los oftalmólogos veterinarios y médicos no tienen mucho éxito en llegar a un diagnóstico definitivo con conjuntivitis crónica, a pesar de pruebas exhaustivas, ya que los signos de las conjuntivitis se asemejan (Fernandez, 2012).

La conjuntivitis es una enfermedad que puede amenazar la integridad y destruir las estructuras externas de los ojos, causar una enfermedad tisular significativa, con este criterio se propone que el protocolo de diagnóstico que debe enfocarse a encontrar el agente causal, iniciando por conocer que, puede deberse a varios factores físicos, químicos, biológicos como lo cita Martín, (2007).

Al diagnosticar conjuntivitis se ha encontrado comúnmente un aumento en el número de células epiteliales descamadas que en ocasiones aparecen degeneradas o queratinizadas cuando hay procesos crónicos. De la misma forma se han encontrado células gigantes dos a tres veces mayores a las células conjuntivales normales, a la vez que puede aparecer



alguna célula plasmática. Las células conjuntivales muestran signos de degeneración tales como cariólisis o cariorrexis (Rodríguez *et al.*, 1991).

Los signos comúnmente reconocibles de conjuntivitis son el enrojecimiento, la inyección conjuntival o una coloración roja intensa en el fondo, se observa también una inyección ciliar que es un anillo hiperémico alrededor de la córnea, un hiposfagma que es la colección de sangre subconjuntival que se presenta en la segunda o tercera semana (Ruiz & Salguero, 2003).

El enrojecimiento de la conjuntiva o hiperemia es característico de las conjuntivitis, este enrojecimiento puede ser variable en severidad. La hiperemia de la conjuntivitis es difusa y más severa hacia el fondo del saco conjuntival se puede situar incluso en la conjuntiva palpebral, pero habrá ocasiones en donde comprometa todas las superficies conjuntivales (Martin, 2010).

Al observar secreción ocular se toma en cuenta las características de esta, para aproximarse al diagnóstico del agente, es así que al tener una secreción ausente o mínima pero acuosa se considera la presencia de una conjuntivitis viral y alérgica aguda, cuando es mucopurulenta podría tratarse de una conjuntivitis catarral. Cuando la secreción es mucosa sería una conjuntivitis alérgica estacional u ojo seco y al tener una secreción purulenta sería por presencia de bacterias (Ruiz & Salguero, 2003), (Martin, 2010)

El edema conjuntival o quemosis aparece en las conjuntivitis agudas, este signo se manifiesta con pliegues gruesos, que se hacen notar al frotar el párpado contra la conjuntiva bulbar, esta edematización se puede deber, probablemente a una retención de líquidos (Martin, 2010).

Se pueden definir varios tipos de conjuntivitis basados en su etiología ya sean agudas provocada por bacterias como el *S. Aureus*, hiperaguda o purulentas a causa de gonococo,



*N. meningitis, clamydia*, por inclusión viral como el adenovirus etc., o crónicas que pasan de cuatro semanas, estas pueden ser causadas por afecciones catarrales crónicas, tracoma o algún molusco contagioso (Ruiz & Salguero, 2003)

Un síntoma de conjuntivitis es el dolor que se da como la sensación de presencia de un cuerpo extraño que es característica en conjuntivitis infecciosa (Ruiz & Salguero, 2003), los perros no suelen demostrar molestia a diferencia del gato en donde incluso se podría encontrar blefarospasmo, en el caso de presentarse se debe descartar en primer lugar un dolor de córnea mediante la tinción con fluroseina (Martin, 2010).

Otro síntoma es el picor, mismo que se nota con la acción del paciente al frotarse los ojos con las patas, y es clásico que en presencia de una conjuntivitis alérgica, también se pueden considerar las infección e inflamaciones combinadas, presentándose estos dos síntomas se dificulta el diagnóstico, ya que se presenta una conjuntivitis alérgica e infecciosa (Ruiz & Salguero, 2003).

Existe una infinidad de etiologías para diagnóstico de conjuntivitis entre ellas se describirán las principales como la **Conjuntivitis inmunomediada o alérgica** que puede deberse a una alergia estacional, a una queratoconjuntivitis atópica, conjuntivitis de contacto por colirios (Torres *et al.*, 2009). Estas conjuntivitis son de origen irritativo en donde las células epiteliales descamadas aumentan, hay un incremento de linfocitos y células plasmáticas e incluso, de células queratinizadas y calciformes. Esta irritación puede ser un factor desencadenante de secreción serosa dado por las glándulas salivales (Ruiz & Salguero, 2003).

El moco es un factor necesario para la película lagrimal, en las cantidades adecuadas y la manifestación grave de secreción del mismo dependerá del tipo de irritante, el cual



podría producir un exudado purulento, asociado con una infección bacteriana. En general este tipo de conjuntivitis es la más tratada con esteroides (Martin, 2010).

En cuanto a la **conjuntivitis eosinofílica** se puede derivar de procesos alérgicos o inmunomediados. Al realizar los raspados para su diagnóstico es característico observar una gran cantidad de granulocitos eosinófilos de forma persistente junto con neutrófilos no degenerados. “Es fácil además la detección de gránulos libres por el fondo debido a la degranulación de los eosinófilos al recoger las muestras” (Fernandez, 2012).

La **Conjuntivitis actínica** tiene la característica en las especies con falta de pigmentación en los bordes del tercer párpado están predisuestos a la blefaritis solar y conjuntivitis, lo que sería un factor predisponente en este tipo de conjuntivitis (Martin, 2010).

En la **conjuntivitis linfoplasmocitaria** se detecta una gran y marcada población de células de origen linfoide donde predominan los linfocitos adultos y pequeños junto con células plasmáticas e incluso la presencia de células Mott, estas últimas son un tipo de células plasmáticas relacionadas con estímulos antigénicos inmunomediados. Esta conjuntivitis afecta fundamentalmente a la raza del Pastor Alemán (Fernandez , 2012).

La **conjuntivitis Leñosa** es una forma rara de conjuntivitis membranosa de tendencia crónica, con enrojecimiento conjuntival que progresa a pseudomembranas que se forman en la superficie conjuntival palpebral. Un diagnóstico de la conjuntivitis leñosa se hizo por los hallazgos de histopatología y la presentación clínica del primer caso reportado en un perro con deficiencia de plasminógeno y conjuntivitis leñosa con un período de supervivencia largo y 2 años de seguimiento. La enfermedad tiene implicaciones sistémicas como oral, respiratoria y renal (Torres *et al.*, 2009) (Martin, 2010).



Las **conjuntivitis tóxicas** se dan por el uso prolongado de colirios, resultado de diagnósticos incompletos y por conjuntivitis reincidentes que se han tratado varias veces sin indagar la causa principal (Ruiz & Salguero, 2003).

Las **conjuntivitis virales** se presentan en los perros diagnosticados con moquillo canino, adenovirus, herpesvirus, Mycoplasma (Martin, 2010). En la citología se produce un aumento en el número de linfocitos, los cuales se acompañan de células gigantes y algunos neutrófilos por la sobreinfección bacteriana. Aparece moco y aumento de células caliciformes (Rodriguez *et al.*, 1991).

En cambio las **conjuntivitis bacterianas** se caracterizan por la presencia de moco y fibrina. Microscópicamente las células conjuntivales también presentan signos de degeneración. Las bacterias no siempre son visibles, aunque los cultivos bacteriológicos son positivos. Entre las bacterias más observadas están, Staphylococcus Aureus, Mycoplasma spp, Bacillus spp., Corynebacterium spp., S. aureus Alpha-hemolítico, Estreptococos Bacillus spp., Escherichia coli (Martin, 2010), (Hofling *et al.*, 2002), (Rodriguez *et al.*, 1991).

El tema de estudio se basa en la **conjuntivitis micótica** que son una causa rara de conjuntivitis en el perro y el gato, aunque la importancia de encontrar elementos micóticos en la conjuntiva es desconocida, en estudios de perros sanos se ha encontrado de un 12% a un 22% de positivos para hongos. Siendo el entorno un factor determinante por la presencia de la flora transitoria (Tarumoto, 2014) (Martin, 2010).

Los animales que presentan una conjuntivitis o queratitis micótica, han sido expuestos a una gran variedad de antibióticos tópicos, o mezclas de preparados antibiótico-esteroidales, que han dado una mejoría temporal, con estabilidad ocular o con recaída. Se debe considerar que la conjuntivitis fúngica primaria es rara (Lopez, 2013).



Los hongos provocan una respuesta fundamentalmente neutrofílica en procesos agudos y en casos crónicos aumentan también los linfocitos y los macrófagos. Lo característico de estas infecciones es la presencia en las extensiones de elementos fúngicos cuya morfología varía según el microorganismo implicado (Rodríguez *et al.*, 1991).

Su terapia se basa en un antifúngico tópico oftálmico y el único tratamiento efectivo comprobado y aprobado por los Estados Unidos por sus pruebas de susceptibilidad es el antifúngico llamado **Natamicina** (Martin, 2010). Se puede encontrar una solución oftálmica al 5% y resulta muy eficaz frente a una gran variedad de hongos, como *Candida*, *Aspergillus*, *Cefalosporium*, *Fusarium* y *Penicilium spp* (Maggs *et al.* 2009)

Otras opciones que han sido bien toleradas son las preparaciones de miconazol por vía intravenosa, este medicamento también ha sido usadas de forma eficaz en preparaciones oftálmicas tópicas (Maggs *et al.*, 2009). Los fármacos que combaten las enfermedades fúngicas oculares son los mismos agentes terapéuticos que se utilizan para la dermatomicosis, como los azoles, el itraconazol con DMSO 104 y el fluconazol que también se ha utilizado tópicamente para la queratitis micótica (Martin, 2010).

Ninguno de los medicamentos conocidos en la actualidad es suficiente de manera individual, su uso prolongado puede originar graves efectos adversos. La inmunoterapia con alérgenos ha demostrado seguridad y eficacia en diferentes ensayos clínicos controlados en procesos alérgicos, como: asma, rinitis y conjuntivitis, que disminuyen los síntomas del paciente y la necesidad de medicamentos, por ello en la actualidad, es el único tratamiento reconocido que modifica la evolución de estas enfermedades (Maggs *et al.*, 2009).



## 2.4. Flora Fúngica

Los hongos que pueden encontrarse en circunstancias normales en el ojo del perro y de otras especies son *Aspergillus spp.*, *Trichoderma spp.*, *Penicillium spp.*, entre otros. A pesar de que muchos de estos se comportan como dimorfos, provocando micosis sistémicas y siendo oportunistas, pueden ser aislados no solo en enfermedades oculares sino incluso en ojos sanos, por la presencia de contaminación ambiental (Arenas, 2008) (Hernandez *et al.*, 2010)

## 2.5. Flora Fúngica Anormal

**2.5.1. *Candida Albicans*.**- El género *Candida* está constituido por estructuras levaduriformes que son organismos unicelulares que se reproducen por gemación. Las blastoconidias se elongan y permanecen unidas a la célula madre formando cadenas denominadas pseudohifas (pseudomicelios), en algunas especies se pueden observar auténticas hifas y/o clamidiosporas y de forma macroscópica se observan las colonias lisas, blandas, brillantes, de color blanco o beige (Arenas, 2008).

Es una levadura, que suele ser muy infectiva, se adapta a las condiciones climáticas, puede presentar morfología levaduriforme o bien, crecer como hongo filamentoso formando hifas verdaderas, muy patógenas, es así que siendo un patógeno oportunista posee factores de virulencia tales como: “habilidad para sobrevivir como comensal, la adherencia a células del hospedero, la secreción de enzimas degradativas y el cambio de morfología” (Garcia, 2011).

La característica más llamativa de *Candida albicans* es su plasticidad fenotípica, lo que permite que este agente se someta a las varias transiciones morfológicas provocadas por diversos estímulos ambientales, es decir que se adapta dependiendo del hábitat en el que



se encuentre Estos factores de transcripción van a jugar un papel crítico, para regular las transiciones morfológicas de este agente (Du *et al.*, 2015).

Encontramos que las especies del género *Candida* son levaduras que se aíslan con mayor frecuencia en el laboratorio de microbiología clínica. Ya sea en infecciones superficiales producidas por *Candida* spp., como en las infecciones profundas en las que intervienen muchos organismos que al igual que ésta son oportunistas, son las estructuras fúngicas con mayor prevalencia. (del Palacio & Cuétara, 2009).

*Candida albicans* ha desarrollado una variedad de estrategias que crearan resistencia a la muerte ocasionada por los macrófagos. Una de sus principales acciones es la de acumular trehalosa, sustancia que se caracteriza como uno de sus principales mecanismos de defensa bajo condiciones de estrés (Esparza *et al.*, 2011).

Una infección por esta levadura se puede agravar y generalizar a muchos órganos del cuerpo, por lo que se han hecho investigaciones de su tratamiento para determinar que el uso de la Anfotericina B o AmB junto con lisina puede ser una estrategia prometedora para la terapia de candidiasis diseminada (Zhao *et al.*, 2015).

Ante la presencia de una invasión de esta levadura, se enfoca sistemáticamente a la sintomatología, en un diagnóstico clínico presuntivo, la principal sintomatología observada fue el prurito, más la confirmación laboratorial de *Candida* spp (Pulido *et al.*, 2011). También existe la posibilidad de detección de *Candida* directamente a partir de suero y muestras de sangre tomadas de pacientes con candidiasis invasiva (Bineshian *et al.*, 2015).

Esta levadura es una de las más comunes, más patógenas y oportunistas del reino fungi en el medio y gracias a algunos estudios, se logró obtener la información sobre *Candida* spp., una levadura que se observó en la mayoría de conjuntivitis. Lo que demuestra que la presencia de la misma toma un título *preocupante* en el medio veterinario. Uno de los



estudios proporciona datos importantes sobre *Candida* así: “se encontró un 50% de positivos en perros con tumor de párpado” (Ferreira *et al.*, 2009).

En una investigación se incluye como causa inicial a una enteritis linfocitaria como ruta de infección de *C. Albicans* a nivel ocular, a su vez hace conocer que en una diabetes mellitus y en enfermedades inmunosupresoras han existido aislamientos de *C. Albicans* a nivel ocular, además dice que una infección por hongos puede ser secundaria al tratamiento antibiótico tópico del ojo que se ha prolongado (Linek, 2004).

La levadura *Candida albicans* es comensal de gran importancia y puede causar infecciones fúngicas de tipo invasivas. Se ha comprobado que después del tratamiento con agentes antifúngicos, la tasa de mortalidad atribuida a este tipo de infección sigue siendo alto (Tarumoto *et al.*, 2014).

