

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



TESIS

**PERFIL BACTERIOLÓGICO Y FÚNGICO DE LA CONJUNTIVA DE
CABALLOS DE TRABAJO EN MONTERREY**

PRESENTADA POR

MVZ. CITLALY MARTÍNEZ COVARRUBIAS

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAestrÍA EN CIENCIA ANIMAL**

OCTUBRE, 2016

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
FACULTAD DE AGRONOMÍA**



TESIS

**PERFIL BACTERIOLÓGICO Y FÚNGICO DE LA CONJUNTIVA DE
CABALLOS DE TRABAJO EN MONTERREY**

PRESENTADA POR

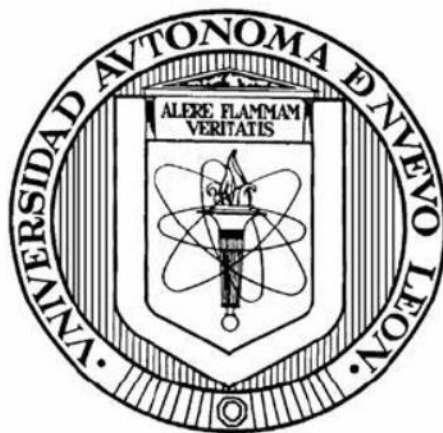
MVZ. CITLALY MARTÍNEZ COVARRUBIAS

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL**

OCTUBRE, 2016

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

POSGRADO CONJUNTO EN CIENCIA ANIMAL



TESIS

**PERFIL BACTERIOLÓGICO Y FÚNGICO DE LA CONJUNTIVA DE
CABALLOS DE TRABAJO EN MONTERREY**

PRESENTADA POR

MVZ. CITLALY MARTÍNEZ COVARRUBIAS

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAestrÍA EN CIENCIA ANIMAL**

GENERAL ESCOBEDO, NUEVO LEÓN, MÉXICO,

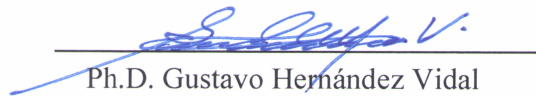
OCTUBRE, 2016

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
POSGRADO CONJUNTO AGRONOMÍA VETERINARIA

PERFIL BACTERIOLÓGICO Y FÚNGICO DE LA CONJUNTIVA DE CABALLOS
DE TRABAJO EN MONTERREY

Aprobación de tesis por el comité particular de

M.V.Z. Citlaly Martínez Covarrubias



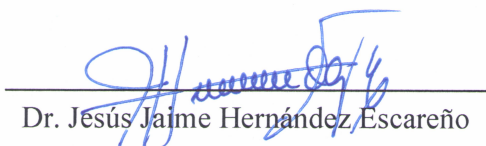
Ph.D. Gustavo Hernández Vidal

Director de tesis



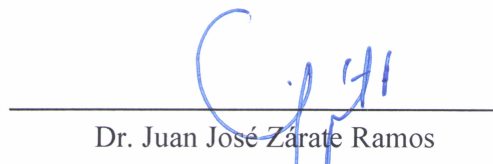
Dra. Diana Elisa Zamora Avila

Co- Director de tesis



Dr. Jesús Jaime Hernández Escareño

Co-Director de tesis



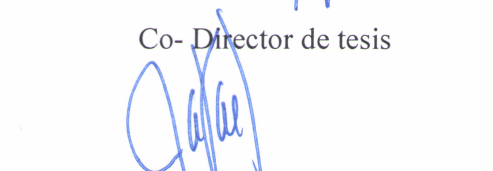
Dr. Juan José Zárate Ramos

Co- Director de tesis



Ph.D. Luis Edgar Rodríguez Tovar

Co-Director de tesis



Ph.D. Rafael Ramírez Romero

Co-Director de tesis

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a mi familia y a todos los que han creído en mí a través de los años.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco infinitamente a mi familia por darme la oportunidad de seguir estudiando, por el apoyo brindado todo este tiempo.

Agradecimiento a las instituciones que colaboraron en mi formación, especialmente al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León por la formación académica que me ha dado durante estos 9 años de universitaria.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UANL por los mil y un conocimientos y experiencias brindadas.

Gracias a todos los Doctores/maestros que forman parte del posgrado conjunto por el apoyo brindado, por sus consejos, por sus exigencias, por todo lo que hicieron por mí y mi generación en búsqueda de formar investigadores de calidad. Especialmente quisiera agradecer a mis asesores: Dra. Diana por sus consejos y asesoría durante la realización de mi proyecto, Al Dr. Jaime por su apoyo en el laboratorio, por su paciencia; gracias por enseñarme tanto y por siempre estar disponible para resolver mis dudas o para platicar de lo lindo, definitivamente usted fue pilar de este proyecto.

Al Dr. Gustavo por todos los consejos y asesoría brindada. Gracias por ponerme a vista en otro nivel, por impulsarme a buscar la excelencia y la superación. Sé que siempre seré su tesista estrella “Citlaly Margarita del Quetzal”.

Gracias al personal del laboratorio de Microbiología y al de Biología molecular por todo el apoyo brindado. Especialmente quisiera agradecerle a Fany por todo su apoyo.

El posgrado conjunto me acercó a muchísimas personas, hice grandes amigos, viví tantas aventuras y generé tan gratos recuerdos. Gracias a Ana quien además de ser una gran amiga es un hombro donde apoyarme, ¡gracias por hacerme caso y entrar a la maestría conmigo hermana! Te dije que no te arrepentirías.

Que decir de mis “compañeditos” Claudia, Liliana y Juan Pablo sin ustedes aprender estadística no hubiera sido ni fácil ni divertido.

A Elva y Mafy por siempre creer en mí, por sus palabras de apoyo y por estar aún en mis momentos malos. A todas mis amigas y amigos quienes siempre tenían una palabra que motivaba a seguir adelante.

A Tony porque con sus palabras alejaba la preocupación de mí y me retaba a seguir escalando académica y profesionalmente hasta lograr mis metas.

Agradezco también al Dr. Andrade ya que fue el quien me introdujo en el estudio de la oftalmología veterinaria; gracias por todos los conocimientos que compartió conmigo y por el apoyo que siempre me ha dado.

RESUMEN

El objetivo principal de este estudio fue determinar el perfil bacteriológico y fúngico de la conjuntiva de caballos de trabajo.

Esta investigación se realizó a partir de hisopados conjuntivales de los cuales se obtuvo el material para el posterior cultivo microbiológico y para la extracción de ADN. Posterior a la siembra y crecimiento de las muestras se realizó la identificación de los microorganismos bajo métodos de microbiología tradicional y mediante métodos moleculares. Una vez identificados estos microorganismos se realizó una cuenta viable en placa de unidades formadoras de colonias (UFC).

Los animales utilizados en este estudio pasaron un breve examen clínico, se les realizó la prueba de producción de lágrima y una anamnesis a cada uno de los caballos utilizados.

En cuanto a los microorganismos recuperados se observó una amplia similitud con estudios previos. Pero las diferencias identificadas representan los resultados más relevantes de este estudio.

Se logró identificar la presencia de *Malassezia* spp en la conjuntiva de estos caballos, esto representa el primer reporte de este organismo fúngico en la superficie ocular del caballo y el primero de la presencia *Malassezia* spp sobre ojos sanos. Además se logró la identificación de distintas especies del género *Candida* spp que no habían sido previamente descritas como habitantes de la superficie ocular.

Se reportan además valores elevados en cuanto a producción de lágrima, los cuales se asocian a las características de alojamiento y a la función zootécnica de los animales.

Este estudio se complementó mediante la realización de un muestreo sobre caballos deportivos de alto rendimiento los cuales se encontraban bajo estricto régimen alimenticio y de limpieza distinto a los de los caballos de trabajo.

Realizando la comparativa entre los resultados obtenidos en los caballos de trabajo y deportivos de alto rendimiento, se notaron diferencias significativas en los valores de producción de lagrima y en la presencia de *Malassezia* spp en la conjuntiva de estos caballos.

ÍNDICE

Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Resumen	vii
Contenido	ix
Abreviaturas	xiii
Índice de Figuras	xv

CAPÍTULO 1

1. Introducción	1
1.1 Superficie ocular	1
1.1.1 Córnea	1
1.1.2 Conjuntiva	2
1.1.3 Película pre corneal	5
1.1.4 Producción de lagrima (Test de Schirmer)	8
1.1.5 Mecanismos de defensa de la superficie ocular	9
1.2 Microorganismos de la superficie ocular de los caballos	9
1.3 Queratitis infecciosa	13
1.3.1 Causas de queratitis infecciosa	14
1.3.2 Queratomicosis	14
1.3.3 Agentes infecciosos implicados	15
1.4 Objetivo	16

CAPÍTULO 2

2. Materiales y Métodos	17
2.1 Materiales	17

2.1.1	Colecta de muestras	17
2.1.2	Microbiología	17
2.1.3	Extracción de ADN y PCR	17
2.1.4	Reactivos y medios de cultivo	18
2.1.4.1	Microbiología	18
2.1.4.2	Medio de transporte Stuart modificado	18
2.1.4.3	Agar Eosina azul de metileno	19
2.1.4.4	Agar Mueller Hinton	19
2.1.4.5	Agar selectivo <i>E. Coli</i> O157H7	20
2.1.4.6	Agar extracto de levadura	21
2.1.4.7	Agar selectivo <i>Candida</i>	21
2.1.4.8	Caldo Dixon modificado (mDixon)	21
2.1.4.9	Azul de lactofenol	22
2.1.5	Material biología molecular	22
2.1.5.1	Extracción de ADN	22
2.1.5.2	Tampón de lisis celular o de extracción	23
2.1.5.3	Tampón TE	23
2.1.5.4	Gel agarosa al 0.8%	23
2.1.5.5	Tampón de carga	23
2.1.5.6	TBE 1x	24
2.1.5.7	PCR	24
2.1.5.8	Master mix	24
2.1.5.9	Cebadores	25
2.1.5.10	Cepa control	25
2.1.5.11	Gel agarosa 1.5%	25
2.1.5.12	Tinción para ácidos nucleicos	25

2.2 Métodos	25
2.2.1 Sitio de estudio	25
2.2.2 Colecta de datos	26
2.2.3 Prueba de producción de lagrima (Test de Schirmer)	26
2.2.4 Colecta de muestras	26
2.2.5 Transporte de muestras	27
2.2.6 Criterios de inclusión	27
2.2.7 Procesamiento de muestras	27
2.2.7.1 Medios de cultivo utilizados	27
2.2.7.2 Siembra de las muestras	28
2.2.7.3 Condiciones de incubación	28
2.2.8 Identificación fenotípica de microorganismos bacterianos	29
2.2.8.1 Evaluación de la morfología de la colonia	29
2.2.8.2 Tinción de Gram	29
2.2.9 Pruebas bioquímicas	31
2.2.9.1 Prueba catalasa	31
2.2.9.2 Prueba coagulasa	31
2.2.9.3 Hidrolisis de la urea	32
2.2.10 Identificación de microorganismos fúngicos	32
2.2.10.1 Evaluación macroscópica de las colonias	32
2.2.10.2 Evaluación microscópica	33
2.2.11 Conteo de UFC	33
2.2.12 Extracción de ADN a partir de hisopados conjuntivales	34
2.2.13 PCR	35
2.2.13.1 Cebadores	35
2.2.13.2 Programa de amplificación	36
2.2.13.3 Protocolo PCR	36
2.2.13.4 Comprobación del producto amplificado	36

2.2.14 Muestreo comparativo	37
CAPÍTULO 3	
3. Resultados	39
3.1 Anamnesis caballos de trabajo	39
3.2 Análisis microbiológico	43
3.3 Análisis molecular/PCR	50
3.4 Análisis del muestreo comparativo	56
CAPÍTULO 4	
4. Discusión	59
CAPÍTULO 5	
5. Conclusión	65
BIBLIOGRAFÍA	66

ABREVIATURAS

%	Porcentaje
μl	Micro litro
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNr	Ácido desoxirribonucleico ribosomal
C	Centígrados
CC	Condición corporal
Cm	Centímetros
Cm ²	Centímetro cuadrado
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
Gr	Gramo
H ₂ O ₂	peróxido de hidrógeno
HCl	Ácido clorhídrico
L	Litro
M	Molar
MgCl ₂	Cloruro de Magnesio
Min	Minutos
ml	Mililitro
Mm	Milímetro
NaCl	Cloruro de sodio
NaOAc	Acetato de sodio
OD	Ojo derecho
OI	Ojo izquierdo
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial hidrogeno
Rpm	Revoluciones por minuto

Spp	Sub especie
STT	Test de Schirmer
TBE	Tampón Tris borato EDTA
TE	Tampón Tris EDTA
UFC	Unidad Formadora de Colonias
UV	Ultra violeta

INDICE DE FIGURAS, IMAGENES Y TABLAS

Figura 1. Anatomía del ojo equino y estructuras anexas.	4
Figura 1.2 Composición de la película lagrimal pre corneal.	6
Figura 1.3 Ilustración de los componentes de la película lagrimal pre corneal y su interacción.	7
Figura 1.4 Penetración de microorganismos a través del epitelio corneal	11
Imagen 1. Expedientes positivos a la presencia de <i>Malassezia</i> spp	52
Imagen 2. Expedientes positivos a la presencia de <i>Malassezia</i> spp	53
Imagen 3. Expedientes positivos a la presencia de <i>Malassezia</i> spp	54
Imagen 4. Expedientes positivos a la presencia de <i>Malassezia</i> spp	55
Imagen 5. Expedientes de caballos deportivos de alto rendimiento positivos a la presencia de <i>Malassezia</i> spp	58
Tabla 1. Protocolo tinción de Gram	29
Tabla 1 ^a . Resultados obtenidos mediante anamnesis y Schirmer Tear Test	41
Tabla 1 ^b . Resultados obtenidos mediante anamnesis y Schirmer Tear Test	42
Tabla 2 ^a . Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de bacterias, hongos y levaduras aisladas a partir de hisopados conjuntivales de caballos de trabajo	44
Tabla 2 ^b . Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de bacterias, hongos y levaduras aisladas a partir de hisopados conjuntivales de caballos de trabajo	45
Tabla 2 ^c . Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de bacterias, hongos y levaduras aisladas a partir de hisopados conjuntivales de caballos de trabajo	46
Tabla 2 ^d . Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de bacterias, hongos y levaduras aisladas a partir de hisopados conjuntivales de caballos de trabajo	47
Tabla 2 ^e . Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de bacterias, hongos y levaduras aisladas a partir de hisopados conjuntivales de caballos de trabajo	48
Tabla 3. Microorganismos aislados, número de ojos positivos, conteo total y porcentaje de UFC	49
Tabla 4. Datos anamnesis de los expedientes positivos a la presencia de <i>Malassezia</i> spp en la superficie ocular	51
Tabla 5. Resultados del Test de Schirmer de los caballos deportivos de alto rendimiento	57

1 INTRODUCCION

1.1 Superficie ocular

La superficie ocular está compuesta por diferentes estructuras y/o tejidos oculares como: conjuntiva bulbar, conjuntiva palpebral, tercer parpado, córnea, margen palpebral y la película lagrimal pre corneal (Petersen-Jones y Sheila, 1999).

1.1.1 Córnea

La córnea del caballo tiene una forma oval, el diámetro horizontal es ligeramente más largo que el vertical. El diámetro en un caballo adulto oscila entre los 29.8 a los 34.0 mm horizontalmente y entre 23 y 26.5 mm verticalmente. El grosor total de la córnea equina es de 0.8-1.0 mm (Gelatt, 2008).

La córnea normal en los caballos consta de 4 capas. La capa más externa está compuesta por un epitelio escamoso estratificado, seguido del estroma corneal el cual representa casi el 90% del volumen total de la córnea, posteriormente se localiza la membrana de Descemet y en la región más interna una simple capa de células, el endotelio corneal. La película lagrimal pre corneal se puede considerar una capa más de la córnea (la más externa), aunque propiamente dicho no lo es (Petersen-Jones y Sheila, 1999).

La nutrición de la córnea se da anteriormente mediante la película lagrimal pre corneal y posteriormente por el humor acuoso. La película pre corneal provee de electrolitos y glucosa a este tejido avascular, también permite la transferencia de oxígeno (Maggs *et al.*, 2012).

La córnea es transparente y no tiene vasos sanguíneos puesto que su función principal es la de la transmisión de luz, es la principal estructura refractiva en el ojo; es ricamente inervada superficialmente por terminaciones nerviosas provistas por el nervio trigémino (Brian, 2010).

La integridad de la córnea está íntimamente relacionada con procesos fisiológicos del ojo y las estructuras encargadas de las mismas tales como el humor acuoso, la presión intra ocular, los párpados y la película lagrimal pre corneal. Cualquier alteración ya sea de origen infeccioso o no, podrían en mayor o menor grado dificultar la visión (Ollivier, 2004).

