



Universidad de Viña del Mar
ESCUELA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

**PRESENCIA DE HONGOS DEL GÉNERO *ASPERGILLUS SPP* EN
CAVIDAD NASOFARÍNGEA DE CABALLOS MESTIZOS
CLÍNICAMENTE SANOS PERTENECIENTES AL REGIMIENTO DE
CABALLERÍA BLINDADA N°1 GRANADEROS**

Memoria Para Optar al Título de Médico Veterinario

CLAUDIA CORREA GURTUBAY

Profesor Guía: Dr. Pablo Larraguibel Vallarino

VIÑA DEL MAR – CHILE

2010

ÍNDICE DE MATERIAS

1. RESUMEN.....	8
SUMMARY.....	9
2. INTRODUCCIÓN.....	10
3. REVISIÓN BILIOGRÁFICA.....	13
3.1. El aparato respiratorio superior en el equino.....	13
3.1.1. Anatomía de las vías aéreas superiores.....	13
3.1.2. Microbiota normal respiratoria.....	18
3.2. Los hongos como agentes infecciosos.....	20
3.3. Características generales de los hongos.....	22
3.4. El género <i>Aspergillus spp</i>	24
3.5. Clasificación taxonómica para <i>Aspergillus spp</i>	27
3.6. Aspergilosis.....	28
3.7. Enfermedades fúngicas de las vías aéreas.....	29
3.7.1. Infección fúngica de la cavidad nasal y senos paranasales.....	32
3.7.2. Micosis de las bolsas guturales.....	32
3.7.3. Neumonía fúngica.....	34
3.7.4. Obstrucción recurrente de las vías aéreas (ORVA).....	35
3.8. Métodos diagnósticos.....	37
3.9. Tratamientos.....	38
4. OBJETIVOS.....	40
4.1. Objetivo general.....	40
4.2. Objetivos específicos.....	40

5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	41
5.1. Animales.....	41
5.2. Insumos.....	41
5.3. Manejo de grupo.....	42
5.4. Tamaño de la muestra.....	43
5.5. Características ambientales.....	43
5.6. Obtención de muestras.....	44
5.7. Cultivo.....	45
5.8. Observación macroscópica y microscópica.....	45
5.9. Identificación de estructuras.....	45
5.10. Recolección de datos y análisis estadístico.....	46
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	47
6.1. Crecimiento fúngico en las muestras analizadas.....	47
6.2. Crecimiento de <i>Aspergillus spp</i> en las muestras analizadas.....	52
6.3. Organismos fúngicos aislados según el total de muestras.....	59
6.4. Organismos fúngicos aislados sobre el total de estructuras.....	63
7. CONCLUSIONES.....	69
8. BIBLIOGRAFÍA.....	70
9. ANEXOS.....	76

ÍNDICE DE FIGURAS Y GRÁFICOS

1. Figura N°1. Corte mediano de la cabeza equina.....	18
2. Figura N°2. Estructura general de los hongos pertenecientes al género <i>Aspergillus spp.</i>	26
3. Gráfico N°1. Porcentaje del crecimiento fúngico sobre el total inicial muestreado.....	48
4. Gráfico N°2. Porcentaje de caballos muestreados por grupo (A y B).....	49
5. Gráfico N°3. Distribución del crecimiento fúngico según grupos (A y B).....	51
6. Gráfico N°4. Porcentaje muestras positivas y negativas a <i>Aspergillus spp</i> en el total de la muestra.....	53
7. Gráfico N°5. Distribución de muestras positivas y negativas a <i>Aspergillus spp</i> según grupo muestreado.....	55
8. Gráfico N°6. Porcentaje de muestras positivas y negativas a <i>Aspergillus spp</i> según sexo de los animales.....	56
9. Gráfico N°7. Porcentaje de muestras positivas y negativas a <i>Aspergillus spp</i> según grupos etarios.....	58
10. Gráfico N°8. Distribución de las muestras según la presencia de <i>Aspergillus</i> y sus asociaciones.....	59

ÍNDICE DE TABLAS

1. Tabla N°1. Sexo de los caballos según grupos (A y B) y el total muestreado.....	49
2. Tabla N°2. Grupos etarios de los caballos muestreados.....	50
3. Tabla N°3. Número de muestras positivas y negativas al crecimiento fúngico según grupos (A y B).....	51
4. Tabla N°4. Número de muestras positivas y negativas a <i>Aspergillus spp</i> según grupos (A y B).....	54
5. Tabla N°5. Número de muestras positivas y negativas a <i>Aspergillus spp</i> según sexo de los animales.....	56
6. Tabla N°6. Número de muestras positivas y negativas a <i>Aspergillus spp</i> según grupos etarios.....	57
7. Tabla N°7. Distribución de géneros aislados según el total de muestras.....	60
8. Tabla N°8. Distribución de géneros aislados según grupo muestreado.....	61
9. Tabla N°9. Distribución de géneros aislados según sexo de los animales muestreados.....	63
10. Tabla N°10. Distribución de géneros aislados según el total de estructuras fúngicas.....	64

11. Tabla N°11. Distribución de géneros aislados para los grupos A y B según el total de estructuras fúngicas	64
12. Tabla N°12. Distribución de géneros aislados para machos y hembras según el total de estructuras fúngicas.....	66

ÍNDICE DE ANEXOS

1. Anexo I: Materiales.....	76
1.1. Tórula nasofaríngea.....	76
1.2. Azul de lactofenol.....	77
1.3. Agar Cloranfenicol Sabouraud.....	77
2. Anexo II: Métodos de análisis.....	78
2.1. Montaje con azul de lactofenol mediante uso de cinta adhesiva.....	78
3. Anexo III: Registro de resultados.....	79
3.1. Tabla N°1. Datos registrados del total de muestras.....	79
3.2. Tabla N°2. Resultados del crecimiento fúngico sobre el total de muestras positivas.....	80
4. Anexo IV: Sitios web.....	82
5. Anexo V: Fotografías.....	84
5.1. Fotografía N°1. <i>Aspergillus spp.</i>	84
5.2. Fotografía N°2. <i>Mucor spp.</i>	85
5.3. Fotografía N°3. <i>Alternaria spp.</i>	85
5.4. Fotografía N°4. <i>Paecilomyces spp.</i>	86
5.5. Fotografía N°5. <i>Acremonium spp.</i>	86
5.6. Fotografía N°6. <i>Cladosporium spp.</i>	87
5.7. Fotografía N°7. <i>Penicillium spp.</i>	87
5.8. Fotografía N°8. Pesebreras grupo A.....	88
5.9. Fotografía N°9. Pesebreras grupo B.....	89

1. RESUMEN

La siguiente memoria establece la presencia de organismos fúngicos pertenecientes al género *Aspergillus spp* en la cavidad nasofaríngea de equinos ubicados en el Regimiento de Caballería Blindada N°1 “Granaderos”, y con ello determinar la relación existente entre la presencia de estos hongos y las condiciones de estabulación, edad y sexo de los animales.

Para lograr los objetivos se estudiaron un total de 32 muestras nasofaríngeas obtenidas mediante tómulas protegidas, desde las cuales fue posible encontrar 49 estructuras fúngicas pertenecientes a 7 géneros distintos de los cuales *Aspergillus spp* constituyó el 28% del total de muestras con 9 muestras positivas. No se encontraron diferencias significativas en la presencia del género según la edad, sexo o condiciones de estabulación de los animales, entendiéndose así que la existencia de *Aspergillus spp* en la nasofaringe equina no depende del sexo de los animales, pero que hay una tendencia entre los 3 a 10 años de encontrar la mayor cantidad de muestras positivas a este género y en cuanto a la estabulación, que son necesarios cambios radicales en las condiciones de manejo para lograr una disminución significativa de estos organismos en el ambiente y consecuentemente en las vías respiratorias.

SUMMARY

The following report establishes the presence of fungal organisms, which belong to the *Aspergillus spp* genre in horse's nasopharyngeal cavity. These horses are located in *Regimiento de Caballería Blindada N°1 "Granaderos", Quillota*. Along with that, determine the relationship between this fungi presence and the housing conditions, age and sex of the animals.

In order to achieve the objectives a total of 32 nasopharyngeal samples were taken through guarded swabs, where it was possible to find 49 fungal structures that belonged to 7 different genres, and only 28% of the sampling constituted *Aspergillus spp* with 9 positive samples. There were no significant differences in genre presence according to age, sex or housing conditions of the animals, so that we can understand that the *Aspergillus spp* existence in horses nasopharyngeal cavity it does not depend on animal's sex but there is a tendency (from 3 to 10 years old horses) to find the biggest quantity of positive sampling of this genre. According to housing, it is necessary to do radical changes to obtain a significant diminution of these organisms in horses environment and consequently in the airways.

Key words: Horses, Nasopharyngeal cavity, *Aspergillus spp*.

2. INTRODUCCIÓN

El caballo es considerado una especie de valor económico para su propietario, esto producto de las diversas actividades en las que pueden ser empleados; ya sea como animal de trabajo, recreación o deporte. Para un óptimo rendimiento físico deportivo, es necesario un adecuado estado clínico del caballo, que permita un funcionamiento sistémico correcto, lo que en la clínica diaria se reduce a dos grandes sistemas; el aparato músculo esquelético y el aparato respiratorio (primero y segundo en importancia respectivamente) (Ainsworth y Hackett, 2005).

Se producen graves pérdidas económicas cuando las enfermedades respiratorias se establecen en los programas de entrenamiento, limitando el rendimiento o bien dejándolos completamente descartados de cualquier tipo de competencia, por el daño pulmonar que éstas provocan.

Estas alteraciones se establecen cuando coexisten diversos factores que en situaciones específicas darán origen a la enfermedad, por lo tanto, es importante para el conocimiento clínico de un paciente considerar factores intrínsecos del animal; como la raza, edad y los problemas médicos previos. Pero es también de gran importancia el reconocimiento de factores extrínsecos, ajenos al animal pero que influyen directamente en él, que van a predisponer el establecimiento de algunas patologías respiratorias. Como por ejemplo el ambiente en el cual está inserto el caballo, si se encuentra estabulado o no y la cantidad de tiempo que se mantiene en esta condición, si convive con animales de otras especies, si se encuentra desparasitado y vacunado, la alimentación que recibe y los materiales empleados para la cama (ej. viruta, paja, aserrín), instalaciones, etc.

Es fundamental señalar que es en el ambiente donde se encuentra una gran cantidad de organismos ubicuos, que bajo ciertas condiciones pueden desarrollar enfermedades.

Para establecerse un organismo patógeno como agente causal de enfermedad, debe en primer lugar existir una interrupción de una asociación de beneficio mutuo entre los comensales. Los organismos comensales son aquellos que se benefician por vivir sobre o dentro del huésped sin crear peligro. Un patógeno es cualquier microorganismo productor de enfermedad; de esta manera, un microorganismo comensal tiene la posibilidad de ser patogénico (Long, 2005).

Los mecanismos de defensa de la mucosa forman una barrera protectora que preserva la vida, compuesta por barreras físicas, químicas y microbiológicas. La flora normal del tracto respiratorio contribuye en la protección contra los patógenos y, a su vez, aporta paradójicamente, una fuente para posibles invasiones oportunistas (Long, 2005). La mucosa del tracto respiratorio superior es a menudo el punto primario de entrada de los patógenos y por lo tanto juega un rol importante en la patogénesis de muchas infecciones respiratorias en el caballo (Vandekerckhove *et al.*, 2008).

Una de las infecciones de tracto respiratorio son las micosis, que no corresponden a las de mayor frecuencia dentro de la práctica clínica diaria, pero que sin embargo, una vez que se establecen producen importantes y graves enfermedades de tracto respiratorio tanto alto como bajo, dentro de ellas se pueden nombrar como ejemplo la micosis de las bolsas guturales, neumonías fúngicas, granulomas fúngicos en sinusitis, etc.

Las infecciones fúngicas pueden dividirse en aquellas producidas por patógenos primarios o por los oportunistas. El establecimiento de infecciones oportunistas se observa cuando se somete al animal a tratamientos antibióticos prolongados, la inmunosupresión y el compromiso de la función orgánica, en especial cuando están afectados los pulmones y el sistema endocrino (Long, 2005). Un grupo de organismos oportunistas que se desarrollan bajo estos parámetros son las especies encontradas en el género *Aspergillus* que pueden colonizar el tracto respiratorio causando un gran número de alteraciones pulmonares (St Leger y Screen, 2000).

Es importante establecer la condición de la microbiota potencialmente patógena, situación que es de fundamental importancia para que el veterinario clínico y el laboratorista establezcan un diagnóstico certero, de manera de establecer el pronóstico y tratamiento de las afecciones micóticas de las vías respiratorias de los equinos (Guida *et al.*, 2005).

Los hongos pertenecientes al género *Aspergillus* son especies cosmopolitas y oportunistas que forman parte del ambiente, estos hongos toman importancia ya que se encuentran comúnmente en las camas y pesebreras, como también en los fardos de heno, suplementos y aditivos alimenticios en polvo, etc. Sus esporas son transportadas a través del aire y con ello los caballos pueden obtenerlas a partir de la inspiración o deglución.

Un estado de infección, inmunosupresión, enfermedad previa e incluso un tratamiento inadecuado o excesivo puede alterar los mecanismos de defensa natural de los caballos, estableciendo una situación de vulnerabilidad en los huéspedes que puede llevar a una infección, establecimiento, crecimiento y diseminación de los hongos, con resultados que pueden potencialmente afectar la futura actividad del caballo.

Por esto, el objetivo de esta memoria es conocer con anterioridad si es posible encontrar hongos pertenecientes al género *Aspergillus* en la cavidad nasofaríngea, vía de entrada de agentes patógenos de la vías aéreas, mediante muestras obtenidas de caballos que tienen una actividad deportiva y con ello establecer una condición de posible vulnerabilidad si las condiciones permiten una infección oportunista de estos microorganismos.

3. REVISIÓN BILIOGRÁFICA

Los microorganismos pueden ser beneficiosos en muchos aspectos de la vida, cumpliendo roles que ayudan al medio ambiente o realizando funciones dentro de los organismos vivos, mientras que otros pueden ser dañinos y muy perjudiciales para la salud. La importancia radica en identificar organismos que son beneficios para el organismo, pero que bajo condiciones que están establecidas y algunas que se están investigando son patógenos de individuos y, con ello conocer sus formas de acción, las enfermedades en que son partícipes y los tratamientos que pueden recibir los pacientes que se vean afectados. Muchos hongos se comportan de esta manera, a pesar de no ser identificados como agentes primarios de enfermedad, actúan en forma conjunta a otros microorganismos agravando así la condición del paciente y extendiendo los tiempos de tratamiento, retardando la recuperación.

3.1. El aparato respiratorio superior en el equino

El caballo es un respirador nasal obligado, el aire que se necesita para el intercambio gaseoso en reposo y ejercicio debe ingresar exclusivamente por las vías aéreas superiores. Las vías aéreas superiores entregan una alta resistencia al flujo de aire y son un sitio común de lesiones limitantes de la capacidad de ejercicio (Derksen y Robinson, 2002).

3.1.1. Anatomía de las vías aéreas superiores

En términos generales la vía aérea superior del aparato respiratorio se origina en la nariz (incluyendo a todas sus estructuras), continúa en la faringe, hasta terminar distal a la laringe lugar en donde se inician las vías aéreas inferiores.

En la nariz se encuentran desde rostral a caudal las siguientes estructuras: la nariz externa, las dos cavidades nasales y los senos paranasales.

En la nariz externa se encuentran las narinas, estructuras grandes y espaciadas particularmente en los caballos fina sangre. Su forma está determinada por los cartílagos que sostienen la nariz externa, de especial interés en los caballos son los cartílagos que sostienen los bordes libres dorsal y lateral de la narina determinando la forma de la abertura (Dyce^b *et al.*, 1991). El cartílago alar es muy desarrollado permitiendo la forma de “coma” típica del ollar. Además, en los equinos la narina se divide en dos; una narina verdadera, correspondiente a la parte ventral que conduce a la cavidad nasal y una falsa narina ubicada en la parte dorsal que comunica hasta el divertículo nasal cubierto de piel que ocupa la escotadura nasoincisiva (Dyce^a *et al.*, 1991).