**2.5.2. *Malassezia pachidermatis*.**- es una levadura que fue llamada así por ser descubierta por primera vez en un rinoceronte que presentaba una enfermedad exfoliativa de la piel (Gutierrez, 2010). Es un organismo oportunista, se halla presente como comensal entre la microbiota cutánea, coloniza folículos y se encuentra en gotas de grasa, entonces la infección ocular es causada por la invasión de las capas externas del estrato córneo después de su conversión de comensal levaduriforme en parásito filamentosos (Arenas, 2008).

Esta levadura se encuentra y afecta comúnmente a piel y oídos de los animales de sangre caliente (Gutierrez, 2010), se cita también un dato muy importante, que la hipersensibilidad a la *Malassezia* se reconoce como un factor iniciador de los signos clínicos de dermatitis atópica en algunos perros (Odenhoff *et al.*, 2014). Entonces nace la inquietud de determinar los posibles signos y síntomas en presencia de esta levadura en



ojos y se encontró que, para los procesos oftalmológicos la principal sintomatología observada durante el diagnóstico clínico presuntivo de ser causado por *Malassezia spp.*, era secreción (Pulido *et al.*, 2011).

De las características de la enfermedad producida por los hongos, levaduras o mohos, se describe que, la invasión de tejidos por hongos es generalmente indicativa de la incompetencia inmunológica, de la inmunosupresión o, en el caso de las infecciones por hongos, una consecuencia de la terapia antibacteriana de uso prolongado (Quinn *et al.*, 2011).

Los tratamientos ineficaces o en dosis inadecuada podrían ser un factor a considerar como es en el caso del clotrimazol que su dosis recomendada es de 10 mg pero en un estudio se encontró que las levaduras mostraron mayor sensibilidad a partir de las dosis de 14 mg/kg (Gutiérrez *et al.*, 2014).

En noreste de Brasil, un estudio reportó la presencia de esta levadura en el saco conjuntival tanto en perros sanos como en aquellos con úlceras de la córnea, además en una investigación realizada se determina la presencia de esta levadura con lo cual se llega a la conclusión que de 38 muestras de secreción ocular, se encontró 1 crecimiento positivo de *Malassezia pachydermatis* (Prado *et al.*, 2008).

La presencia de esta levadura se ha relacionado con ciertos cambios en los mecanismos inmunológicos de su hospedador mismos que regularan la colonización y su posterior carácter infectivo. A su vez hay reportes de que *M. pachydermatis* y *M. furfur* son las levaduras con menos sensibilidad a los azoles y la resistencia a estos agentes puede deberse a la producción de 14-demetilasas. Por lo que ha sido tratada con clotrimazol a dosis de 15 mg/ml para obtener un resultado efectivo (Gutierrez, 2014).



En estudios realizados se determinó que los perros que presentan signos clínicos de dermatitis atópica demostraron tener una hipersensibilidad a *Malassezia* spp. Para el diagnóstico se realiza una prueba intradérmica y la prueba de IgE, esta última es una prueba muy poco utilizada en el campo de la veterinaria, es por eso que se tiene una información muy limitada en las prácticas de diagnóstico (Odenhoff *et al.*, 2014).

Un detalle importante sobre la *Malassezia pachydermatis*, es que no solo la encontramos en los animales, también se aisló a partir de cultivos de sangre de tres bebés en edades de 25 a 27 días de nacidos, ellos presentaban múltiples problemas médicos subyacentes. Lo que ha definido una problemática más extensa con respecto a una zoonosis (Mickelsen *et al.*, 1987).

**2.5.3. *Aspergillus fumigatus*.**- Este género está constituido por hongos filamentosos que se reproducen asexualmente por conidios, aunque algunos de ellos también tienen reproducción sexual afirma del Palacio & Cuétara, (2009). Los hongos del género *Aspergillus* son omnipresentes y oportunistas, viven como saprófitos en el suelo, vegetales en descomposición, y en cualquier tipo de materia orgánica (Hernandez *et al.*, 2010).

Las infecciones causadas por el hongo filamentoso *Aspergillus fumigatus* son una significativa temática clínica y “representan la segunda forma más común de infección por hongos” (Moye-Rowley, 2015). Se debe considerar que existen varias cepas de *A. Fumigatus* y que cada uno de ellos tiene diferentes compuestos que sin lugar a dudas intervienen en la patogenia de la enfermedad (Moreno *et al.*, 2002).

La enfermedad se contrae generalmente por fuentes ambientales, en una época en donde existe mucha contaminación y factores que representan riesgo, la forma más frecuente de contraer la enfermedad es por inhalación o por ingestión (Hernandez *et al.*, 2010). Al contrario, cuando la piel está intacta, con un pH bajo, con ácidos grasos



segregados y superficies mucosas con sus secreciones antimicrobianas, estos factores van a ejercer una buena protección, siendo la principal barrera a la invasión de hongos (Quinn *et al.*, 2011).

También aparece en los cultivos oculares de perros sanos y los animales sanos de otras especies. Entre los microorganismos fúngicos predominantes encontramos que *Aspergillus* es de gran importancia incluso dentro de la flora normal del saco conjuntival, y a su vez su presencia varía dependiendo la temporada o el clima (Verneuil, 2013). Se ha determinado que el Pastor Alemán tiene mayor incidencia a la Aspergillosis, ya que se asocia a una deficiencia inmunológica. Así se describe el caso en una perra de esta raza, de 1.5 años de edad. En el perro la aspergilosis es una enfermedad que se caracteriza por afectar principalmente el tracto respiratorio superior (Hernandez *et al.*, 2010).

El *A. fumigatus* es considerado como el segundo agente causante más común de infección por hongos después de *Candida albicans*. Este moho crece a temperatura fisiológica de 37°C, tiene un genoma haploide estable, y se somete a la reproducción asexual, formando conidiosporas que se liberan en el medio ambiente. Debido a su pequeño tamaño que oscila entre 2 y 3 micras de diámetro, los conidios pueden penetrar profundamente en la vía aérea respiratoria por inhalación sencilla y adherirse a las células epiteliales antes del comienzo de la infección (Said-Sidier *et al.*, 2010).

Para aislar este microorganismo se debe conocer que en teoría la temperatura de crecimiento de *A. fumigatus* es de 40°C, pero se considera que para la formación de metabolito una temperatura optima seria de 30°C, y de 37°C para los agentes patógenos que generalmente crecen bien a esta temperatura (Said-Sidier *et al.*, 2010). La cepa de *A. brasiliensis* *fumigatus* mostró una capacidad inherente para producir antimicrobianos,



especialmente en cultivo con agar Jackson, con un pH inicial de 6,0 y una incubación a 40°C durante 144 horas (Cardoso *et al.*, 2005).

En un estudio se comprobó que al presentarse una combinación de *A. Fumigatus* con bacterias sobre todo con *Estafilococo Aureus*, se limita significativamente el crecimiento del mismo, posiblemente a través del contacto célula - célula y por medio de la síntesis de productos bacterianos, ”Este evento puede estar relacionado con las observaciones clínicas realizadas por los oftalmólogos en los casos de queratitis infecciosa, que encontraron una mejor evolución clínica cuando la infección se mezcla, hongo-bacteria” (Granillo *et al.*, 2015).

En la investigación realizada por Bueid *et al.*, (2010) demuestra que el 28% de casos con aspergillus fumigatus fueron resistentes a azoles como el itraconazol y el posaconazol, sin mutaciones que confieran esta resistencia al agente estudiado, en este caso se deberá tomar en consideración factores de resistencia para estos agentes que podrían ser causa de una infección por recidivas.

En individuos sanos este hongo normalmente se elimina de manera eficiente por el sistema inmune; sin embargo, puede desencadenar una infestación severa que será responsable de las altas tasas de morbilidad y mortalidad en los seres inmunodeprimidos. En estos pacientes, las esporas de Aspergillus germinan en los pulmones, formando unas ramificaciones filamentosas de hifas que se desprenden y entran en el torrente sanguíneo, dando lugar a la invasión vascular a través del cuerpo (Said-Sidier *et al.*, 2010).

También es importante saber que la función de los macrófagos y neutrófilos es matar a los conidios, mientras que a las hifas las asesinan principalmente los neutrófilos. Estas estructura son muy difíciles de combatir ya que son demasiado grandes para ser envueltas, sin embargo los neutrófilos poseen una gran variedad de mecanismos de matanza



extracelulares, entre estas, la formación de trampas extracelulares de neutrófilos (Bruno, 2010).

La respuesta innata del huésped contra la aspergillosis son dos tipos de células los neutrófilos y los macrófagos que son las principales células de defensa contra este agente, es por esto que al encontrarse frente a un paciente con un número inadecuado de estas células o anomalías en las mismas incrementan el riesgo de infección (Said-Sidier *et al.*, 2010).

Entre los factores de riesgo para Aspergillosis pueden ser, restos vegetales en montones como las pilas de heno y paja, mismas que presentan un alto contenido de humedad razón por la que se produce un calentamiento espontáneo, por lo tanto se producirá un gran número de esporas que pueden ser liberados en el aire causando esparcimientos localizados de gran magnitud si se los mueve (Mullins *et al.*, 2006).



### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Materiales

##### 3.1.1 Materiales de Campo:

###### **Biológicos:**

- Muestras de secreción conjuntival en perros.

###### **Químicos:**

- Alcohol.
- Agua destilada.

###### **Físicos:**

- Hielera.
- Hoja de recolección de datos.
- Adhesivos para etiquetas.
- Cinta masquin.
- Tubos de tapa rosca para transporte.
- Guantes de examinación.
- Hisopos para frotis conjuntival.
- Cámara de fotos.
- Fundas de basura



### 3.1.2 Materiales de Laboratorio:

#### **Biológicos:**

- Sangre Humana
- Secreción conjuntival

#### **Físicos:**

- Autoclave
- Incubadora
- Refrigeradora
- Esterilizador
- Mechero de bunsen
- Microscopio
- Varilla de vidrio
- Azas de platino
- Sacabocados
- Probetas
- Pinza anatómica
- Cajas Petri
- Tubos de ensayo
- Porta y cubreobjetos
- Hisopos 20 cm
- Gradillas
- Espátula
- Erlenmeyer
- Lápiz encerado
- Guantes estériles
- Aguja calibre 14
- Jeringa 20 ml

#### **Químicos:**

- Cloro
- Alcohol
- Aceite de inmersión
- Agua destilada
- Agar Sabouraud Dextrosa
- Agar harina de Maíz
- Lactosa
- Sacarosa
- Galactosa
- Rafinosa
- Peróxido de hidrógeno
- Manitol



- Agar úrea de Cristensen
- Sorbitol
- Cristal violeta
- Tween 20%
- Lugol
- Tween 40%
- Safranina
- Tween 60%
- Azul de lactofenol de algodón
- Tween 80%

### **3.1.3 Materiales de Escritorio:**

- Esferográfico
- Impresora
- Marcadores
- Cinta adhesiva
- Calculadora
- Hoja de papel bond
- Computadora
- Flash memory



## **3.2. Métodos:**

### **3.2.1 Diseño de la investigación.**

La investigación es de tipo exploratoria y descriptiva

### **3.2.2 Lugar del ensayo.**

La investigación se realizó en el Laboratorio de Bacteriología y Micología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca, a partir de muestras que se tomaron en: Clínica Veterinaria Mora ubicada en el sector de la Av. Huayna Capac. Clínica de especialidades Veterinarias Clinican en el sector Ex Crea en la Avenida 10 de Agosto

### **3.2.3 Población, muestra y muestreo de campo**

Los datos proporcionados de las dos clínicas veterinarias de la ciudad de Cuenca, fueron **3222** pacientes oftálmicos que llegaron a consulta durante el último año entre cachorros, jóvenes y gerontes (Revisar anexo 10.3).

Se realizó una encuesta en las instancias y se calculó la muestra en base a los datos obtenidos. El número de la muestra fue de 87 caninos, cantidad que dependió de la asistencia de pacientes en los 3 meses de recolección que se determinó en el cronograma de actividades. A cada perro se le tomó una muestra por hisopado de la conjuntiva ocular que posteriormente fue llevada al Laboratorio de Bacteriología y Micología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca (Revisar anexo 10.4).



### 3.2.4 Metodología para la investigación

#### Mucosa conjuntival ocular

Con hisopos estériles se frotó suavemente el fondo de cada saco conjuntival, luego se utilizó como conservante agua destilada estéril; y, en recipientes de triple empaque se trasladaron las muestras al laboratorio.

El proceso investigativo consta de las siguientes etapas basadas en la matriz de conceptualización ver (Anexo 10.1):

- Toma, conservación, empaque, envío, transporte y recepción en el laboratorio de las muestras de la mucosa conjuntival ocular.
  - Aislamiento de las levaduras: *Candida albicans* y *Malassezia pachidermatis*, como también del moho filamentoso *Aspergillus fumigatus*, como patógenos oportunistas.
  - Tinciones para conocer la morfología de cada microorganismo.
  - Tipificaciones de las levaduras: *Candida albicans* y *Malassezia pachidermatis*
  - Tipificación del *Aspergillus fumigatus*.
- Toma, conservación, transporte y recepción de las muestras.**

En el sistema de Gestión de Calidad Microbiológica, la fase pre analítica comprende la toma, conservación, empaque, envío, transporte y recepción en el laboratorio de las muestras clínicas. Para todas las muestras se utilizó como medio de transporte el agua destilada estéril, como conservante al gel refrigerante y en recipientes de triple empaque se trasladaron las muestra (Guevara, Ursia, & Casquero, 2007).



**Aislamiento de las levaduras: *Candida albicans* y *Malassezia pachidermatis*, como también del moho filamentoso *Aspergillus fumigatus*, como patógenos oportunistas.**

Se procedió a sembrar en el medio de cultivo micológico universal Agar Sabouraud Dextrosa, a las levaduras y mohos. Las cajas de Petri que contengan las levaduras: *Candida albicans* y *Malassezia pachidermatis* fueron incubadas aeróbicamente a 37 °C, durante 72 horas y las cajas que contengan el moho filamentoso: *Aspergillus fumigatus*, fueron incubados a 30 °C, durante siete días (Guevara, Ursia, & Casquero, 2007).