1.1.2 Conjuntiva

La conjuntiva es un tejido el cual consiste en células epiteliales columnares no queratinizadas y células caliciformes. Es una membrana mucosa delgada, semitransparente de pigmentación variable (Maggs *et al.*, 2012).

Para su estudio la conjuntiva se puede dividir de la siguiente forma: Conjuntiva nictitante, la cual cubre tanto la cara externa como la interna de la membrana nictitante. La conjuntiva palpebral, la cual cubre la superficie posterior de los párpados inferior y superior. La conjuntiva palpebral termina en el borde palpebral y se refleja en el fornix ventral y dorsal, para continuar encima del globo ocular como conjuntiva bulbar, la cual cubre la superficie anterior de la epiesclera y esclerótica. El espacio que crea la conjuntiva en los párpados superior e inferior recibe el nombre de saco conjuntival (Crispin, 2012) (**Fig.1**).

La conjuntiva está altamente vascularizada y contiene muchas células caliciformes las cuales contribuyen en la formación de la película lagrimal. Cerca al limbo corneo escleral se encuentra un área con folículos linfoides, llamado tejido linfático asociado a la conjuntiva el cual desempeña un papel importante en la respuesta inmune del ojo (Brian, 2010).

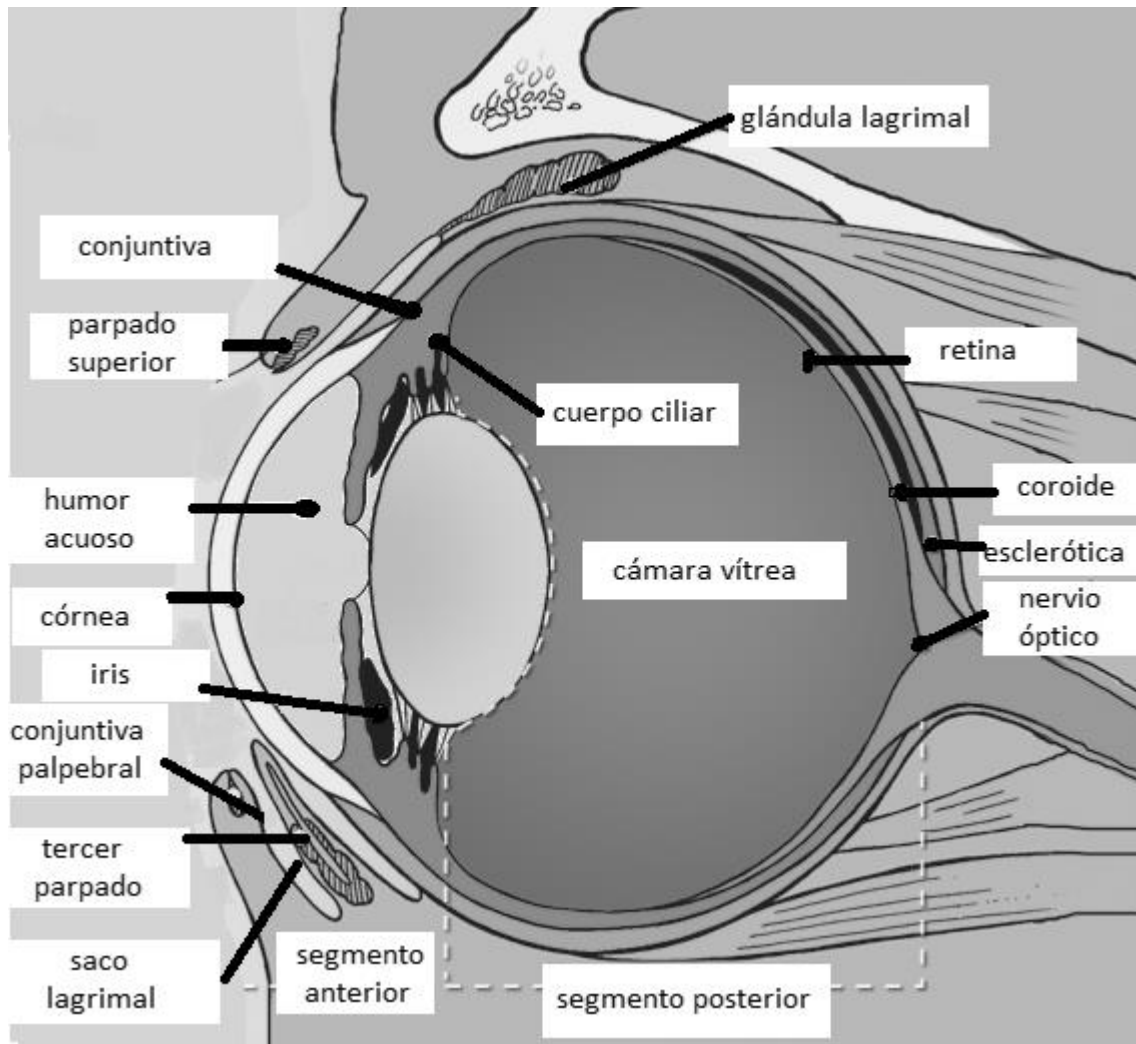


Fig. 1. Anatomía del ojo equino y estructuras anexas (Sandmeyer 2016).

1.1.3 Película pre corneal

La película lagrimal pre corneal (PLP) o gel lagrimal pre corneal está compuesto por 3 capas (de exterior a interior): capa lipídica compuesta por esteroides de colesterol y fosfolípidos; capa acuosa compuesta por iones, glicoproteínas, enzimas, inmunoglobulinas, compuestos antimicrobianos y lactoferrina; capa de mucina compuesta por principalmente por mucoproteínas de adhesión (Ollivier, 2004; Sack *et al.*, 2000) **Fig. 1.2.**

Las funciones principales de la película lagrimal pre corneal están relacionadas con mantener a la córnea sana y en equilibrio; dentro de estas funciones se pueden mencionar las siguientes como las más importantes: mantener el tejido lubricado previniendo la evaporación de los compuestos acuosos de la lagrimal, suplementar oxígeno a los tejidos, contribuye en la correcta refracción de luz, efecto antimicrobiano de protección y por último se debe mencionar que la película pre corneal forma parte del sistema de defensa innato de la córnea (Bron y Tiffany, 2004; Nichols *et al.*, 2007).

Debido a la constante exposición de la película lagrimal pre corneal con la contaminación ambiental, esta se considera la primer línea de defensa (barrera física) contra estos patógenos ya que un gran número de microorganismos podrían infectar a la córnea y a la conjuntiva. Además se debe mencionar la actividad antimicrobiana que tienen las lágrimas en la superficie ocular (McDermott, 2013; Ollivier, 2004) **Fig 1.3.**

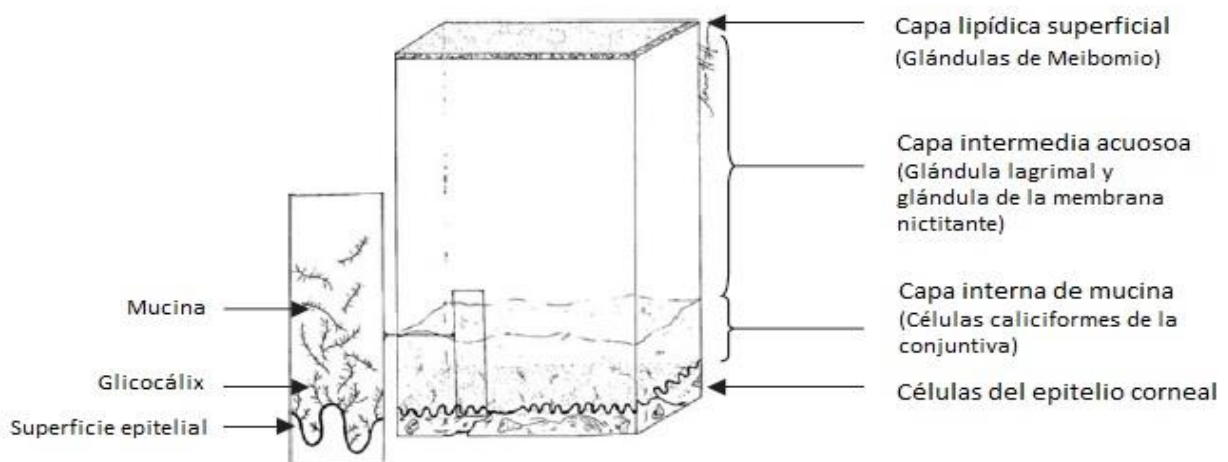


Fig. 1.2 Composición de la película lagrimal pre corneal (Ollivier, 2004).

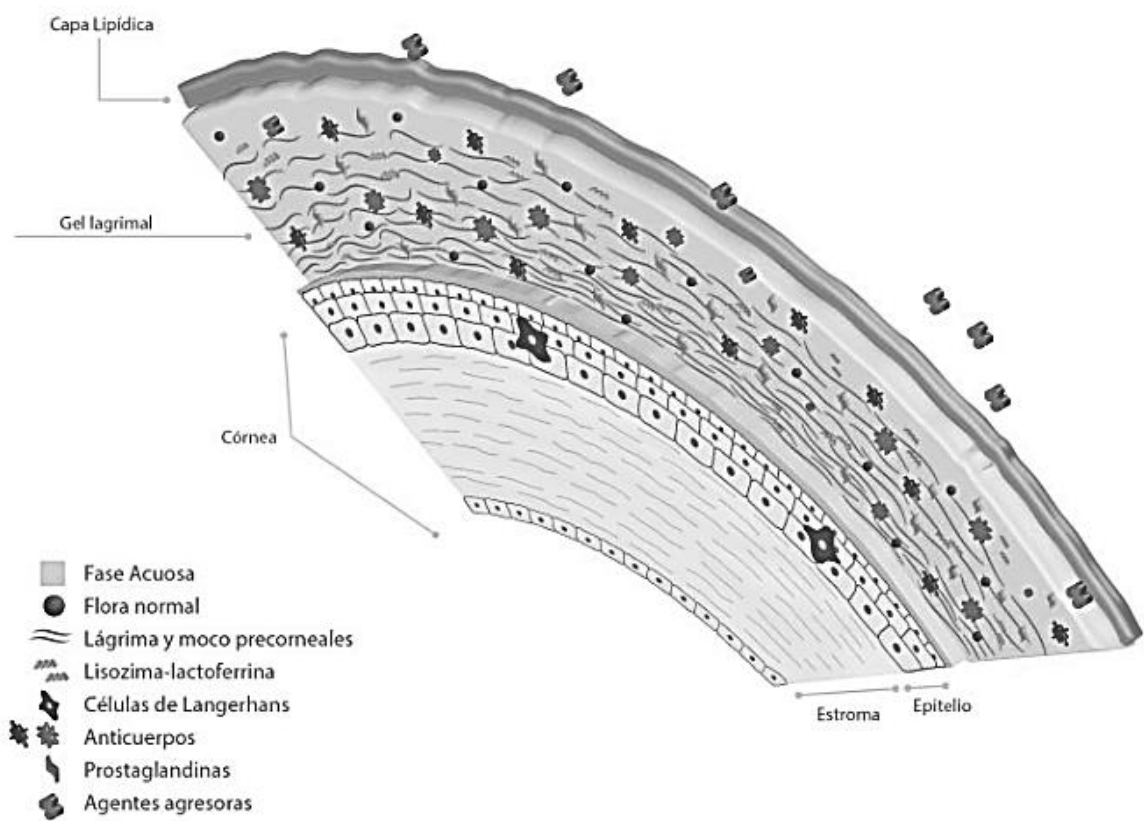


Fig 1.3 Ilustración de los componentes de la película pre corneal, córnea y su interacción (Santgar, 2016).

1.1.4 Producción de lágrima (Test de Schirmer)

En los animales existen dos tipos de producción de lágrima la basal o continua que es producida de manera constante permitiendo así la producción y funcionamiento normal de la película lagrimal pre corneal; el otro tipo es la producción refleja la cual es estimulada por una respuesta reflejo a cualquier irritación de la córnea o conjuntiva (Gelatt y Brooks, 2011; Ollivier, 2004).

En los caballos la glándula lagrimal orbital es la principal productora de lágrima (Gelatt, 2008). La producción de lágrima en caballos se ha reportado en un rango de 11 a 30 mm/min (Marts *et al.*, 1977).

El pH en la lágrima de caballos se reportó en el rango de 8 a 8.6, aunque se han reportado valores más bajos. La importancia de este pH radica en los efectos de protección que tiene sobre diferentes tejidos, en este caso los del ojo y tejidos anexos (Beckwith-Cohen *et al.*, 2014; Lowe y Crispin, 2003).

La prueba de Schirmer o el Test de Schirmer (STT) es el método utilizado para cuantificar la producción acuosa de la lágrima. La prueba consiste en el uso de tiras de papel filtro de 5mm x 35mm. Estas tiras se colocan durante 1 minuto en el saco conjuntival inferior cerca al borde palpebral, quedando así en contacto con el párpado inferior y con la córnea. Pasado este tiempo se realiza una lectura sobre las tiras de papel rotulado, midiendo así la progresión que tuvo la lagrima. La prueba de Schirmer II sigue los mismos pasos que la antes descrita pero en esta prueba se requiere la colocación de un anestésico local sobre la córnea, esto con el fin de evitar la producción refleja y medir así únicamente la producción basal (Brian, 2010; Crispin, 2012).

1.1.5 Mecanismos de defensa de la superficie ocular

La superficie ocular normalmente se encuentra protegida de invasiones microbianas mediante: epitelios intactos, efecto protector de la película pre corneal, componentes de defensa presentes en la lagrime, competencia entre microorganismos, la acción mecánica de lavado por medio del parpadeo y la propia inmunidad de los tejidos oculares (Brooks, 2002; Reed y Williams, 1978).

La función principal del epitelio corneal es la de crear una barrera que protege al ojo contra la invasión de agentes patógenos (Brian, 2010). Pero defectos en el epitelio corneal permitirían que los microorganismos presentes en la superficie ocular se adhieran a la córnea y establezcan una infección (Nasisse y Nelms, 1992) **Fig 1.4.**

1.2 Microorganismos de la superficie ocular de los caballos

La superficie ocular este en constante exposición a los microorganismos presentes en el medio ambiente. Y es a partir de esta contaminación ambiental que se establece la microbiota de la superficie ocular. Esta microbiota de la superficie ocular puede definirse como: aquellos microorganismos que se encuentran presentes en la superficie ocular sana de manera constante a través del tiempo (Zegans y Van Gelder, 2014).

Los microorganismos presentes en córnea y conjuntiva son agrupados y llamados microbiota de la superficie ocular debido a que la conjuntiva palpebral está en contacto directo con la córnea cada vez que se presenta un parpadeo (Brian, 2010).

La edad del animal, temperatura, condiciones de alojamiento, uso de medicamentos oftálmicos, etc. son algunos de los factores que influyen la presencia de determinados microorganismos (Andrew *et al.*, 2003; Brooks *et al.*, 2000; Gemensky-Metzler *et al.*, 2005; Reed *et al.*, 2013; Sgorbini *et al.*, 2010; Sgorbini *et al.*, 2008; Voelter-Ratson *et al.*, 2014).



Fig. 1.4 Penetración de microorganismos a través del epitelio corneal. (Brooks, 2005).

- (1) Adhesión y paso de microorganismos a través del epitelio corneal dañado.
- (2) Establecimiento de los microorganismos en el estroma corneal.
- (3) Formación de absceso estromal.

Los principales microorganismos encontrados en la superficie ocular de los caballos son bacterias Gram positivas, Gram negativas, levaduras y hongos (Brian, 2010).

Dentro de estos se pueden mencionar los siguientes como los más comúnmente encontrados: *Aspergillus* spp, *Fusarium* spp, *Rhizopus* spp, *Cladosporium* spp, *Penicillium* spp, *Candida* spp, *Alternaria* spp, *Mucor* spp, *Curvularia* spp; *Pseudomonas* spp, *Staphylococcus* spp, *Streptococcus* spp, *Bacillus* spp, *Escherichia coli*, *Actinomyces* spp, *Klebsiella* spp. (Andrew *et al.*, 2003; Araghi-Sooreh *et al.*, 2014; Brooks *et al.*, 2000; Hernández-Vidal *et al.*, 2010; Keller y Hendrix, 2005; Khosravi *et al.*, 2014; Reed *et al.*, 2013; Sherman *et al.*, 2016; Voelter-Ratson *et al.*, 2014; Wada *et al.*, 2010; Whitley *et al.*, 1983; Zeiss *et al.*, 2013).

La presencia de estos microorganismos ha sido evaluada a partir de hisopados conjuntivales del margen palpebral, conjuntiva bulbar y/o palpebral, raspados corneales y suspendidos dentro de las lágrimas (Willcox, 2013).

Los microorganismos considerados normales contribuyen a la protección de la superficie ocular evitando la colonización de microorganismos potencialmente patógenos y esto se logra mediante diversos mecanismos, algunos tan sencillos como el ocupar un espacio potencial de colonización y algunos otros más complejos como la producción de bacteriocinas o mediante la activación de mecanismos inmunológicos de defensa (Willcox, 2013).