El tegumento penetra hasta cierta distancia en el vestíbulo, donde se une con la mucosa nasal en una línea visible, cerca de ella desembocan el conducto nasolagrimal, cuya abertura se distingue claramente en el piso vestibular a unos 5 cm de la entrada. En esta área también desembocan los conductos largos pertenecientes a las glándulas laterales serosas mucho más pequeños pero que ayudan a la humectación del aire.

Las dos cavidades nasales abarcan parte importante de la cara del animal, extendiéndose en dirección caudal hasta el tabique óseo transverso situado en el extremo rostral de la cavidad craneana (Dyce^a *et al.*, 1991). Externamente la cavidad nasal parece ser amplia, pero hay una serie de estructuras que disminuyen su dimensión interna como por ejemplo; los senos paranasales que se comunican con ella pero que no forman parte de ella, las raíces de los dientes molares superiores y los cornetes óseos (*conchae*), cubiertos por una mucosa muy delgada que sobresale al interior desde las paredes dorsal y lateral de la cavidad nasal (Dyce^b *et al.*, 1991). Además, la cavidad está cubierta por la mucosa que se fusiona al periostio teniendo un grosor local variable según la

ubicación, principalmente determinado por la vascularización de los plexos sanguíneos que a su vez, es dependiente de la actividad o del estado clínico del animal. Ambas cavidades nasales están divididas por el tabique nasal de naturaleza cartilaginosa y ósea sólo en su porción más caudal, compuesta por la lámina perpendicular del hueso etmoides. El piso de la cavidad nasal corresponde al paladar duro que se une al tabique, el cual divide la cavidad nasal y bucal.

Específicamente en el caballo, el tabique abarca toda la extensión del paladar duro, determinando que cada cavidad se comunique con la faringe por medio de una abertura aparte, coana (Dyce^a *et al.*, 1991). Los cornetes tienen una disposición compleja y muy variable, comprenden un sistema caudal de cornetes etmoidales con disposición lateral también llamados laberinto del hueso etmoides; y un sistema rostral (nasal) donde predominan los grandes cornetes dorsal y ventral, correspondientes a frágiles láminas que giran sobre sí mismo y en direcciones opuestas desde sus inserciones laterales, junto a un cornete intermedio más pequeño. Entre los cornetes separados por estrechas hendiduras, se observan los meatos, en una disposición similar a la letra “E” (corte transversal) estableciendo 3 meatos; dorsal, medio y ventral que se ramifican a partir de un meato común contra el tabique. El meato dorsal se comunica directamente con el fondo de la cavidad nasal llevando el aire hacia la mucosa olfatoria, el meato medio a los senos, mientras que el meato ventral es la vía que conduce a la faringe, de esta manera el espacio que se genera entre el meato común y ventral es el más ancho, los cuales abastecen el pasaje respiratorio principal y tienen gran importancia clínica.

Los senos paranasales se dividen en senos frontal, maxilar (caudal y rostral), conchal dorsal y ventral, esfenopalatino y etmoidal (Tremaine y Dixon, 2002). El seno frontal se encuentra en la parte dorsal del cráneo medial a la órbita, el área rostrolateral se presenta la abertura frontomaxilar comunicación con el seno maxilar caudal. Los dos senos maxilares se comunican a partir de la abertura

nasomaxilar con el meato medio de la cavidad nasal, están divididos totalmente por un tabique oblicuo ubicado en la mayoría de los casos a 5 cm detrás del extremo rostral de la cresta facial. La parte ventral de cada seno se divide a partir de una lámina longitudinal vertical en dos espacios uno medial y otro lateral. La parte medial del seno caudal se continúa con el seno esfenopalatino; mientras que la parte rostral del seno se extiende dentro del cornete ventral (Dyce^b *et al.*, 1991).

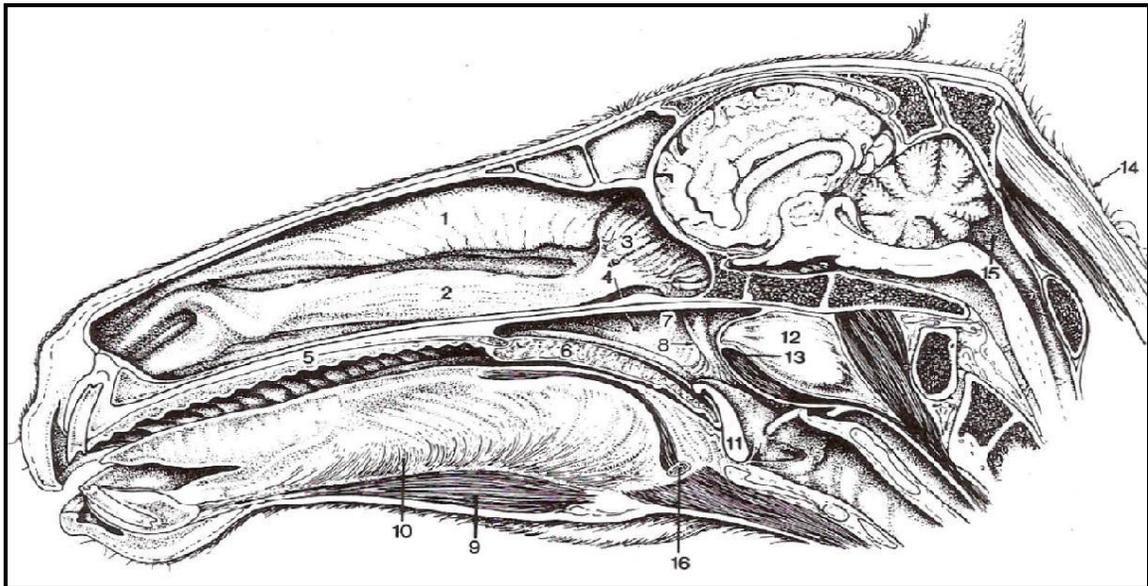
Las bolsas guturales del caballo son dos divertículos del tubo de Eustaquio, cada bolsa contiene una capacidad de 300 a 500 ml, están divididas ventral y caudalmente por el hueso estilohioideo, obteniendo dos compartimentos uno lateral y uno medial más grande. Las bolsas se ponen en contacto mediante una membrana delgada en la parte rostral, y a través de los músculos *longus capitis*, *rectus capitis ventralis* en la parte ventral (Lepage, 2007). Están cubiertas por epitelio ciliado, glándulas mucosas y seromucosas y estructuras linfoides. Existe una importancia anatómica entre las bolsas guturales y estructuras anexas como el linfonódulo retrofaríngeo, elementos nerviosos y vasculares. La pared lateral del compartimento lateral tiene contacto con las arterias maxilar y carótida externa, la parte caudal del compartimento medial está en contacto cercano con la arteria carótida interna y, además con estructuras nerviosas como el ganglio cervical craneal, tronco simpático cervical, nervio vago (X), n. accesorio (XI), el ramo faríngeo del n. glossofaríngeo (IX) y el nervio hipogloso (XII). En el piso del compartimento medial se encuentra el ramo faríngeo de los nervios vago y laríngeo craneal; en el área caudo-dorsal del compartimento lateral está el nervio facial (Lepage, 2007).

La faringe está ubicada completamente debajo del cráneo ocupando topográficamente el tercio rostral del techo, el resto del cráneo lo abarcan las bolsas guturales. El espacio interno de la faringe está dividido en un compartimento superior e inferior a partir del paladar blando y de los arcos palatofaríngeos, extendidos por las paredes laterales hasta unirse sobre la

entrada del esófago. Por lo tanto, se pueden establecer 3 estructuras faríngeas; nasofaringe, orofaringe y laringofaringe. El compartimento superior de la faringe es la nasofaringe donde se encuentran los colgajos que resguardan la entrada a las bolsas guturales, cada lengüeta mide unos 3 cm ubicándose contra la pared de la faringe y presenta un borde libre ventral, oblicuo y algo sinuoso endurecido por una expansión del cartílago medial que sostiene a la trompa auditiva, la comunicación hacia la bolsa gutural normalmente se encuentra cerrada pudiendo ser levantados (los velos) en forma pasiva o cuando el animal deglute produciéndose un movimiento medial de las lengüetas para encontrarse con la parte caudal del paladar blando, de este modo, se pueden igualar las presiones de ambos lados de la membrana timpánica. El compartimento inferior de la faringe se divide en orofaringe y laringofaringe, la orofaringe es estrecha y se extiende entre los arcos palatoglosos de la lengua y la epiglotis, sus paredes laterales y el piso están cubiertos de abundante tejido amigdalino difuso, incluyendo a la amígdala palatina. Por otro lado, la laringofaringe está ocupada por la saliente de la laringe, su espacio interno se estrecha abruptamente dando el paso al esófago (Dyce^b *et al.*, 1991).

Finalmente, las vías aéreas superiores terminan en la laringe (Derksen y Robinson, 2002) lugar donde se conecta la faringe y el aparato traqueobronquial, se encuentra bajo la faringe detrás de la boca suspendido desde la base del cráneo por el aparato hioideo.

Figura N°1. Corte mediano de la cabeza equina



1, cornete nasal dorsal; 2, cornete nasal ventral; 3, cornetes etmoidales; 4, coana derecha (*flecha*); 5, paladar duro con rugosidades (*rugae*) prominentes; 6, paladar blando; 7, nasofaringe; 8, abertura faríngea de la trompa auditiva; 9, geniohioideo; 10, geniogloso; 11, epiglotis; 12, pared medial de la bolsa gutural; 13, músculos faríngeos; 14, sitio para punzar la cisterna cerebelobulbar; 15, cisterna cerebelobulbar; 16, basihioides (Dyce^b *et al.*, 1991).

3.1.2. Microbiota normal respiratoria

La mucosa respiratoria, al igual que toda la superficie mucosa y cutánea encontrada en un organismo vivo, proporciona un mecanismo de defensa físico, químico y microbiológico, que en conjunto mantienen la integridad del individuo permitiendo un adecuado estado de salud.

Del punto de vista microbiológico, existe un equilibrio entre la mucosa como barrera protectora y los organismos vivos que se encuentran en esta, desarrollándose una relación de comensales entre los organismos que habitan como flora normal y el individuo. La dificultad se produce en la mayoría de los

casos, cuando se quiebra esta relación de comensales, dado por una serie de acontecimientos como por ejemplo el daño físico de la mucosa, enfermedades inmunodepresivas congénitas o adquiridas e incluso el uso desmedido de un tratamiento farmacológico; de esta manera, un organismo que era comensal y por ende beneficioso en estado de salud, bajo esta nueva realidad es oportunista pasando a ser patogénico que dará origen a una enfermedad.

De todas formas, existe una flora normal en las mucosas (Hoquet *et al.*, 1985) y superficies cutáneas, que ha llegado a establecerse a través de la colonización. La colonización cutánea, gastrointestinal, respiratoria y urogenital se produce en las primeras etapas de la vida y persiste a menos que sea interrumpida (Long, 2005).

Específicamente la flora de la mucosa oral y faríngea, está asociada con la salud y la enfermedad del aparato respiratorio superior e inferior (Long, 2005), se encuentran pobladas con bacterias que incluyen aerobios y anaerobios obligados y anaerobios facultativos. Dentro de los anaerobios y aerobios facultativos se encuentran *Streptococcus equi*, *Streptococcus spp*, *Pasteurella spp*, *Escherichia coli*, *Actinomyces spp* (Long, 2005). También es posible encontrar *Fusobacterium spp*, *Eubacterium spp*, *Clostridium spp*, *Veillonella spp* y *Megasphaera spp*; géneros que se encuentran en caballos con infecciones respiratorias bajas, indicando que la flora faríngea es una fuente común de contaminación resultando un 30% de los aspirados transtraqueales positivos en caballos y potrillos sanos (Long, 2005).

Al igual que la piel del equino en la mucosa oral, nasal y conjuntival se encuentran múltiples especies fúngicas que las habitan como por ejemplo; *Alternaria*, *Aspergillus*, *Candida*, *Fusarium*, *Rhizopus* entre otros. Además, se ha logrado establecer que la mayor permanencia de los animales estabulados aumenta la frecuencia de los hongos oculares en los caballos normales (Long, 2005).

3.2. Los hongos como agentes infecciosos

La mayoría de los hongos patógenos son exógenos. Como agentes infecciosos afectan plantas causando fuertes impactos económicos en las cosechas, a los animales y al hombre, pero es reconocida que su acción como agente patógeno no es tan significativa como la tienen virus o bacterias y, sólo unos pocos cientos de especies fúngicas participan en enfermedades humanas y animales.

El ingreso de los hongos al huésped depende de una serie de factores de mayor complejidad que los descritos en las bacterias, esto producto que sus factores de virulencia tienden a ser más complejos que otros microorganismos vivos debido al mayor grado de oportunismo, que está mediado por el huésped. Por lo tanto, se deben generar cambios en el mismo hongo y en el huésped para que adquiera virulencia y produzca una enfermedad.

Para la infección y colonización de un huésped es fundamental que todo microorganismo tenga la capacidad de adherirse, los componentes de superficie de la pared celular median la adherencia de los hongos a la célula huésped (Brooks *et al.*, 2004), característica que se ha estudiado logrando descubrir adhesinas en *Candida albicans* y *Blastomyces dermatitidis*, en el caso puntual de *C. albicans* estas estructuras responden a la codificación de dos genes de adherencia, el primero es una glicoproteína donde su transformación en otras especies fúngicas no adherentes da lugar a la adherencia de levaduras (Long, 2005).

Durante la infección, las paredes fúngicas muestran importantes propiedades patobiológicas. Muchos hongos tienen cápsulas de polisacáridos que ayudan a resistir la fagocitosis y activan la respuesta inmune (Long, 2005) gatillando la cascada del complemento provocando una reacción inflamatoria. Las paredes celulares liberan antígenos inmunodominantes que pueden inducir respuesta inmunitaria celular y anticuerpos diagnósticos (Brooks *et al.*, 2004). *Cryptococcus*

neoformans inhibe la acción de los macrófagos, secreción de citoquinas y la fagocitosis mediante este mecanismo, esto queda establecido con mayor claridad cuando se ven especies que no poseen esta cápsula quedando totalmente vulnerables, avirulentos e inefectivos.

Por otro lado hay factores virulentos que permiten la supervivencia de los hongos al interior de los macrófagos una vez que han sido fagocitados o cuando se establecen condiciones de vida intracelular. Otros factores de virulencia fúngica son: la capacidad de adaptación al ambiente en el que se encuentra el huésped, demostrándose el dimorfismo fúngico, donde el hongo adopta estados morfológicos distintos y la transformación fenotípica de algunas especies como *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Histoplasma capsulatum*. La señal para el dimorfismo fúngico, suele ser la temperatura. Muchas especies de hongos germinan dentro del huésped con un aumento de la temperatura, permitiendo la diseminación dentro de éste (Long, 2005), dos proteínas permiten la capacidad de los hongos de crecer y mantenerse a temperaturas corporales (37°C), una de ellas es la calcineurina en *C. neoformans* y la ciclofilina B (proteína dependiente de calcio) que media también el golpe de calor en *Aspergillus spp.* Dentro de los nutrientes requeridos que afectan la virulencia está la melanina, el hierro y calcio, los hongos tienen mecanismos complejos y específicos que establecen una condición de adaptación cuando existen ambientes bajos en hierro, calcio u oxidación en el caso de la melanina.