### **Agar Sabouraud Dextrosa**

Es el medio de cultivo que más se utiliza en micología médica debido a que las características que se estudian y describen se ajustan cuando los hongos se desarrollan sobre este medio de cultivo. Para inhibir el desarrollo bacteriano se puede agregar Cloranfenicol al 0,05%

- Dextrosa            20 g
- Peptona             10 g
- Agar                 20 g

- Agua destilada    1000 ml. El pH final: 7,0±0,2 a 25 °C. Disolver y autoclavar a 121 °C por 15 minutos (Cañedo, 2004).

### **Tinción de Gram**

#### **a) Cristal Violeta de Hucker**

##### **Solución A**

- Cristal violeta (certificado) 90% pureza    2 gramos
- Alcohol 95%                                        20 ML.

**Solución B**

- Oxalato de amonio 0.8 gramos
- Agua destilada 80 m L.

Disolver el cristal violeta en alcohol (solución a), luego disolver el oxalato de amonio en agua destilada (solución b). Finalmente mezclar las soluciones a y b; filtrar con papel después de 24 horas y conservar en frascos de color ámbar.

**b) Yodo de Gram (Lugol)****Fórmula:**

- Cristales de yodo 1 gramo
- Yoduro de potasio 2 gramos
- Agua destilada 300 ML.

Mezclar los cristales de yodo y el yoduro de potasio hasta triturar en un mortero, con algunos ml de agua y añadir después de disolución el resto del agua. El reactivo preparado guardar en frasco de color ámbar.

**c) Alcohol acetona**

**Safranina, solución 0.25%** Frotar la safranina con alcohol en un mortero.

## Solución de stock

- Safranina (certificada) 25 gramos
- Alcohol etílico 95% 100 ml. (Cañedo, 2004).

**Azul de lactofenol de algodón para observar el *Aspergillus fumigatus***

Es empleado para examinar muestras obtenidas a partir de los cultivos. El fenol mata al hongo, el ácido láctico es un agente aclarante que preserva la estructura del hongo, la glicerina previene la desecación y el azul de algodón colorea la quitina y celulosa del hongo.

**Solución A:**

- Fenol (cristales) 20 g
- Ácido láctico 20 g
- Glicerina 40 ml
- Mezclar.

**Solución B:**

- Azul de algodón 0,05 g
- Agua destilada 20 ml. (Guevara, Ursia, & Casquero, 2007)

Mezclar las soluciones A y B. Conservar a temperatura ambiente hasta por seis meses.

**- Tipificación de *Candida albicans***

Crecimiento principal en agar Sabouraud Dextrosa a 37 °C., para observar las blastosporas. Con la finalidad de observar el tubo germinativo, clamidosporas y pseudohifas, a partir de la siembra en agar harina de maíz. También se realizó la asimilación de los siguientes carbohidratos: glucosa, lactosa, sacarosa, maltosa, galactosa y rafinosa.

**a) Preparación del agar harina de maíz (Oxoid), para *Candida Albicans***

Utilizar para la producción de pseudohifas de levaduras del género *Candida* y producción de clamidoconidios de *C. albicans*.

- Composición:
  - Harina de maíz 62,5 g
  - Agua destilada 1500 ml
  - Tween 80 15 g
  - Agar 19 ml



**Carbohidratos:**

Utilizar: Glucosa, Lactosa, Sacarosa, Galactosa, Maltosa, y Rafinosa. Disolver en agua destilada estéril y se esteriliza por filtración (Diámetro de filtro: 0,2  $\mu$ m). Concentración final de cada carbohidrato 10%. Agregar en la SPD con el indicador, a temperatura de 45 a 50 ° C. Mezclar y repartir en tubos 13 x 100 mm de tapa rosca. Antes de utilizar controlar a 37° C por 24 horas (Guevara, Ursia, & Casquero, 2007)*Modificado*.

**Positivo:** viraje al color amarillo, para glucosa, galactosa, maltosa y sacarosa, en el caso de *C. albicans*.

**Negativo:** no se produce viraje de color permaneciendo el color del medio de cultivo en morado o en púrpura, para lactosa y rafinosa, en el caso de *C. albicans* (Prats, 2005).

**c) Prueba de filamentación precoz**

Para realizar la prueba de filamentación precoz, se toma un tubo estéril de 3 ml; en el cual se coloca una azada de inóculo con *Candida spp.*, procedente del agar harina de maíz y se mezclará con 0.5 ml., de suero vacuno o humano, e inmediatamente se incuba por el espacio de 2 horas a 37 °C.

A partir de este último ensayo, mediante una gota de suspensión que se coloca en un portaobjetos y cubre objetos, se trató de observar microscópicamente a los tubos germinales, los cuales se presentan como filamentos no septados, únicos, estrechos, sin ramificar que emergen de las células de levadura, identificándose de esta manera a *Candida albicans*. También a partir de la prueba de filamentación precoz, se procede a realizar un frotis y tinción de Gram, con el fin de obtener la presencia de tubos germinales, pseudomicelios y clamidosporas que son características de la *Candida albicans*. (Pemán, Martín, & Rubio, 2007).



## - Tipificación de *Malassezia pachidermatis*

### a) Prueba de la hidrolisis de la urea

**Agar Urea:** Permite evidenciar la producción de ureasa

Pesar:

- Dextrosa 1 g
- Peptona 1 g
- Cloruro de sodio 5 g
- Monofosfato de potasio 2 g
- Urea 20 g
- Agar 15 g
- Rojo fenol 12 mg
- Agua destilada 1000 ml.

Disolver la urea en 100 ml de agua destilada y esterilizar por filtración. • Disolver los ingredientes restantes en 900 ml de agua destilada. Esterilizar a 121 °C por 15 minutos. Enfriar hasta unos 45– 50 °C., colocar en tubos, inclinándolos para que se solidifique de tal manera que forme un pico. Tomar una colonia de *Malassezia*, sembrar centralmente y arrastrar (Guevara et al. 2007), se muestra positivo cuando hay un viraje a fucsia o rosado.

### b) Prueba de la Catalasa

Consiste en determinar la presencia de la enzima catalasa. Colocar una gota de peróxido de hidrógeno (agua oxigenada) 10 vol. en una lámina portaobjeto y agregar una suspensión de la levadura. (Pemán et al. 2007).

- **Positivo:** cuando existe efervescencia como se muestra en la imagen 4
- **Negativo:** ausencia de efervescencia

**b) Asimilación del *tween* 20, 40, 60 y 80**

Tomar 3 colonias de *M. pachidermatis* del debido aislamiento en agar Sabouraud dextrosa y colocar en un tubo con 4 ml de solución salina fisiológica, luego se agita en el equipo para tubos vórtex (Prats, 2005).

Realizar diluciones seriadas logarítmicas hasta el tubo  $10^{-3}$  a continuación se toma 1 ml., del inóculo como solución de principio activo y se coloca en el diluyente de 9 ml., de solución salina fisiológica, luego se transporta desde el primer tubo 1 ml., del volumen en cada tubo de sucesión, hasta llegar al tubo  $10^{-3}$ . Finalmente se siembra por duplicado 100  $\mu$ l de los tres tubos en las placas de Agar Triptona Soja (Difco), se esparció con la espátula de Drigalsky. Se inoculó a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. Proceder a contar las colonias con la ayuda de un contador de colonias, Tomar en consideración los valores que estén entre los 30 a 300. Finalmente se calcula la Unidad Formadora de Colonias UFC/ml, para conocer a que concentración se encuentra el inóculo, mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{UFC}{mL} = \frac{ufcp1 + ufcp2}{2} \times \text{dilución de siembra} \times \text{volumen de siembra} (10^{-1})$$

La concentración final correcta debe estar entre  $1-6 \times 10^5$  células /ml.

**Ejemplo:** De las tres diluciones, la de  $10^{-2}$  proporciono los siguientes resultados

$$UFC/ml = \frac{180 + 200}{2} \times 10^{-2} \times 10^{-1}$$

$$UFC/ml = 190 \times 10^3 = 1900000$$

$$UFC/ml = 1 \times 10^5$$

Después de haber obtenido la proporción de  $10^5$  células/ml de la *Malassezia spp.* En estudio, se procede a preparar 16 ml de agar Sabouraud destrosa y se enfría hasta



aproximadamente 50°C luego, se adiciona al medio 2 ml de una suspensión de  $10^5$  células/ml de la levadura en estudio que se encuentra en solución salina fisiológica. La suspensión se mezcla vigorosamente y se vierte en una placa de Petri. Una vez que el medio solidifico, con un sacabocados se realizan 4 pocillos de 2 mm de diámetro y se los rellena con 1 gota de Tween 20, 40, 60, 80, respectivamente. Las placas se inoculan a 32°C durante una semana. Los componentes de tween sirven para analizar el grado de crecimiento y/o la reacción de precipitación de las levaduras alrededor de los pocillos. (Giusiano, 2006) *Modificado*.

#### **- Tipificación de *Aspergillus fumigatus***

Convencionalmente se siembra en agar Sabouraud dextrosa. A pesar del desarrollo de técnicas moleculares de identificación de microorganismos, en los mohos filamentosos hasta la actualidad se obtiene el género y especie, mediante la medición con micrómetro objetivo (portaobjetos) y un micrómetro ocular (disco de vidrio), que se encuentran incorporados al tubo ocular (Prats, 2005)

##### **a) Calibración del micrómetro para tipificar *Aspergillus fumigatus***

###### **Procedimiento de calibración.**

1. Colocar el micrómetro objetivo (portaobjetos), sobre la platina del microscopio y enfocar la escala. La calibración de los objetivos, debe iniciarse por el menor aumento y luego continuar por los demás.
2. La línea **0** del ocular micrometrado debe coincidir con el **0** del portaobjeto milimetrado
3. Cuando estas dos líneas estén sobrepuestas entre sí. Procurar encontrarlas lo más alejado hacia la derecha; esta distancia va a variar según el objetivo utilizado. A un mayor aumento, el grosor de las líneas grabadas va a resultar tan grande, que cuando se



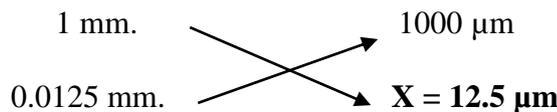
sobrepongan las líneas, se podrá hacerlo ya sea hacia la izquierda o hacia la derecha de las líneas individuales.

- 4. Se procede a contar el número de divisiones del ocular y del portaobjeto que, estén sobrepuestas.
- 5. A continuación se calcula para cada objetivo los micrómetros correspondientes
- 6. Con el objetivo **4x** del micrómetro Olympus Japan CH2 (Pemán, Martín, & Rubio, 2007).

80 unidades (líneas) del ocular ----- 1.0 mm de la platina (100 líneas)

- 1 unidad del ocular ----- **X= 0.0125 mm**

1 mm. = 1000 μm. (micrómetro)

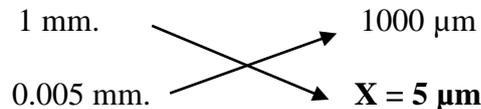


- 7. Con el objetivo **10x** del micrómetro Olympus Japan CH2

100 unidades (líneas) del ocular ----- 0.5 mm de la platina (50 líneas)

1 unidad del ocular -----**X= 0.005 mm**

- 1 mm. = 1000 μm.



- 8. Con el objetivo **40x** del micrómetro Olympus Japan CH2

40 unidades (líneas) del ocular ----- 0.05mm de la platina (5 líneas)

1 unidad del ocular ----- **X= 0.00125 mm**

- 1 mm. = 1000 μm. (micrómetro)

$$\begin{array}{ccc}
 1 \text{ mm.} & \xrightarrow{\quad} & 1000 \mu\text{m} \\
 0.00125 \text{ mm.} & \xrightarrow{\quad} & \mathbf{X = 1.25 \mu\text{m}}
 \end{array}$$

## b) Identificación por la Taxonomía de *Aspergillus fumigatus*

**Tabla 1: Taxonomía de *Aspergillus fumigatus***

CARACTERISTICAS	MEDIDAS
Coloración	Verde azulado a verde grisáceo. Reverso incoloro, amarillento, marrón rojizo o verde
Textura	Aterciopelada o flocosa, plana o con surcos radiales
Largo de estipe y/o esporangióforo	200-400 $\mu\text{m}$
Diámetro de la vesícula y/o esporangio	18-30 $\mu\text{m}$ . Piriforme
Largo de las fiálides	5-9 $\mu\text{m}$
Ancho de las fiálides	2-3 $\mu\text{m}$
Diámetro de las microconidias y/o esporangiosporas	2-3 $\mu\text{m}$

Posterior a la calibración del microscopio con el micrómetro se procede a la observación y medición de *Aspergillus spp.* (Abarca, 2000).

### - Análisis estadístico para los resultados

Se utilizaron, frecuencias, gráficos y tablas de contingencia para relacionar los factores de riesgo; para el efecto, se utilizó odds ratio para obtener la razón de prevalencias y test exacto de Fisher para analizar los mohos y levaduras como causantes de la micosis conjuntival canina, entre los perros sanos y con conjuntivitis. Se aplicó la regresión logística binomial para determinar la relación entre la presencia o no de conjuntivitis; las



variables regresoras fueron los hongos en estudio, el patrón facial, edad, raza. Los resultados fueron analizados con el software SPSS 22 para Windows.

### **- Ubicación Geográfica y Político - Administrativa**

El área de estudio se realizó en las Clínicas Mora y Clinican, ubicadas en la República de Ecuador, Provincia del Azuay, en las jurisdicciones del cantón Cuenca, en las parroquias: Huayna-Cápac y Sucre, respectivamente.



#### 4. RESULTADOS

En concordancia con los objetivos generales y específicos de esta investigación, a continuación se describe el orden de presentación de las pruebas, (1) Prueba de hipótesis, (2) Tablas de prevalencia por variable: Agente (Prevalencia Total), Procedencia de casos, Conjuntivitis, Condición genética, Edad y Patrón facial, (3) Pruebas de asociación.

Los agentes, *Candida albicans*, *Malassezia pachydermatis* y *Aspergillus fumigatus* afectan de igual manera a los perros con conjuntivitis.

Los agentes, *Candida albicans*, *Malassezia pachydermatis* y *Aspergillus fumigatus* afectan en diferente forma a los perros con conjuntivitis.