Se conocen algunos de los beneficios provistos por los microorganismos presentes en la superficie ocular pero también se ha reportado que esta microbiota es la mayor fuente de contaminación en procedimientos quirúrgicos oculares (Chabouty *et*

al., 2015), además en los casos en los que cualquiera de los mecanismos de defensa del ojo fallan, esta microbiota normal puede convertirse en patógena y causar una enfermedad ocular infecciosa (Whitley *et al.*, 1983).

1.3 Queratitis infecciosa

Los microorganismos presentes en la superficie ocular desempeñan un papel importante en la salud del ojo; pero cuando estos microorganismos o las condiciones en las que habitan se ven alterados pueden ocasionar un sobre crecimiento, causando así una infección (Schaefer *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2008).

Las queratitis (inflamación de la córnea) son unas de las condiciones oftálmicas más comúnmente vistas en los caballos. Un gran porcentaje de las queratitis ulcerativas (ulceras corneales) presentadas en esta especie tiene presencia de forma activa de organismos fúngicos por lo que reciben el nombre de queratomicosis (Brooks, 2002; Wada *et al.*, 2013; Zeiss *et al.*, 2013).

Las úlceras corneales (queratitis ulcerativa) son clasificadas como no complicadas (superficiales, pequeñas, sin presencia de infección) o complicadas (infectadas, profundas, de gran diámetro) (Petersen-Jones y Sheila, 1999).

Las consecuencias de las queratitis infecciosas pueden llegar a ser tan severas para el individuo que las padece que lo pueden llevar a perder la visión en el ojo afectado, por eso se hace necesaria la identificación del agente etiológico y la posterior administración de un tratamiento adecuado y oportuno (Schaefer *et al.*, 2001; Sherman *et al.*, 2016; Whitley *et al.*, 1983).

1.3.1 Causas de queratitis infecciosas

Los ojos de los caballos y especialmente sus corneas son tan prominentes que las mismas son muy susceptibles a lesiones traumáticas y subsecuentemente a infecciones (Andrew *et al.*, 1998; Brian, 2010).

Algunas de las patologías oculares asociadas a la prominencia del globo ocular en los caballos, a las condiciones de alojamiento en las que habitan y/o a la función zootécnica que desempeñan son: úlceras corneales, úlceras queratolíticas, úlceras indolentes, presencia de cuerpos extraños en la córnea o conjuntiva, prolapsos de iris, abscesos estromales entre otras (Brian, 2010; Brooks, 2002).

1.3.2 Queratomicosis

La queratomicosis es el daño corneal provocado por la adhesión de organismos fúngicos en el epitelio corneal, la quimiotaxis de leucocitos al sitio de infección, la elevación en el número de proteinasas en la película pre corneal y subsecuentemente la proliferación y colonización de organismos fúngicos en la córnea (Brooks, 2009).

La queratomicosis o queratitis fúngica es una condición ocular con presentaciones clínicas severas como úlceras corneales profundas, con o sin queratolisis, formación de placas fúngicas, abscesos estromales, micro erosiones, etc. (Scotty, 2005). Es considerada como una enfermedad que amenaza la visión (Galera y Brooks, 2012).

El diagnóstico y tratamiento de la misma representan un reto para los clínicos. Por lo que un tratamiento específico y oportuno es fundamental (Galera y Brooks, 2012).

Como se mencionó antes, los ojos de los caballos son altamente susceptibles a las queratitis infecciosas, pero en el caso de las queratomycosis la incidencia es mayor debido a la abundante presencia de organismos fúngicos en el medio ambiente en el que habitan los caballos; aunado a esto situaciones como climas húmedos y cálidos representan otro de los principales factores que favorecen la incidencia de la queratomycosis (Andrew *et al.*, 2003; Brooks, 2002; Scotty, 2005).

1.3.3 Agentes infecciosos implicados

Se mencionó previamente que los microorganismos de la superficie ocular representan una de las principales formas de contaminación para el ojo enfermo, por lo tanto los microorganismos presentes en los casos de lesiones/enfermedad ocular no serán muy diferentes a los encontrados bajo condiciones normales.

Numerosos estudios han reportado los microorganismos encontrados en casos de queratitis bacterianas y fúngicas en caballos. Si se comparan los hallazgos de estos estudios con los realizados sobre ojos sanos se observará que existe gran similitud en cuanto a los microorganismos recuperados. Por tanto queda claro que los microorganismos presentes en la superficie ocular sana serán en gran parte los mismos identificados bajo condiciones de enfermedad.

1.4 Objetivo

Las queratitis infecciosas y especialmente las queratomycosis son enfermedades muy comunes en los caballos. Las mismas son generadas bajo determinadas circunstancias, por los microorganismos presentes en la superficie ocular. Estas lesiones representan un reto para los veterinarios debido a las consecuencias clínicas y económicas que generan.

Por lo tanto conocer los microorganismos presentes en la conjuntiva de caballos en esta región orientará a los clínicos al momento de elegir las terapias en los casos de queratitis infecciosas.

El objetivo de este estudio fue la realización de un perfil bacteriológico y fúngico de la conjuntiva de caballos de trabajo.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales

2.1.1 Colecta de muestras

Hisopos estériles (PROTEC ®, Degasa.)

Medio de transporte Stuart modificado

Tiras para prueba de Schirmer (Tear Flo™, HUB Pharmaceuticals.)

2.1.2 Microbiología

Cajas de Petri desechables y estériles de 60 x 15 mm

Asa bacteriológica

Mecheros

Porta objetos

Cubre objetos

Incubadoras (Riossa®)

Microscopios (Primo Star, Zeizz™)

Aceite de inmersión

Palillos estériles

Tubos para prueba de Coagulasa

Tubos para prueba de Hidrólisis de la urea

Incubadora con movimiento (Smart check™, Labnet international)

2.1.3 Extracción de ADN y PCR

Tubos eppendorf®

Vórtex (Vx100™, Labnet)

Ultracentrifugadora (Centrifuge 5430, Eppendorf®)

Incubadora (Riossa®)

Cámara de electroforesis (Power Pac 3000™ Bio RAD)

Termociclador (Axygen® Maxygen™)

Gelred (Biotium®)

Transiluminador UV (MultiDoc-it Digital Imaging system, UVP®)

2.1.4 Reactivos y medios de cultivo

2.1.4.1 Microbiología

Medio de transporte Stuart

Agar eosin azul de metileno (BD Bioxon ® Becton Dickinson)

Agar Mueller-Hinton (Difco™ Mueller Hinton Agar, Becton Dickinson)

Agar selectivo para *Escherichia. Coli* O157:H7 (Fluorocult ® Merck)

Agar extracto de levadura (Bacto™ Yeast Extrac BD, Becton Dickinson)

Agar cromogénico selectivo para *Candida* (BBL Chromagar *Candida*™)

Agar Dixon modificado

Autoclave (Sterilmatic® Market Forge Industries inc)

H₂O₂ al 30%

Azul de lactofenol

Kit de tinción Gram (BD™ Gram Stain Kit)

2.1.4.2 Medio de transporte Stuart modificado

19 gr por L agua destilada

Composición:

Sodio glicerofosfato	10 gr
Sodio tioglicolato	1.0 gr
Calcio cloruro	0.1 gr
Azul de metileno	0.002 gr
Agar-agar	8.0 gr

2.1.4.3 Agar eosina azul de metileno

36 gr por L agua destilada

Composición:

Peptona	10.0 gr
Hidrogeno fosfato dipotásico	2.0 gr
Lactosa	5.0 gr
Sacarosa	5.0 gr
Eosina amarillenta	0.4 gr
Azul metileno	0.07 gr
Agar- agar	13.5 gr

2.1.4.4 Agar Mueller-Hinton

22 gr por L de agua destilada

Composición:

Extracto de carne bovina	2.0 gr
Hidrolizado acido de caseína	17.5 gr
Almidón	1.5 gr
Agar-agar	17.0 gr

2.1.4.5 Agar selectivo *E. coli* 0157:H7

55 gr por L de agua destilada

Composición:

Peptona caseína 20.0 gr	20.0 gr
Extracto de carne 2.0 gr	2.0 gr
Extracto de levadura 1.0 gr	1.0 gr
Cloruro sódico 5.0 gr	5.0 gr
Sorbitol 10.0 gr	10.0 gr
Desoxicolato sódico 1.12 gr	1.12 gr
Tiosulfato sódico 2.0 gr	2.0 gr
Citrato de amonio e hierro 0.5 gr	0.5 gr
Agar-agar 13.0 gr	13.0 gr
4-metil-umbeliferil- β -D-glucoronido 0.01 gr	0.01 gr
Azul de bromotinol 0.025 gr	0.025 gr

2.1.4.6 Agar extracto de levadura

Por L de agua destilada

Extracto de levadura 10.0 gr

Agar-agar 15.0 gr

2.1.4.7 Agar selectivo para *Candida*

80 gr por L de agua destilada

Composición:

Cromopeptona 10.0 gr

Glucosa 20.0 gr

Mezcla cromogénica 2.0 gr

Cloranfenicol 0.5 gr

Agar-agar 15.0 gr

2.1.4.8 Caldo Dixon modificado (mDixon)

Composición:

Extracto de malta 36 gr

Peptona 6 gr

Ox-bile 20 gr

Tween 40 10ml

Glicerol	2 ml
Ácido oleico	2 ml
Agua destilada	1000 ml
Cicloheximida	2 ml

2.1.4.9 Azul de lactofenol

Composición:

Ácido láctico	100 ml
Fenol	100 gr
Glicerol	200 ml
Agua destilada	100 ml

2.1.5 Material biología molecular

2.1.5.1 Extracción de ADN

Tampón de lisis

Fenol-cloroformo (Bio-basic Inc TM)

NaOAc

NaCl

Isopropanol (Amresco®)

Etanol 70%

Tampón TE

Gel de Agarosa 0.8% (Ultrapure TM Agarose, Invitrogen)

Tampón de carga

Tinción para ADN (Gel red, Biotium™)

TBE 1x

2.1.5.2 Tampón de lisis celular o de extracción

7.5 ml Tris-HCl 1 M

15 ml EDTA 0.5 M

45 ml SDS

1.5 ml 2-mercaptoetanol 1%

2.1.5.3 Tampón TE

1 ml Tris-HCl 1M

0.1 ml EDTA 0.5 mM

98.2 ml de agua destilada

2.1.5.4 Gel de agarosa al 0.8%

0.8 gr de agarosa

100 ml de agua destilada

2.1.5.5 Tampón de carga

0.25% azul de bromofenol

10% glicerol

40% sacarosa

2.1.5.6 TBE 1x

10.78 gr Tris

5.50 gr Borato

0.58 g EDTA

2.1.5.7 PCR

Master mix (2x Taq Master Mix TM, GenScript)

Agua miliQ (simplicity®, Merck Millipore)

Cebadores

Cepa de control *Malassezia* spp.

Agarosa 1.5%

Tampón de carga

TBE 1x

Marcador de peso molecular de 100pb (GenScript 100bp DNA leaderTM)

Tinción para ácidos nucleicos

2.1.5.8 Master mix

0.2 U/μl Taq DNA polimerasa

Buffer de reacción

3 mM de MgCl₂

0.3 mM dNTPs

2.1.5.9 Cebadores

Se utilizaron los cebadores NL1 y NL4 (O'donnell, 1993) Forward NL1 5" GCATATCAATAAGCGGAGGAAAA G 3" y Reverse NL 4 5" GGTCCTGTGTTTCAAGACGG 3".

2.1.5.10 Cepa de control

Como control positivo en los ensayos de PCR se utilizó una cepa de *Malassezia pachydermatis* CBS 1879NT (Cabañes *et al.*, 2007).

2.1.5.11 Gel de agarosa al 1.5%

1.5 gr de agarosa

100 ml de agua destilada

2.1.5.12 Tinción para ácidos nucleicos

Gelred™ (Biotium) 10000X solución en agua.

2.2 Métodos

2.2.1 Sitio de estudio

La toma de muestras se realizó a partir de 50 caballos carretoneros que se presentaron en las instalaciones del Sistema Integral para el Manejo Ecológico y Procesamiento de Desechos (SIMEPRODE) en el municipio de Monterrey durante el verano del 2015.

2.2.2 Colecta de datos

Se realizó una reseña a cada uno de los caballos utilizados en este estudio, la información recabada incluyó datos tales como: Nombre del propietario, dirección, teléfono, número de placa, nombre del paciente, raza, color, edad aproximada, sexo, condición corporal (según el rango propuesto por Carrol y Huntington (1988)), lesiones oculares evidentes, manejo profiláctico (aplicación de vacunas y/o desparasitaciones). Además se evaluó la producción de lágrima mediante la prueba de Schirmer por lo que los resultados obtenidos fueron agregados a la reseña.

2.2.3 Prueba de producción de lágrima o Test de Schirmer

Para medir la producción de lagrima se utilizaron las tiras de papel filtro (Tear Flo™, HUB Pharmaceuticals) las cuales están rotuladas desde 0 a 35mm. Estas tiras se colocaban en la superficie ocular (siempre manteniéndose en contacto con la córnea) mediante eversión del párpado inferior de cada ojo. Las tiras se mantenían en esta posición durante un minuto y posteriormente se realizaba la lectura de la misma.

Para evaluar los resultados del test de Schirmer (STT) se formaron tres grupos; grupo 1 STT <10mm/min, grupo 2 STT >10<25mm/min y grupo 3 STT>25mm/min.

2.2.4 Colecta de muestras

El material para cultivo fue recolectado a partir del saco conjuntival (de ambos ojos) de 50 caballos de trabajo (N=100) utilizando hisopos estériles (PROTEC®, Degasa), se tuvo especial cuidado de no contaminar las muestras tocando margen palpebral, pestañas, párpados o legañas.

No se utilizaron anestésicos locales para evitar alteración alguna en los microorganismos presentes en la superficie ocular.

2.2.5 Transporte de muestras

Las muestras fueron transportadas bajo condiciones de refrigeración (4°C) en un medio de transporte Stuart, previamente identificadas con el número de expediente correspondiente a cada animal y el ojo muestreado (OD (ojo derecho), OI (ojo izquierdo)).

2.2.6 Criterios de inclusión

No se descartó a los animales que manifestaron enfermedad ocular o sistémica en curso durante el periodo de la toma de muestras.

2.2.7 Procesamiento de muestras

Estas muestras fueron procesadas en el laboratorio de microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León para el aislamiento e identificación de los microorganismos. Posteriormente para los ensayos moleculares las muestras fueron procesadas en el laboratorio de genética de la misma dependencia.

2.2.7.1 Medios de cultivo utilizados

En base a los hallazgos reportados previamente (Andrew *et al.*, 2003; Hernández-Vidal *et al.*, 2010; Keller y Hendrix, 2005; Rosa *et al.*, 2003; Wada *et al.*, 2013) y a las condiciones de alojamiento en las que se encontraban los animales de este estudio se seleccionaron los siguientes medios de cultivo: Agar eosin azul de metileno (EMB agar, BD Bioxon™), agar Mueller Hinton (MH agar, BD Bioxon™) y agar selectivo para *E.coli* 0157 H7 (Flurocult™, Merck) esto para el crecimiento de microorganismos bacterianos. En cuanto a microorganismos fúngicos se utilizó agar

Extracto de levadura (Bacto™ Yeast Extract, BD Bioxon) y agar cromogénico selectivo para el crecimiento de especies de *Candida* (BBL Chromagar *Candida*™).

La preparación de estos agares se realizó siguiendo las especificaciones de cada fabricante y siguiendo las normas básicas del laboratorio de microbiología. Se utilizaron cajas de Petri desechables y estériles de 60 x 15 mm para repartir y servir los medios de cultivo preparados.

Cuando los medios de cultivo se encontraban totalmente solidificados y atemperados se procedió con la rotulación de las cajas, para posteriormente realizar la siembra de cada una de las 100 muestras en los 5 diferentes medios de cultivo.

2.2.7.2 Siembra de las muestras

La siembra se realizó mediante la técnica de dilución por estriado, es decir con los hisopos se realizó la descarga de la muestra en un extremo del agar, posteriormente con ayuda de un asa bacteriológica se realizaba la repartición en el agar formando 3 estrías, cubriendo así todo el espacio disponible dentro de la caja (Prats, 2006).

2.2.7.3 Condiciones de incubación

Los medios dirigidos al crecimiento de microorganismos bacterianos se mantuvieron a 37°C por 24 horas mientras que los dirigidos a hongos y levaduras se mantuvieron a 32°C durante 7 días, realizando revisiones periódicas.

Todas las muestras se incubaron bajo condiciones aeróbicas.

2.2.8 Identificación fenotípica de microorganismos bacterianos

Con identificación fenotípica nos referimos principalmente a las observaciones realizadas sobre las características macroscópicas y microscópicas de crecimiento y desarrollo de estos microorganismos.