Un huésped está sujeto a la exposición fúngica ya sea de patógenos o saprófitos diariamente, para el ingreso con posterior contaminación e infección el mecanismo es similar a cualquier patógeno, que puede ser en forma respiratoria (importante vía en algunas especies sobretodo en los caballos), penetración cutánea o lesiones intestinales; cualquiera sea la vía el mecanismo es similar perdiendo las barreras físicas de defensa. Entonces para que una infección se disemine, debe existir una lesión tisular previa, que haya una penetración mecánica profunda o una invasión de tejidos nuevos. Para atravesar las barreras

estructurales, los hongos poseen una batería de enzimas que incluyen proteinasas, fosfatasas y ADNasas las que son secretadas permitiendo la degradación de los tejidos, normalmente invaden los vasos sanguíneos estableciéndose en la capa íntima de ellos. En el caso de *Aspergillus fumigatus* se genera la producción de dos proteinasas que rompen la elastina, componente principal del tejido pulmonar (Long, 2005). Los hongos tienen capacidad de producir apoptosis por efecto de sus toxinas o por reordenamiento del citoesqueleto en las células que invaden. *A. fumigatus* tiene una gliotoxina que fragmenta el ADN y produce apoptosis de los macrófagos, como también actividades inmunosupresoras de los neutrófilos.

Las infecciones oportunistas más frecuentes incluyen a *Candida albicans*, *Aspergillus spp*, *Cryptococcus neoformans*, *Mucor spp* y *Pneumocystis carinii* (Long, 2005).

3.3. Características generales de los hongos

Los hongos son organismos vivos, eucariotas, aerobios obligados o facultativos en su mayoría, que poseen pared celular y esporas de diversos tipos (que los diferencian entre especies). Normalmente se encuentran en el medio ambiente acuático (sobre todo en agua dulce) como terrestre. Son quimiotrópicos, es decir, obtienen la energía vital a partir de la respiración o de la fermentación del material orgánico soluble presentes en estos ambientes (Stanier *et al.*, 1996).

Todos los hongos poseen una pared celular rígida que determina su forma, compuesta en un 80 a 90% de polisacáridos; mientras que los lípidos, polifosfatos e iones inorgánicos forman una matriz cementante (Madigan *et al.*, 2004). Los tres polisacáridos principales son: manosa, glucanos y quitina. Se ha estudiado el rol de estas estructuras en los factores de virulencia fúngica,

determinando que la quitina de algunas especies fúngicas tiene virulencia desigual según la especie del huésped que esté afectando.

Los hongos crecen de dos formas básicas: levaduras o mohos (Brooks *et al.*, 2004), esta categoría se basa a partir de la observación microscópica en el tejido o en el medio de cultivo, la levadura comprende una estructura de crecimiento incipiente unicelular, además macroscópicamente en medios de cultivo rutinarios el crecimiento en levadura tiene una apariencia similar al de las colonias bacterianas, mientras que el crecimiento en forma de moho produce colonias filamentosas que en su conjunto se denominan *micelio*, estructura vegetativa rígida que corresponde a una serie de tubos ramificados y entrelazados, *hifas*, de diámetro medianamente uniforme que contienen citoplasma y múltiples núcleos, denominado organismo *cenocítico*. El microorganismo entero surge de la germinación y posterior crecimiento de una sola célula reproductora o espora (Stanier *et al.*, 1996), por este motivo su tamaño es variable y puede abarcar desde pocos milímetros hasta varios metros. Las hifas que penetran al medio de apoyo son las hifas de apoyo o vegetativas, que absorben los nutrientes correspondientes a sustancias orgánicas o inorgánicas disueltas mediante la secreción de enzimas digestivas sobre la fuente alimenticia (Curtis y Barnes, 2000), mientras que las que se extienden por encima, en la superficie del micelio y que contienen las estructuras reproductivas del moho, son llamadas hifas aéreas. En la naturaleza, sin embargo, el micelio vegetativo de los hongos raramente se ve porque suele estar incorporado en el suelo o en otros substratos opacos (Stanier *et al.*, 1996).

La mayoría de los hongos se reproducen tanto sexual como asexualmente (Curtis y Barnes, 2000). En este último tipo de reproducción participan las esporas o *conidios*, que se forman en el extremo de las hifas en crecimiento que pueden ser uninucleadas o multinucleadas, a menudo muy pigmentadas, resistentes a la desecación, sirviendo como forma de dispersión de hongo a nuevos hábitat e incrementando su supervivencia, las cuales germinan cuando

las condiciones de crecimiento son favorables. En la reproducción asexual las esporas son de progenie mitótica (mitosporas), genéticamente idénticas, siendo las de interés médico los conidios. Otra forma de reproducción asexual es mediante la fragmentación de las hifas, por la que cada fragmento da origen a un nuevo individuo.

3.4. El género *Aspergillus spp*

En este género se encuentran hongos de interés médico tanto animal como humano, su mecanismo de acción patógena es reconocido en tres niveles: la infección como agente oportunista, desencadenando alergias y produciendo micotoxicosis.

Dentro del género *Aspergillus* se encuentran aproximadamente 900 especies (Hirsh *et al.*, 2004), saprófitos ubicuos de la naturaleza presentes en un gran número de sustratos encontrados fácilmente en el suelo, la vegetación, los alimentos y, en forma secundaria en el aire, el agua y los objetos expuestos a éstos.

Son organismos termófilos, capaces de crecer a temperaturas superiores a 50°C (Ausina *et al.*, 2004), algunas especies son incluso altamente resistentes a la desecación y al calor.

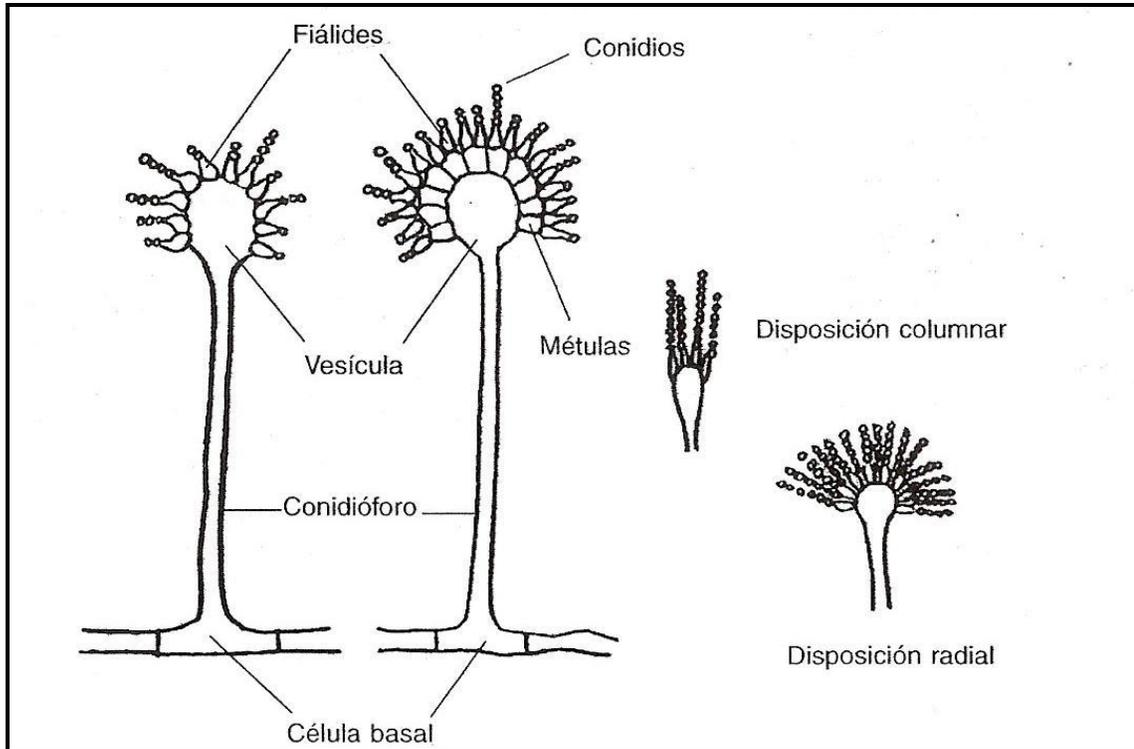
En cultivos de laboratorio estos hongos crecen en una fase asexual o anamórfica muy característica. Lo que permite su identificación, al menos en cuanto al género (Ausina *et al.*, 2004). Al pertenecer y crecer normalmente en el ambiente, aunque existen notables diferencias cuantitativas y cualitativas dependiendo del clima, la región y la época del año (Ausina *et al.*, 2004), son hongos que no poseen necesidades nutricionales específicas, es por ello que se cultivan fácilmente en agar Sabouraud o agar extracto de malta (Vadillo *et al.*, 2002).

El crecimiento de sus colonias es rápido y de apariencia aterciopelada, al madurar adquieren colores blanquecinos, amarillos, verdes, azul, café o negro según la especie.

Su estructura microscópica similar a la estructura general de los mohos, está constituida por un micelio septado e hialino que forma conidióforos no ramificados erectos con un ensanchamiento apical llamado vesícula y sobre ella se establecen la fiálides (células conidiógenas), que forman un solo verticilio en *Aspergillus* monoseriados, o bien se desarrollan dos tipos de células sobre la vesícula; las métulas (primer verticilo o profiálides) y sobre ellas las fiálides, en los *Aspergillus* biseriados (Vadillo *et al.*, 2002).

De la conidiogénesis se producen conidios (esporas) los cuales son lisos o rugosos y se pueden disponer en columnas (*Aspergillus* columnares) o divergentes (*Aspergillus* radiales). Las especies se identifican según sus diferencias morfológicas en estas estructuras, las cuales incluyen tamaño, forma, textura y color del conidio.

Figura N°2. Estructura general de los hongos pertenecientes al género *Aspergillus spp*



(Ausina *et al.*, 2004).

En los tejidos, sólo las hifas se pueden observar en cambio; en las cavidades aéreas ej. nasal, sacos aéreos (en el caso de las aves) y lesiones cavitarias, los conidios son vistos con frecuencia.

Las especies de *Aspergillus* reconocidas son principalmente: *Aspergillus fumigatus*, especie más importante de todas, también principal agente patógeno del hombre y animales. Se encuentra predominante sobre otros organismos fúngicos presentes en la materia orgánica vegetal fermentada como por ejemplo heno, ensilaje y compost. Otras especies conocidas de este género son *A. flavus*, *A. niger*, *A. nidulans*, *A. ochraceus*, *A. versicolor* y *A. terreus*.

Además de encontrarse con facilidad en la naturaleza, se ha indicado que forma parte de la microbiota normal de la piel y de la cavidad nasal de muchos animales domésticos incluidos los equinos, pero estudios realizados por Guida *et al.* (2005) determinaron una capacidad de los caballos de ser “portadores” de *Aspergillus fumigatus* en la cavidad nasofaríngea obteniendo un 11,5% de aislamiento positivo en caballos, existiendo diferencias significativas de acuerdo al tipo de estabulación y del sexo de éstos.

3.5. Clasificación taxonómica para *Aspergillus spp*

La clasificación de los hongos se basa en el mecanismo de reproducción sexual y de las esporas que resultan de éste (Brooks *et al.*, 2004), además de su morfología y patrones moleculares (secuencias de ADN) (Curtis y Barnes, 2000).

Los miembros del reino Fungi (hongos) se clasifican en cuatro grupos principales o phyla: *Chytridiomycota* (quitridiomicetos), *Zygomycota* (zigomicetos) y dos grupos superiores, los *Ascomycota* (ascomicetos) y *Basidiomycota* (basidiomicetos) (Curtis y Barnes, 2000). Existe también un grupo conocido como *Fungi Imperfecti* o *Deuteromycota* (Curtis y Barnes, 2000; Brooks *et al.*, 2004), para incluir en él a todas aquellas especies que se desconoce o no se observa estado sexual reproductivo o teleomorfa (Brooks *et al.*, 2004), por lo tanto es una clasificación temporal que pueden reagruparse una vez descubierta su reproducción sexual, este criterio no responde a una relación filogenética (Curtis y Barnes, 2000). En este grupo se encuentran los integrantes del género *Aspergillus*.

La clasificación taxonómica del género no está del todo establecida, generando discrepancias entre los taxonomistas, de esta manera se ha optado por la siguiente clasificación (según Ainsworth 1973): reino *Fungi*, división *Eumycota*, subdivisión *Deuteromycetes*, (*Hyphomycetes*), orden *Moniliales*

(*Hyphomycetales*), familia *Monilaceae* (Raper y Fennel, 1965; Piontelli y Toro, 1989; Herrera y Ulloa, 1990).

3.6. Aspergilosis

Término dado a enfermedades causadas por algunas especies de *Aspergillus*. En condiciones normales los individuos sanos poseen una resistencia natural a las esporas de *Aspergillus*, jugando un papel decisivo los macrófagos alveolares (Ausina *et al.*, 2004). Por lo tanto el desarrollo de una aspergilosis se condiciona a una serie de factores tales como: ingestión de alimentos contaminados por sustancias tóxicas (micotoxinas), procesos de hipersensibilidad, colonización invasiva o no invasiva de cavidades naturales o patológicas, invasión de tejidos y menos frecuente, la inoculación cutánea traumática de esporas o inyección iatrogénica de productos contaminados (Ausina *et al.*, 2004).

En Medicina humana se clasifican de acuerdo al nivel de acción del hongo patógeno, estableciendo los tipos de micosis en: superficial, cutánea, subcutánea, endémica (primaria y sistémica) y por último la oportunista en donde se ubican las aspergilosis. En Medicina Veterinaria, estas micosis son conocidas como sistémicas o profundas (Hirsh *et al.*, 2004).

Las micosis sistémicas en animales comparten ciertas características, la infección se produce comúnmente mediante la inhalación de las esporas del hongo, los huéspedes son el determinante decisivo para el desarrollo de la enfermedad, en el caso particular de las aspergilosis los pacientes deben estar inmunocomprometidos, las lesiones tienden a ser piogranulomatosas, ya que luego de la infección primaria el curso de la enfermedad está determinado por la efectividad de la respuesta inmune celular, si es inadecuada se podría diseminar a los huesos, la piel, el sistema nervioso central o los órganos abdominales. Se

ha establecido que las micosis sistémicas no son contagiosas, ya que una infección por contacto no ha sido demostrada, aunque puede ser transmitida.

Las aspergilosis son adquiridas desde fuentes ambientales, generalmente mediante la ingestión (Radostits^a *et al.*, 2002; Tell, 2005) y la inhalación. Es una enfermedad esporádica, generando síndromes inespecíficos debido a la variabilidad de órganos en que se localizan los microorganismos (Radostits^a *et al.*, 2002).

En los equinos, la aspergilosis corneal es la mayor causa de keratomicosis y al invadir el aparato respiratorio superior puede desencadenar micosis de las bolsas guturales.

Estos hongos son participantes de distintas enfermedades, dentro de ellas las que afectan el aparato respiratorio, diversas especies de mamíferos y aves se ven afectadas, los caballos pueden ser susceptibles especialmente en la región de la cabeza (Tell, 2005).

Las dos especies de *Aspergillus* que afectan con mayor frecuencia a los equinos son *A. fumigatus* y *A. nidulans*.

3.7. Enfermedades fúngicas de las vías aéreas

Las enfermedades fúngicas que afectan a las vías aéreas son de rara presentación en los caballos pero una vez que se logran establecer son muy significativas en todo ámbito. Las infecciones provocadas por hongos, sea esta de cualquier tipo, pero que afecte a las vías aéreas son prácticamente desconocidas en poblaciones de equinos salvajes, por esto es que pueden ser derechamente denominadas como enfermedades presentes en animales domésticos.

Las esporas fúngicas son casi un contaminante inevitable de las vías aéreas en los equinos, producto de las prácticas de manejo modernas que usan forrajes almacenados como fuente mayor de nutrición, cuando el pastoreo es escaso o cuando los caballos deben estar necesariamente estabulados. El polvo en el ambiente ejerce una fuerte influencia en la salud del tracto respiratorio tanto humano como animal, compuestos del polvo ambiental son las esporas de hongos que pueden estar fácilmente suspendidas en el aire, actuando como biocontaminantes especialmente en aéreas densamente pobladas de animales y en lugares cerrados o con ventilación deficiente, lo que genera consecuentemente un daño respiratorio prolongado (Nardoni *et al.*, 2004).