#### 4.1. Análisis de agentes por presencia o no de conjuntivitis

**Tabla 2: Prevalencia, frecuencias observadas y esperadas de Chi cuadrado de agentes para conjuntivitis existente o no.**

			Conjuntivitis		Prevalencia Total %	IC %	
			Sin %	Con %			
<i>Candida albicans</i>	P	Observadas	2 (4,35)	2 (4,87)	4 (4,6)	0,2 - 9	
		Esperadas	2,1	1,9	4,0	± 4,40	
	N	Observadas	44 (95,65)	39 (95,12)	83 (9,4)		
		Esperadas	43,9	39,1	83,0		
	Total		Observadas	46	41	87	
<i>Malassezia pachydermatis</i>	P	Observadas	3 (6,52)	5 (12,19)	8 (9,2)	3,13 - 15,27	
		Esperadas	4,2	3,8	8,0	± 6,07	
	N	Observadas	43 (93,47)	36 (87,8)	79 (90,80)		
		Esperadas	41,8	37,2	79,0		
	Total		Observadas	46	41	87	
<i>Aspergillus fumigatus</i>	P	Observadas	4 (8,7)	0 (0)	4 (4,6)	0,2 - 9	
		Esperadas	2,1	1,9	4,0	± 4,40	
	N	Observadas	42 (91,3)	41 (100)	83 (93,4)		
		Esperadas	43,9	39,1	83,0		
	Total		Observadas	46	41	87	

**Tabla 3: Valores del Test de probabilidad exacta de Fisher por agente e interpretación**

Agente	Test Exacto de Fisher Significación exacta (2 caras)
<i>Candida albicans</i>	1,000
<i>Malassezia pachydermatis</i>	0,467
<i>Aspergillus fumigatus</i>	0,119



La estadística nos demuestra que hay una frecuencia de *Candida albicans* de 4,87% de casos positivos con presencia de conjuntivitis y 4,35% de casos positivos sin conjuntivitis y una prevalencia total 4,6% de positivos. Para la *Malassezia pachydermatis* en cambio tenemos 12,19% de casos positivos asociados a conjuntivitis y 6,52% casos positivos sin conjuntivitis y una prevalencia total de 9,20% de positivos. Para *Aspergillus fumigatus* no existen casos positivos en presencia de conjuntivitis pero si 8,7% de casos positivos sin conjuntivitis y una prevalencia total de 4,6% . Los valores de las frecuencias esperadas de la conjuntivitis por agente, en cada subtabla, son menores a 5 en más del 25% de las celdas, en consecuencia, se empleará el Test exacto de Fisher en vez de la prueba de significación de Chi cuadrado.

En la tabla 3 del análisis estadístico realizado con el Test de Fisher, con el 100% de probabilidad que *Candida albicans* ( $p=1,000$ )  $> 0,05$ , afecta de igual modo a los perros con y sin conjuntivitis. Asimismo, con la probabilidad exacta del 46,7%, *Malassezia pachydermatis* ( $p=0,467$ ), afecta de igual forma a los perros con y sin conjuntivitis. Para *Aspergillus fumigatus* ( $p=0,119$ ) la probabilidad es del 11,9% y afecta de igual modo a los perros con y sin conjuntivitis. En consecuencia la conjuntivitis en perros, no está asociada con ninguno de los agentes estudiados. Al no haber una asociación causal entre los agentes citados y la conjuntivitis, probablemente la conjuntivitis es ocasionada por otras causas.

#### 4.2. Análisis del agente por procedencia de casos.

Tabla 4: Prevalencia del agente por procedencia de casos.

		Clínicas veterinarias				
		Clínica Mora		Clinican		Total
		Num	%	Num	%	Num
<i>Candida albicans</i>	P	3	3,45	1	1,15	4
	N	42	48,28	41	47,13	83
	<b>Total</b>	<b>45</b>	<b>51,72</b>	<b>42</b>	<b>48,28</b>	<b>87</b>
<i>Malassezia pachydermatis</i>	P	3	3,45	5	5,75	8
	N	42	48,28	37	42,53	79
	<b>Total</b>	<b>45</b>	<b>51,72</b>	<b>42</b>	<b>48,28</b>	<b>87</b>
<i>Aspergillus fumigatus</i>	P	3	3,45	1	1,15	4
	N	42	48,28	41	47,13	83
	<b>Total</b>	<b>45</b>	<b>51,72</b>	<b>42</b>	<b>48,28</b>	<b>87</b>

Tabla 5: Valores de test de probabilidad exacta de Fisher por procedencia de casos

<i>Agente</i>	Test Exacto de Fisher
	Significación exacta (2 caras)
<i>Candida albicans</i>	0,617
<i>Malassezia pachydermatis</i>	0,475
<i>Aspergillus fumigatus</i>	0,617



La muestra de 87 perros se obtuvo de dos clínicas veterinarias de la ciudad de Cuenca, 45 de Clínica Mora y 42 de Clinican, las tasas de prevalencia por cada agente se describen a continuación.

***Candida albicans.*** De los 87 casos observados, 4 fueron positivos, de los cuales 3 (3,45%) se obtuvieron de la Clínica Mora y 1 (1,15%) en Clinican. Los 83 animales restantes fueron negativos; de ellos, 42 (48,28%) fueron de Clínica Mora y 41 (47,13%) de Clinican.

***Malassezia pachydermatis.*** Sobre 87 casos analizados, 8 fueron positivos, de estos 3 (3,45%) se obtuvieron en la Clínica Mora y 5 (5,75%) en Clinican. Los 79 perros restantes fueron negativos a este agente; de ellos, 42 (48,28%) se analizaron en Clínica Mora y 37 (42,53%) de Clinican.

***Aspergillus fumigatus.*** De los casos analizados, 4 fueron positivos, de estos 3 (3,45%) se obtuvieron en Clínica Mora y 1 (1,15%) en Clinican. Los 83 perros restantes fueron negativos a este agente; de ellos, 42 (48,28%) se examinaron en Clínica Mora y 41 (47,13%) de Clinican.

En la tabla 5 se muestra por el Test de probabilidad exacta de Fisher que se realizó por cada agente, para los datos registrados de las dos clínicas veterinarias de la ciudad de Cuenca. Con el 61,7% de probabilidad que *Candida albicans* ( $p=0,617$ )  $> 0,05$ , en ninguno de los dos establecimientos de salud animal, hubo predilección por *Candida albicans*, por lo tanto, afectó de igual modo a los perros de los establecimientos observados; con la probabilidad exacta del 47,5%, no existen diferencias entre los perros examinados en las dos clínicas para *Malassezia pachydermatis* ( $p=0,475$ ), y para *Aspergillus fumigatus* ( $p=0,617$ ) con la probabilidad del 61,7%, tampoco se observaron diferencias significativas entre los casos analizados en las dos clínicas veterinarias.

### 4.3. Análisis del agente por condición genética.

**Tabla 6: Prevalencia de agentes por condición genética.**

		Puro o mestizo					
		Puro		Mestizo		Total	
		Num	%	Num	%	Num	%
<i>Candida albicans</i>	P	4	100,00	0	0,00	4	100,00
	N	57	68,67	26	31,33	83	100,00
	<b>Total</b>	<b>61</b>		<b>26</b>		<b>87</b>	
<i>Malassezia pachydermatis</i>	P	6	75,00	2	25,00	8	100,00
	N	55	69,62	24	30,38	79	100,00
	<b>Total</b>	<b>61</b>		<b>26</b>		<b>87</b>	
<i>Aspergillus fumigatus</i>	P	2	50,00	2	50,00	4	100,00
	N	59	71,08	24	28,92	83	100,00
	<b>Total</b>	<b>61</b>		<b>26</b>		<b>87</b>	

**Tabla 7: Valor de test de probabilidad exacta de Fisher por condición genética.**

<i>Agente</i>	Test Exacto de Fisher Significación exacta (2 caras)
<i>Candida albicans</i>	<b>0,312</b>
<i>Malassezia pachydermatis</i>	<b>1,000</b>
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<b>0,580</b>



Sobre un total de 87 casos, se establecen las siguientes tasas de prevalencia de los tres agentes en perros puros y mestizos.

De 87 animales examinados para *Candida albicans*, 4 fueron positivos, de los cuales 4 (100%) fueron puros y 0 (0,00%) mestizos. Los 83 restantes fueron negativos, de los cuales 57 (68,67%) fueron puros, y 26 (31,33%) mestizos.

En los mismos 87 casos observados para *Malassezia pachydermatis*, 8 fueron positivos, de los cuales 6 (75,00%) fueron puros; y los 2 (25,00%) mestizos. De los 79 restantes, 55 (69,62%) fueron puros; y 24 (30,38%) mestizos.

Sobre la misma muestra observada para *Aspergillus fumigatus*, 4 fueron positivos, de ellos 2 (50,00%) fueron puros, y 2 (50,00%) fueron mestizos; De los 83 negativos restantes a este agente, 59 (71,08%) fueron puros; 24 (28,92%) fueron mestizos.

En la tabla 7 de test de Fisher se observa que por cada agente y la condición genética de los perros muestreados, con el 31,2% de probabilidad que *Candida albicans* ( $p=0,312$ )  $>0,05$ , ninguna de sus condiciones genéticas tuvo predilección por la *Candida albicans*, por lo tanto, afecta de igual modo a los perros de los dos grupos genéticos analizados; con la probabilidad exacta del 100%, no existen diferencias entre los perros de los dos grupos genéticos para la frecuencia de *Malassezia pachydermatis* ( $p=1,000$ ), mientras que para el *Aspergillus fumigatus* ( $p=0,580$ ) con la probabilidad del 58% tampoco se tuvieron diferencias entre los perros de estos dos grupos.

#### 4.4. Análisis de conjuntivitis por condición genética

**Tabla 8: Prevalencia, frecuencias observadas y esperadas de Chi cuadrado de conjuntivitis por condición genética o raza.**

		Conjuntivitis		Total
		Con %	Sin %	
Puro	Observado	30 (49,18)	31 (50,82)	61 (70,11)
	Esperado	28,7	32,3	61,0
Mestizo	Observado	11 (42,31)	15 (57,69)	26 (29,89)
	Esperado	12,3	13,7	26,0
Total	Observado	41	46	87

**Tabla 9: Valores de Chi cuadrado para conjuntivitis por condición genética.**

	Sig. Asintótica (2 caras)	Sig. Exacta (2 caras)	Sig. exacta (1 cara)
Chi-cuadrado de Pearson	,557		
Corrección de continuidad <sup>b</sup>	,724		
Razón de verosimilitud	,556		
Prueba exacta de Fisher		,642	,363
Asociación lineal por lineal	,559		
N de casos válidos			

De 87 casos, 61 fueron puros y 26 mestizos; dentro los primeros, 30 (49,18%) tuvieron conjuntivitis y 31 (50,82%) no presentaron la enfermedad. Entre los 26 mestizos, 11 (42,31%) tuvieron conjuntivitis y 15 (57,69%) no presentaron la enfermedad.

En la tabla 9 de Chi cuadrado, con un valor  $p=0,557$  de la prueba de Chi cuadrado, se establece que no existen diferencias en la presentación de la conjuntivitis en los perros de diferente condición genética. No hay predilección de la enfermedad por ninguna de las dos condiciones genéticas por lo tanto las dos variables analizadas no están asociadas.

#### 4.5. Análisis de agentes por rango de edad.

**Tabla 10: Prevalencia de agentes por rango de edad.**

		Rangos de edad (años)									
		<1 – 1		1 - 4		4 – 8		> 8		Total	
		Nu m	%	Nu m	%	Nu m	%	Num	%	Num	%
<i>Candida albicans</i>	P	0	0,00	3	75,00	0	0,00	1	25,00	4	100,00
	N	20	24,10	22	26,51	23	27,71	18	21,69	83	100,00
	Total									87	
<i>Malassezia pachydermatis</i>	P	1	12,50	1	12,50	3	37,50	3	37,50	8	100,00
	N	19	24,05	24	30,38	20	25,32	16	20,25	79	100,00
	Total									87	
<i>Aspergillus fumigatus</i>	P	0	0,00	1	25,00	2	50,00	1	25,00	4	100,00
	N	20	24,10	24	28,92	21	25,30	18	21,69	83	100,00
	Total									87	

**Tabla 11: Valores de test de Fisher, de agentes por rangos de edad.**

Agente	Test Exacto de Fisher Significación exacta (2 caras)
<i>Candida albicans</i>	0,162
<i>Malassezia pachydermatis</i>	0,478
<i>Aspergillus fumigatus</i>	0,724

A partir de los 87 casos, se establecen las siguientes tasas de prevalencia de cada agente por rangos de edad.

Para *Candida albicans* de 87 perros examinados para este hongo, 4 fueron positivos, de los cuales, 0 (0,00%) pertenecen al rango <1 – 1 año de edad; 3 (75,00%) estuvieron entre 1 - 4 años; 0 (0,00%) están en el rango de 4 – 8 años; y 1 (25,00%) está dentro del rango > 8 años. De los 83 perros negativos, 20 (24,10%) están dentro del rango de edad <1 – 1; 22



(26,51%) tuvieron entre 1 - 4 años; 23 (27,71%) fueron de 4 – 8 años; y 18 (21,69%) tuvieron > 8 años.

***Malassezia pachydermatis*** De los 87 perros, 8 fueron positivos, de los cuales 1 (12,50%) pertenece al rango <1 -1 año; 1 (12,50%) tuvo entre 1 – 4 años; 3 (37,50%) estuvieron en el rango de 4 – 8 años; 3 (37,50%) pertenecen al rango > 8 años. De los 79 perros negativos, 19 (24,05%) estuvieron dentro del rango de edad <1 – 1; 24 (30,38%) tuvieron entre 1 - 4 años; 20 (25,32%) se encontraron entre 4 – 8 años; y 16 (20,25%) fueron > 8 años.

***Aspergillus fumigatus*** que de 87 perros muestreados, 4 fueron positivos, de los cuales, 0 (0,00%) pertenecieron al rango <1 -1 año; 1 (25,00%) tuvo entre 1 – 4 años; 2 (50,00%) pertenecieron al rango de 4 – 8 años; y 1 (25,00%) estuvo en el rango > 8 años. De los 83 perros negativos, 20 (24,10%) estuvieron dentro del rango de edad <1 – 1; 24 (28,92%) tuvieron entre 1 - 4 años; 21 (25,30%) fueron de 4 – 8 años; y 18 (21,69%) > 8 años.

En la tabla **11** del Test de Fisher de cada agente por rangos de edad de los perros observados, establece que con el 16,20% de probabilidad que *Candida albicans* ( $p=0,162$ )  $> 0,05$ , no tuvo predilección por ninguna de las edades de los perros; por lo tanto, afectó de igual modo en los diferentes rangos de edad; asimismo con la probabilidad exacta del 47,8%, no existen diferencias entre los perros de las diferentes edades con relación a *Malassezia pachydermatis* ( $p=0,478$ ), para *Aspergillus fumigatus* ( $p=0,724$ ) con la probabilidad del 72,4% no se observaron diferencias para este agente entre los rangos de edad. En consecuencia los agentes afectan de igual manera a los perros de las diferentes edades, no hay asociación entre la prevalencia de los agentes y la edad.