Las revisiones del crecimiento de los organismos bacterianos se realizaron a las 24 y 48 horas posteriores a la siembra.

Para facilitar la visualización (microscópica) de estos organismos se optó por el uso de las tinciones de Gram. Posteriormente en los casos necesarios se realizaron pruebas bioquímicas para la diferenciación y/o identificación de estos microorganismos.

2.2.8.1 Evaluación de la morfología de la colonia

Esta es una observación de carácter macroscópico. Los parámetros o criterios evaluados primordialmente fueron : el tamaño de la colonia, coloración de la colonia, su forma (elevación, bordes, textura, etc.) aspecto de la superficie (brillante, opaca o transparente) (Koneman y Allen, 2008; Prats, 2006).

2.2.8.2 Tinciones de Gram

Para la realización de estas tinciones se utilizó un kit comercial (Gram colorantes, Hycel® Reactivos Químicos) el cual incluye todas las soluciones necesarias para esta técnica.

A continuación se mencionan los pasos seguidos en la realización de esta tinción.

Extensión	Depositar una gota de agua sobre un porta objetos, posteriormente colocar la
-----------	--

	muestra procedente del cultivo y formar una emulsión.
Secado	Dejar el frotis a temperatura ambiente
Fijación	Pasar el portaobjetos por la llama de un mechero (indirectamente) un par de veces
Tinción	<p>Sobre el lado del portaobjetos donde se fije la muestra, se coloca la cantidad necesaria de tinción para cubrirlo por completo. Respetando la siguiente secuencia y tiempos.</p> <p>Violeta de genciana (1 minuto)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Lavar con agua destilada <p>Lugol/Yodo (1 minuto)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Lavar con agua destilada <p>Safranina (30 segundos)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Lavar con agua destilada <p>Alcohol acetona (3 segundos)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Lavar con agua destilada

Tabla 1.- Protocolo tinción de Gram (Prats, 2006).

Terminadas las tinciones las muestras eran observadas bajo microscopia óptica mediante objetivos 40X y 100X (Primo Star, Zeizz™).

2.2.9 Pruebas bioquímicas

Como ya se había mencionado antes, las pruebas bioquímicas ayudan en la diferenciación e identificación de microorganismos. Se basan en las características fisiológicas y/o metabólicas de los mismos.

2.2.9.1 Prueba de la catalasa

Esta enzima (catalasa) provoca la separación de las moléculas que componen el peróxido de Hidrogeno (H_2O_2) en moléculas separadas de oxígeno (O_2) y agua (H_2O).

Método: Se colocó una pequeña cantidad del crecimiento bacteriano sobre un portaobjetos. Posteriormente se colocó una gota de H_2O_2 e inmediatamente se esperó observar una reacción, la cual consistía en la aparición de burbujas, lo cual indicaba un resultado: catalasa positivo (Prats, 2006).

2.2.9.2 Prueba de la coagulasa

El principio o fundamento de esta prueba se basa en la capacidad de ciertos microorganismos bacterianos en coagular el plasma. Es decir esta enzima reacciona ante la presencia de fibrinógeno.

Método: Se tomaba un poco del crecimiento bacteriano y se colocaba dentro de un tubo con plasma de conejo. Posteriormente este tubo se lleva a incubación a $35^\circ C$ durante por los menos 3 horas. Pasado este tiempo se buscaba la aparición de “grumos” lo cual indicaba un resultado: coagulasa positivo.

2.2.9.3 Hidrólisis de la urea

Determina la capacidad de un organismo de producir ureasa. El producto de una reacción enzimática de este tipo daba como resultado: amoníaco y dióxido de carbono. El amoníaco era el principal elemento indicador en esta prueba.

Método: en un agar inclinado para urea se colocó un poco de las colonias crecidas, es decir estas muestras se re sembraban dentro de estos tubos. Posteriormente se incubaron a 35°C durante un periodo de 48 horas. Debido al pH provocado por el amoníaco y mediante el indicador incluido en el agar (rojo Fenol) la coloración del agar pasaba a tonalidades rosas (Prats, 2006). Este cambio de coloración indicaba un resultado positivo.

2.2.10 Identificación de microorganismos fúngicos

Para el crecimiento de hongos y levaduras, las revisiones se realizaron a partir del día 7 y hasta el día 14 post siembra. Para la identificación de estos microorganismos se realizaron preparaciones con lactofenol y se utilizaron claves de identificación.

2.2.10.1 Evaluación macroscópica de las colonias

Se observó el diámetro/tamaño de las colonias formadas, el aspecto de las mismas (algodonosas, cremosas, etc.). Estas características se observaban por el lado anverso y reverso a través de las cajas de Petri. En general se evaluó el color, la forma y el tamaño de las colonias (Koneman y Allen, 2008; Prats, 2006).

En el caso del agar cromogénico para especies de *Candida* la identificación se realizaba únicamente siguiendo las indicaciones colorimétricas del fabricante (BBL Chromagar *Candida*™). Por lo que basados solo en este criterio se podían distinguir 3 especies diferentes del genero *Candida* (*C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. albicans*).

2.2.10.2 Evaluación microscópica

Para la visualización microscópica se utilizó como medio de contraste la tinción de azul de lactofenol, esto con el fin de facilitar la identificación microscópica de estos organismos.

Para realizar la tinción de las estructuras y/u organismos fúngicos se colocaba una gota de azul lactofenol sobre un portaobjetos limpio. Posteriormente con ayuda de un asa bacteriológica se tomaba una porción del agar conteniendo una parte de la colonia a revisar; Es decir se marcaba un cuadrado de aproximadamente 1-3cm², con aproximadamente 1 cm de profundidad y con ayuda del asa bacteriológica se tomaba y se colocaba sobre el portaobjetos. Posteriormente se colocaba un cubreobjetos sobre la muestra y con ayuda del asa se ejercía la presión suficiente para distribuir la muestra y la tinción entre el porta y el cubre objetos. En el caso de levaduras, se realizaba una tinción simple con cristal violeta, con esta técnica la muestra se fijaba en un portaobjetos con calor y posteriormente se teñía. Terminado este proceso las muestras eran observadas bajo microscopio (Koneman y Allen, 2008; Prats, 2006).

Se utilizó el mismo tipo de microscopía óptica pero con una menor magnificación comparándola con la utilizada en bacterias, por lo que para estas muestras se utilizó el 10x y 40x.

2.2.11 Conteo de UFC

Al identificar a los microorganismos recuperados se realizó el conteo de UFC. Como las revisiones se realizaban de manera continua (bacterias cada 8 horas durante el día 1 y 2 posteriores a la siembra y en el caso de hongos y levaduras cada 12 horas durante el periodo comprendido entre el día 7 y el 14 post siembra) se podía observar el crecimiento y aparición de estas colonias, por lo que en los días de revisión de

crecimiento tanto de organismos bacterianos y fúngicos se realizaba el conteo de estas colonias. Mediante un marcador se colocaba una señal en el anverso de las cajas de Petri para así identificar que esa colonia ya había sido contabilizada.

Se tuvo especial cuidado en no permitir la invasión o saturación de microorganismos, ya que esto imposibilitaría el conteo de colonias. Y eso se hacía mediante el seguimiento puntal de cada una de las muestras.

2.2.12 Extracción de ADN a partir de hisopados conjuntivales

Los hisopos utilizados en la colecta de muestras y posteriormente utilizados en la siembra de las mismas se conservaron bajo condiciones de refrigeración en el medio Stuart, ya que a partir de estos se realizó una extracción de ADN siguiendo la metodología propuesta por Ferrer *et al* (2001).

Para iniciar la extracción los hisopos fueron colocados en 7ml de caldo Dixon modificado. Posteriormente estas muestras fueron colocadas dentro de una incubadora con movimiento (Smart Check™, Labnet International) durante 48 horas a 32°C.

Transcurridas 48 horas en el caldo Dixon se recuperó 1 ml de cada uno de estos tubos y a partir de esta cantidad de muestra se realizó la extracción según el método Fenol-Cloroformo-alcohol isoamílico. Para iniciar la extracción de ADN las muestras pasaron por un proceso de ultracentrifugación (Centrifuge 5430, Eppendorf®) durante 3 minutos a 10 000 rpm, a los tubos se les agregó 500µl de solución de lisis y posteriormente las muestras se colocaron en el vórtex (Vx100™, Labnet) durante 2 minutos. Después se incubaron a 65°C durante una hora y fueron agitadas nuevamente mediante el vórtex en intervalos de 15 minutos. Se añadieron 500µl de fenol-cloroformo y se centrifugaron a 13 000 rpm durante 15 minutos.

Posteriormente se recuperaron 700µl del sobrenadante y se transfirieron a un tubo nuevo, al cual se añadieron 65µl de NaOAC 3M y 75µl de NaCl 3M, y se mezclaron mediante inversión. Las muestras fueron refrigeradas por 30 minutos y posteriormente se centrifugaron a 12 000rpm durante 10 minutos. Se recuperaron 500µl del sobrenadante en un tubo nuevo y se añadieron 270µl de isopropanol y luego se refrigeraron a -20°C durante toda la noche. El proceso se reinició mediante la centrifugación de las muestras a 10 000rpm durante 10 minutos, luego se eliminó el sobre nadante y se añadieron 500µl de etanol al 70% para re suspender el pellet obtenido. Nuevamente las muestras fueron centrifugadas a 10 000rpm, posteriormente decantadas e incubadas a 37°C para secar y eliminar cualquier residuo de etanol. Por ultimo las muestras fueron re suspendidas con 20µl de TE.

Para comprobar la correcta extracción de ADN de nuestras muestras las mismas pasaron por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. En este gel se colocaron 2µl de la muestra, 2µl de colorante (GelRed™, Invitrogen) y 2µl de buffer de corrida. La cámara de electroforesis (Power Pac 3000®, Bio RAD) fue programada a 90V durante 20 minutos; y los geles obtenidos se visualizaron en el transiluminador (UV Transiluminator, UVP ®) con la ayuda del sistema de análisis de imágenes MultiDoc-it®, Digital Imaging System.

2.2.13 PCR

2.2.13.1 Cebadores

Los ensayos de PCR se dirigieron a la región D1/D2 del 26S ADNr. Se utilizaron los cebadores NL1 y NL4 (O'donnell, 1993) para amplificar dicha región, la cual es característica para el género *Malassezia* . Estos cebadores fueron: Forward NL1 5" GCATATCAATAAGCGGAGGAAAA G 3" y Reverse NL 4 5"

GGTCCGTGTTTCAAGACGG 3'". Al final del ensayo se espera la amplificación de un producto de 600 pb.

2.2.13.2 Programa de amplificación

El programa de amplificación utilizado consta de una etapa de pre-desnaturalización a 94°C durante 5 min; seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 45 segundos, una fase de alineamiento durante 1 minuto a 51°C y extensión durante 3 minutos a 72°C ; finalizando el programa con una extensión a 72°C por 10 minutos (Hernández-Escareño *et al.*, 2005).

2.2.13.3 Protocolo PCR

Para la amplificación, se utilizaron los siguientes reactivos obteniendo una concentración final de 25µl por reacción, de los cuales: 12.5 µl de master mix (2x Taq Master Mix TM, Genscript), 1 µl cebador NL1, 1 µl cebador NL4, 8.5 µl de agua miliQ (simplicity®, Merck Millipore) y 2 µl del ADN. Se utilizó el Termociclador Axygen MaxygeneTM, con el programa de amplificación antes mencionado.

En cada reacción de amplificación se añadieron tubos control. Para el control positivo se utilizaron 2 µl de la cepa previamente descrita y para el control negativo 2 µl de agua miliQ. Para estos tubos el volumen final también fue de 25 µl por lo que los demás reactivos se colocaron siguiendo el mismo protocolo.

2.2.13.4 Comprobación del producto amplificado

La comprobación de los productos amplificados se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Se utilizó tampón TBE 1X; como tinción 2 µl de Gelred, (BiotiumTM) para la visualización del ADN y 2 µl de buffer de carga. Para

comparar los pesos moleculares de los productos amplificados se colocaron 6µl de marcador de peso molecular de 100pb (GenScript 100bp DNA leader™).

Los geles se colocaron en una cámara de electroforesis (Power Pac 3000™, Bio Rad) Durante 120 minutos a un voltaje de 90.

Una vez teñido el gel y transcurrido este tiempo se fotografiaron con luz UV (UV transiluminador UVP®) por medio del sistema de análisis de imágenes MultiDoc-it Digital Imaging System™.

2.2.14 Muestreo comparativo

Debido a los resultados obtenidos a partir de las muestras provenientes de caballos de trabajo (carretoneros) este equipo de trabajo se dio a la tarea de comparar estas muestras contra las de animales expuestos a condiciones de alojamiento y/o de salud radicalmente distintas. .

Estudios previos realizados en esta misma ciudad pero sobre caballos deportivos de alto rendimiento no reportaron la presencia o ausencia del género *Malassezia* dentro del perfil bacteriológico y fúngico de la conjuntiva de caballos (Hernández-Vidal *et al.*, 2010). Por lo que se decidió tomar muestras a partir de caballos deportivos, los cuales se encuentran tanto en condiciones de alojamiento como físicas radicalmente distintos a los caballos de trabajo.

Por lo que complementario a todo este proceso se procedió a realizar una colecta de muestras a caballos deportivos de alto rendimiento.

La metodología utilizada sobre estas muestras fue la misma, tal y como ya fue descrita. Desde la toma de muestras, el cultivo en caldo Dixon modificado, el protocolo de extracción de ADN y el posterior ensayo de PCR. El proceso microbiológico fue

omitido, ya que solo se necesitaba la comprobación de la presencia o ausencia de especies del genero *Malassezia* spp a partir de las muestras de hisopados conjuntivales.

3. Resultados

3.1 Anamnesis caballos de trabajo

Las muestras fueron recolectadas a partir de 100 ojos de 50 caballos carretoneros (de trabajo) durante el verano del 2015 dentro de las instalaciones del Sistema Integral para el Manejo Ecológico y Procesamiento de Desechos (SIMEPRODE) en el municipio de Monterrey. Estos animales se presentaban en este sitio con el motivo principal de descargar todos los desperdicios/basura recolectados durante su jornada de trabajo. Todos estos animales trabajan un promedio de 8 horas diarias, 6 días a la semana.

De los caballos muestreados 29 eran machos, incluyendo a 5 castrados; 21 hembras incluyendo a 4 en gestación y 1 en lactación. Según los datos proporcionados por los propietarios el rango de edad de estos caballos era de 3 a 25 años (media = 8.52 años).

Basados en una breve anamnesis se obtuvieron los siguientes resultados: Poco más de la mitad de estos animales (28/50) jamás recibieron algún tipo de manejo profiláctico es decir, nunca habían recibido algún tipo de vacuna o desparasitación; los animales bajo esta situación representaban el 56% de los caballos muestreados. En cuanto a los caballos que si recibieron manejo profiláctico se encontraban 15 que fueron desparasitados al menos una vez en su vida, 2 que recibieron una vacuna al menos una vez en su vida y 5 que recibieron ambas al menos una vez en su vida, estos números representaban el 30%, 4% y el 10% respectivamente. Acerca de los desparasitantes administrados no se obtuvo mucha información, pero sobre las vacunas los propietarios refirieron la aplicación de vacuna antitetánica, influenza y rabia.

Se evaluó la condición corporal (CC) de cada caballo muestreado según la metodología previamente descrita. De los 50 caballos muestreados 4 presentaron una CC de 1 (8%), 21 una CC de 2 (42%), 21 una CC de 3 (42%) y 4 una CC de 4 (8%), ningún animal presentó obesidad o una CC de 5.

Para evaluar los resultados de la Prueba de producción de lagrima / Schirmer Tear Test (STT) se formaron tres grupos, tal como se mencionó previamente (3.2.2). Establecidos estos parámetros se observó que en el Grupo 1 (STT <10 mm/min) solo se presentó 1 ojo, en el grupo 2 (STT >10 <25 mm/min) se contabilizaron 24 ojos y por último en el grupo 3 (STT >25 mm/min) se presentaron un total de total de 75 ojos.

De los 50 animales utilizados en este estudio, 6 de ellos presentaron alguna lesión o anomalía ocular durante la realización de la toma de muestras; estas lesiones incluían: Cicatriz corneal (presente en 3 ojos), quemosis (en 2 ojos), úlcera epitelial (en 1 ojo), edema corneal (en 1 ojo), vascularización corneal (en 1 ojo), epifora (en 1 ojo) y abundante presencia de legaña o secreción ocular (en 1 ojo). Estas lesiones se presentaron de forma unilateral. En 2 de estos 6 individuos afectados se presentó más de una lesión en un mismo ojo (cicatriz/epifora y cicatriz/edema/ vascularización corneal).

Todos estos resultados obtenidos mediante anamnesis de estos 50 caballos se pueden observar en las **Tablas 1^a y 1^b**.