Se ha identificado que las infecciones fúngicas afectan con mayor frecuencia en las siguientes estructuras:

- Cavidad nasal.
- Senos paranasales.
- Bolsas guturales.
- Pulmones.

Las infecciones fúngicas dentro de la cavidad nasal, senos paranasales y bolsas guturales tienen particular importancia por sus efectos secundarios que surgen de la destrucción tisular que se produce (Knottenbelt, 2002), las lesiones granulomatosas o placas fúngicas pueden alcanzar el tamaño suficiente para causar la obstrucción parcial, incluso hay ciertas micosis que son agresivas y pudiendo comprometer los senos paranasales o producir desfiguración facial (Derksen, 1998), se evidencia clínicamente mediante la descarga nasal purulenta ligera y epistaxis intermitente.

La gran mayoría de esas infecciones son producto de la acción de *Aspergillus spp* (Knottenbelt, 2002) agentes que van a limitar o comprometer la vida de un paciente, su uso y rendimiento futuro. Otros hongos oportunistas como *Mucor*

spp y *Candida spp* también pueden originarlas pero en raras ocasiones sucede (Knottenbelt, 2002).

Las infecciones provocadas por *Aspergillus spp* en las vías aéreas se dividen en tres categorías básicas:

- Lesiones de destrucción de la cavidad nasal, senos paranasales y bolsas guturales.
- Lesiones proliferativas de la cavidad nasal, senos paranasales y bolsas guturales.
- Neumonía y alveolitis fibrosa.

Las enfermedades fúngicas en el tracto respiratorio se presentan con mayor frecuencia en caballos estabulados inmunocomprometidos o bien los animales que presentan patologías pulmonares primarias (virales o bacterianas) y, sólo unos pocos casos se pueden desarrollar por tratamientos antibióticos prolongados en donde se presume que los organismos simbióticos o comensales son destruidos dejando el libre desarrollo de las infecciones fúngicas.

Por esto, las infecciones fúngicas se establecen en destrucción o necrosis tisular, incluso los abscesos pulmonares pueden ser una fuente primaria. La patogénesis de las micosis de cavidad nasal, senos paranasales y bolsa gatural es aún desconocida (Knottenbelt, 2002) la distribución de las lesiones dentro de la cavidad nasal sugieren que las lesiones se desarrollan espontáneamente, en cambio, en la bolsa gatural las lesiones ocurren con mayor frecuencia sobre la región dorsal del área expuesta de la arteria carótida interna, o bien en la arteria maxilar de la pared lateral, incluso en algunos casos todo el área superior de la bolsa puede ser severamente afectada, destruyendo la mucosa y estableciendo hemorragias severas. Las lesiones de la mucosa en el área superior de la bolsa gatural pueden causar también destrucción de los nervios.

3.7.1. Infección fúngica de la cavidad nasal y senos paranasales

La rinitis micótica es relativamente común en caballos estabulados de Estados Unidos y Europa. *Aspergillus spp* como agente etiológico se presenta con lesiones altamente destructivas y raramente proliferativas (Knottenbelt, 2002), que son granulomas nasales o placas fúngicas en los pasajes nasales de los caballos (Derksen, 1998). Además de la inflamación local hay también en otras partes del aparato respiratorio. Si bien los estados tempranos de la infección son asintomáticos, con la progresión se acompaña de signos clínicos como: estertores en inspiración, sibilancias, estornudos y secreción mucopurulenta con epistaxis intermitente, incluso si se establece una secreción nasal unilateral purulenta crónica que dura varias semanas o meses, puede indicar en los caballos la presencia de granulomas nasales asociados a infecciones micóticas (Radostits^b *et al.*, 2002). En la inspección se puede identificar un estrechamiento de los ollares acompañado de un engrosamiento del tabique nasal, los cornetes nasales presentan cambios evidentes con endurecimiento y aspecto edematoso, los meatos ventrales se pueden observar reducidos bilateralmente en tamaño.

Mediante el uso de endoscopio es posible observar múltiples granulomas en la cavidad nasal, que se extienden al paladar blando y al seno maxilar (Radostits^b *et al.*, 2002). El diagnóstico definitivo se alcanza con el examen microscópico de los exudados o las biopsias de las lesiones (Derksen, 1998).

3.7.2. Micosis de las bolsas guturales

La infección micótica de las bolsas guturales es posiblemente la más común y ciertamente la infección fúngica más dramática del tracto respiratorio equino (Knottenbelt, 2002) se asienta principalmente en la pared dorsal del compartimento medial de la bolsa y en segundo lugar en la pared lateral del compartimento lateral del saco (Millán, 2001; Ainsworth y Hackett, 2005; Lepage,

2007), cuando el daño se produce en el techo de la bolsa, las lesiones abarcan la arteria carótida interna provocando una hemorragia letal y ocasionalmente la arteria maxilar, o al tronco común de los nervios craneales IX, X y XII; resultando en una disfunción neurológica laríngea (disfagia por hemiplejia) y faríngea (parálisis). Otra estructura afectada es el tronco simpático post ganglionar desarrollando Síndrome de Horner. Mientras más profunda es la penetración del hongo en la mucosa y, con ello el daño tisular, se pueden ver afectados otros nervios como el XII desarrollando parálisis facial o el V perdiendo la sensibilidad cutánea.

Los hongos más aislados son los del género *Aspergillus*, especialmente *A. nidulans* (Derksen, 1998) y *A. fumigatus*. Existen además otros géneros participantes pero son de menor relevancia.

La enfermedad se establece sin discriminar edad, sexo o actividad, teniendo una tasa de mortalidad de un 33% (Radostits^b *et al.*, 2002). Se ha postulado sin certeza absoluta que la causa de esta enfermedad sería el ingreso de las esporas del hongo a través de la abertura faríngea, donde germinan y se establece la lesión fúngica en las zonas identificadas anteriormente, el origen de esa localización es desconocido. Se han propuesto factores predisponentes como traumas de tejidos blandos y condiciones ambientales que llevarían a la germinación de los conidios como por ejemplo; una ventilación deficiente, alta humedad y temperatura. El mecanismo de entrada del agente estaría establecido por vía oro y nasofaríngea durante la espiración y la deglución (Tell, 2005).

Es una enfermedad normalmente unilateral, sólo en el 8% de los casos es bilateral, los principales signos son una epistaxis no inducida por el ejercicio, la cual puede ser profusa o intermitente grave, que puede llevar a la muerte por shock hipovolémico producto de las estructuras involucradas en la bolsa gutural. Otros signos clínicos evidentes son el dolor a la palpación de la región parotidea y la posición anormal de la cabeza.

3.7.3. Neumonía fúngica

La neumonía fúngica en el caballo como entidad primaria es poco frecuente, pero sí se desarrolla en conjunto con inmunodeprimidos, neutropénicos, con enteritis/colitis o en neumonías bacterianas (Ainsworth y Hackett, 2005), que se caracteriza por la invasión de las hifas a nivel de los vasos sanguíneos provocando trombosis, necrosis e infartos hemorrágicos (Ainsworth y Hackett, 2005).

El principal agente causal es el *Aspergillus fumigatus* que se ha visto involucrado en muchas especies de animales dentro de ellas el caballo. Su participación como agente patógeno primario en las enfermedades respiratorias, particularmente en las neumonías fúngicas es limitada y muy poco frecuente, desconociéndose en profundidad los mecanismos por los cuales se establecen dichas infecciones. Por lo general la enfermedad se desarrolla bajo condiciones que favorecen el establecimiento tales como; la exposición a un gran número de partículas fúngicas ambientales, la estabulación en ambientes húmedos, prolongados tratamientos antimicrobianos que desequilibran la microflora o que interfieren en la síntesis de vitaminas y la existencia de un estado inmunosupresor primario o secundario.

Se sospecha que la inhalación de esporas es un hecho común pero que sólo en condiciones no muy establecidas, en este tipo de infecciones son más probables las complicaciones generalizadas y agudas de la enfermedad, que pueden derivar en infecciones sistémicas con múltiples signos clínicos desencadenado la muerte del animal, los casos de infecciones micóticas duales (participación de dos agentes concomitantes) son muy raras, pero probables (Thirion-Delalande *et al.*, 2005). Otro asentamiento que sugiere presencia de aspergilosis sistémica es en la mucosa intestinal, particularmente la colónica (Buechner-Maxwell *et al.*, 1994).

Es probable que los únicos signos que se adviertan, que son vagos y generales para cualquier infección sean la depresión y letargo. La auscultación puede revelar ciertas áreas de consolidación, la tos no es un signo prominente, y algunas veces hay presencia de hemoptisis, sin embargo; en la mayoría de los casos hay evidentes signos de enfermedad pulmonar como por ejemplo, la elevada frecuencia respiratoria en reposo, estertores a la auscultación y una muy baja tolerancia al ejercicio.

3.7.4. Obstrucción recurrente de las vías aéreas (ORVA)

Es una enfermedad inflamatoria obstructiva de las vías aéreas caracterizada por periodos reversibles de obstrucción, que se convierte clínicamente evidente en caballos de mediana a avanzada edad (Robinson, 2002), con una media de presentación de 12 años (Ainsworth y Hackett, 2005), sin predilección de raza, pero si con una connotación “familiar” ya que se ha demostrado que de una madre y un semental que la presenten, la cría tiene alto riesgo de desarrollarla. De alta prevalencia en el hemisferio norte donde los caballos son estabulados por periodos prolongados, en ambientes calurosos y húmedos expuestos a materia orgánica en descomposición, al polvo ambiental y alimentados con heno. De esta manera es una enfermedad prácticamente inexistente en caballos que no se encuentran estabulados (Pascoe y Asbury, 2003).

Se inicia por la inhalación de polvo orgánico, donde la mayor fuente es el heno y la cama (Robinson, 2002). El polvo orgánico posee una gran variedad de componentes, presentando más de 50 especies de hongos, un gran número de ácaros del forraje, endotoxinas y componentes inorgánicos (Ainsworth y Hackett, 2005), siendo los dos hongos implicados con mayor frecuencia *Aspergillus fumigatus* y *Micropolyspora faeni* (actinomiceto termofílico) (Art et al., 2002).

Estos en conjunto inician la inflamación pulmonar principalmente alérgenos específicos, endotoxinas, componentes de hongos como beta-glucanos y partículas pequeñas, producto de esto en lavados bronqueoalveolares se encuentran elevados niveles de IgE además de la visualización de citoquinas que indicarían una respuesta inmune de tipo alérgica. Por otro lado, es posible inducir la enfermedad en animales a partir de la administración de esporas de hongos en caballos susceptibles, obteniendo los signos clínicos típicos de ORVA. Las pequeñas partículas y fibras se disponen sobre la superficie mucosa del epitelio desencadenando la liberación de citoquinas proinflamatorias como IL-8 (Robinson, 2002), pero el conjunto de componentes inmunoalérgicos que componen el polvo lo desarrollaría, provocando una hipersensibilidad de tipo I (IgE) o de tipo III (IgE, IgG) (Zaror *et al.*, 1999).

Cuando un caballo con historia clínica de ORVA es estabulado y alimentado con heno, se desencadena la inflamación de las vías aéreas a partir de la liberación de IL-8 y, la acción conjunta de el leucotrieno B4 y ICAM-1 (Robinson, 2002), en este punto una serie de eventos se suceden iniciándose con la invasión de neutrófilos en el lumen de las vías aéreas dentro de seis a ocho horas, posteriormente se produce el broncoespasmo (Ainsworth y Hackett, 2005) con acumulación de mucus por una mayor producción y cambios inflamatorios en la pared epitelial de las vías lo que lleva a la obstrucción aérea. Los mediadores de la inflamación actúan en las fibras colinérgicas y en el musculo liso del árbol bronquioalveolar gatillando el broncoespasmo. Los cambios inflamatorios en la pared de las vías aéreas se producen en forma aguda con la aparición de edema, o crónica en donde hay una remodelación de la pared incluyendo metaplasia de la mucosa, hipertrofia del músculo liso, fibrosis peribronquial e inflamación peribronquial (Robinson, 2002).

Los signos clínicos incluyen tos crónica espontánea, secreción mucopurulenta, disnea espiratoria con estertores sibilantes y crepitantes. En el establecimiento crónico de la enfermedad se desarrolla la hipertrofia de los músculos oblicuo

externo y recto abdominales llamada “línea pesada” o *heavy line*, además la intolerancia al ejercicio, la pérdida de peso y la caquexia pueden ser evidentes.

3.8. Métodos diagnósticos

El establecimiento de un diagnóstico detallado va directamente relacionado con los costos que el dueño esté dispuesto a sustentar. Normalmente el diagnóstico de las infecciones fúngicas de las vías aéreas superiores es relativamente simple pero en las vías aéreas inferiores puede ser mucho más dificultoso (Knottenbelt, 2002), producto de la falta de especificidad de los métodos utilizados.

El diagnóstico más básico y elemental se basa a partir de los signos clínicos, que revelan una alteración del aparato respiratorio, pero que muchas veces no entregan mayor detalle sobre la ubicación específica, además existen otros organismos patógenos que producen signos clínicos similares, por este motivo la signología será inespecífica, pero orientará a un diagnóstico de posible origen fúngico. En forma conjunta con la anamnesis del animal, su manejo en estabulación, la alimentación, si se ha sometido a stress como por ej. el transporte, etc.

Sin duda el uso de la endoscopía o de la biopsia endoscópica es el principal elemento diagnóstico de las micosis de aparato respiratorio superior, desarrollada con o sin cultivo fúngico (Knottenbelt, 2002). Con ella es posible confirmar la ubicación exacta de las placas fúngicas, en el caso de la rinitis micótica o de la micosis de las bolsas guturales.

Las radiografías tienen uso en la localización de la alteración cuando ésta es radiográficamente evidenciable, pero no entregan mayor información sobre la etiología de la enfermedad. El uso principal de la radiografía se desarrolla en la existencia de solidificación pulmonar focal o generalizada, pero los cambios

pueden ser sutiles y además la interpretación de los cambios radiográficos es difícil (Knottenbelt, 2002).

En el caso de la neumonía fúngica por *Aspergillus*, el diagnóstico no es fácil requiriendo de aislamientos repetidos en el tiempo por medio de aspirados traqueobronquiales, frotis nasales y nasofaríngeos.

En consenso, el diagnóstico de una enfermedad respiratoria fúngica se obtiene mediante el uso conjunto de diferentes métodos, en donde los exámenes de laboratorio directos o mediante cultivos, van a establecer con precisión la etiología de la enfermedad, con la desventaja que muchas veces los hongos participan como microbiota normal.

3.9. Tratamientos

Un tratamiento efectivo no sólo implica el uso de fármacos antifúngicos, sino que una serie de procedimientos que en conjunto llevarán a la resolución de la enfermedad con mínimas secuelas y erradicando totalmente la recidiva.

Por esto, el manejo del animal dentro del mismo tratamiento adquiere gran importancia promoviendo la remoción o disminución ambiental del agente, en el polvo orgánico, en la administración del alimento introduciendo pellets a la ración, disminuyendo las horas de estabulación o bien dejándolos a pastoreo cubiertos con capas en el invierno, adecuar los materiales de la cama a papel cortado, viruta u otro material hipoalergénico, etc.

La terapia farmacológica se complementa dependiendo de la ubicación de la micosis con lavados, la hemostasis en los casos de hemorragias, técnicas quirúrgicas en la remoción de granulomas.

Cuando la infección fúngica se presenta en forma secundaria la prioridad es el tratamiento de la enfermedad primaria establecida, con frecuencia determinando que los tratamientos antifúngicos no se administren cuando el hongo es un agente de infección secundario a menos que las lesiones puedan ser manejadas por la aplicación directa de un fármaco antifúngico (Knottenbelt, 2002). Además el tratamiento se limitaría sólo a las infecciones de la superficie nasal, senos paranasales y bolsas guturales. En asociación a los antifúngicos también es recomendado el uso conjunto de antimicrobianos, producto de la participación bacteriana en las enfermedades, de corticoesteroides tópicos, productos yodados diluidos, broncodilatadores, mucolíticos, etc.