#### 4.6. Análisis de conjuntivitis por rangos de edad

**Tabla 12: Prueba de significación de conjuntivitis por rangos de edad.**

Tabla cruzada			Conjuntivitis		Total	
			Sin %	Con %		
Rangos de edad (años)	<1 - 1	Observadas	<b>10 (50)</b>	<b>10 (50)</b>	20 (22,99)	
		Esperadas	10,6	9,4	20,0	
	1 - 4	Observadas	<b>15 (60)</b>	<b>10 (40)</b>	25 (28,74)	
		Esperadas	13,2	11,8	25,0	
	4 - 8	Observadas	<b>10 (43,48)</b>	<b>13 (56,52)</b>	23 (26,44)	
		Esperadas	12,2	10,8	23,0	
	> 8	Observadas	<b>11 (57,89)</b>	<b>8 (42,11)</b>	19 (21,83)	
		Esperadas	10,0	9,0	19,0	
	Total		Observadas	46	41	87

**Tabla 13: Valores de Chi cuadrado para conjuntivitis por rangos de edad.**

	gl	Sig. Asintótica (2 caras)	Significación Exacta (2 caras)	Significación exacta (1 cara)	Probabilidad en el punto
Chi-cuadrado de Pearson	3	,663	,677		
Razón de verosimilitud	3	,662	,677		
Prueba exacta de Fisher			,677		
Asociación lineal por lineal	1	,949	1,000	<b>,514</b>	<b>,079</b>
N de casos válidos					

a. 0 casillas (0,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 8,95.

Sobre un total de 87 casos, 41 tuvieron conjuntivitis y 46 no presentaron la enfermedad; de los cuales, 20 fueron del rango <1 – 1 año de edad, y de estos 10 (50,00%) tuvieron



conjuntivitis y los otros 10 (50,00%) no presentaron la enfermedad.

En el rango de 1 – 4 años se examinaron 25 animales, de los cuales 10 (40,00%) estaban con conjuntivitis y 15 (60,00%) no presentaron la enfermedad.

El rango de 4 – 8 años tuvo 23 animales; de los cuales 13 (56,52%) presentaron conjuntivitis y 10 (43,48%) no la tuvieron.

De los perros mayores a 8 años, 8 (42,11%) tuvieron conjuntivitis y 11 (57,89%) no fueron positivos a la enfermedad.

Las pruebas de Chi cuadrado y el Test de Fisher, con un valor  $p=0,677$  que se muestran en la tabla **13** indican que las frecuencias observadas de la prevalencia no difieren de las esperadas, con el 95% de seguridad; por lo tanto la prevalencia de conjuntivitis no difiere con la edad de los perros.

#### 4.7. Análisis de los agentes por patrón facial.

**Tabla 14: Prevalencia de agentes por estructura del patrón facial.**

		Estructura facial					
		Braquicéfalo		No braquicéfalo		Total	
		Num	%	Num	%	Num	%
<i>Candida albicans</i>	P	1	25,00	3	75,00	4	100,00
	N	25	30,12	58	69,88	83	100,00
	Total					87	
<i>Malassezia pachydermatis</i>	P	4	50,00	4	50,00	8	100,00
	N	22	27,85	57	72,15	79	100,00
	Total					87	
<i>Aspergillus fumigatus</i>	P	1	25,00	3	75,00	4	100,00
	N	25	30,12	58	69,88	83	100,00
	Total					87	

**Tabla 15: Valores de test de Fisher para agentes por patrón facial.**

Agente	Test Exacto de Fisher Significación exacta (2 caras)
<i>Candida albicans</i>	<b>1,000</b>
<i>Malassezia pachydermatis</i>	<b>0,232</b>
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<b>1,000</b>

En la tabla anterior, a partir de los 87 casos, se establecen las siguientes tasas de prevalencia de cada agente por estructura facial.



***Candida albicans***. De 87 perros examinados, 4 fueron positivos, de los cuales, 1 (25,00%) fueron braquicéfalos y 3 (75,00%) no braquicéfalos. De los 83 perros negativos, 25 (30,12%) fueron braquicéfalos y 58 (69,88%) no braquicéfalos.

***Malassezia pachydermatis***. De 87 perros analizados, 8 fueron positivos, de los cuales 4 (50,00%) fueron braquicéfalos y 4 (50,00%) no braquicéfalos. De los 79 perros negativos a este agente, 22 (27,95%) fueron braquicéfalos y 57 (72,15%) no braquicéfalos.

***Aspergillus fumigatus***. De 87 perros analizados, 4 fueron positivos, de los cuales 1 (25,00%) fue braquicéfalo y 3 (75,00%) no braquicéfalos. De los 83 perros negativos a este agente, 25 (30,12%) fueron braquicéfalos y 58 (69,88%) no braquicéfalos.

El Test de Fisher que se muestra en la tabla **15**, que por cada hongo, según el patrón facial de los perros analizados, establece que con el 100% de probabilidad que ninguno de los dos patrones faciales tuvo predilección por la *Candida albicans* ( $p=1,000 > 0,05$ ); por lo tanto, afecta de igual manera a los perros de los dos patrones faciales; asimismo con la probabilidad exacta del 23,2%, no existen diferencias entre los perros de los dos patrones faciales con relación a *Malassezia pachydermatis* ( $p=0,232$ ), para el *Aspergillus fumigatus* ( $p=1,000$ ) con la probabilidad del 100% afecta de igual manera a los perros de los patrones faciales estudiados. Las pruebas indican que no existe asociación entre las variables, agentes estudiados y patrón facial.

#### 4.8. Análisis de conjuntivitis por patrón facial

**Tabla 16: Prevalencia, frecuencias observadas y esperadas para la prueba de Chi cuadrado.**

		Conjuntivitis		Total
		Con %	Sin %	
<b>Braquicéfalo</b>	Observada	17 (65,38)	9 (34,62)	26
	Esperada	12,3	13,7	26,0
<b>No braquicéfalo</b>	Observada	24 (39,34)	37 (60,66)	61
	Esperada	28,7	32,3	61,0
Total	Observada	41 (47,13)	46 (52,87)	87
	Esperada	41,0	46,0	87,0

**Tabla 17: Valores de Chi cuadrado de conjuntivitis por patrón facial.**

	Sig. asintótica (2 caras)	Significación exacta (2 caras)	Significación exacta (1 cara)
Chi-cuadrado de Pearson	,026		
Corrección de continuidad <sup>b</sup>	,046		
Razón de verosimilitud	,025		
Prueba exacta de Fisher		<b>,035</b>	<b>,023</b>
Asociación lineal por lineal	,027		
N de casos válidos			

a. 0 casillas (0,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 12,25.

b. Sólo se ha calculado para una tabla 2x2, gl =1

**Tabla 18: Estimación de riesgo**

	ODDS	Intervalo de confianza de 95 %	
		Inferior	Superior
<b>Odds ratio para "Braquicéfalos No braquicéfalos"</b>	2,912	1,118	7,586
Para cohorte Conjuntivitis = con	1,662	1,093	2,526
Para cohorte Conjuntivitis = sin	,571	,324	1,005
N de casos válidos	87		



Sobre un total de 87 casos, 26 fueron braquicéfalos 61 no braquicéfalos; de los primeros, 17 (65,38%) tuvieron conjuntivitis y 9 (34,62%) no estaban enfermos. De los segundos 24 (39,34%) tuvieron conjuntivitis y 37 (60,66%) no presentaron la enfermedad.

En la tabla **17** con un valor  $p=0,026$  la prueba de significación de Chi cuadrado, indica que la prevalencia de conjuntivitis no es igual, entre los perros con diferente patrón facial, al existir asociación entre estas dos variables.

En la tabla **18**, el valor de Odds ratio es  $OR=2,912$  con un IC al 95% entre los límites inferior de 1,118 y superior de 7,586, en consecuencia la asociación entre las variables es significativa; por lo tanto, se acepta la que el patrón facial en perros es un factor de riesgo para la conjuntivitis. El riesgo se encuentra incrementado en un 74,44% en los braquicéfalos.

Debido a que no se encontraron asociaciones entre los agentes y ninguna de las variables objetivo como son, procedencia de casos, condición genética y edad, se aplicó esta prueba únicamente para las variables conjuntivitis y patrón facial, ya que el riesgo de padecer conjuntivitis podría estar incrementado por el patrón facial de los perros.



## 5. DISCUSION

Los resultados detallados en las tablas demuestran que los tres agentes en estudio no son causa principal de conjuntivitis, considerándolos como flora normal o como agentes oportunistas, debido a que en los cultivos y pruebas realizadas se obtuvo positivos en muestras con o sin conjuntivitis. Habiendo concordancia con otra investigación en donde se cita que los hongos ya sean mohos o levaduras se pueden aislar en algunas enfermedades oculares e incluso en ojos sanos, por la presencia de contaminación ambiental (Arenas, 2008).

La levadura *Malassezia pachydermatis* se presentó en una cantidad más elevada que *Candida albicans*, y *Aspergillus fumigatus*, pero no se muestra relevante en cuanto a causa principal de conjuntivitis, pese a esto en la investigación realizada por Prado, (2008) afirma que de 38 muestras de secreción ocular encontró un positivo es decir un 2.63% del total de las muestras, a diferencia de esta investigación con un 9.2% de positivos, un porcentaje un tanto superior a la investigación citada, pero a su vez encontrándose dentro del intervalo de confianza dados estadísticamente, lo que afirma que los resultados obtenidos presentan concordancia y credibilidad.

En el caso de *A. fumigatus* se encontraron positivos pero todos sin presencia de signos clínicos de conjuntivitis de ningún grado. Verneuil, (2013) cita, que la presencia de este agente depende de la temporada o el clima es así que podríamos considerar que la presencia del mismo en las muestras obtenidas se puede deber a factores ambientales.

En el análisis de variables se encontró que no existe asociación entre los microorganismos estudiados con ninguna de las variables planteadas en los objetivos como son los establecimientos de salud animal, condición genética, edad y patrón facial.



Entre los resultados hallados también se plasma un agregado a la investigación, se trata del análisis de la variable patrón facial y conjuntivitis, de esto se pudo obtener que, los perros braquicéfalos tienen un 74.44% de riesgo de adquirir una conjuntivitis, una asociación significativa, entre braquicéfalos y la presencia de conjuntivitis, que puede deberse a la mayor exposición del globo ocular que presentan los perros con esta anatomía craneal.



## 6. CONCLUSIONES

Una vez realizado el proceso de identificación y tipificación de los agentes fúngicos en estudio, se analizaron los resultados con pruebas de hipótesis, tablas de prevalencia por variable, pruebas de asociación, pruebas de riesgo, mediante las cuales se pudo determinar qué los agentes fúngicos en estudio afectan de igual modo a los perros con o sin conjuntivitis. Es decir que no existe asociación entre la conjuntivitis y los hongos investigados; pudiendo ser causa otros factores.

De la misma forma se observó que al analizar las relaciones entre agente etiológico con las variables de establecimientos de salud animal, condición genética como razas puras y mestizas, edad determinada por rangos, patrón facial braquicéfalo y no braquicéfalo, no se encontró asociación significativa, lo que nos demuestra que *Candida Albicans*, *Malassezia pachidermatis* y *Aspergillus fumigatus*, no tienen asociación con ninguna de las variables propuestas.

El análisis de las variables reveló que los perros con patrones faciales de tipo braquicéfalo tienen una mayor predisposición de adquirir conjuntivitis por cualquier causa. Siendo este un resultado agregado a la investigación, por ser relevante para el diagnóstico clínico.



## 7. RECOMENDACIONES

- Realizar una investigación profunda sobre *Malassezia pachidermatis* en enfermedades generales de ojos, esto podría ofrecer información de una enfermedad sistémica.
- Fomentar investigaciones sobre fármacos tópicos oftálmicos, que se podrían utilizar para controlar los agentes fúngicos patógenos, ampliando la investigación a las zonas rurales de la ciudad ya que ésta investigación fue realizada netamente en la zona urbana de Cuenca y serviría comparar los resultados de las dos partes.
- Ampliar la investigación a más especies de *Malassezia* como la *M. furfur*, *M. globosa*, debido que en la etapa de crecimiento e identificación de los agentes en estudio se pudo observar varios microorganismos entre los cuales estaban bacterias, diferentes levaduras y mohos filamentosos que se podrían investigar con mayor profundidad.



## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Gutiérrez** , R., Ortiz , C., Hincapié, J., & Ramirez, L. (2014). Evaluación in vitro de dos fármacos de uso Veterinario frente a patógenos causantes de otitis externa en perros. *Inv Vet Perú*, 538-544.
- Abarca**, M. (2000). Taxonomía e indentificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. *Revista iveroamericana de micología*, 79-83.
- Arenas**, R. (2008). *Micología Medica Ilustrada*. Mexico: Editorial Mexicana.
- Bineshian**, F., Yadegari, M., Sharifi, Z., & Akbari, E. (2015). Identification of Candida Species Using MP65 Gene and Evaluation of the Candida albicans MP65 Gene Expression in BALB/C Mice. *Published online*, 2-4.
- Bruno**, S. (28 de Abril de 2010). *Production of Extracellular Traps against Aspergillus fumigatus In Vitro and in Infected Lung Tissue Is Dependent on Invading Neutrophils and Influenced by Hydrophobin RodA*. Obtenido de Plos Pathogens: <http://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1000873>
- Cañedo**, V. (2004). *Manual de laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos* . Lima: Perú.
- Cardoso**, N., Vieira , M., & Kenupp, J. (2005). THE POTENTIAL OF AN ASPERGILLUS FUMIGATUS BRAZILIAN STRAIN TO PRODUCE. *Brazilian Journal of Microbiology*, 357-361.
- da Cunha**, O. (2008). *Manual de Oftalmología Veterinaria*. Recuperado de: <http://www.nusi.ccr.ufsm.br/www/biblioteca/Oftalmo.pdf>
- del Palacio**, A., & Cuétara, M. (2009). *Infecciones por hongos invasores*. Recuperado el 13 de 11 de 2013, de <http://seq.es/seq/pdf/libros/imageneshongos.pdf>
- Du**, H., Li, X., Huang, G., Kang, Y., & Zhu, L. (2015). The zinc-finger transcription factor, Ofi1, regulates white–opaque switching and filamentation in the yeast Candida albicans. *Acta Biochim Biophys*, 335-341.
- Esparza** , M., Abellan , A., Vitse-Standaert, Pañarrubi, P., Arguelles , J., Poulain , D., & Jouault, T. (2011). Glycoconjugate expression on the cell wall of tps1/tps1 trehalose-deficient Candida albicans strain and implications for its interaction with macrophages. *Glycobiology*, 796–805.