Tabla 1^a. Resultados obtenidos mediante anamnesis y Schirmer Tear Test

Número de Expediente	Sexo	Edad	Condición corporal	Profilaxis	Schirmer Tear Test		Lesión ocular
					OD	OI	
1	M	12	3	-	29	15	-
2	M	25	3	-	27	35	-
3	H	10	4	-	30	>35	-
4	H*G	6	3	-	27	30	-
5	M	4	3	-	27	20	-
6	M	8	2	Desp	34	20	-
7	H	12	2	Desp	15	20	Cicatriz corneal, edema, neo vascularización
8	M	10	3	Tétanos + Desp	26	29	-
9	M	8	3	-	26	20	-
10	H	25	2	-	18	>35	-
11	H*G	5	3	-	25	29	-
12	H	10	3	-	>35	30	-
13	H	3	3	Tétanos + Desp	30	25	-
14	H	6	3	-	23	35	-
15	H	18	2	Desp	30	30	Lesión en conjuntiva + quemosis OD
16	H	27	1	Tétanos + Desp	15	25	Abundante legaña OI
17	M	6	3	Desp	30	28	-
18	M	5	2	-	>35	28	-
19	M	6	2	Desp	22	30	-
20	M	10	4	Tétanos + Desp	>35	30	-
21	H	7	2	-	24	23	-
22	H	9	3	-	>35	>35	-
23	C	14	2	Desp	>35	>35	-
24	C	3	2	-	23	31	-
25	H	7	2	-	29	12	-

(OD)-Ojo derecho, (OI)-Ojo izquierdo, (M)-Macho, (H)-Hembra, (H*G)-Hembra gestante, (H*L)-Hembra lactando, (C)-Macho castrado, (Desp)-Desparasitación interna

Tabla 1^b. Resultados obtenidos mediante anamnesis y Schirmer Tear Test

Número de Expediente	Sexo	Edad	Condición corporal	Profilaxis	Schirmer Tear Test		Lesión ocular
					OD	OI	
26	H	5	2	-	>35	>35	-
27	M	8	2	-	>35	>35	-
28	M	5	2	Desp	33	33	-
29	M	6	3	-	4	23	-
30	M	8	3	-	23	>35	-
31	C	12	2	-	31	35	Cicatriz corneal ambos ojos + epifora
32	M	3	3	Influenza	35	33	-
33	M	7	4	Desp	>35	>35	-
34	H	10	3	Tétanos	19	24	-
35	M	7	2	Desp	>35	27	-
36	M	5	1	-	>35	32	Úlcera epitelial OD
37	H *G	8	3	-	30	35	-
38	H *L	8	2	-	>35	22	-
39	M	9	3	Desp	28	23	-
40	M	5	3	-	15	18	-
41	H	8	3	Desp	>35	31	Quemosis OD
42	M	8	4	Desp	35	23	-
43	C	6	2	Desp	>35	>35	-
44	H	5	2	Tétanos +Desp	>35	>35	-
45	M	10	2	-	32	32	-
46	M	4	2	-	28	32	-
47	H	3	2	Desp	28	32	-
48	H *G	6	3	Desp	34	26	-
49	M	10	1	-	25	35	-
50	C	10	1	-	23	33	-

(OD)-Ojo derecho, (OI)-Ojo izquierdo, (M)-Macho, (H)-Hembra, (H *G)-Hembra gestante, (H *L)-Hembra lactando, (C)-Macho castrado, (Desp)-Desparasitación interna

3.2 Análisis microbiológico

A partir de estas muestras se lograron recuperar bacterias, hongos y levaduras mediante técnicas microbiológicas, además se determinó el número total de unidades formadoras de colonias (UFC) de cada microorganismo encontrado en cada uno de los ojos muestreados. La información correspondiente a cada microorganismo identificado y el número de UFC's contabilizadas a partir de cada muestra se presenta en las **Tablas 2^a, 2^b, 2^c, 2^d y 2^e**.

En cuanto a bacterias los géneros recuperados fueron *Escherichia coli* spp (57% del total de ojos muestreados), *Bacillus* spp (50%), *Klebsiella* spp (18%), *Proteus* spp (2%), además se localizaron dos especies del género *Staphylococcus*: *S. epidermidis* (63%) y *S. aureus* (64%).

Respecto a los hongos, *Penicillium* spp fue el microorganismo más aislado (presente en el 29% del total de los ojos muestreados), seguido de *Aspergillus* spp, donde se pudieron identificar 3 especies: *A. niger* (9%), *A. fumigatus* (11%) y *A. flavus* (4%); Además se aisló *Rhizopus* spp (6%) y *Fusarium* spp (5%).

Las levaduras aisladas a partir de estas muestras fueron *Rhodotorula* spp (en el 46% del total de ojos muestreados) y tres especies del género *Candida*: *C. albicans* (18%), *C. tropicalis* (19%) y *C. krusei* (15%). (**Tabla 3**)

Tabla 2ª. Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de bacterias, hongos y levaduras, aisladas a partir de hisopados conjuntivales de caballos de trabajo

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10												
	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I												
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	4	0	65	16	36	55	0	3	13	18	19	2	31	22	0	22	0	0	15	0	13	12
<i>S. aureus</i>	1	5	1	12	0	0	3	13	7	3	15	14	25	0	0	0	0	0	3	1	49	40
<i>Escherichia coli</i>	0	4	0	0	0	0	0	11	0	1	13	6	3	11	0	0	0	0	1	6	0	14
<i>Bacillus spp</i>	41	7	0	0	14	3	0	9	0	5	6	11	4	2	30	0	1	1	1	4	0	0
<i>Proteus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	18	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Klebsiella</i>	7	0	3	70	5	55	0	0	0	0	0	0	0	0	45	0	0	0	0	0	0	0
<i>Penicillium</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	25
<i>Aspergillus niger</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>A. fumigatus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>A. flavus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Fusarium</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Rhizopus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Rhodotorula</i>	0	4	48	21	21	0	49	2	0	0	0	1	0	39	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Candida tropicalis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13	37	0	0	0	0	0	50
<i>C. albicans</i>	2	1	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. krusei</i>	0	0	0	17	18	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

(D) Ojo derecho, (I) Ojo izquierdo

Tabla 2^a. Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de bacterias, hongos y levaduras, aisladas a partir de hisopados conjuntivales de caballos de trabajo

	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20								
	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I								
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	106	25	0	0	98	0	0	0	16	0	0	6	32	0	0	0	0	0
<i>S. aureus</i>	55	8	7	58	0	0	0	0	0	0	0	0	3	10	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i>	13	11	0	0	15	0	2	0	3	0	0	43	40	184	38	0	0	0
<i>Bacillus spp</i>	0	4	0	0	0	0	5	0	3	0	0	6	9	0	0	6	3	0
<i>Proteus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Klebsiella</i>	0	0	0	9	154	0	0	0	0	0	0	6	0	0	1	0	0	0
<i>Penicillium</i>	41	11	0	0	0	0	118	20	169	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Aspergillus niger</i>	0	0	0	0	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>A. fumigatus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	1	0	0
<i>A. flavus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Fusarium</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Rhizopus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Rhodotorula</i>	10	0	0	70	62	39	0	59	0	0	0	39	43	70	79	0	0	0
<i>Candida tropicalis</i>	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5	1	0	0	4	5	1
<i>C. albicans</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. krusei</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	19	0	0	0	0	0	0

(D) Ojo derecho, (I) Ojo izquierdo

Tabla 2°. Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de bacterias, hongos y levaduras, aisladas a partir de hisopados conjuntivales de caballos de trabajo

	21		22		23		24		25		26		27		28		29		30		
	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	6	31	0	0	5	0	0	0	0	2	5	0	4	30	4	0	4	17	15	27	0
<i>S. aureus</i>	3	4	0	0	14	0	0	0	0	7	8	2	0	32	5	0	0	30	10	7	8
<i>Escherichia coli</i>	8	2	0	0	1	1	0	195	11	7	7	0	12	6	1	0	39	8	4	0	0
<i>Bacillus spp</i>	3	0	16	0	0	28	0	0	8	3	0	0	0	0	2	0	19	1	3	0	15
<i>Proteus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Klebsiella</i>	0	0	0	14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	5
<i>Penicillium</i>	4	22	0	0	0	0	0	0	57	1	1	1	10	1	0	0	0	0	5	0	0
<i>Aspergillus niger</i>	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0
<i>A. fumigatus</i>	0	0	1	4	0	1	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>A. flavus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>Fusarium</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Rhizopus</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Rhodotorula</i>	0	3	68	66	15	0	0	0	7	1	1	1	0	7	0	97	33	15	127	63	36
<i>Candida tropicalis</i>	0	0	36	0	0	48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13	0	0	0	8	0
<i>C. albicans</i>	6	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. krusei</i>	0	2	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0

(D) Ojo derecho, (I) Ojo izquierdo

Tabla 2^d. Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de bacterias, hongos y levaduras, aisladas a partir de hisopados conjuntivales de caballos de trabajo

	31		32		33		34		35		36		37		38		39		40	
	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	7	4	0	0	15	37	34	18	89	0	7	0	14	7	0	38	49	22	26	130
<i>S. aureus</i>	1	23	0	59	52	0	13	6	0	0	3	0	5	10	3	6	5	5	16	2
<i>Escherichia coli</i>	14	2	0	0	0	0	41	7	34	0	0	0	1	1	0	0	15	9	7	26
<i>Bacillus spp</i>	0	2	0	0	0	0	6	0	0	0	2	1	1	0	0	2	9	2	4	0
<i>Proteus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	36
<i>Klebsiella</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Penicillium</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	0	1	0	8	29
<i>Aspergillus niger</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
<i>A. fumigatus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>A. flavus</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Fusarium</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Rhizopus</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Rhodotorula</i>	1	0	49	9	0	0	2	8	21	0	1	0	0	0	0	0	5	2	0	0
<i>Candida tropicalis</i>	0	0	0	0	0	12	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	6	0	0	1
<i>C. albicans</i>	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	4	0	0	0	2	0	0
<i>C. krusei</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1

(D) Ojo derecho, (I) Ojo izquierdo

Tabla 2°. Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de bacterias, hongos y levaduras, aisladas a partir de hisopados conjuntivales de caballos de trabajo

	41		42		43		44		45		46		47		48		49		50	
	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	15	0	1	1	40	0	22	69	53	72	12	6	0	0	108	0	5	0	0	79
<i>S. aureus</i>	0	6	1	3	23	35	80	0	0	1	1	2	0	0	1	25	2	0	60	1
<i>Escherichia coli</i>	11	8	0	2	4	12	0	54	0	0	0	63	13	0	0	36	8	0	87	0
<i>Bacillus spp</i>	1	7	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	3	1	0	0
<i>Proteus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Klebsiella</i>	0	0	0	0	0	0	0	37	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	2	1
<i>Penicillium</i>	0	16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	53	246	66	48	0	0
<i>Aspergillus niger</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>A. fumigatus</i>	0	0	0	0	2	0	2	0	1	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0
<i>A. flavus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Fusarium</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0
<i>Rhizopus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Rhodotorula</i>	0	0	0	0	90	0	113	91	0	0	0	61	28	31	0	0	0	0	0	0
<i>Candida tropicalis</i>	0	0	0	0	1	28	30	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>C. albicans</i>	0	0	0	0	25	0	0	29	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0
<i>C. krusei</i>	0	0	0	0	0	0	19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

(D) Ojo derecho, (I) Ojo izquierdo

Una vez identificados los microorganismos se realizaron conteos de UFC totales, estos datos se pueden observar en la **Tabla 3**. Dentro de los microorganismo bacterianos *Staphylococcus epidermidis* fue el que mayor cantidad de UFC produjo, con un total de 1798; seguido por *Escherichia coli* spp con 1405, *Staphylococcus aureus* con 916, *Klebsiella* spp con 423, *Bacillus* spp con 380 y por ultimo *Proteus* spp con 54 UFC totales. Por otro lado, en cuanto a microorganismos fúngicos y levaduras *Rhodotorula* spp produjo 1723 UFC totales, siendo este el microorganismo con mayor producción de colonias, seguido por *Penicillium* spp con 994, *Candida tropicalis* con 307, *C. albicans* con 133, *C. krusei* con 93, *Aspergillus fumigatus* con 88, *A. niger* con 37, *A. flavus* con 22, *Rhizopus* spp con 14 y *Fusarium* spp con 5.

Tabla 3. Microorganismos aislados, número de ojos positivos, conteo total y porcentaje de UFC.

Microorganismo	Ojos positivos	UFC totales	%
<i>Rhodotorula</i>	46	1723	50.43
<i>Penicillium</i>	29	994	29
<i>Candida tropicalis</i>	20	307	8.98
<i>C. albicans</i>	18	133	3.89
<i>C. krusei</i>	14	93	2.72
<i>Aspergillus fumigatus</i>	11	88	2.57
<i>A. niger</i>	9	37	1.08
<i>A. flavus</i>	4	22	0.64
<i>Rhizopus</i>	6	14	0.40
<i>Fusarium</i>	4	5	0.14
	Total	3416	
<i>S. aureus</i>	64	916	18.40
<i>S. epidermidis</i>	63	1798	36.13
<i>E. coli</i>	57	1405	28.23
<i>Bacillus</i>	50	380	7.63
<i>Klebsiella</i>	18	423	8.50
<i>Proteus</i>	2	54	1.08
	Total	4976	

*Total de ojos muestreados= 100

*Porcentaje basado en el total de UFC

3.3 Análisis molecular/PCR

El ADN extraído de los hisopados conjuntivales se analizó mediante PCR punto final bajo las condiciones previamente descritas. En las **Imágenes 1, 2 y 3** se observan los resultados positivos de PCR en los geles de agarosa al 1.5x. De las 100 muestras sometidas a estos ensayos 82 mostraron un resultado positivo a la presencia del género *Malassezia* spp. Estas 82 muestras positivas provenían de 44 de los 50 caballos muestreados. Se observó también que 38 caballos (76%) presentaron resultados positivos en ambos ojos, mientras que 6/50 fueron positivos unilateralmente (12%) y 6/50 mostraron resultados negativos a la presencia de este microorganismo (12%).

Analizando estos datos obtenidos mediante PCR y la anamnesis (**Tabla 4**) se observó que 24 de estos animales no contaban con ningún manejo profiláctico esto representa el 54.5% del total de caballos positivos a la presencia de *Malassezia* spp en superficie ocular, en cuanto a la CC esta se distribuyó de la siguiente forma: 3 caballos con cc de 1 (6.81%), 18 una cc de 2 (40.9%), 19 una cc de 3 (43.1%), 4 una cc de 4 (9.09%) y 19 caballos presentaban una cc de 3 (43.1%).

El rango de edad presentado por los animales con resultados positivos, fue el mismo al presentado en el total de la población muestreada es decir de 3 a 25 años; Dentro de estos animales positivos se presentaron 26 machos y 18 hembras.

Los resultados en cuanto a producción de lagrimea mostraron que 61 de 82 ojos (74.4%) presentaban resultados de STT > 25mm/min, 20 (24.4%) STT >10 <25mm/min y solo un ojo (1.21%) presentó una producción menor a 10 mm/min.

Tabla 4. Datos anamnesis de los expedientes positivos a la presencia de *Malassezia* spp en la superficie ocular.