La mayoría de las drogas utilizadas para tratar la aspergilosis no son efectivas, sino tóxicas y los tratamientos son prolongados y costosos. Los tratamientos se extienden por varios meses considerando un período de 10 a 12 semanas, requiriéndose de fármacos antifúngicos y la corrección de la causa iniciadora. En medicina equina se han usado dos clases básicas de fármacos antifúngicos; los antibióticos polienos (anfotericina B, nistatina y natamicina) que se combinan con la membrana citoplasmática de los hongos aumentando la permeabilidad celular. Y la segunda clase de fármacos, los azoles (miconazol, ketoconazol, itraconazol y fluconazol) que inhiben la síntesis del ergosterol y causan un acúmulo de esteroides aberrantes en la membrana (Ainsworth y Hackett, 2005), el itraconazol 3mg/Kg/PO (cada 12 horas) ha resultado efectivo en aspergilosis nasales en periodos prolongados de 3 a 4 meses. Se ha establecido que la anfotericina B en dosis de 0,1 a 0,5 mg/Kg/EV (cada 8 horas) y el ketoconazol son efectivos en estas micosis pero la primera es relativamente tóxica y ambas son muy caras (Derksen, 1998). Dentro de los efectos secundarios proporcionados por la anfotericina B incluyen anorexia, arritmias, anemias, disfunción hepática y renal.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Establecer la presencia de hongos pertenecientes al género *Aspergillus spp* mediante muestras obtenidas desde la cavidad nasofaríngea de caballos mestizos ubicados en el Regimiento de Caballería Blindada N°1 “Granaderos”.

4.2. Objetivos específicos

4.2.1. Identificar macroscópicamente el crecimiento fúngico de muestras obtenidas a partir de torulados nasofaríngeos mediante su cultivo en Agar Cloramfenicol Sabouraud.

4.2.2. Identificar microscópicamente la presencia de *Aspergillus spp* mediante la observación de sus estructuras con la tinción azul de lactofenol.

4.2.3. Relacionar la presencia o ausencia de *Aspergillus spp* según el sexo, grupo etario y las condiciones de estabulación.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Animales

Los animales utilizados en el estudio correspondieron a cuarenta y dos caballos mestizos ubicados en el Regimiento de Caballería Blindada N°1 “Granaderos”, sin importar la edad o el sexo de éstos. Todos los caballos presentaron un estado clínico normal, es decir, no demostraban signos clínicos asociados a enfermedades de aparato respiratorio, gastrointestinal ni músculo esquelético. Para asegurar el adecuado estado clínico, se realizó un examen clínico general antes de cada toma de muestra, haciendo hincapié en los siguientes parámetros fisiológicos en reposo: frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria, tiempo de llene capilar, temperatura y auscultación de ambos lados del tórax.

5.2. Insumos

Fueron utilizados en la toma de muestra, en el cultivo de los hongos y su posterior observación en el laboratorio, incluyendo guantes de látex, tómulas estériles protegidas, placas petri, porta y cubre objetos, solución de azul de lactofenol y Agar Cloramfenicol Sabouraud (ver Anexo I).

5.3. Manejo de grupo

Los animales se diferenciaron a partir de las características de su estabulación, estableciéndose dos grupos (ver Anexo V):

- Grupo A: Correspondiente a 10 caballos mestizos de Polo, que se manejan estabulados en pesebreras construidas en base a materiales livianos (estructura de madera y rejas de fierro). Su diseño se destaca por ser visualmente abierto hacia los pasillos, lo que permite una mejor ventilación de las pesebreras. Las pesebreras se encuentran ubicadas en un cuerpo de nave (cada nave presenta dos cuerpos), distribuidas en un total de 20, separadas en 10 por cada lado por un pasillo central de 2,1 m de ancho. Las dimensiones de estas pesebreras son 3,5 m de frente, 3 m de profundidad y presentan una muralla liviana de separación de 2,5 m de altura, consistente en tablas y enrejado.
- Grupo B: Correspondiente a 32 caballos mestizos usados en el curso de maestros, viven en pesebreras construidas en base a materiales livianos (principalmente madera). Su diseño es más cerrado comparado con las pesebreras del grupo A. Estas pesebreras se encuentran dentro de una nave y ocupan los dos cuerpos de ésta, cada uno con un total de 23 pesebreras individuales, divididas por un pasillo central de 2,5 m de ancho. Las dimensiones de las pesebreras son 3,0 m de frente, 3,0 m y separadas entre ellas por una muralla liviana de 2,5 m de altura, similar a la de las pesebreras del grupo A.

5.4. Tamaño de la muestra

Se calculó el tamaño de la muestra mediante la siguiente fórmula:

$$n = \frac{Z^2 * p * q}{\varepsilon^2}$$

Donde,

p: prevalencia asumida 11,5% (según estudio de Guida *et al.*, 2005)

ε^2 : error de la estimación 10%

Z²: (1.96)² a un 95% confianza.

q: 1-p

De esta manera fue posible realizar un muestreo bietápico, que consistió en un muestreo estratificado (según grupos A y B) en una primera instancia, obteniendo una muestra total de 42 individuos, para posteriormente realizar un muestreo al azar dentro de cada estrato (grupo), obteniendo una cantidad estadísticamente proporcional de 10 caballos muestreados en el grupo A y 32 caballos en el grupo B.

5.5. Características ambientales

El Regimiento se encuentra ubicado en la provincia de Quillota, de acuerdo al Instituto Meteorológico de Chile, las condiciones ambientales del área corresponden al clima templado cálido con lluvias invernales y estación seca prolongada (7 a 8 meses), que aparece en la sección media del valle del

Aconcagua y cubre también el sector de la cordillera de la Costa. En invierno son frecuentes las heladas aumentando a medida que se asciende hacia la Cordillera de Los Andes. La temperatura media es del orden de 15°C, con pequeñas variaciones según la ubicación, valores de 8° C en Quillota. Las precipitaciones se concentran en invierno, dejando al menos 7 meses con cantidades inferiores a 40 mm. Los inviernos más lluviosos precipitan hasta 10 veces más que en los inviernos con sequía. La presente memoria se llevó a cabo durante los meses de agosto y septiembre del año 2009.

5.6. Obtención de muestras

Las muestras fueron obtenidas en las instalaciones del Regimiento de Caballería Blindada N°1 “Granaderos”.

Como método de sujeción se utilizó el axial labial (puro). Para la toma de muestra se usó el método descrito por Guida *et al.* (2004) y Picard (2005), el cual se realizó mediante el uso de la tórula protegida extrayendo la muestra desde la cavidad nasofaríngea introduciéndola por el meato nasal ventral hasta la nasofaringe donde se empujó y se rotó por 5 segundos, para posteriormente cubrirla al retirar (ver Anexo I). Luego la tórula se llevó a un envase con medio de transporte Stuart para ser transportados en cajas de poliestireno expandido refrigeradas hasta su cultivo en el laboratorio de Microbiología de la Universidad Viña del Mar, el cual se efectuó en un periodo no mayor a 6 horas posteriores al muestreo.

5.7. Cultivo

La siembra de la muestra se hizo directamente rotando la tórula sobre la superficie del Agar Sabouraud Cloramfenicol previamente preparado (ver Anexo I). Posteriormente la muestra se incubó por 10 días a 25°C, observado el crecimiento fúngico cada 3 días, para su observación microscópica. Si dentro de los primeros 10 días no hubo evidencias de crecimiento fúngico, se prolongó la incubación de las muestras por 20 días, las cuales se eliminaron si no existió crecimiento alguno.

5.8. Observación macroscópica y microscópica

Si macroscópicamente hubo evidencias de crecimiento fúngico, identificando el aspecto o textura de la superficie (pulverulenta, algodonosa, plegada, granular y lanosa) y color de la colonia (dorso y reverso), se observó microscópicamente mediante la extracción de una pequeña muestra de la colonia con una cinta adhesiva transparente observándola bajo aumento en el microscopio previa postura de una gota de azul de Lactofenol (ver Anexos I y II). Las muestras se establecieron como negativas si macroscópicamente no hubo evidencias de crecimiento fúngico o si microscópicamente no se observaron estructuras pertenecientes a *Aspergillus*.

5.9. Identificación de estructuras

La identificación de las estructuras fúngicas encontradas se realizó mediante el uso de claves genéricas para los hongos miceliares y para *Aspergillus spp* según Raper y Fennel (1965), Piontelli y Toro (1989), e imágenes en sitios web reconocidos (ver Anexo IV).

5.10. Recolección de datos y análisis estadístico

Cada toma de muestra se rotuló según el grupo que corresponda (A o B) con un número correlativo para cada grupo, del 1 al 10 (grupo A) o del 1 al 32 (grupo B), además se adicionó la información correspondiente a cada animal (nombre del animal, edad, actividad, sexo, hora y fecha del procedimiento) (ver Anexo III).

Los resultados obtenidos de cada muestra tomada se ordenaron tabulados en tablas de contingencia y gráficos.

Para el análisis estadístico de las variables sexo, edad y grupo A o B (condiciones de estabulación) se aplicó el *test* de Ji-cuadrado (χ^2), determinando como valor significativo un valor de $P < 0,05$, de esta manera se determinó si existía independencia (Taucher, 1997) entre la presencia del hongo y las distintas variables.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

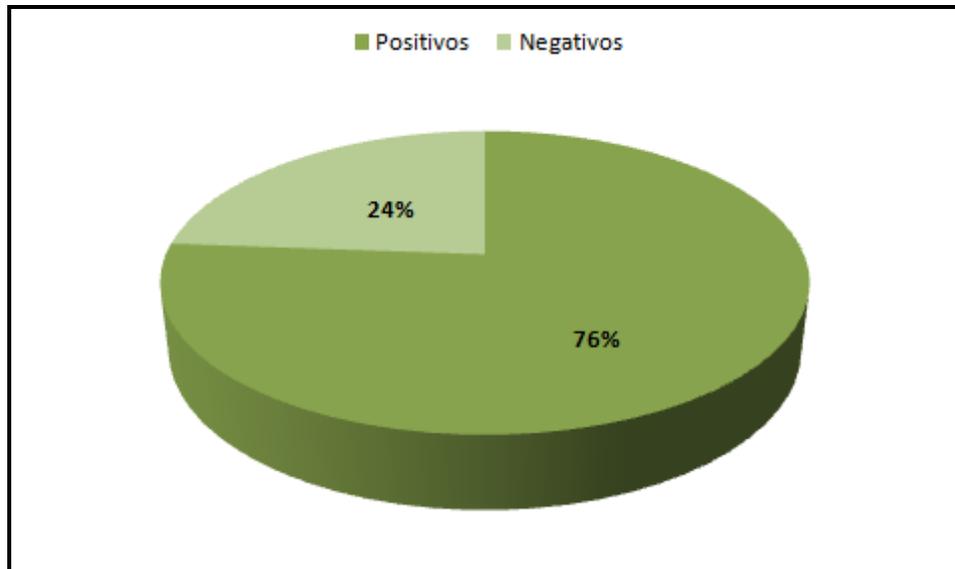
6.1. Crecimiento fúngico en las muestras analizadas

De las 42 muestras obtenidas correspondientes al 100% del total a analizar, sólo se trabajó con los resultados de 32 torulados nasofaríngeos desde los cuales se pudo identificar el crecimiento de hongos filamentosos, ya que las 10 muestras negativas restantes no evidenciaron crecimiento de hongos miceliados, las que fueron descartadas luego de un periodo de incubación de 20 días.

Por lo tanto, las 32 muestras positivas equivalen al 76% del universo muestral inicial, mientras que las 10 muestras negativas corresponden al 24% (gráfico N°1), lo que es esperable si se establece que un muestreo no sería suficiente en muchos casos para establecer la presencia o ausencia de hongos en un individuo, ya que según Picard (2005) se estableció que 5 muestras obtenidas en distintos periodos de tiempo pueden entregar distintos resultados, lo que indicaría que los organismos fúngicos aislados al igual que los microorganismos bacterianos (Hoquet *et al.*, 1985) se comportan como una microflora no permanente al no poder ser aislados en forma constante desde un mismo animal.

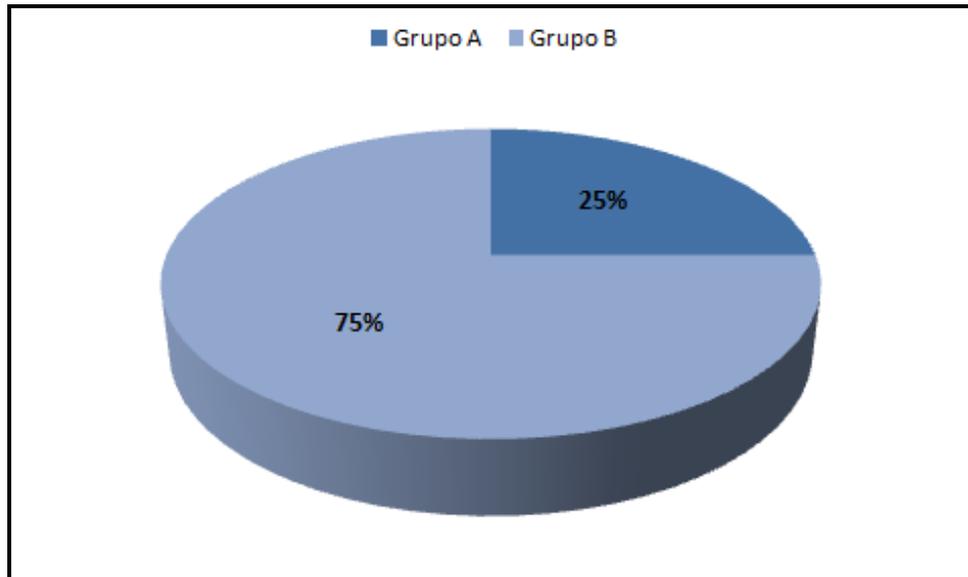
De esta manera al igual que estudios realizados tanto en animales adultos como en potrillos, la obtención de cultivos negativos se establece en porcentajes similares a los obtenidos en este estudio, sin dejar de considerar que la presencia o ausencia de hongos en el aparato respiratorio depende en gran parte de las condiciones generales de manejo (alimentación, estabulación, tipo de cama, entre otros) (Millán, 2001).

Gráfico N°1. Porcentaje del crecimiento fúngico sobre el total inicial muestreado



Con este nuevo universo muestral de 32 animales, se observó que el grupo A fue conformado por un total de 8 caballos, el cual correspondió a un 25% de la muestra, mientras que para el grupo B se obtuvieron resultados de 24 caballos equivalentes al 75% (gráfico N° 2).

Gráfico N°2. Porcentaje de caballos muestreados por grupo (A y B)



La tabla N°1, detalla el sexo de los animales muestreados (machos o hembras) correspondientes a cada grupo, en el caso particular de los machos se consideraron dentro de esta categoría a caballos (machos castrados) y potros (machos no castrados). También se entregan las cifras totales de 15 machos y 17 hembras para la muestra de 32 animales.

Tabla N°1. Sexo de los caballos según grupos (A y B) y el total muestreado

Sexo	Grupo		Total
	A	B	
Machos	3	12	15
Hembras	5	12	17
Total	8	24	32

Los 32 caballos participantes en el estudio presentaron un amplio rango de edad que abarcó desde los 3 hasta los 22 años, por lo tanto para minimizar la dispersión de datos y poder analizarla se realizaron 5 intervalos de edades, correspondientes cada intervalo a un grupo etario. De esta manera, los datos quedaron ordenados como indica la tabla N°2.