- Fernandez** , C. (2012). Citología en oftalmología veterinaria. *Reduca (Recursos Educativos)*, 45-47.
- Ferreira**, L., Ferreira , A., da Silva , M., Tinasi, J., & Franco , V. (2009). *Microbiota conjuntival de cães hígidos e com afecções oftálmicas*. Recuperado el 13 de Noviembre de 2013, de Acta Scientiae Veterinariae. Recuperado de: <http://www.ufrgs.br/actavet/37-2/art826.pdf>
- Garcia**, C. (Junio de 2011). *Oftalmología Veterinaria*. Mexico D.F.: La Carita.
- Giusiano**, G. (2006). Malassezia, Estado del conocimiento y perspectivas en su estudio. *Argentina de Microbiología*, 44-46.
- Granullo**, A. (2015). (2015). Antibiosis interaction of Staphylococcus aureus on Aspergillus fumigatus assessed in vitro by mixed biofilm formation. *BMC Microbiology*, 12 of 15.
- Guevara**, M., Ursia, F., & Casquero, J. (2007). *Manual de Procedimientos y técnicas de laboratorio para la identificación de los principales hongos oportunistas causantes de micosis humana*. Lima: Instituto Nacional de Salud.
- Gutierrez** , L. (2014). Evaluación in vitro de Dos Fármacos de Uso Veterinario frente a. *Rev Inv Vet Perú*, 538-542.
- Gutierrez**, J. (2010). *Inmunología Veterinaria*. México: El Manual Moderno.
- Hernandez**, A., & et al. (Marzo de 2010). *Presentación sistémica de Aspergillus spp con semiología neurológica en un Pastor Alemán: informe de un caso clínico*. 1 de Julio de 2014, Recuperado de: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0301-50922010000100002&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0301-50922010000100002&script=sci_arttext)
- Hernandez**, G., Ramirez, R., Rodriguez, L., Mora, F., Vidales , J., & Hernandez, J. (2010). Localization of Serratia marcescens in bacterial and fungal profile of conjunctiva of clinically healthy horses from Monterrey, Nuevo Leon, Mexico. *Veterinaria Mexico*, 239-249. Recuperado de: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0301-50922010000400001&script=sci\\_arttext&tlng=en](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0301-50922010000400001&script=sci_arttext&tlng=en)
- Hofling**, A., Eid, M., Montero , L., Souza, L., Catai, M., & Zorat, M. (2002). Alterações da microbiota conjuntival e palpebral após uso tópico de lomefloxacina e tobramicina na cirurgia de catarata e cirurgia refrativa. *Arq. Bras Oftalmol*, 21-29.



- Leite, A., Oliveira, D., & Baraldi.** (2013). *MORPHOLOGY OF OCULAR SYSTEM OF DOMESTIC ANIMALS*. Recuperado el 17 de julio de 2014, Recuperado de: <http://www.arsveterinaria.org.br/index.php/ars/article/viewFile/504/830>
- Linek, J.** (2004). Mycotic endophthalmitis in a dog caused by *Candida Albicans*. *Veterinary Ophthalmology*, 159-162.
- Lopez, E.** (2013). Efectividad de la inmunoterapia con alérgenos en pacientes con queratoconjuntivitis vernal. *Alergia México*, 11-16.
- Maggs, D., Miller, P., & Ofri, R.** (2009). *Slatter Fundamentos de Oftalmología Veterinaria*. Barcelona: Elsevier.
- Martin, C.** (2010). *Ophthalmology Disease Veterinary Medicine*. Barcelona-España: Grafos SA.
- Martín, J.** (2007). *Atlas de Oftalmología Clínica del Perro*. Zaragoza: Isac Artes Graficas.
- Mickelsen, P., Viano, M., Stevens, D., & Dias, P.** (1987). Clinical and Microbiological Features of Infection with *Malassezia pachydermatis* in High-Risk Infants. *The Journal of Infections Diseases*, 1163-1168.
- Moreno, R., Valdés, M., & Cevantes, O.** (2002). Evaluación de la producción de gliotoxina en 10 cepas de *Aspergillus fumigatus* obtenidas de aislamientos clínicos. *Tec Pecu Mex*, 139-148.
- Moye-Rowley.** (2015). Multiple mechanisms contribute to the development of clinically significant azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Frontier in Microbiology*, 1-5.
- Mullins, J., Harvey, R., & Seaton, A.** (2006). Sources and incidence of airborne *Aspergillus fumigatus*. *Clinical y Experimental Allergy*, 209-217.
- Odenhoff, W., Frank, G., & Deboer, D.** (2014). Comparison of the results of intradermal test reactivity and serum allergen-specific Ig E measurement for *Malassezia pachydermatis* in atopic dogs. *Veterinary Dermatology*, 507.
- Oriá, A., Pinheiro, A., Almeida, D., Furtado, M., & Pinna, M.** (26 de octubre de 2011). *Normal bacterial microbiota of the conjunctiva*. 12 de noviembre de 2013, Recuperado de: <http://www.revista.dmv.ufrpe.br/index.php/rdmv/article/download/153/126>.
- Pemán, J., Martín, E., & Rubio, M.** (2007). Guía Práctica de Identificación y Diagnóstico en Micología Clínica. *Iberoamericana de Micología*, 10-1 a 10-7, 11-1 a 11-9.



- Prado, M.** (2008). *Frequency of yeasts and dermatophytes from healthy and diseased dogs*. 12 de noviembre de 2013, Recuperado de:  
<http://vdi.sagepub.com/content/20/2/197.full.pdf+html>
- Prats, G.** (2005). *Microbiología Clínica*. Buenos Aires: Medica Panamericana.
- Pulido, A.,** Linarez, M., Castañeda, R., Gutierrez , C., Araqnda , M., & Rueda, M. (2011). *Análisis retrospectivo de las alteraciones dermatológicas, óticas y oftalmológicas con diagnóstico clínico presuntivo de micosis en caninos y felinos*. El 11 de Agosto de 2013, Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/unsc/v16n3/v16n3a08.pdf>
- Quinn, P.,** Markey , B., Leonard, F., FitzPatrick, E., Fanning, S., & Hartigan, P. (2011). *veterinary microbiology and microbial disease*. Obtenido de <http://www.slideshare.net/vicky14381/veterinary-microbiology-and-microbial-disease>
- Rodriguez, A.,** Montoya, J., Martinez, E., Bouvery, I., & Pérez, M. (1991). Citodiagnóstico Conjuntival en el Perro. *Clínica Veterinaria de pequeños animales*, 245 - 246.
- Ruiz, C.,** & Salguero, O. (28 de Marzo de 2003). *Ojo Rojo*. Obtenido de Urgencias en atención primaria. Recuperado de:  
<http://test.elsevier.es/ficheros/sumarios/1/64/1469/56/1v64n1469a13045469pdf001.pdf>
- Said-Sidier, N.,** Padilla , E., Langsley, G., & Ojcius, D. (2010). *Aspergillus fumigatus Stimulates the NLRP3 Inflammasome through a Pathway Requiring ROS Production and the Syk Tyrosine Kinase*. Obtenido de Plos one: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0010008#abstract0>
- Spanamberg, A.,** & et al. (2013). *Aspergillus fumigatus from normal and condemned carcasses*. *Scielo org*. Obtenido el 24 de Julio de 2014, Recuperado de:  
<http://www.scielo.br/pdf/pvb/v33n9/a04v33n9.pdf>
- Tarumoto, N.** (2014). Exacerbation of Invasive Candida albicans Infection by Commensal Bacteria or a Glycolipid Through IFN- $\gamma$  Produced in Part by iNKT Cells. *The Journal of Infectious Disease*, 799-810.
- Torres, M.,** Leiva, M., Tabar, M., Naranjo, C., Peña , J., & Peña, T. (2009). Ligneous conjunctivitis in a plasminogen-deficient dog: clinical management and 2-year follow-up. *Veterinary Ophthalmology*, 248-253.



**Turner, S.** (2010). Soluciones Saunders en la práctica veterinaria. En *Small Animal Ophthalmology* (págs. 15-167). Elsevier, España: Saunders.

**Verneuil, M.** (2013). *Conjunctival and cutaneous fungal flora in clinically normal dogs in Southern France*. Obtenido el 18 de julio de 2014, Recuperado de:

[http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=ArticleListURL&\\_method=list&\\_ArticleListID=-](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleListURL&_method=list&_ArticleListID=-)

[612453016&\\_sort=r&\\_st=13&view=c&md5=be97d7ecae6d5fad03ef3266d0b075bf&searchtype=a](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleListURL&_method=list&_ArticleListID=-612453016&_sort=r&_st=13&view=c&md5=be97d7ecae6d5fad03ef3266d0b075bf&searchtype=a)

**Zhao, L., Jiang, J., Zhu, Z., & Jiang, Y.** (18 de Octubre de 2015). *Lysine enhances the effect of amphotericin B against Candida albicans in vitro*. Obtenido de Acta Biochim Biophys. Oxford journals. Recuperado de:

<http://abbs.oxfordjournals.org/content/early/2015/12/28/abbs.gmv125.abstract>



## 9. GLOSARIO

- **Proencéfalo:** Parte superior del cerebro del embrión, que más tarde se divide en telencéfalo y diencéfalo
- **Fotorreceptores:** En general, un fotorreceptor es un mecanismo capaz de convertir la energía óptica de la luz que incide sobre una superficie sensora en energía eléctrica, mediante un proceso que se denomina transducción
- **Hiperplasia:** Es el aumento de tamaño de un órgano o de un tejido
- **Reino Fungi:** Es un grupo de organismos eucariotas entre los que se encuentran los mohos, las levaduras y las setas.
- **Hifas:** Las hifas son los filamentos que, reunidos, forman el micelio de la mayoría de los hongos
- **Clamidosporas:** Una clamidospora es un tipo de espora de paredes gruesas de varias clases de los hongos. Es una etapa del ciclo vital del organismo que sobrevive en condiciones desfavorables, tales como estaciones secas o cálidas
- **Conidios:** Un conidio es una espora asexual inmóvil formada directamente a partir de una hifa o célula conidiógena o esporógena.
- **Blastoconidias:** Conidio que se produce por gemación
- **Propágulos:** Es decir, es cualquier estructura de reproducción y propagación biológica, producido sexual o asexualmente, capaz de desarrollarse de manera separada para dar lugar a un nuevo organismo idéntico al que le formó.



## 10. ANEXOS



### 10.1 Matriz de conceptualización de variables

**Tabla 19: Matriz de conceptualización y operacionalización de las variables.**

	<b>Variab</b> les	<b>Tipo de variables</b>	<b>Escala de medición de las variables</b>	<b>Definición operacional de las variables</b>	<b>Dimensiones</b>	<b>Indicadores</b>	<b>Valor final</b>	<b>Técnicas e instrumentos</b>	<b>Fuente</b>
<b>Y<sub>1</sub></b>	Prevalencia	Cuantitativa	Razón	Levadura o moho filamentoso que afecta la conjuntiva	Fraccionario	Número de Unidades Formadoras de Colonias	Crecimiento	Experimento y hoja de laboratorio	Cultivos
<b>Y<sub>2</sub></b>	Levaduras y mohos filamentosos	Cualitativa	Nominal	<i>Candida Albicans, Malassezia Pachidermatis, Asperigillus Fumigatus</i> , otros, ninguno	Análisis de laboratorio:0-1-2-3-4	Número de Unidades Formadoras de Colonias	Crecimiento	Experimento y hoja de laboratorio	Cultivos
<b>Y<sub>3</sub></b>	Conjuntivitis en perros	Cualitativa	Nominal	Afección ocular no	Signos, síntomas, laboratorio. Existe o no: 0-1	*Hiperemia ocular, secreción mucoide *Engrosamiento de la mucosa conjuntival *Cultivo y tipificación	Signos Agente etiológico	Técnica: Observación Instrumentos: hoja clínica y de laboratorio	Mucosa conjuntival
<b>Y<sub>4</sub></b>	Intensidad o gravedad de la enfermedad	Cuantitativa	Ordinal politómica	Ausente, Ligera, Moderada, Severa	Signos: 1-2-3-4	Hiperemia ocular, secreción ocular mucoide, epifora	Ausente, Ligera, Moderada, Severa	Instrumento: hoja clínica	Clínicas
<b>X<sub>1</sub></b>	Lugar	Cualitativa	Nominal	Área para muestrear	Clínicas	Área urbana de Cuenca	Características	Observaciones y hoja clínica	Clínicas
<b>X<sub>2</sub></b>	Edad (Estratos)	Cuantitativa	Ordinal	Periodo de existencia del animal	Cachorros(<1-1años), jóvenes(1-4años), adultos(4-8años), gerontes (> 8)	Número de perros cachorros, Jóvenes, adultos y gerontes	Afectados	Entrevista y hoja de campo	Clínicas
<b>X<sub>3</sub></b>	Raza	Cualitativa	Nominal	Cada uno de los grupos en que se subdividen las especies	Varios	Todas	Controlar la población canina	Entrevista y hoja clínica	Clínicas
<b>X<sub>4</sub></b>	Patrón facial	Cuantitativa	Nominal	Dolicocefalos, mesocéfalos, braquicefalos	Perros: 1 2 3	Diagnóstico o definición	Tipos	Observación y hoja clínica	Clínicas