Exp	Ojo positivo	Sexo	Edad	CC	Profilaxis	Schirmer		Lesión	
						OD	OI		
1	D	-	M	12	3	-	29	15	-
2	D	I	M	25	3	-	27	35	-
3	D	I	H	10	4	-	30	>35	-
4	D	I	H*G	6	3	-	27	30	-
5	D	I	M	4	3	-	27	20	-
6	D	I	M	8	2	Desp	34	20	-
7	D	I	H	12	2	Desp	15	20	Cicatriz corneal, edema
8	D	I	M	10	3	Tétanos + Desp	26	29	-
9	D	I	M	8	3	-	26	20	-
10	D	I	H	25	2	-	18	>35	-
11	D	I	H*G	5	3	-	25	29	-
13	D	I	H	3	3	Tétanos + Desp	30	25	-
14	-	I	H	6	3	-	23	35	-
15	D	I	H	18	2	Desp	30	30	Quemosis OD
16	D	I	H	25	1	Tétanos + Desp	15	25	Abundante legaña OI
17	D	I	M	6	3	Desp	30	28	-
19	D	-	M	6	2	Desp	22	30	-
20	D	I	M	10	4	Tétanos + Desp	>35	30	-
21	D	I	H	7	2	-	24	23	-
23	D	I	C	14	2	Desp	>35	>35	-
24	D	I	C	3	2	-	23	31	-
25	D	I	H	7	2	-	29	12	-
26	D	I	H	5	2	-	>35	>35	-
27	D	I	M	8	2	-	>35	>35	-
28	D	I	M	5	2	Desp	33	33	-
29	D	I	M	6	3	-	4	23	-
30	D	I	M	8	3	-	23	>35	-
31	D	I	C	12	2	-	31	35	Cicatriz corneal OD,OI
32	D	I	M	3	3	Influenza	35	33	-
33	D	I	M	7	4	Desp	>35	>35	-
34	D	-	H	10	3	Tétanos	19	24	-
35	D	I	M	7	2	Desp	>35	27	-
36	D	I	M	5	1	-	>35	32	Ulcera epitelial OD
37	D	I	H*G	8	3	-	30	35	-
38	D	I	H*L	8	2	-	>35	22	-
39	D	I	M	9	3	Desp	28	23	-
40	D	I	M	5	3	-	15	18	-
41	D	I	H	8	3	Desp	>35	31	Quemosis OD
42	D	I	M	8	4	Desp	35	23	-
44	D	I	H	5	2	Tétanos + Desp	>35	>35	-
45	-	I	M	10	2	-	32	32	-
46	D	I	M	4	2	-	28	32	-
48	D	-	H*G	6	3	Desp	34	26	-
49	D	I	M	10	1	-	25	35	-

(OD)-Ojo derecho, (OI)-Ojo izquierdo, (M)-Macho, (H)-Hembra, (H*G)-Hembra gestante,(H*L)-Hembra lactando, (C)-Macho castrado,(CC)-Condición corporal (Desp)-Desparasitación interna

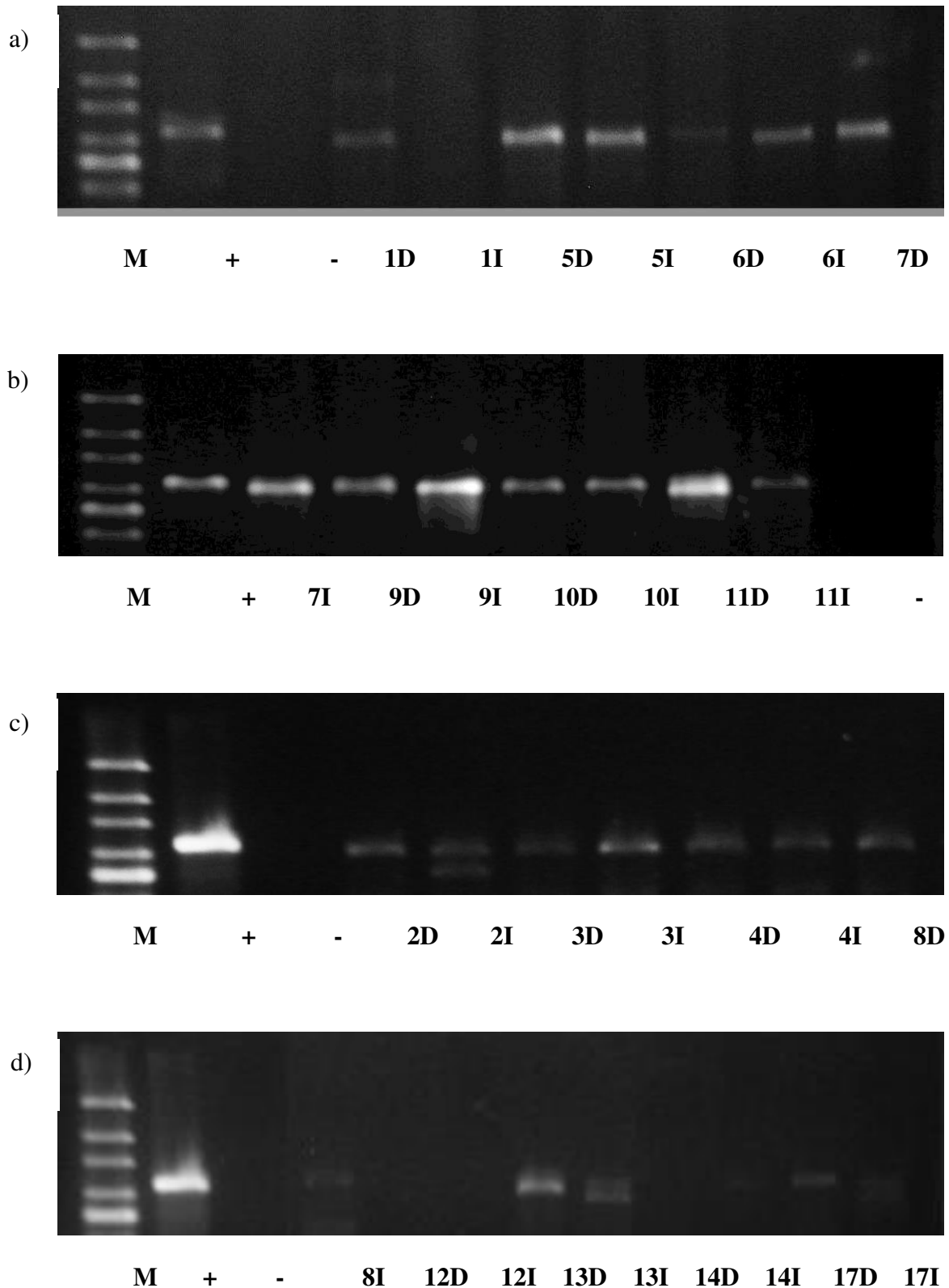


Imagen 1. Expedientes positivos a la presencia de *Malassezia* spp. PCR dirigido a la región D1/D2 del 26S LSU. (M) Marcador de peso molecular, (+) Control positivo a 600pb, (-) Control negativo. * Marcador de peso molecular: 100pb Gene Script 100bp DNA leader™

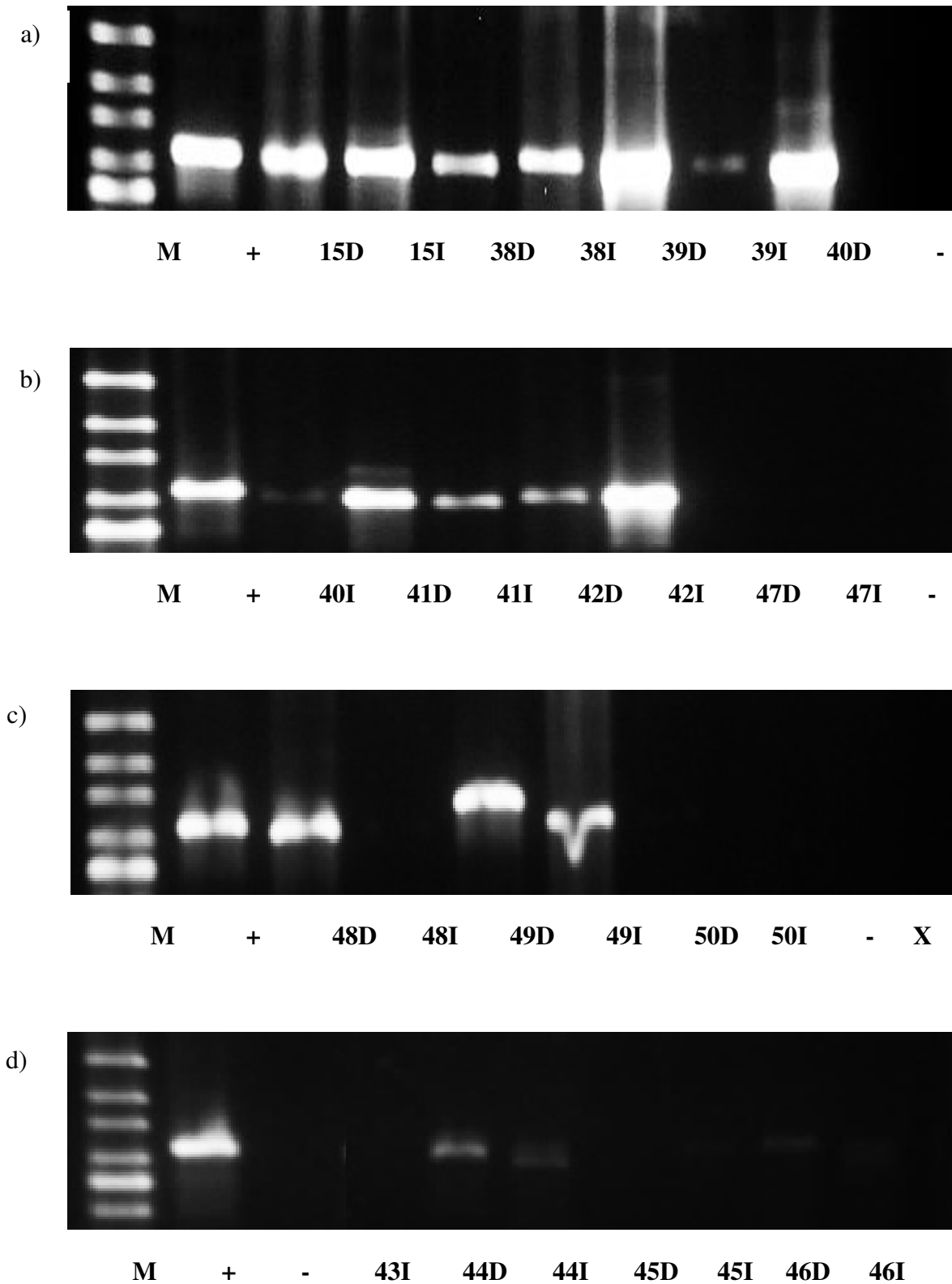


Imagen 2. . Expedientes positivos a la presencia de *Malassezia* spp. PCR dirigido a la región D1/D2 del 26S LSU. (M) Marcador de peso molecular, (+) Control positivo a 600pb, (-) Control negativo. * Marcador de peso molecular: 100pb Gene Script 100bp DNA leader™

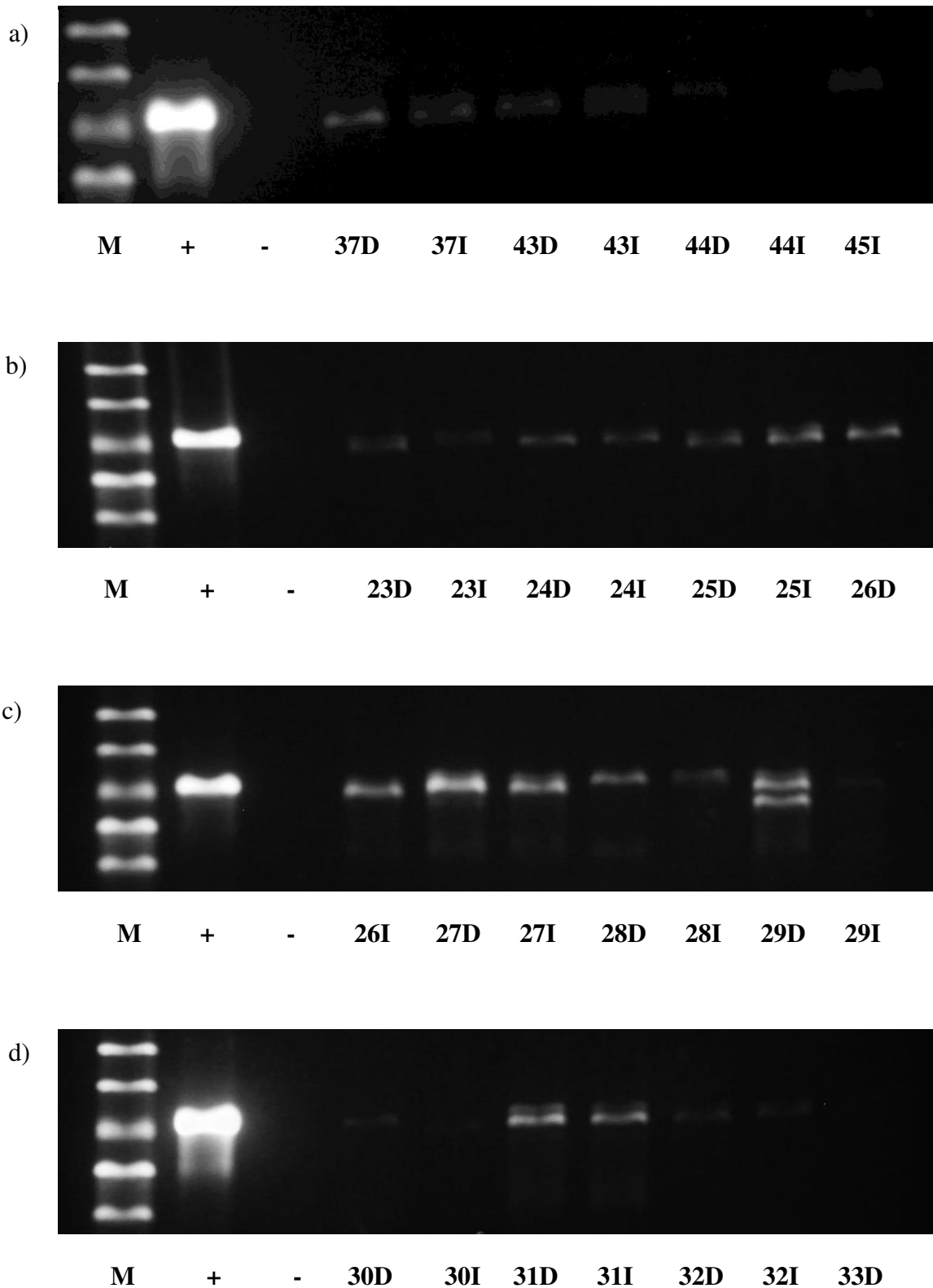


Imagen 3. Expedientes positivos a la presencia de *Malassezia* spp. PCR dirigido a la región D1/D2 del 26S LSU. (M) Marcador de peso molecular, (+) Control positivo a 600pb, (-) Control negativo. * Marcador de peso molecular: 100pb Gene Script 100bp DNA leader™.

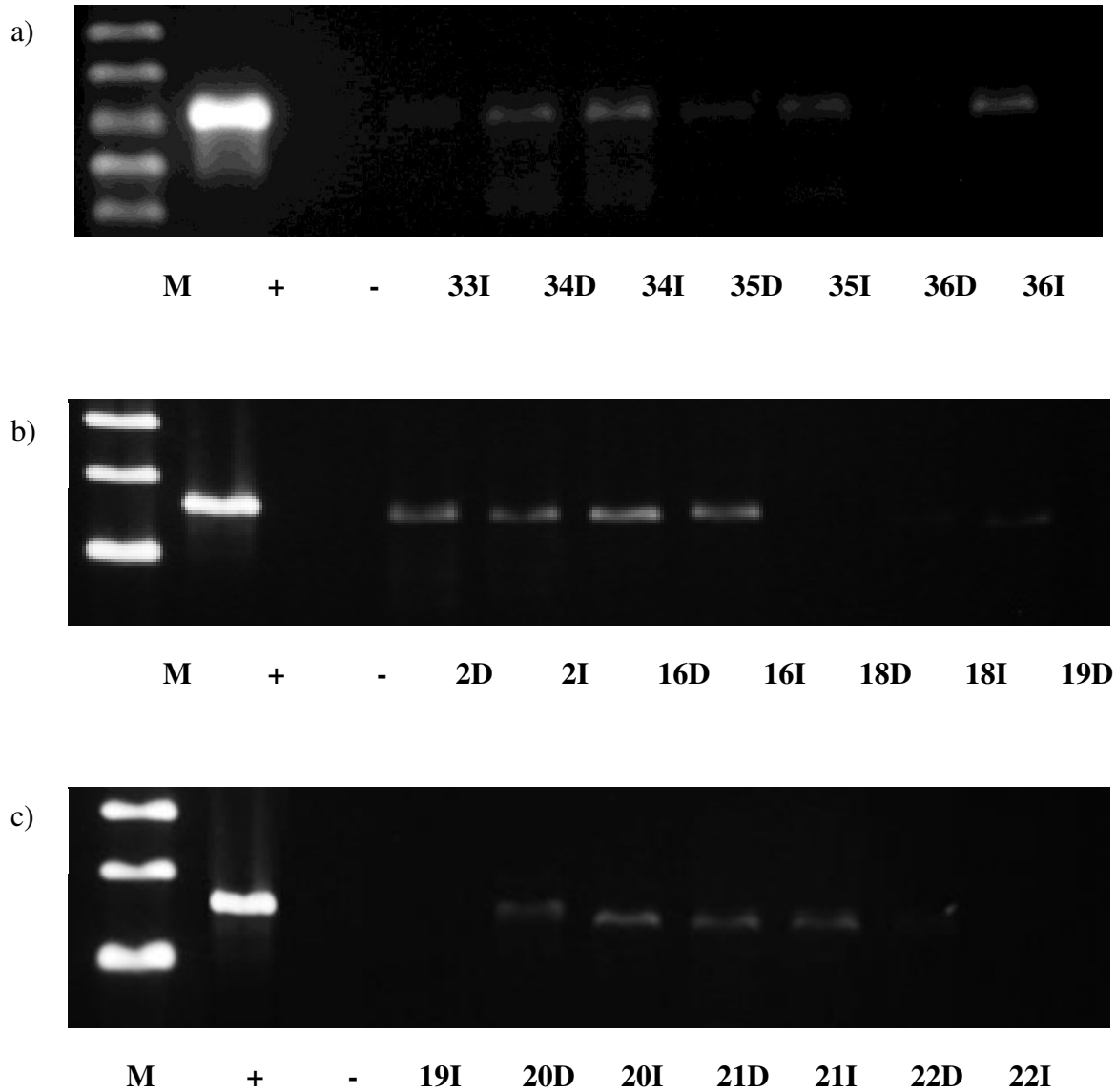


Imagen 4. Expedientes positivos a la presencia de *Malassezia* spp. PCR dirigido a la región D1/D2 del 26S LSU. (M) Marcador de peso molecular, (+) Control positivo a 600pb, (-) Control negativo. *a) Marcador de peso molecular: 100pb Gene Script 100bp DNA leader™, b) y c) Marcador de peso molecular: amresco PCR DNA marker™.