Tabla N°2. Grupos etarios de los caballos muestreados

Grupo etario [años]	Grupos		Total
	A	B	
Grupo 1 [3-6]	2	11	13
Grupo 2 [7-10]	3	4	7
Grupo 3 [11-14]	2	4	6
Grupo 4 [15-18]	1	3	4
Grupo 5 [19-22]	0	2	2
Total	8	24	32

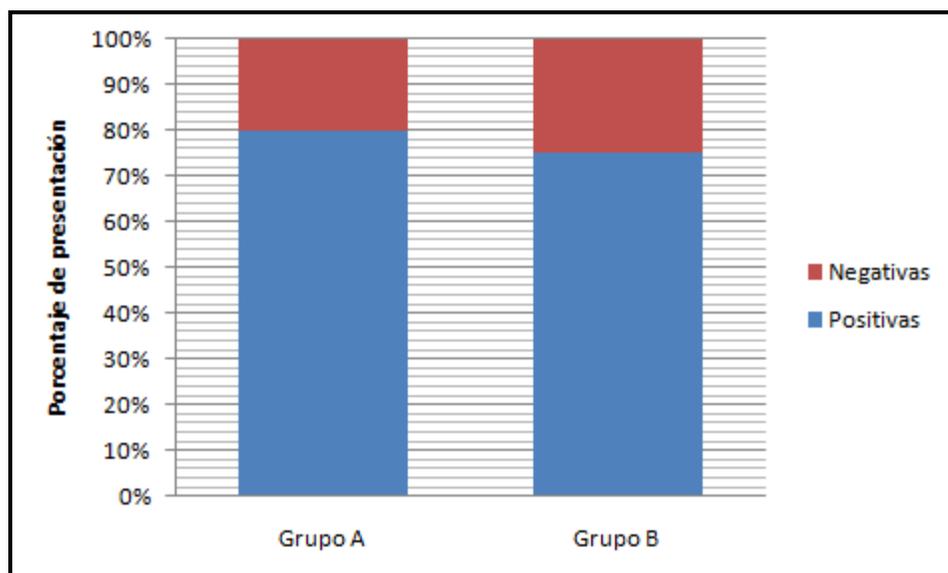
Luego de haber establecido y caracterizado el grupo a estudiar, el siguiente gráfico y tabla N°3 muestran el número de muestras con y sin crecimiento de hongos filamentosos, determinando que el grupo A presentó un crecimiento fúngico de 8 muestras positivas y sólo 2 sin la presencia de hongos filamentosos, representados por el 80 y 20% respectivamente; a diferencia del grupo B, que su crecimiento fúngico está compuesto de 24 muestras positivas y sólo 8 sin evidencias de crecimiento, equivalentes al 75% y 25% respectivamente. Al mismo tiempo las diferencias porcentuales son reducidas al analizar el crecimiento positivo en ambos grupos, dejando en evidencia desde una primera instancia, que los dos tipos de pesebreras no son lo suficientemente diferentes como para establecer mayores diferencias en los organismos fúngicos encontrados, es más, en un estudio realizado por Nardoni *et al.* (2005) se observó que la concentración de esporas fúngicas potencialmente patógenas en el aire no difieren

significativamente entre pesebreras individuales cerradas o abiertas al exterior (semi estabuladas). Por lo que el real cambio en la calidad del aire sólo se obtendría en condiciones de pastoreo.

Tabla N°3. Número de muestras positivas y negativas al crecimiento fúngico según grupos (A y B)

Grupo	N° de muestras		
	Positivas	Negativas	Total
A	8	2	10
B	24	8	32

Gráfico N°3. Distribución del crecimiento fúngico según grupos (A y B)



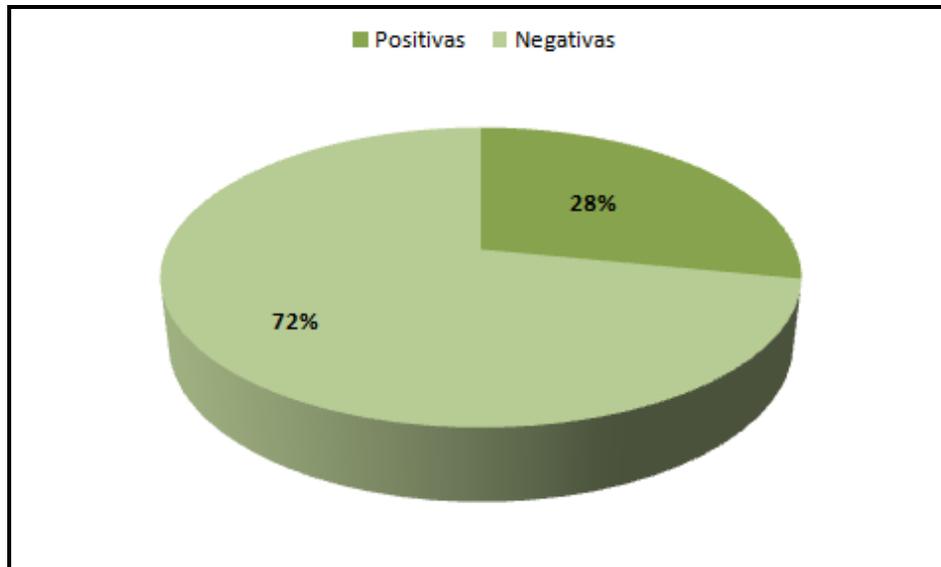
6.2. Crecimiento de *Aspergillus spp* en las muestras analizadas

La flora de la mucosa oral y faríngea, está asociada con la salud y la enfermedad del aparato respiratorio superior e inferior (Long, 2005), en la cavidad nasofaríngea es posible encontrar especies fúngicas que se encuentran como microorganismos oportunistas y que en condiciones puntuales pueden ser agentes patógenos, es por ello que se estudió la presencia de *Aspergillus spp*, uno de los agentes fúngicos que participa en la mayoría de las infecciones respiratorias fúngicas (Knottenbelt, 2002).

Del total de muestras analizadas, se encontró que 9 resultaron positivas a la presencia de *Aspergillus spp* correspondiendo a un 28,13% del total (gráfico N°4), mientras que las muestras negativas corresponden a 23 equivalentes al 71,87% restante. En general los porcentajes de presencia de *Aspergillus* en las distintas estructuras del aparato respiratorio superior no difieren en términos porcentuales en comparación con las encontradas en el presente estudio, obteniendo un rango de presentación de 20 al 30%, en potrillos y caballos adultos (Millán, 2001; Picard, 2005).

La intención de establecer la presencia como género y no entre especies se debe a que el establecimiento de la aspergilosis como enfermedad se genera mediante la inmunosupresión del animal y la presencia conjunta de *Aspergillus*, siendo múltiples especies del mismo género las que generan la entidad, dentro de ellas las más comunes *A. fumigatus* y *A. nidulans* (Tell, 2005).

Gráfico N°4. Porcentaje muestras positivas y negativas a *Aspergillus spp* en el total de la muestra



Al analizar las muestras positivas a *Aspergillus spp* frente a los grupos A y B, las diferencias porcentuales entre los grupos no se diferencian mayormente, ya que el grupo A posee un 25% de positivos (2 muestras) frente a un 29,17% del grupo B (7 muestras) (gráfico N°5 y tabla N°4). En cuanto a las muestras negativas corresponden a 6 muestras para el grupo A equivalentes al 75% y 17 muestras para el grupo B o expresado en términos porcentuales el 70,83%.

En términos generales, el manejo de los caballos estabulados se basa en la siguiente premisa, los caballos se encontrarán “sanos” mientras sean mantenidos por mayor tiempo fuera de estabulación (Pascoe y Asbury, 2003), de esta manera la probabilidad de inhalar esporas fúngicas producto de una mala ventilación, condiciones deficientes de la pesebrera y de los manejos de alimentación se reducen, esto producto que el hábito normal del equino es oler constantemente su cama y cualquier superficie de la misma pesebrera, respirando las esporas fúngicas que pudieran encontrarse allí (Millán, 2001).

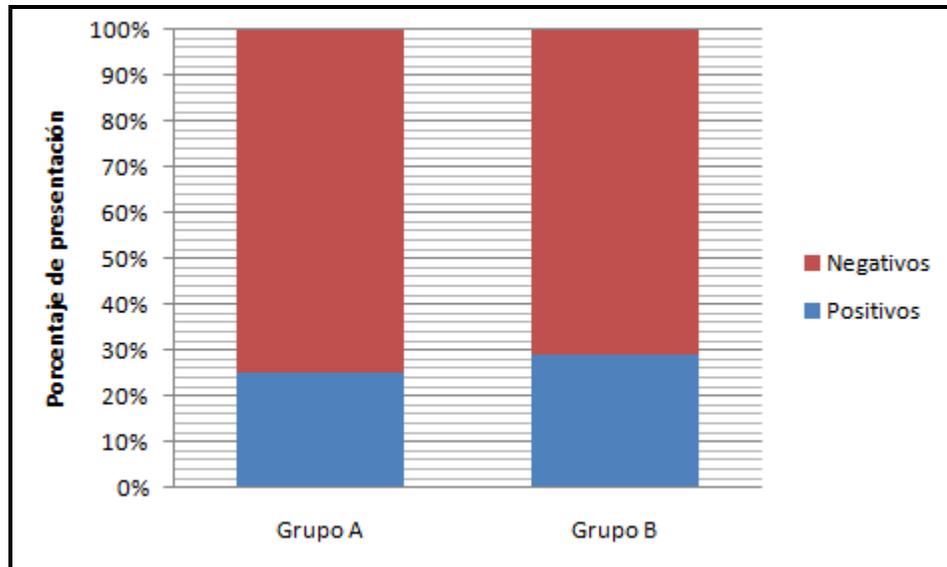
Asegurar una adecuada ventilación es probablemente el factor más importante en el diseño y construcción de las pesebreras (Pascoe y Asbury, 2003), ya que la ventilación en las pesebreras será siempre peor que la de los animales a libre pastoreo, adicionalmente a una mala ventilación, una cama de paja y la alimentación con heno, en conjunto con el amonio proveniente de las camas húmedas podrían irritar las vías respiratorias desarrollando entre otras enfermedades respiratorias ORVA (Pascoe y Asbury, 2003). Si bien en cuanto a mantención las pesebreras de ambos grupos presentaban diferencias observables, los detalles significativos en condiciones de ventilación, material de la cama y tipo de alimentación eran similares, no pudiéndose establecer diferencias estadísticamente significativas (valor $P > 0,05$) entre la presencia de hongos del género *Aspergillus spp* y los grupos establecidos según condiciones de estabulación.

Parece ser, que las diferencias son más significativas cuando los cambios ambientales son más drásticos como por ejemplo la estabulación versus el pastoreo tal como se demostró en el estudio de Guida *et al.* (2005) en donde la estabulación correspondía un factor importante en la presencia de *A. fumigatus* en la nasofaringe, con respecto a los caballos perteneciente a haras en donde el aislamiento fue considerablemente menor.

Tabla N°4. Número de muestras positivas y negativas a *Aspergillus spp* según grupos (A y B)

Grupo	N° de muestras		
	Positivas	Negativas	Total
A	2	6	8
B	7	17	24

Gráfico N°5. Distribución de muestras positivas y negativas a *Aspergillus spp* según grupo muestreado



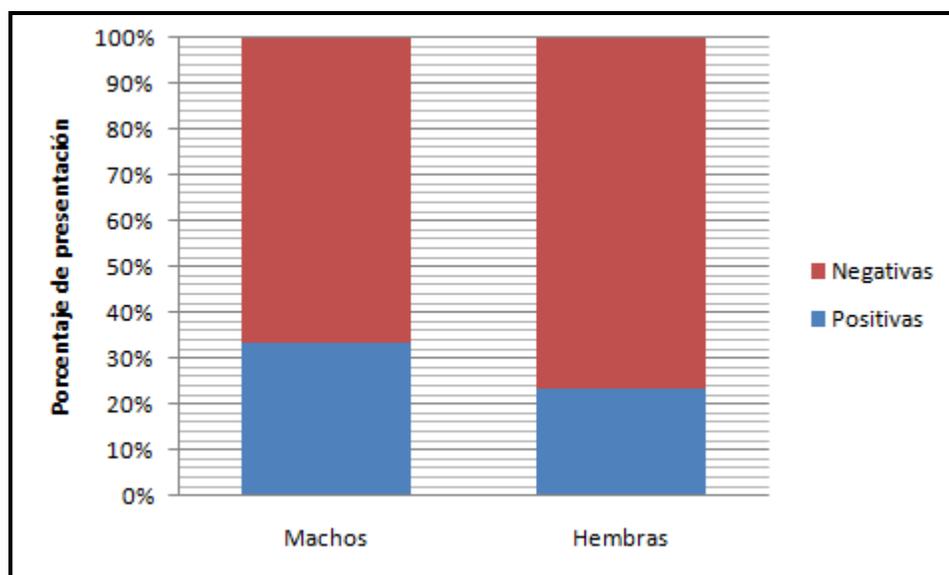
En los siguientes gráfico N°6 y tabla N°5, se observan las muestras positivas a *Aspergillus spp* según el sexo de los individuos muestreados, determinando que en los machos se encontraron 5 muestras positivas (33,33%) de un total de 15 machos en la muestra, en cuanto a las hembras obtuvieron 4 muestras positivas (22,22%) de un total es de 17 hembras. Los individuos negativos al igual que en el caso anterior corresponde al resto de machos y hembras sin crecimiento de *Aspergillus spp*, es decir 9 machos (66,67%) y 14 hembras (76,47%).

No existe evidencia suficiente para establecer que el sexo de los individuos es un factor relevante en la presencia del hongo en la nasofaringe (valor $P > 0,05$). A pesar de que en estudios se ha determinado que hay una dependencia favorable estadísticamente entre *A. fumigatus* y yeguas en animales estabulados y en pastoreo (Guida *et al.*, 2005). Los resultados de este estudio no difieren de la literatura que indica que la presencia o ausencia de hongos como agentes oportunistas es independiente de la raza o sexo de los individuos (Millán, 2001; Long, 2005).

Tabla N°5. Número de muestras positivas y negativas a *Aspergillus spp* según sexo de los animales

Sexo	N° de muestras		
	Positivas	Negativas	Total
Machos	5	10	15
Hembras	4	13	17

Gráfico N°6. Porcentaje de muestras positivas y negativas a *Aspergillus spp* según sexo de los animales



Con la finalidad de establecer qué participación tiene la edad de los animales y la presencia de *Aspergillus spp* en la nasofaringe se registraron los datos ordenados en el gráfico N°7 y tabla N°6.

En primer lugar y como se registró en la tabla N°2, el grupo etario que incluye a la mayor cantidad de individuos fue el N°1 (3 a 6 años) con 13 caballos, de estos

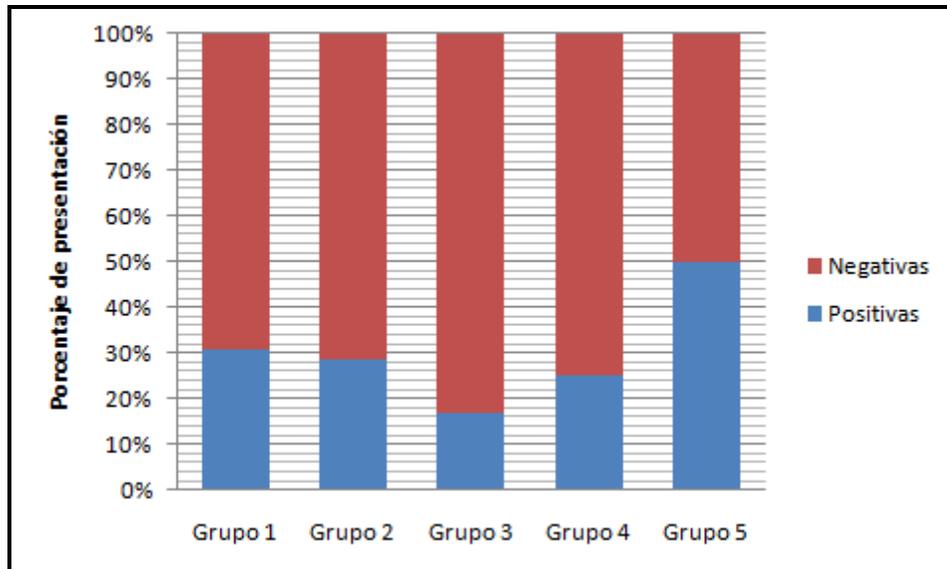
4 muestras (30,77%) presentaron un crecimiento positivo y 9 negativos (69,23%). En el grupo N°2 (7 a 10 años) se encontraron 2 caballos positivos (28,57%) mientras que los negativos alcanzaron los 5 individuos (71,43%). Los grupos N°3 y 4 obtuvieron una sola muestra positiva, es decir, un 16,67% y 25% respectivamente producto que estos grupos están constituidos por una cantidad total de 6 y 4 individuos, en cuanto a los negativos estos fueron 5 y 3 muestras equivalentes al 83,33 y 75% respectivamente. En el caso del grupo etario N°5 se da una excepción ya que el número total de caballos que constituye este grupo es de 2, siendo 1 muestra positiva y 1 negativa lo que establece un 50% de positivos y el mismo porcentaje de negativos.