## 10.2 Árbol para el Planteamiento del Problema.

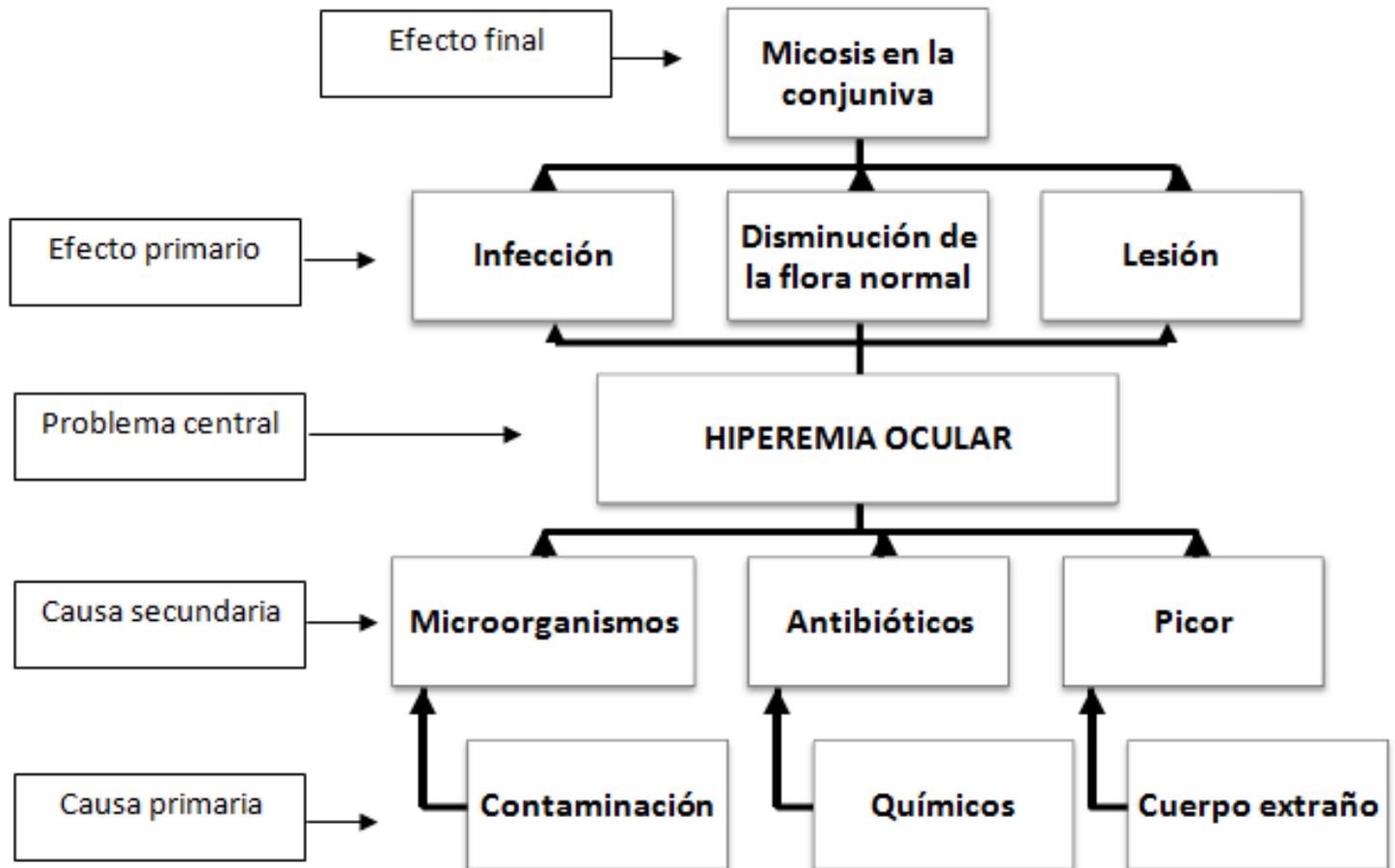


Gráfico 1: Árbol para el Planteamiento del Problema.



### 10.3. Muestreo por casos oftálmicos anuales.

Tabla 20: Pacientes caninos en dos Clínicas de la ciudad de Cuenca.

Establecimiento	Pacientes totales por año	Casos oftálmicos %	Pacientes oftálmicos al año
Clínica veterinaria Mora	2160	11	238
Clínica veterinaria Clinican	1062	10	106
<b>Total</b>	<b>3222</b>		<b>344</b>

### 10.4 Cálculo de recepción de muestras

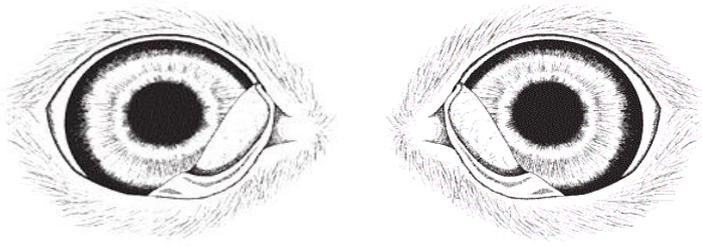


Tabla 21: Muestras

Establecimiento	Pacientes oftalmológicos		
	En un año	Un mes	Tres meses
Clínica veterinaria Mora	238	20	60
Clínica veterinaria Clinican	106	9	27
<b>Total</b>	344	29	<b>87</b>

## 10.5 Hoja de Campo

Hoja de recolección de datos		Fecha	Nro.	
<b>1. Datos del establecimiento</b>				
Nombre de establecimiento				
Médico responsable				
<b>2. Datos del animal</b>				
Nombre del animal		<b>Sexo</b>	M	F
Raza		Edad		

Nombre del propietario				
<b>3. Historia clínica general/Anamnesis</b>				
<b>4. Datos de la muestra</b>				
DERECHO		IZQUIERDO		
				
<b>5. Caracterización de la conjuntivitis</b>				
<b>CONJUNTIVITIS</b>	<b>Ausente</b>	<b>Ligera</b>	<b>Moderada</b>	<b>Severa</b>
<b>SIGNOS</b>				
<b>Prurito</b>				
<b>Hiperhemia</b>				
<b>Epífora</b>				
<b>Secreción ocular</b>				
<b>Quemosis</b>				
<b>Queratosis</b>				

**Gráfico 2: Hoja de recolección de datos para toma de muestra de mucosa conjuntival.**



**10.6. Anexo: Hoja de laboratorio para *Aspergillus fumigatus***

F E C H A 2015	Nº de Mues tra	L U G A R	Tipo de Muestra mucosa conjuntival	Medio de cultivo	Tipo de Colora ción	Largo del Estipe y/o esporan- gióforo	Diámetro del estipe y/o esporan- gióforo	Diámetro de la vesícula y/o E孢angio. Columela en Zygomycetos	Largo de las fiálides y/o Métulas	Ancho de las Fiálides y/o Métulas	Diámetro de las micro- conidias y/o esporangios- poras	Tipifi cación	Observ.
19/03	4	<b>CC</b>	Secreción	ASD	Verde olivo	225	5	18.13	2.5	2	2.25	<b>A. fumigatus</b>	replicado
26/03	17	<b>CM</b>	Secreción	ASD	Verde	237.5	5	18.75	2.5	2	2	<b>A. fumigatus</b>	
02/04	23	<b>CM</b>	Secreción	ASD	Verde y blanco	200	9.75	19.4	5.25	2	2	<b>A. fumigatus</b>	
15/04	39	<b>CM</b>	Secreción	ASD	Verde	250	8.75	25	7.5	2.5	2.5	<b>A. fumigatus</b>	Replicado combinado

**Gráfico 3: Hoja de laboratorio para registrar *Aspergillus fumigatus*.**



**10.7. Anexo: Hoja de laboratorio para *Candida albicans***

Fecha  2015	Clínica Veterinaria	N° de Muestra	Medio de cultivo		Presencia de Blastosporas a partir del ASD	Presencia de Clamidosporas y pseudohifas	Asimilación de Carbohidratos						Tipificación	Observaciones
			ASD	AHM			Gl	Lac	Sac	Mlt	Gal	Raf		
24/03	CM	14	*	*	*	*	*		*	*	*		C. Albicans	replicado
31/03	CM	20	*	*	*	*	*		*	*	*		C. Albicans	
08/04	CC	26	*	*	*	*	*		*	*	*		C. Albicans	replicado
14/04	CM	36	*	*	*	*	*		*	*	*		C. Albicans	replicado

**Gráfico 4: Hoja de laboratorio para registrar *Candida albicans*.**

Gl=glucosa, Lac=lactosa, Sac=sacarosa, Mlt=maltosa, Gal=galactosa, Raf=rafinosa, ASD=Agar Sabouraud dextrosa, AHM=Agar Harina de Maíz



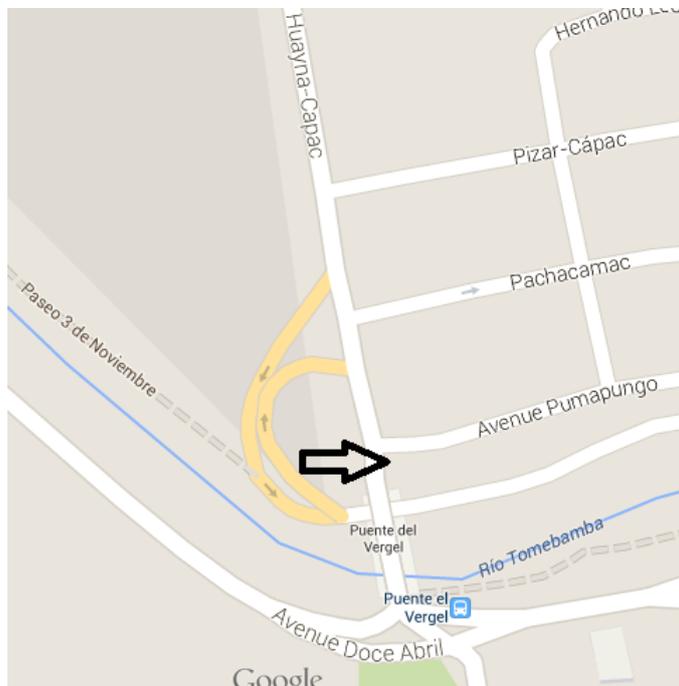
**10.8. Anexo: Hoja de laboratorio para *Malassezia Pachydermatis*.**

Fecha 2015	Clínica Veterinaria	N° de Muestras	Medio de Cultivo ASD	Presencia de Blastosporas a partir de ASD	Prueba de hidrólisis Urea	Asimilación de Carbohidratos			Prueba de Catalasa	Asimilación Tween				Tipificación	Observaciones
						Gl	Mn	Sb		T 20 10 %	T 40 0,5 %	T 60 0,5 %	T 80 0,1 %		
18/03	CC	4	*	*	*	*	*	*	*	-	*	*	*	<b>M. pachydermatis</b>	<b>combinada</b>
23/03	CC	7	*	*	*	*	*	*	*	-	*	*	*	<b>M. pachydermatis</b>	
15/04	CM	34	*	*	*	*	*	*	*	-	*	*	*	<b>M. pachydermatis</b>	<b>replicado</b>
14/04	CM	36	*	*	*	*	*	*	*	+/-	*	*	*	<b>M. pachydermatis</b>	<b>replicado</b>
15/04	CM	39	*	*	*	*	*	*	*	+/-	*	*	*	<b>M. pachydermatis</b>	
21/04	CC	40	*	*	*	*	*	*	*	-	*	*	*	<b>M. pachydermatis</b>	
21/04	CC	44	*	*	*	*	*	*	*	-	*	*	*	<b>M. pachydermatis</b>	<b>replicado</b>
16/05	CC	82	*	*	*	*	*	*	*	+/-	*	*	*	<b>M. pachydermatis</b>	

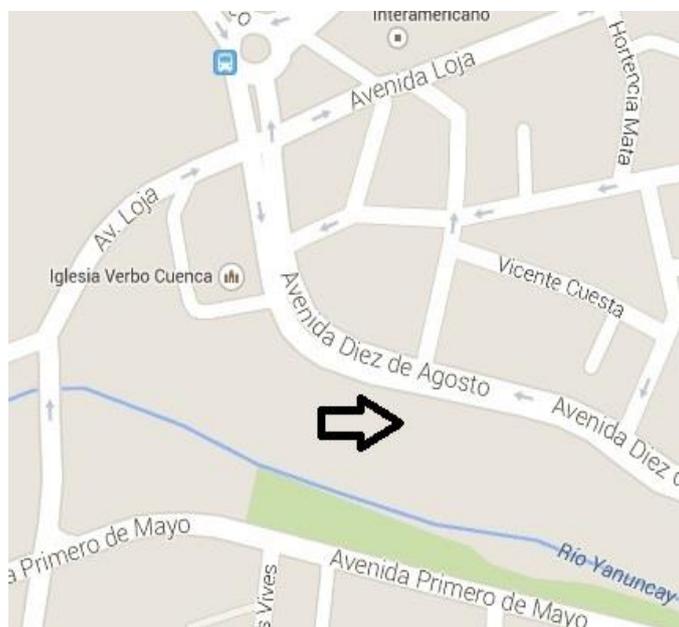
**Gráfico 5: Hoja de laboratorio para registrar *Malassezia Pachydermatis*.**

**Gl**=glucosa, **Mn**=manitol, **Sb**=sorbitol, **ASD**=Agar Sabouraud dextrosa

### 10.9. Croquis de las Clínicas de recepción de muestras



**Gráfico 6: Clínica Veterinaria Mora.**



**Gráfico 7: Clínica Veterinaria Clinican**

## 10.10. Registro Fotográfico De La Investigación

### RECOLECCION Y CULTIVO DE MUESTRAS



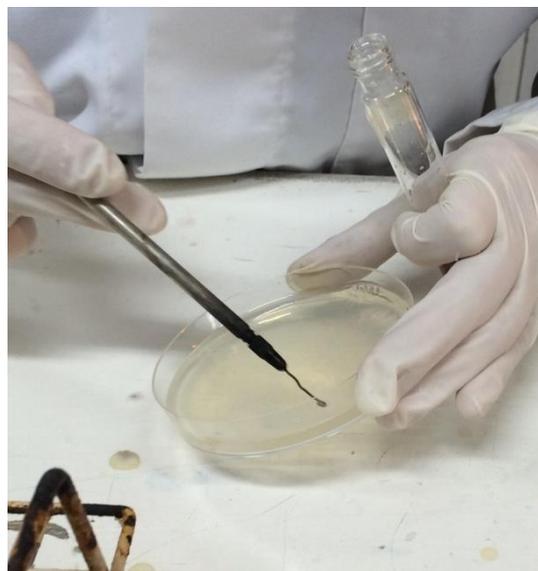
**Imagen 1: Tubo con agua destilada para recolección de muestras.**