3.4 Análisis del muestreo comparativo

Se tomó la decisión de analizar la conjuntiva de 10 caballos deportivos de alto rendimiento clínicamente sanos a manera de muestreo comparativo. A estos caballos también se les realizó una breve anamnesis; todos los caballos contaban con un calendario de vacunación y desparasitación al corriente, condición corporal optima, y acceso a dietas balanceadas, ninguno de los animales manifestaba alguna enfermedad, lesión ocular o sistémica al momento de tomar las muestras.

En cuanto a la prueba de producción de lagrima 17/20 ojos quedaron dentro del grupo 2 (STT >10 >25 mm/min), 2/20 en el grupo 1 (STT <10 mm/min) y 1 ojo en el grupo 3 (STT >25 mm/min). Esto indica que el 85 % de los ojos marcaron una producción de lágrima normal. Estos datos se pueden observar en la **Tabla 5**.

Las muestras colectadas a partir de los 10 caballos deportivos de alto rendimiento también pasaron por ensayos de PCR, dichos resultados se muestran en la **Imagen 5**. De las 20 muestras sometidas a esta prueba, solo 2 mostraron un resultado positivo a la presencia del genero *Malassezia* spp. esto representa el 10% de positividad en estas muestras.

Tabla 5. Resultados del Test de Schirmer de los caballos deportivos de alto rendimiento

Número de Expediente	STT OD	STT OI
60	16	18
61	19	19
62	14	15
63	30	14
64	17	18
65	14	15
66	20	16
67	16	17
68	6	9
69	17	18

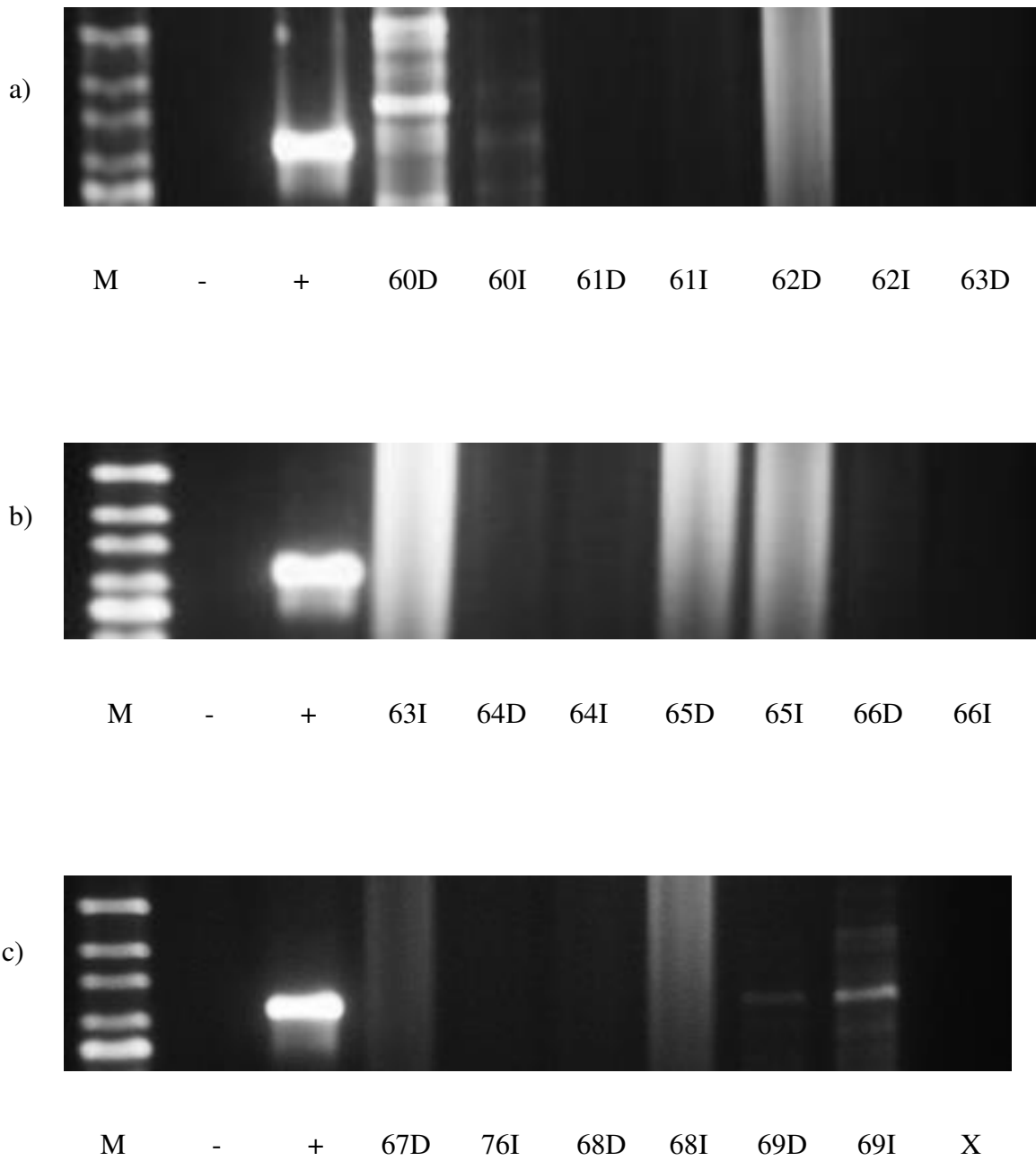


Imagen 5. Expedientes de caballos deportivos de alto rendimiento positivos a la presencia de *Malassezia* spp. PCR dirigido a la región D1/D2 del 26S LSU. (M) Marcador de peso molecular, (+) Control positivo a 600pb, (-) Control negativo. *Marcador de peso molecular: 100pb Gene Script 100bp DNA leader™.

4 DISCUSIÓN

Los géneros y especies de microorganismos reportados en este estudio coinciden ampliamente con los resultados previamente reportados en la literatura, sobre los microorganismos de la superficie ocular de los caballos. Aunque existen numerosas diferencias, entre ellas la identificación por primera vez del género *Malassezia* spp en la conjuntiva de caballos.

Estudios previos mencionan la presencia de bacterias en la superficie ocular de caballos principalmente de las bacterias Gram positivas (Andrew *et al.*, 2003) también se presentan estudios en diferentes especies animales que mencionan la presencia de bacterias anaerobias obligadas (Ledbetter y Scarlett, 2008). Las bacterias comúnmente presentes son *Staphylococcus* spp, *Bacillus* spp, *Corynebacterium* spp y en menos grado las Gram negativas *Klebsiella*, *Escherichia coli*, *Proteus* y *Pseudomonas*. (Araghi-Sooreh *et al.*, 2014; Keller y Hendrix, 2005; Wada *et al.*, 2010; Whitley *et al.*, 1983). Todos estos microorganismos son clasificados como microbiota normal, aunque también son aislados a partir de casos de queratitis infecciosas. En este estudio coincidimos en que la presencia de bacterias Gram positivas es significativamente mayor a la de otros tipos de bacterias.

El género de *Staphylococcus* spp forma parte de esta clasificación y es comúnmente encontrado en la superficie ocular de distintas especies; en este estudio *S. aureus* fue localizado en 64% de las muestras, mientras que *S. epidermidis* en el 63% de las muestras. Estos porcentajes muestran una diferencia significativa comparada contra estudios que reportan una incidencia que oscila entre el 20 y 25% (Andrew *et al.*, 2003; Araghi-Sooreh *et al.*, 2014). Un estudio previo realizado en el área metropolitana de

Monterrey mostró resultados en los cuales el género *Staphylococcus* spp estaba presente, pero únicamente la especie de *S. aureus* en un 35% de las muestras (Hernández-Vidal *et al.*, 2010). Seguida de esta bacteria localizamos a *Escherichia coli* (57%), *Bacillus* (50%), *Klebsiella* (18%) y *Proteus* (2%).

Hernández Vidal *et al.* (2010) también reportó la presencia de *Pseudomona* spp, bacteria comúnmente aislada en la conjuntiva de caballos, agente etiológico de las queratitis infecciosas y uno de los patógenos con mayor virulencia sobre la córnea (Wada *et al.*, 2010). Este mismo estudio reportó por primera vez la presencia de *S. marcescens* en la conjuntiva de caballos clínicamente sanos, previo a este hallazgo solo existía un reporte de la presencia de esta especie bacteriana en un caso de queratitis infecciosas en caballos y tiempo después se reportó en un caso de queratitis ulcerativa (Keller y Hendrix, 2005; Zeiss *et al.*, 2013) y en humanos en casos de endoftalmitis y queratitis (Alexandrakis *et al.*, 2000; Equi y Green, 2001; Schaefer *et al.*, 2001; Shah *et al.*, 2014). En el presente estudio, esta bacteria no fue recuperada en ninguna de las muestras. Esta diferencia puede atribuirse a las condiciones de alojamiento de los caballos utilizados en estos estudios ya que los caballos con presencia de *Serratia marcescens* eran caballos deportivos de alto rendimiento, mientras que los utilizados por nosotros fueron caballos de trabajo.

Los organismos fúngicos de *Aspergillus* y *Penicillium* son los de mayor presencia en los perfiles fúngicos de la conjuntiva, de la superficie ocular o en los casos de queratomycosis en caballos (Araghi-Sooreh *et al.*, 2014; Khosravi *et al.*, 2014; Sgorbini *et al.*, 2008). En este estudio el organismo fúngico con mayor presencia fue el de *Penicillium* presente en el 29% de los ojos muestreados. Seguido por el género de *Aspergillus*, donde *A. fumigatus* fue encontrado en el 11% de los ojos muestreados, *A.*

niger en el 9% y *A. flavus* en el 4%; adicionalmente se identificó *Rhizopus* en el 6% y a *Fusarium* en el 5%.

Sherman *et al.* (2016) encontró una alta presencia del genero *Aspergillus* en estudios similares a este; ellos encontraron e identificaron cuatro especies de este género: *A. fumigatus* en 63% de las muestras, *A. niger* en el 7%, *A. glaucus* en el 2%, *A. terreus* 2% y en otros casos no identificaron especie pero si reportaron la presencia del genero *Aspergillus*. (Sherman *et al.*, 2016). Los porcentajes tiene una diferencia importante, en este estudio se logró recuperar especies del género *Aspergillus* en 24% de las muestras mientras que Sherman y colaboradores en un 63%; también se podría mencionar el caso de *Fusarium* spp donde ellos lo aislaron en un 37% de las muestras, mientras que en esta investigación en un 4%.

En el presente estudio se recuperaron 2 géneros de levaduras: *Candida* spp y *Rhodotorula* spp. Está bien documentada la presencia de *Candida* spp en la superficie ocular de los caballos y otras especies animales tanto en condiciones normales como en los casos de queratitis infecciosas (Andrew *et al.*, 2003; Brooks *et al.*, 2013; Khosravi *et al.*, 2014; Ledbetter *et al.*, 2011; Ledbetter *et al.*, 2015; Reed *et al.*, 2013; Sansom *et al.*, 2005; Voelter-Ratson *et al.*, 2014; Zeiss *et al.*, 2013). Mediante el uso del agar cromogénico selectivo para *Candida* (BBL CHROMEagar *Candida*™) se pudieron aislar e identificar diferentes especies de este género a partir de los hisopados conjuntivales; Estos agares ofrecen la posibilidad de identificar y diferenciar *Candida albicans*, *Candida tropicalis* y *Candida krusei* (Odds y Bernaerts, 1994), además basados en el uso práctico de estos agares se ha determinado que también se puede identificar *Trichosporon beigeli* (Giusiano y Mangiaterra, 1998). En este estudio se lograron recuperar 3 especies del genero *Candida*: *C. tropicalis* en 20% de las

muestras, *C. albicans* en 18% y *C. krusei* en 14%. Un estudio previo sobre los organismos fúngicos y bacterianos presentes en la conjuntiva de 45 caballos de trabajo obtuvo resultados de aislamiento de *Candida* spp de 3.14%, en este estudio *Candida* fue el único organismo levaduriforme encontrado (Araghi-Sooreh *et al.*, 2014); Voelter-Ratson *et al.* (2014) identificó 2 caballos positivos a la presencia de *Candida guilliermondii*. Otro estudio realizado en Italia identificó diferentes especies de *Candida*, la metodología principal utilizada por estos investigadores fue la siembra en agar Saboraud dextrosa y/o en agar extracto de malta y posteriormente la identificación morfológica con ayuda de pruebas bioquímicas, las especies identificadas fueron: *C. famata*, *C. guilliermondii*, *C. catenulata* y *C. intermedia*. El hallazgo de este gran número de especies puede explicarse o adjudicarse a la naturaleza del estudio, ya que el mismo se realizó sobre potros recién nacidos por lo que se especula de una contaminación fúngica provocada por los genitales de las yeguas (Sgorbini *et al.*, 2008).

Malassezia pachydermatis es un agente oportunista normalmente encontrado en la piel de distintas especies animales. En caballos el género *Malassezia* ha sido reportado en piel (Crespo *et al.*, 2002), en un caso de dermatitis facial eritematosa (Paterson, 2002), en la región intra mamaria y prepucial (White *et al.*, 2006), región inguinal y en el canal auditivo externo (Shokri, 2016). Actualmente existen pocos reportes de la presencia de esta levadura lipofílica o de la colonización de la misma en ojos, pero se presentó un caso de queratitis por *Malassezia* en humanos (Suzuki *et al.*, 2007) también ha sido reportado en la superficie ocular de perros sanos y en perros con ojos ulcerados (Prado *et al.*, 2004) existe un caso de queratomycosis canina (Ledbetter y Starr, 2015) y recientemente se reportó una queratitis por *Malassezia pachydermatis* mediante infección experimental (Ledbetter *et al.*, 2015). A nuestro conocimiento no

existe reporte alguno de la presencia de esta levadura en los ojos de los caballos. En el presente estudio esta levadura fue recuperada en 82 de las muestras recolectadas (82%), de estas muestras positivas solo una provenía de un ojo con una ulcera corneal activa al momento de la toma de muestras. Cabe mencionar que este microorganismo no fue localizado en los cultivos microbiológicos por lo que se llegó a la identificación del mismo mediante técnicas moleculares, esta situación también fue presentada por Ledbetter *et al.* (2015) donde bajo ensayos de PCR pudo localizar e identificar microorganismos fúngicos a partir de muestras oculares posterior a la obtención de resultados microbiológicos negativos.

Esta positividad a la presencia de *Malassezia* no se asoció a edad, género o al manejo profiláctico que se le daba a estos caballos, pero si se notó que el 74% de los animales positivos presentaban una producción de lagrima por encima del rango normal. Se ha sugerido que las lágrimas o la película lagrimal pueden considerarse una fuente importante de lípidos (Prado *et al.*, 2004). La literatura menciona diferentes rangos en cuanto a la producción de lagrima en caballos, estos van desde 12.7 ± 9.1 mm/min (Marts *et al.*, 1977), 18.3 ± 2.1 (Gilger y Stoppini, 2011), 20 ± 5 mm/min (Beech *et al.*, 2003), 28.6 ± 6.2 mm/min (Silva *et al.*, 2016), los resultados en este estudio reflejan un promedio de 28.6 mm/min en los caballos de trabajo con valores mínimos de 4 y máximos mayores a los 35 mm/min, en los caballos deportivos de alto rendimiento se obtuvo un promedio de 16.4 mm/min con valores mínimos de 6 y máximo de 30 mm/min. Beech *et al.* (2003) reportó que factores tales como el género, edad, condiciones de alojamiento y/o la temporada no afectan o causan cambios en la producción de lagrima. Contrario a este estudio se obtuvieron resultados con una clara diferencia en los resultados del test de Schirmer entre los caballos de trabajo los cuales

principalmente se encuentran en condiciones de poca higiene y los caballos deportivos de alto rendimiento los cuales viven bajo estrictas condiciones de higiene.

El incremento en producción de lágrima de estos caballos de trabajo queda en duda tanto por el amplio rango reportado en cuanto a producción de lagrima como por la necesidad de realizar estudios más específicos para conocer a fondo las cualidades o deficiencias cualitativas y/o cuantitativas de la lagrima. (Ollivier, 2004; Silva *et al.*, 2016). A nuestro conocimiento ningún artículo reporta que valores elevados en producción de lagrima sean considerados una patología, solo se menciona que estos incrementos pueden estar relacionados con inflamación ocular, nasal, cualquier condición que cause dolor ocular tales como queratitis, úlceras, cuerpos extraños, etc. (Ollivier, 2004).