Si bien, no hay significancia estadística respecto a estas dos variables (presencia de *Aspergillus* vs edad) (valor $P > 0,05$), en definitiva hay una tendencia de concentración de muestras a tempranas edades, que indicaría que la presencia del género está sujeta a edades que fluctúan entre los 3 y los 10 años, esto tiene sentido cuando se conoce que enfermedades respiratoria como el ORVA tienen a especies de este género como su mayor causante, ya que se encuentra habitualmente en el heno y la paja (Zaror *et al.*, 1999). Encontrándose una estrecha relación entre la presentación de ORVA y edades que van desde los 4 a los 10 años (Von Fürstenberg, 2003) rango que abarca la mayoría de aislamientos positivos a *Aspergillus* en este estudio.

Tabla N°6. Número de muestras positivas y negativas a *Aspergillus spp* según grupos etarios

Grupo etario	N° de muestras		
	Positivas	Negativas	Total
Grupo 1	4	9	13
Grupo 2	2	5	7
Grupo 3	1	5	6
Grupo 4	1	3	4
Grupo 5	1	1	2

Gráfico N°7. Porcentaje de muestras positivas y negativas a *Aspergillus spp* según grupos etarios

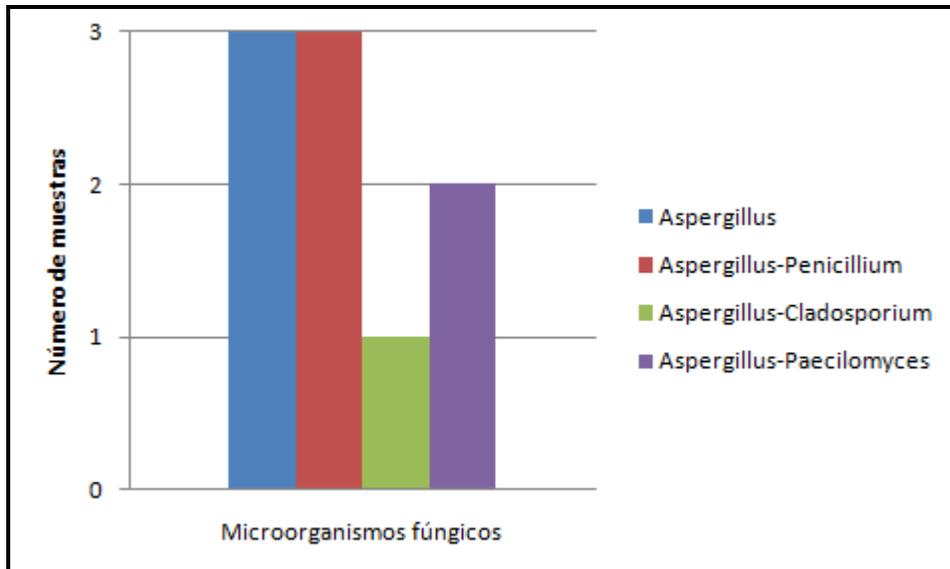


Los animales herbívoros como por ejemplo bovinos y equinos están comúnmente expuestos a un gran número de elementos fúngicos (Millán, 2001).

De los cultivos positivos obtenidos a partir de las 32 muestras nasofaríngeas se puede establecer que el 47% de las muestras, es decir 15 muestras presentaron el crecimiento de 1 género y el 53% restante, correspondientes a 17 muestras presentaron dos géneros, no hubo muestras con más géneros aislados.

Por otro lado, de las 9 muestras positivas a *Aspergillus spp*, 3 se obtuvieron por cultivo único y 3 asociado a *Penicillium spp*, resultados similares a los obtenidos en estudios de flora fúngica desde las bolsas gurgales en donde esta asociación correspondía al mayor porcentaje de las muestras (Millán, 2001). Mientras que las otras asociaciones correspondieron a 2 muestras aisladas de *Aspergillus–Paecilomyces* y sólo una con *Aspergillus spp* y *Cladosporium spp* (gráfico N°8).

Gráfico N°8. Distribución de las muestras según la presencia de *Aspergillus* y sus asociaciones



6.3. Organismos fúngicos aislados según el total de muestras

Los géneros de hongos miceliados aislados en este estudio correspondieron a *Acremonium spp*, *Alternaria spp*, *Aspergillus spp*, *Cladosporium spp*, *Mucor spp*, *Paecilomyces spp* y *Penicillium spp*. Organismos fúngicos similares fueron encontrados desde las bolsas guturales de caballos fina sangre de carrera en un estudio realizado por Millán (2001).

El polvo orgánico posee una gran variedad de componentes, presentando más de 50 especies de hongos (Zaror *et al.*, 1999; Pascoe y Asbury, 2003; Ainsworth y Hackett, 2005), dado a las esporas fúngicas encontradas en el polvo de la paja y heno es posible el aislamiento de los distintos tipos de hongos desde las vías respiratorias.

A continuación y como complemento de los resultados obtenidos con el género *Aspergillus spp*, se detallan los géneros fúngicos encontrados en las muestras en forma meramente descriptiva.

En relación al total de las muestras obtenidas (tabla N°7), es importante mencionar que *Penicillium spp* correspondió al hongo de mayor aislamiento con 16 muestras positivas es decir un 50%, lo que no difiere en términos porcentuales obtenidos en estudios desde bolsas guturales (Millán, 2001) en segundo lugar se encuentra *Cladosporium* con 11 muestras equivalentes al 34,38%, en tercer lugar se encuentra *Aspergillus spp* 9 muestras correspondientes al 28,13%, en menor cantidad *Alternaria spp* y *Paecilomyces spp*, hongos presentes con 4 muestras representadas por el 12,50% cada uno, luego *Acremonium spp* con 3 muestras positivas lo que equivale al 9,38% y finalmente *Mucor spp*, presente sólo en 2 muestras que es el 6,25%.

Tabla N°7. Distribución de géneros aislados según el total de muestras

Géneros	N° de muestras	% de muestras
<i>Acremonium</i>	3	9,38
<i>Alternaria</i>	4	12,50
<i>Aspergillus</i>	9	28,13
<i>Cladosporium</i>	11	34,38
<i>Mucor</i>	2	6,25
<i>Paecilomyces</i>	4	12,50
<i>Penicillium</i>	16	50,00

En cuanto a los microorganismos aislados según grupo A y B, se evidencia de manera clara que el grupo A tiene menor variedad de géneros aislados, ya que no se encontraron muestras positivas a *Mucor* y *Paecilomyces*, no así el grupo B que tiene la totalidad de géneros del estudio y las mayores frecuencias.

De acuerdo al porcentaje de las muestras según el número de individuos para cada grupo, se entregan los datos ordenados en la tabla N°8, de la cual es posible observar que para el grupo A el género *Cladosporium* representa el 50% de los géneros presentes en el grupo, *Penicillium* y *Alternaria* poseen un 37,5% cada uno; mientras que *Acremonium* y *Aspergillus* presentan una menor participación porcentual. Para el grupo B los géneros se distribuyen porcentualmente estableciendo que *Penicillium* con un 54,17% fue el género con mayor número de muestras aisladas, seguido de *Aspergillus* y *Cladosporium* con un 29,17% cada uno y, en menor porcentaje se encuentran *Paecilomyces*, *Acremonium* y *Mucor* y *Alternaria* con 16,67%, 8,33% y 4,17% respectivamente.

Tabla N°8. Distribución de géneros aislados según grupo muestreado

Géneros	Grupo A		Grupo B	
	N° de muestras	% de muestras	N° de muestras	% de muestras
<i>Acremonium</i>	1	12,5	2	8,33
<i>Alternaria</i>	3	37,5	1	4,17
<i>Aspergillus</i>	2	25	7	29,17
<i>Cladosporium</i>	4	50	7	29,17
<i>Mucor</i>	0	0	2	8,33
<i>Paecilomyces</i>	0	0	4	16,67
<i>Penicillium</i>	3	37,5	13	54,17

Los resultados de géneros aislados según los 5 grupos etarios (tabla N°2) fueron los siguientes: grupos N°1 y 2 fue posible aislar 6 géneros, los grupos N°3 y 4, 5 géneros y el N°5 sólo 3 géneros. *Penicillium* constituye el microorganismo con mayor aislamiento con un total de 16 muestras distribuidas en los grupos etarios de la siguiente manera: 11 muestras positivas (80,62%), 1 (14,29%), 2 (33,33%), 1 (25%) y 1 (50%) para los grupos N°1, 2, 3, 4, y 5 respectivamente, las diferencias porcentuales en cada grupo están dadas por la cantidad de integrantes que conforman dichos grupos, así *Cladosporium* es el segundo organismo con mayor aislamiento con un total de 11 muestras positivas en donde cada grupo etario

(desde N°1 al 5) obtuvo 2 (15,38%), 4 (57,14%), 4 (66,67%), 1 (25%), y 0 (0%). Posteriormente se encuentra *Aspergillus* que ya fue analizado anteriormente y fue posible aislarlo de todos los grupos etarios. Los otros géneros presentaron menor número total de muestras positivas y por ende menores muestras positivas en cada grupo etario.

En el caso de géneros aislados según el sexo de los individuos en estudio, es interesante señalar que en el grupo de hembras se establece el aislamiento de la totalidad de géneros presentes en el estudio, incluyendo a *Acremonium spp* y *Alternaria spp* que no se encuentran en el grupo de los machos.

Con respecto al número de muestras para cada género según el número de machos y hembras del muestreo se ordenan los datos en la tabla N°9, determinando que los machos presentan menor variedad de hongos aislados y además mayores porcentajes en las muestras encontradas producto que la menor frecuencia de machos en el estudio (ver tabla N°1). *Cladosporium* y *Penicillium* son los géneros con mayor frecuencias aisladas (7 muestras cada uno) representando el 46,67% cada una.

Para el grupo de las hembras, es posible observar una mayor distribución de las muestras, en donde la mayor frecuencia con 9 muestras positivas la obtiene el género *Penicillium*, representando un 52,94% del total de hembras en el estudio, a diferencia de *Mucor* que tiene el menor porcentaje de hembras positivas con un 5,88%

Tabla N°9. Distribución de géneros aislados según sexo de los animales muestreados

Géneros	Macho		Hembra	
	N° de muestras	% de muestras	N° de muestras	% de muestras
<i>Acremonium</i>	0	0	3	17,65
<i>Alternaria</i>	0	0	4	23,53
<i>Aspergillus</i>	5	33,33	4	23,53
<i>Cladosporium</i>	7	46,67	4	23,53
<i>Mucor</i>	1	6,67	1	5,88
<i>Paecilomyces</i>	2	13,33	2	11,76
<i>Penicillium</i>	7	46,67	9	52,94

6.4. Organismos fúngicos aislados sobre el total de estructuras

De las 32 muestras analizadas se observó la presencia de 49 estructuras fúngicas, clasificadas en 7 géneros distintos. En la siguiente tabla N°10 se observa la participación porcentual de cada género respecto al hallazgo total de estructuras fúngicas en las muestras. Es importante señalar que *Penicillium* fue el hongo con mayor participación llegando a un 32,65% del total de estructuras fúngicas observadas, seguido de *Cladosporium* y *Aspergillus* (22,45 y 18,37% respectivamente). Los géneros que menor porcentaje obtuvieron fueron *Mucor* y *Acremonium* (4,08 y 6,12% respectivamente).

Tabla N°10. Distribución de géneros aislados según el total de estructuras fúngicas

Géneros	N° de estructuras	% de estructuras
<i>Acremonium</i>	3	6,12
<i>Alternaria</i>	4	8,16
<i>Aspergillus</i>	9	18,37
<i>Cladosporium</i>	11	22,45
<i>Mucor</i>	2	4,08
<i>Paecilomyces</i>	4	8,16
<i>Penicillium</i>	16	32,65
Total	49	100

La tabla N°11 muestra la participación porcentual de cada género para los grupos A y B, en donde el grupo A tiene una concentración del 26,53% de las estructuras aisladas y el grupo B un 73,47%, indicando que en el porcentaje total de estructuras aisladas, el grupo B en el cual las pesebreras eran visiblemente menos ventiladas y más antiguas en infraestructura, hay una mayor concentración total de organismos aislados. Esto se puede deducir también de la variedad de organismos fúngicos aislados, como ya se mencionó anteriormente.

Tabla N°11. Distribución de géneros aislados para los grupos A y B según el total de estructuras fúngicas

Géneros	Grupo A		Grupo B	
	N° de estructuras	% de estructuras	N° de estructuras	% de estructuras
<i>Acremonium</i>	1	2,04	2	4,08
<i>Alternaria</i>	3	6,12	1	2,04
<i>Aspergillus</i>	2	4,08	7	14,29
<i>Cladosporium</i>	4	8,16	7	14,29
<i>Mucor</i>	0	0	2	4,08
<i>Paecilomyces</i>	0	0	4	8,16
<i>Penicillium</i>	3	6,12	13	26,53
Total	13	26,53	36	73,47

En cuanto a los géneros aislados según los grupos etarios, se obtiene que el grupo N°1 fue el que presentó el mayor número microorganismos fúngicos, con 6 géneros distintos que representan al 42,86% del total de estructuras fúngicas aisladas, el grupo N°2 presenta igualmente 6 aislamientos fúngicos que equivale al 20,41% del total de muestras, pero a diferencia del anterior, el grupo N°1 tiene un mayor número de muestras aisladas por género, lo que establece el porcentaje mayor de participación total. El grupo N°3, tiene 5 géneros distintos aislados equivalentes a un 18,37%. Para los grupos etarios de las edades más avanzadas la variedad de hongos aislados que disminuye de 5 para el grupo N°4 y sólo 3 microorganismos para el grupo N°5, con una participación porcentual de 12,24 y 6,12% respectivamente. A diferencia de lo encontrado en potrillos que la variedad de especies fúngicas aisladas aumenta con la edad de los mismos pero su número de cultivos negativos disminuía (Picard, 2005), en los equinos adultos la mayor variedad de especies fúngicas encontradas se encuentra en los individuos pertenecientes a los primeros grupos etarios N°1, 2 y 3; mientras que los crecimientos negativos corresponden a caballos pertenecientes a todos los grupos etarios.

Es interesante señalar que, *Penicillium spp* y *Aspergillus spp* son las únicas especies fúngicas que pueden ser aisladas a través de todos los grupos etarios. En el estudio el grupo de machos presentan una concentración del 44,9% de las estructuras fúngicas aisladas, mientras que las hembras obtienen un mayor porcentaje total equivalente a un 55,1% (tabla N°12). Además presentan mayor variedad de géneros aislados (7 en total), con respecto a los machos.