**Imagen 2: Toma de muestra a nivel de conjuntiva ocular.**

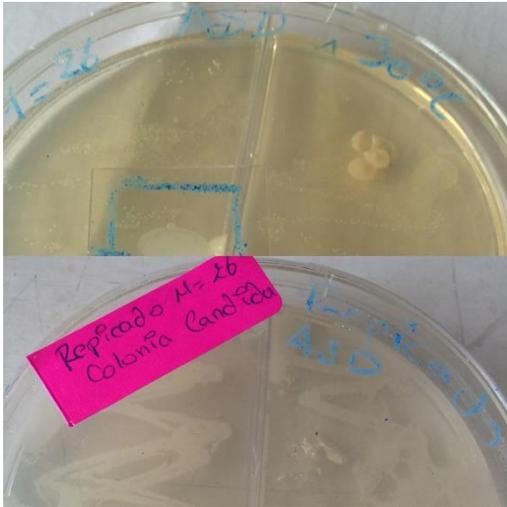


**Imagen 3: Recepción de muestras.**



**Imagen 4: Siembra de la muestra en ASD.**

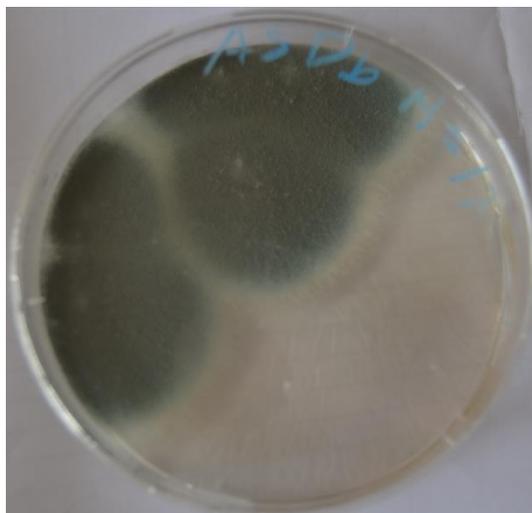
## REVISIÓN DE CULTIVOS



**Imagen 5: Observación de colonias de Candida albicans.**



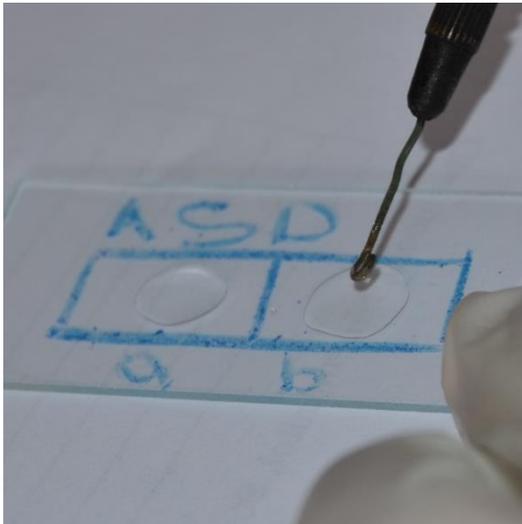
**Imagen 6: Observación de colonias de Malassezia pachidermatis.**



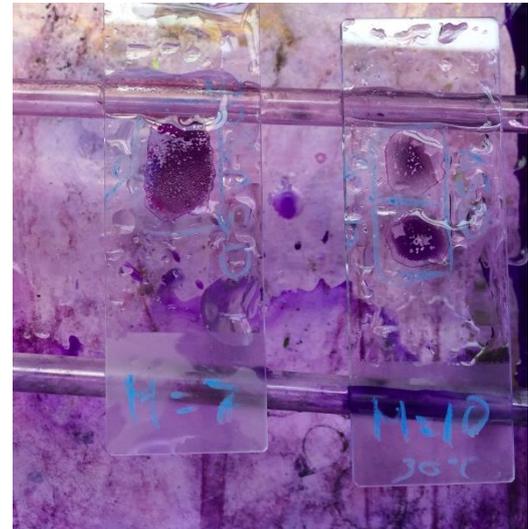
**Imagen 7: Observación de colonias de Aspergillus fumigatus.**

## PRUEBAS DE LABORATORIO

### Tinciones



**Imagen 8: Disolución de una colonia en el suero fisiológico.**



**Imagen 9: Tinción de GRAM.**



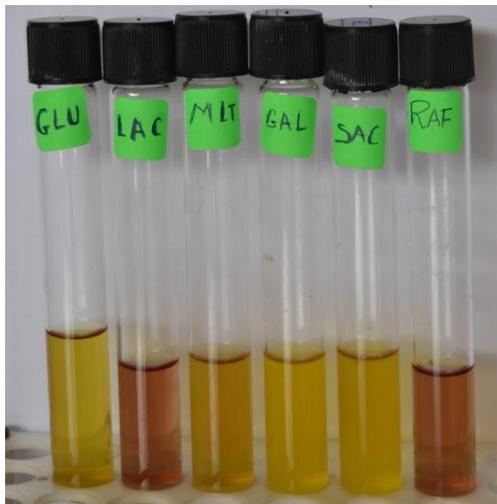
**Imagen 10: Tinción con azul de lactofenol para mohos filamentosos.**

## OBSERVACIÓN DE *CANDIDA ALBICANS*



**Imagen 11: Observación de *Candida albicans* en el microscopio.**

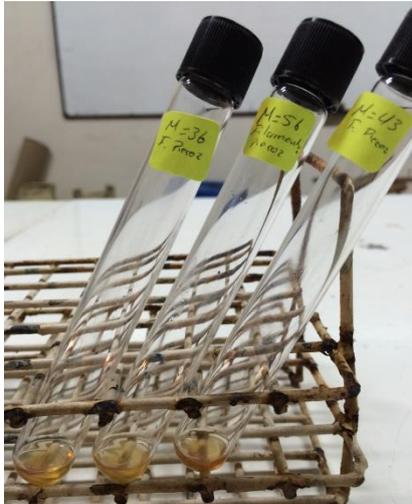
## TIPIFICACIÓN *CANDIDA ALBICANS*



**Imagen 12: Prueba de azúcares para *C. albicans*.**



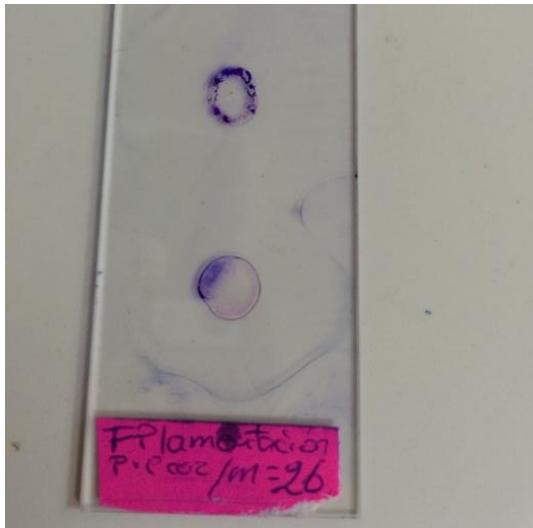
**Imagen 13: Cultivo en AHM para filamentos tempranos y presencia de clamidiasporas.**



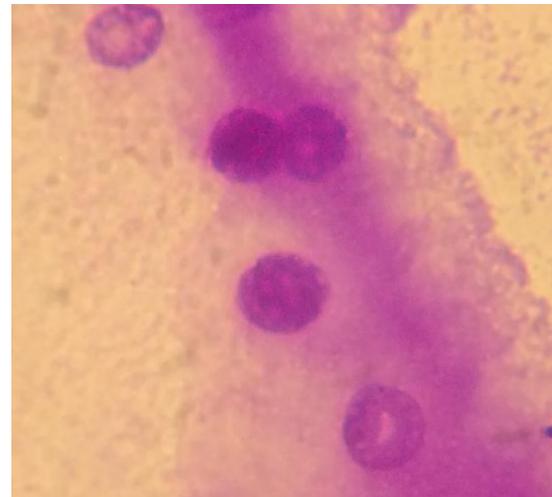
**Imagen 14:** Tubos con suero sanguíneo, para prueba de filamentación precoz



**Imagen 15:** Observación de filamentos con presencia de Clamidosporas de *C. Albicans*.

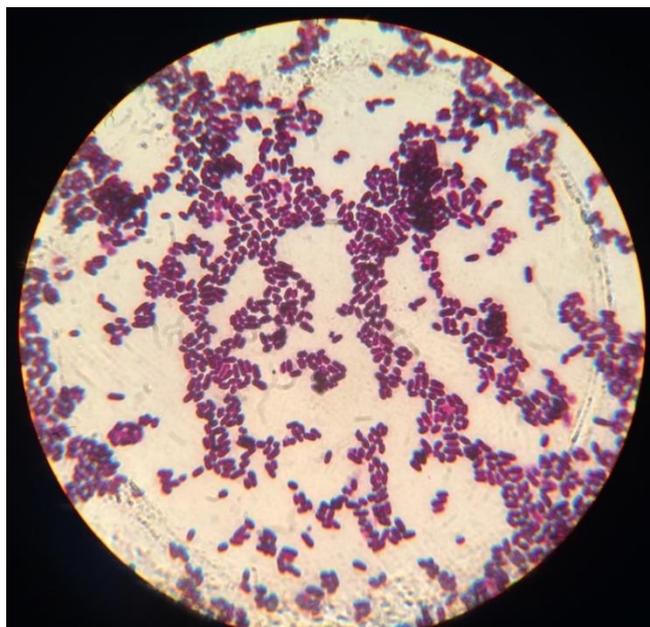


**Imagen 17:** Tinción de Gram para filamentación precoz.



**Imagen 16:** Observación en el microscopio de Clamidosporas de *C albicans*.

### ***OBSERVACION DE MALASSEZIA PACHIDERMATIS***

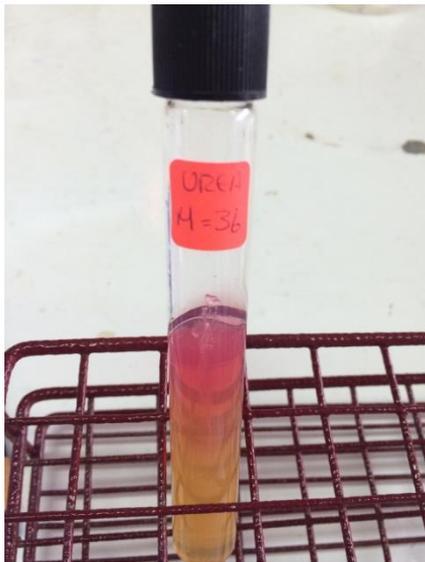


**Imagen 18: Observación de blastosporas de *M. pachidermatis*.**

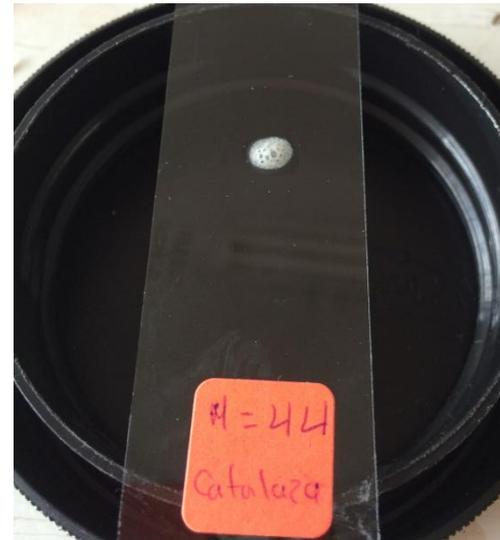
### ***TIPIFICACION PARA MALASSEZIA PACHIDERMATIS***



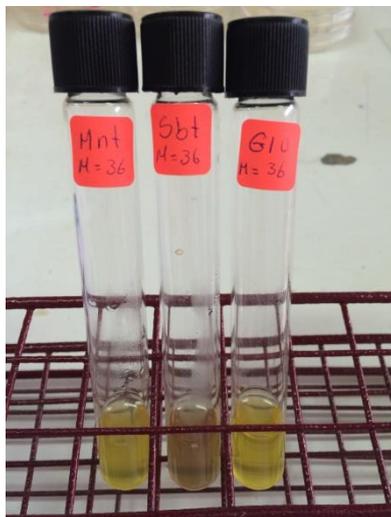
**Imagen 19: Pruebas de tipificación para *M. pachidermatis*.**



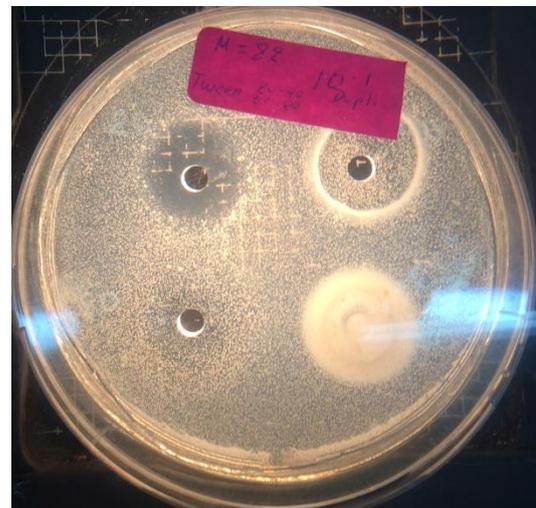
**Imagen 21: Prueba positiva de hidrólisis de la urea, para *M. pachidermatis***



**Imagen 20: Prueba de Catalasa positiva *M. pachidermatis*.**

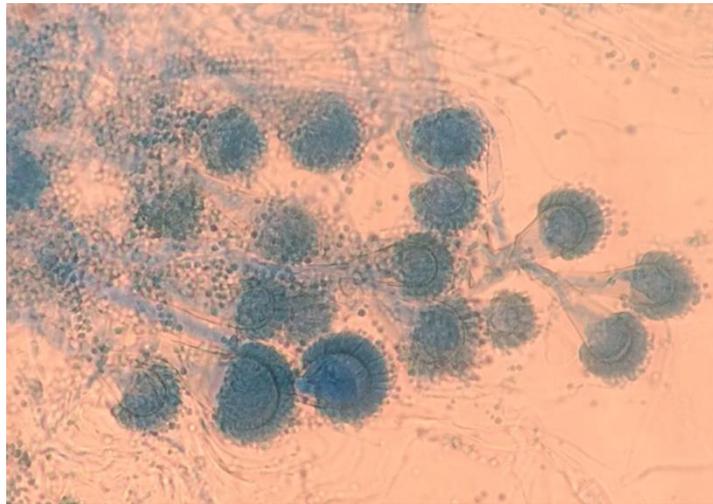


**Imagen 22: Prueba de asimilación de azúcares positiva a *M. pachidermatis*.**



**Imagen 23: Prueba de tween positivo para *M. pachidermatis*.**

## ***OBSERVACION DE ASPERGILLUS FUMIGATUS***



**Imagen 24: Observación mediante microscopio.**

## ***TIPIFICACIÓN DE ASPERGILLUS FUMIGATUS***



**Imagen 25: Medición de Aspergillus fumigatus gracias al micrómetro ocular.**