Debido a los resultados obtenidos en este estudio plantea el hecho de que las condiciones de alojamiento pueden tener un efecto sobre las condiciones de la superficie ocular y/o sobre la cantidad y tipo de microorganismos presentes en la misma. El hallazgo previo del género *Malassezia* en casos de queratitis en otras especies y el hallazgo propio de este estudio de la presencia de esta levadura en la conjuntiva de caballos de trabajo sugiere la capacidad que tiene este microorganismo de participar como agente oportunista en los casos de queratomicosis en caballos.

5 CONCLUSIÓN

Se identificó un gran número de microorganismos en la conjuntiva de caballos de trabajo. Dentro de los organismos levaduriformes se identificaron 3 especies del género *Candida* y se identificó la presencia de *Malassezia* spp en un gran porcentaje de las muestras.

El hallazgo de *Malassezia* spp representa el primer reporte de la presencia de esta levadura en la superficie ocular de ojos sanos.

Factores como las condiciones de alojamiento de los caballos tienen una influencia en los valores de producción de lágrima y esto a su vez puede estar relacionado con la presencia o ausencia de determinados microorganismos.

Conocer los microorganismos presentes en la conjuntiva de ojos sanos ayudará en el diagnóstico y establecimiento de planes terapéuticos en los casos de enfermedad ocular de origen infeccioso.

BIBLIOGRAFÍA

- Alexandrakis, G., E. C. Alfonso, y D. Miller, 2000, Shifting trends in bacterial keratitis in south Florida and emerging resistance to fluoroquinolones: *Ophthalmology*, V. 107, p. 1497-1502.
- Andrew, S., D. Brooks, P. Smith, K. Gelatt, N. Chmielewski, y C. Whittaker, 1998, Equine ulcerative keratomycosis: visual outcome and ocular survival in 39 cases (1987–1996): *Equine Veterinary Journal*, v. 30, p. 109-116.
- Andrew, S. E., A. Nguyen, G. L. Jones, y D. E. Brooks, 2003, Seasonal effects on the aerobic bacterial and fungal conjunctival flora of normal thoroughbred brood mares in Florida: *Veterinary Ophthalmology*, v. 6, p. 45-50.
- Araghi-Sooreh, A., M. Navidi, y M. Razi, 2014, Conjunctival bacterial and fungal isolates in clinically healthy working horses in Iran: *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, v. 20, p. 625-627.
- Beckwith-Cohen, B., D. Elad, T. Bdolah-Abram, y R. Ofri, 2014, Comparison of tear pH in dogs, horses, and cattle: *American Journal Of Veterinary Research*, v. 75, p. 494-499.
- Beech, J., R. Zappala, G. Smith, y S. Lindborg, 2003, Schirmer tear test results in normal horses and ponies: effect of age, season, environment, sex, time of day and placement of strips: *Veterinary Ophthalmology*, v. 6, p. 251-254.
- Brian, G., 2010, *Equine Ophthalmology*. Ed. Elsevier Health Sciences
- Bron, A., y J. Tiffany, 2004, The contribution of meibomian disease to dry eye: The ocular surface, v. 2, p. 149-164.
- Brooks, D., 2002, *Ophthalmology For The Equine Practitioner*, Teton NewMedia.
- Brooks, D., 2009, Equine keratomycosis: an international problem: *Equine Veterinary Education*, v. 21, p. 243-246.
- Brooks, D., S. Andrew, D. Biros, H. Denis, T. Cutler, D. Strubbe, y K. Gelatt, 2000, Ulcerative keratitis caused by beta-hemolytic *Streptococcus equi* in 11 horses: *Veterinary Ophthalmology*, v. 3, p. 121-125.
- Brooks, D. E., 2005, Equine stromal and endothelial keratopathies: medical management of stromal abscesses, eosinophilic keratitis, calcific band keratopathy, striate band opacities, and endotheliitis in the horse: *Clinical Techniques in Equine Practice*, v. 4, p. 21-28.
- Brooks, D. E., C. E. Plummer, B. G. Mangan, y G. Ben-Shlomo, 2013, Equine subepithelial keratomycosis: *Veterinary Ophthalmology*, v. 16, p. 93-96.
- Cabañes, F. J., B. Theelen, G. Castellá, y T. Boekhout, 2007, Two new lipid-dependent *Malassezia* species from domestic animals: *FEMS Yeast Research*, v. 7, p. 1064-1076.
- Carroll, C., y P. Huntington, 1988, Body condition scoring and weight estimation of horses: *Equine Veterinary Journal*, v. 20, p. 41-45.
- Chabouty, H., R. Moreno, F. Ortiz, y F. Barría, 2015, Microbiota conjuntival en el preoperatorio de pacientes que se someterán a cirugía de cataratas: *Revista Chilena De Infectología*, v. 32, p. 150-157.
- Crespo, M., M. Abarca, y F. Cabanes, 2002, Occurrence of *Malassezia* spp. in horses and domestic ruminants: *Mycoses*, v. 45, p. 333-337.
- Crispin, S., 2012, Conjuntiva, *in* Manual de Oftalmología en pequeños animales, ed.Lexus.

- Equi, R. A., y W. R. Green, 2001, Endogenous *Serratia marcescens* endophthalmitis with dark hypopyon: a case report and review: *Survey Of Ophthalmology*, v. 46, p. 259-268.
- Ferrer, C., F. Colom, S. Frases, E. Mulet, J. L. Abad, y J. L. Alió, 2001, Detection and identification of fungal pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8 S ribosomal DNA typing in ocular infections: *Journal Of Clinical Microbiology*, v. 39, p. 2873-2879.
- Galera, P. D., y D. Brooks, 2012, Optimal management of equine keratomycosis: *Vet Med-CZECH*, v. 3, p. 7-17.
- Gelatt, K., 2008, Equine Ophthalmology, in *Essentials of Veterinary Ophthalmology*, ed., Wiley Blackwell, p. 331-378.
- Gelatt, K. N., y D. E. Brooks, 2011, Chapter 7 - Surgical procedures for the conjunctiva and the nictitating membrane, in *Veterinary Ophthalmic Surgery*, ed., Edinburgh, W.B. Saunders, p. 157-190.
- Gemensky-Metzler, A. J., D. A. Wilkie, J. J. Kowalski, L. M. Schmall, A. M. Willis, y M. Yamagata, 2005, Changes in bacterial and fungal ocular flora of clinically normal horses following experimental application of topical antimicrobial or antimicrobial-corticosteroid ophthalmic preparations: *American Journal of Veterinary Research*, v. 66, p. 800-811.
- Gilger, B., y R. Stoppini, 2011, Equine ocular examination: routine and advanced diagnostic techniques: *Equine Ophthalmology*, v. 1, p. 1-36.
- Giusiano, G., y M. Mangiaterra, 1998, Diferenciación e identificación presuntiva rápida de levaduras con el medio CHROM-agar *Candida*: *Revista Argentina de Microbiología*, v. 30, p. 100-3.
- Hernández Escareño, J. J., F. J. Cabañes Saenz, and G. Castellà Gómez, 2005, Caracterización molecular de especies del género *Malassezia*, Universitat Autònoma de Barcelona.
- Hernández Vidal, G., R. Ramírez Romero, L. E. Rodríguez Tovar, F. A. Mora Valdez, J. A. Vidales Contreras, and J. J. Hernández Escareño, 2010, Localización de *Serratia marcescens* en perfil bacteriológico y fúngico de la conjuntiva de caballos clínicamente sanos en Monterrey, Nuevo León, México: *Veterinaria México*, v. 41, p. 239-249.
- Keller, R., y D. Hendrix, 2005, Bacterial isolates and antimicrobial susceptibilities in equine bacterial ulcerative keratitis (1993–2004): *Equine Veterinary Journal*, v. 37, p. 207-211.
- Khosravi, A., D. Nikaein, A. Sharifzadeh, y F. Gharagozlou, 2014, Ocular fungal flora from healthy horses in Iran: *Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology*, v. 24, p. 29-33.
- Koneman, E. W., y S. Allen, 2008, Koneman. Diagnostico Microbiologico/Microbiological diagnosis: Texto Y Atlas En Color/Text and Color Atlas, Ed. Médica Panamericana.
- Ledbetter, E. C., N. L. Irby, y S. G. Kim, 2011, In vivo confocal microscopy of equine fungal keratitis: *Veterinary Ophthalmology*, v. 14, p. 1-9.
- Ledbetter, E. C., M. L. Norman, y J. K. Starr, 2015, In vivo confocal microscopy for the detection of canine fungal keratitis and monitoring of therapeutic response: *Veterinary Ophthalmology*.
- Ledbetter, E. C., y J. M. Scarlett, 2008, Isolation of obligate anaerobic bacteria from ulcerative keratitis in domestic animals: *Veterinary Ophthalmology*, v. 11, p. 114-122.

- Ledbetter, E. C., y J. K. Starr, 2015, *Malassezia pachydermatis* keratomycosis in a dog: Medical Mycology Case Reports, v. 10, p. 24-26.
- Lowe, R., y S. Crispin, 2003, Normal equine tear pH as measured with pH paper: Programs and Abstracts of the Joint Meeting of BrAVO/ECVO/ESVO/ISVO. Cambridge.
- Maggs, D. J., P. Miller, y R. Ofri, 2012, *Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology*, Elsevier Health Sciences.
- Marts, B., G. Bryan, y D. Prieur, 1977, Schirmer tear test measurement and lysozyme concentration of equine tears [secretion, in order to aid in the diagnosis of ocular disease]: *Journal of Equine Medicine and Surgery*.
- McDermott, A. M., 2013, Antimicrobial compounds in tears: *Experimental Eye Research*, v. 117, p. 53-61.
- Nasissse, M., y S. Nelms, 1992, Equine ulcerative keratitis: The Veterinary clinics of North America. *Equine Practice*, v. 8, p. 537-555.
- Nichols, K. K., B. M. Ham, J. J. Nichols, C. Ziegler, y K. B. Green-Church, 2007, Identification of fatty acids and fatty acid amides in human meibomian gland secretions: *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, v. 48, p. 34-39.
- Odds, F. C., y R. Bernaerts, 1994, CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species: *Journal of Clinical Microbiology*, v. 32, p. 1923-1929.
- Ollivier, F. J., 2004, The precorneal tear film in horses: its importance and disorders: *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, v. 20, p. 301-318.
- O'donnell, K., 1993, *Fusarium* and its near relatives in the fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics: CAB International, Wallingford, UK, p. 225-233.
- Paterson, S., 2002, Identification of *Malassezia* from a horse's skin: *Equine Veterinary Education*, v. 14, p. 121-125.
- Petersen-Jones, S. M. C., y M. Sheila, 1999, *Manual de Oftalmología en Pequeños Animales*.
- Prado, M., E. Brito, M. Girão, A. Monteiro, J. Sidrim, y M. Rocha, 2004, Higher incidence of *Malassezia pachydermatis* in the eyes of dogs with corneal ulcer than in healthy dogs: *Veterinary Microbiology*, v. 100, p. 115-120.
- Prats, G., 2006, *Microbiología clínica*, Ed. Médica Panamericana.
- Reed, W. P., y R. C. Williams, 1978, Bacterial adherence: first step in pathogenesis of certain infections: *Journal of Chronic Diseases*, v. 31, p. 67-72.
- Reed, Z., S. Thomasy, K. Good, D. J. Maggs, K. Magdesian, N. Pusterla, y S. R. Hollingsworth, 2013, Equine keratomycoses in California from 1987 to 2010 (47 cases): *Equine Veterinary Journal*, v. 45, p. 361-366.
- Rosa, M., L. M. Cardozo, J. da Silva Pereira, D. E. Brooks, A. L. B. Martins, P. S. S. Florido, and J. S. P. Stussi, 2003, Fungal flora of normal eyes of healthy horses from the State of Rio de Janeiro, Brazil: *Veterinary Ophthalmology*, v. 6, p. 51-55.
- Sack, R. A., A. Beaton, S. Sathe, C. Morris, M. Willcox, y B. Bogart, 2000, Towards a closed eye model of the pre-ocular tear layer: *Progress in Retinal and Eye Research*, v. 19, p. 649-668.
- Sandmeyer, L. (2016). Anatomía del ojo equino y estructuras anexas. [image] Available at: <https://www.horsejournals.com/understanding-equine-vision-and-eye-disease> [Accessed 28 Sep. 2016].
- Sansom, J., H. Featherstone, y K. Barnett, 2005, Keratomycosis in six horses in the United Kingdom: *Veterinary Record*, v. 156, p. 13-17.

- Santgar, (2016). Gel lagrimal pre corneal. [image] Available at: <http://santgar.com/tratamiento-ojo-seco.html> [Accessed 28 Sep. 2016].
- Schaefer, F., O. Bruttin, L. Zografos, e Y. Guex-Crosier, 2001, Bacterial keratitis: a prospective clinical and microbiological study: *British Journal of Ophthalmology*, v. 85, p. 842-847.
- Scotty, N. C., 2005, Equine keratomycosis: *Clinical Techniques in Equine Practice*, v. 4, p. 29-36.
- Sgorbini, M., G. Barsotti, S. Nardoni, M. Brombin, A. Sbrana, F. Mancianti, y M. Corazza, 2010, Seasonal prevalence of fungi in the conjunctival fornix of healthy cows during a 2-year study: *Veterinary Ophthalmology*, v. 13, p. 227-234.
- Sgorbini, M., G. Barsotti, S. Nardoni, F. Mancianti, S. Rossi, y M. Corazza, 2008, Fungal flora of normal eyes in healthy newborn foals living in the same stud farm in Italy: *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 28, p. 540-543.
- Shah, S. B., A. S. Bansal, M. P. Rabinowitz, C. Park, E. H. Bedrossian Jr, y R. C. Eagle, 2014, Endogenous *Serratia marcescens* endophthalmitis: *Retinal Cases and Brief Reports*, v. 8, p. 7-9.
- Sherman, A. B., A. B. Clode, y B. C. Gilger, 2016, Impact of fungal species cultured on outcome in horses with fungal keratitis: *Veterinary Ophthalmology*.
- Shokri, H., 2016, Occurrence and distribution of *Malassezia* species on skin and external ear canal of horses: *Mycoses*, v. 59, p. 28-33.
- Silva, L. R., A. F. Gouveia, C. J. Fátima, L. B. Oliveira, J. L. Reis, R. F. Ferreira, C. M. Pimentel, and P. D. Galera, 2016, Tear ferning test in horses and its correlation with ocular surface evaluation: *Veterinary Ophthalmology*, v. 19, p. 117-123.
- Suzuki, T., N. Hori, T. Miyake, Y. Hori, y K. Mochizuki, 2007, Keratitis caused by a rare fungus, *Malassezia restricta*: *Japanese Journal of Ophthalmology*, v. 51, p. 292-294.
- Voelter-Ratson, K., M. Monod, L. Unger, B. M. Spiess, y S. A. Pot, 2014, Evaluation of the conjunctival fungal flora and its susceptibility to antifungal agents in healthy horses in Switzerland: *Veterinary Ophthalmology*, v. 17, p. 31-36.
- Wada, S., S. Hobo, y H. Niwa, 2010, Ulcerative keratitis in thoroughbred racehorses in Japan from 1997 to 2008: *Veterinary Ophthalmology*, v. 13, p. 99-105.
- Wada, S., S. Hobo, H. Ode, H. Niwa, y H. Moriyama, 2013, Equine keratomycosis in Japan: *Veterinary Ophthalmology*, v. 16, p. 1-9.
- Wang, L., Q. Pan, L. Zhang, Q. Xue, J. Cui, y C. Qi, 2008, Investigation of bacterial microorganisms in the conjunctival sac of clinically normal dogs and dogs with ulcerative keratitis in Beijing, China: *Veterinary Ophthalmology*, v. 11, p. 145-149.
- White, S., S. Vandenabeele, N. Drazenovich, y J. Foley, 2006, *Malassezia* species isolated from the intermammary and preputial fossa areas of horses: *Journal of veterinary Internal Medicine*, v. 20, p. 395-398.
- Whitley, R., E. C. BURGESS, y C. Moore, 1983, Microbial isolates of the normal equine eye: *Equine Veterinary Journal*, v. 15, p. 138-140.
- Willcox, M. D., 2013, Characterization of the normal microbiota of the ocular surface: *Experimental Eye Research*, v. 117, p. 99-105.
- Zegans, M. E., y R. N. Van Gelder, 2014, Considerations in understanding the ocular surface microbiome: *American Journal of Ophthalmology*, v. 158, p. 420-422.
- Zeiss, C., M. Neaderland, F. C. Yang, G. Terwilliger, y S. Compton, 2013, Fungal polymerase chain reaction testing in equine ulcerative keratitis: *Veterinary Ophthalmology*, v. 16, p. 341-351.