Tabla N°12. Distribución de géneros aislados para machos y hembras según el total de estructuras fúngicas

Géneros	Macho		Hembra	
	N° de muestras	% de muestras	N° de muestras	% de muestras
<i>Acremonium</i>	0	0	3	6,12
<i>Alternaria</i>	0	0	4	8,16
<i>Aspergillus</i>	5	10,2	4	8,16
<i>Cladosporium</i>	7	14,29	4	8,16
<i>Mucor</i>	1	2,04	1	2,04
<i>Paecilomyces</i>	2	4,08	2	4,08
<i>Penicillium</i>	7	14,29	9	18,37
Total	22	44,9	27	55,1

Los hongos pueden ser fácilmente acumulados y transportados en el aire, actuado como biocontaminantes en lugares cerrados, especialmente en ambientes con poblaciones equinas de alta densidad de individuos y en naves poco abiertas al exterior, esta continua exposición puede causar daño respiratorio (Nardoni *et al.*, 2005) provocando enfermedades de aparato respiratorio superior o inferior, incluidas las micosis.

Se han estudiado una amplia variedad de matrices para establecer la presencia e identificar los hongos que se encuentran en constante contacto con los equinos, como por ejemplo; el aire, el polvo, el agua, el heno, la cama y la conjuntiva en la hembras (Zaror *et al.*, 1999; Nardoni *et al.*, 2005; Barsotti *et al.*, 2006), pero en general existe un desconocimiento de la microflora faríngea equina lo que hace difícil establecer en muchos casos los organismos participantes en las infecciones de los colonizadores (Hoquet *et al.*, 1985).

Se han realizado pocos estudios que incluyan a los microorganismos fúngicos en el aislamiento, se ha determinado incluso que los organismos fúngicos aislados desde la faringe son infrecuentes y, parecen estar asociados mayormente a las condiciones ambientales que a las propias del equino como por ejemplo, en

caballos con enfermedades de aparato respiratorio donde no se han establecido diferencias en el aislamiento de hongos (incluido *Aspergillus*) desde faringe de caballos sanos versus con faringitis (Hoquet *et al.*, 1985). Lo cierto es que en diversos estudios se ha logrado concluir que las distintas infraestructuras no influirían en los organismos fúngicos encontrados en el ambiente (Nardoni *et al.*, 2005), lo que hace pensar que al ser el equino un respirador nasal obligado y según sus hábitos de comportamiento normales que corresponden a oler su cama y pesebrera constantemente, esté expuesto a los organismos fúngicos de su pesebrera frecuentemente, los que pueden inhalar pudiendo ser aislados desde los pasajes de la cavidad nasal y aparato respiratorio. Por esto, para lograr reducir considerablemente la carga fúngica ambiental y con ello los potenciales organismos fúngicos de las vías aéreas, parece ser fundamental que el animal tenga la capacidad de moverse y no restringirse a un sólo lugar como es el caso de la estabulación cualquiera sea su condición (cerrada o semi abierta, nueva en infraestructura o no). Por otro lado, el caballo al ser un individuo único, no es posible establecerle un patrón de presentación de los hongos (en este caso de *Aspergillus*) ya que varía individualmente la presencia y, no según edad o sexo de los mismos.

Manejos habitualmente usados por dueños o criadores de caballos es el humedecer los fardos de heno, esto con la finalidad de reducir la generación el polvo en el aire de las pesebreras. Lo que parece ser una práctica adecuada, estudios han demostrado que no sería lo suficientemente afectiva, ya que el humedecer con agua la superficie de los fardos no logra humedecer su centro, evaporándose el agua de la superficie rápidamente, por lo que la inmersión completa de los fardos reduciría eficientemente la liberación de polvo y con ello la inhalación de esporas (Clements y Pirie, 2007).

Un buen sistema de manejo diseñado para minimizar los riesgos de alergias respiratorias o micosis, debe considerar factores como: camas de papel o viruta como preferentes a las de paja, heno de buena calidad, tratar de disminuir la

agitación de los fardos y por sobretodo considerar sistemas extensivos, donde los caballos se resguarden sólo durante la noche o en climas adversos, sin mantenerlos estabulados por 20 o 22 horas que es lo que normalmente se realiza, lo que muchas veces no es posible porque es un manejo que está directamente relacionado a la capacidad económica y a las dimensiones del lugar.

Posteriores estudios sobre la presencia de hongos del género *Aspergillus* en la nasofaringe desde caballos sanos versus caballos con enfermedad de aparato respiratorio, o estabulados versus pastoreo entregarían resultados que se podrían complementar con la presente memoria, lo que significaría un valioso aporte al estudio de los organismos fúngicos del aparato respiratorio equino.

7. CONCLUSIONES

- El 75% del total de muestras presentaron evidencias de algún tipo de crecimiento fúngico miceliar.
- Fue posible determinar la presencia de *Aspergillus spp* en el 28,13% del total de la muestra estudiada.
- No se encontró dependencia entre las variables presencia de *Aspergillus spp* en la cavidad nasofaríngea versus las condiciones de estabulación de los animales muestreados.
- No se encontró dependencia entre las variables presencia de *Aspergillus spp* en la cavidad nasofaríngea versus el sexo de los animales muestreados.
- No se encontró dependencia entre las variables presencia de *Aspergillus spp* en la cavidad nasofaríngea versus grupos etarios de los animales muestreados.
- De las 32 muestras tomadas se identificaron un total de 49 estructuras fúngicas aisladas, clasificadas en 7 géneros diferentes, los cuales incluyeron a *Penicillium spp* (50% del total de muestras aisladas), *Cladosporium spp* (34,38%), *Aspergillus spp* (28,13%), *Paecilomyces spp* (12,5%), *Alternaria spp* (12,5%), *Mucor spp* (6,25%) y *Acremonium spp* (9,38%).

8. BIBLIOGRAFÍA

AINSWORTH, Dorothy. M y HACKETT, Richard. P. Alteraciones *del aparato respiratorio*. En: REED, Stephen, BAYLY, Warwick y SELTON, Debra. Medicina interna equina: vol. 1. 2ª ed. Buenos Aires, Inter-Médica, 2005. pp. 321-392.

ART, T [Et. al.]. *Environmental Control of Respiratory Disease*. Equine Respiratory Diseases Lekeux P. (Ed.) International Veterinary Information Service, 2002, número documento B0334.0302. [Fecha de consulta: 14 de Septiembre 2008]. Disponible en: <http://www.ivis.org/special_books/Lekeux/art2/chapter_frm.asp?LA=1>

AUSINA R., V. [et al]. (2004). *Micosis profundas causadas por hongos oportunistas*. En: FARRERAS, P y ROZMAN, Ciril. Medicina interna II. España, Elsevier, 2004. pp. 2392-2395.

BROOKS, Geo, BUTEL, Janet y MORSE, Stephen. Microbiología médica de Jawetz, Menlnick y Adelberg. 18ª ed. México, Manual Moderno, 2004. 606 p

CLEMENTS JM. y PIRIE RS. Respirable dust concentration in equine estables. Part 2: The benefits of soaking hay and optimising the environment in a neighbouring stable. Research in veterinary science; 83: 263-268, 2007.

COMPARISON of the bacterial and fungal flora in the pharynx of normal horses and horses affected with pharyngitis por F. Hoquet "et al". Canadian Veterinary Journal, 26 (11): 342-346, 1985.

CURTIS, Helena y BARNES, N. Sue. *Los hongos (fungi)*. En su: Biología parte II. 6ª ed. Buenos Aires, Panamerica, 2000. pp. 798-815

DERKSEN, F.J. Enfermedades *del aparato respiratorio*. En: MEDICINA y cirugía equina I por Patrick Colahan “et al”. 4ª ed. California, Inter-Médica, 1998. pp. 321-375.

DERKSEN, F.J. y ROBINSON, N.E. *Overview of the Equine Respiratory System*. Equine Respiratory Diseases Lekeux P. (Ed.) International Veterinary Information Service, 2002, número documento B0301.0302 [Fecha de consulta: 14 de Septiembre 2008]. Disponible en:

<http://www.ivis.org/special_books/Lekeux/derksen/chapter_frm.asp?LA=1>

DISSEMINATED acute concomitant Aspergillosis and Mucormycosis in a Pony por C. Thirion-delalande “et al”. Journal of Veterinary Medicine, Series A (52): 121-124, 2005.

DYCE^a K.M, SACKS, W.O y WENSING, C.J.G. *Aparato respiratorio*. En su: Anatomía veterinaria. España, Panamericana, 1991. pp. 164-171.

DYCE^b K.M, SACKS, W.O y WENSING, C.J.G. *Cabeza y cuello ventral del caballo*. En su: Anatomía veterinaria. España, Panamericana, 1991. pp. 484-504.

HERRERA, T y ULLOA, M. El reino de los hongos micología básica y aplicada. México, Publicado por Universidad Nacional Autónoma de México y El Fondo de Cultura Económica, 1990. 552p

HIRSH, Dwight, MACLACHLAN, N. James y WALKER, Richard. *Veterinary microbiology*. 2a ed. Iowa, Blackwell, 2004. 536 p

IDENTIFICATION and seasonal distribution of airborne fungi in three horse stables in Italy por S. Nardoni “et al”. Mycopathologia; 160: 29-34. 2005.

INTRAVASCULAR leukostasis and sistemic Aspergillois in a horse with subleukemic acute myelomonocytic leukemia por V. Buechner-Maxwell “et al”. Journal of Veterinary Internal Medicine, 8: 258-263. 1994.

IN VITRO culture of equine respiratory mucosa explants por A. Vandekerckhove “et al”. The Veterinary Journal, (2008), (Article in press).

KNOTTENBELT, D.C. *Fungal Airway Diseases*. Equine Respiratory Diseases Lekeux P. (Ed.) International Veterinary Information Service, 2002, número documento B0338.0302. [Fecha de consulta: 14 de Septiembre 2008]. Disponible en: <http://www.ivis.org/special_books/Lekeux/knottenbelt/chapter_frm.asp?LA=1>

LEPAGE, O.M. *Disorders of the guttural pouches*. Equine Respiratory Diseases Lekeux P. (Ed.) International Veterinary Information Service, 2007, número documento B0314.0607 [Fecha de consulta: 14 de Septiembre 2008]. Disponible en: <http://www.ivis.org/special_books/Lekeux/lepage/chapter.asp?LA=1>

LONG, Maureen. T. *Mecanismos de las enfermedades infecciosas*. En: REED, Stephen, BAYLY, Warwick y SELLON, Debra. Medicina interna equina: vol. 1. 2ª ed. Buenos Aires, Inter-Médica, 2005. pp. 67-84.

MADIGAN, Michael, MARTINKO, John y PARKER, Jack. Brock biología de los microorganismos. 10ª ed. Madrid, Prentice-Hall Hispanoamérica, 2004. 1011p

MEDICINA^a veterinaria: tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino: vol. I por Otto Radostits “et al”. Madrid, McGraw-Hill, 2002. 1206 p

MEDICINA^b veterinaria: tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino: vol. II por Otto Radostits “et al”. Madrid, McGraw-Hill, 2002. 1008 p

MICROBIOLOGÍA por Roger Stanier “et al”. Barcelona, Reverté, 1996. 750 p.

MILLÁN Henríquez, María Inés. Estudio descriptivo de la microbiota fúngica presente en las bolsas guturales de equinos fina sangre de carrera del hipódromo Chile de Santiago. *Tesis (Medicina Veterinaria)*. Santiago, Chile, Universidad Santo Tomás, 2001. 46 p.

OCURRENCE of fungi from conjuntiva of healthy horses in Tuscany Italy por G. Barsotti “et al”. *Veterinary Research Communications*, 30: 903-906. 2006.

PASCOE, Reg y ASBURY, Woody. *Desing and construction of a breeding farm*. En su: Equine stud farm medicine and surgery. Estados Unidos, Saunders, 2003. pp. 1-19.

PICARD, Jaqueline Anita. Respiratory pathogens in thoroughbred foals up to one year of age on a stud farm in South Africa. *Tesis (MSc Medicina Veterinaria)*. Pretoria, Sudáfrica , University of Pretoria, 2005. 150 p.

PIONTELLI, Eduardo y TORO, María Alicia. Introducción al estudio de los microhongos. Guía de identificación genérica. Parte I Mucorales, Ascomycetes y Deuteromycetes. Cátedra de Medicina. Universidad de Valparaíso, 1989. 127 p

PRESENCIA de *Aspergillus fumigatus* en la cavidad nasofaríngea de equinos por Nora Guida “et al”. *Revista Iberoamericana de Micología*, 22: 160-162, 2005.

RAPER, Kenneth B. y FENNEL, Dorothy I. *The Genus Aspergillus*. Baltimore, Md, The williams & Wilkins Company, 1965. 686 p.

ROBINSON, N.E. Recurrent Airway Obstruction (Heaves). Equine Respiratory Diseases Lekeux P. (Ed.) International Veterinary Information Service, 2002, número documento B0317.1101. [Fecha de consulta: 14 de Septiembre 2008]. Disponible en: <http://www.ivis.org/special_books/Lekeux/robinson/chapter_frm.asp?LA=1>

ST LEGER Raymond J. y SCREEN Steven E. In vitro utilization of mucin, lung polymers, plant cell walls and insect cuticle by *Aspergillus fumigatus*, *Metarhizium anisopliae* and *Haematonectria haematococca*. Micology Research, 104(4): 463-471, Abril. 2000.

TAUCHER, Erica. Bioestadística. Santiago, Universitaria, 1997. 310p

TELL LA. Medical mycology supplement 43, S71-S73. 2005.

TREMAINE, W.H. y DIXON, P.M. . *Diseases of the Nasal Cavities and Paranasal Sinuses*. Equine Respiratory Diseases Lekeux P. (Ed.) International Veterinary Information Service, 2002, número documento B0312.0302. [Fecha de consulta: 14 de Septiembre 2008]. Disponible en: <http://www.ivis.org/special_books/Lekeux/tremaine/chapter_frm.asp?LA=1>

VADILLO, Santiago, PÍRIZ, Segundo y MATEOS, Emilio. Manual de microbiología veterinaria. Madrid, MacGraw-Hill, 2002. 853 p

VON FÜRSTENBERG Bartolucci, Sofía Katherina. Estudio de la casuística en equinos con afecciones del aparato respiratorio pacientes del hospital veterinario de la Universidad Austral de Chile (1992-2002). *Tesis (Medicina Veterinaria)*. Valdivia, Chile, Universidad Austral de Chile, 2003. 62 p.

ZAROR, L. [Et. al.] *Determinación de hongos y bacterias termofílicas en heno y paja en criaderos de caballos criollos chilenos*. Archivos de Medicina Veterinaria, 1999, vol. 31, n°1 [Fecha de consulta: 14 de Septiembre 2008]. Disponible en: <http://mingaonline.uach.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-732X1999000100013&lng=es&nrm=isoLa>

9. ANEXOS

ANEXO I: MATERIALES

- **Tórula nasofaríngea**

Descripción

El sistema corresponde en un estuche de plástico sellado estéril que contiene una tórula de plástico estéril de 65 cm de largo para la recolección de la muestra, la cual se encuentra protegida dentro de un tubo plástico, además el estuche contiene un envase plástico estéril con medio de transporte Stuart. El medio de transporte Stuart se utiliza para mantener la visibilidad de microorganismos de muestras oculares, óticas, faríngeas, etc.

Modo de uso

Se utiliza despegando ambas capas del estuche plástico, se retira la tórula protegida y se introduce sobre la superficie que se quiera muestrear, para desplegar la punta de algodón se empuja la tórula hacia adelante para que rompa el sello del tubo protector, posteriormente se toma la muestra girando la tórula para posteriormente deslizar suavemente la tórula hacia atrás de esta manera cubrir en la protección la punta de algodón nuevamente. Retirar la tórula completamente, separarla del tubo protector e introducirla al envase plástico con el medio Stuart, quebrar la tórula y tapar el envase. Finalmente rotular con los datos.

- **Azul de Lactofenol.**

Solución de azul de lactofenol lista para su uso. Las estructuras fúngicas se tiñen azul oscuro.

Método de preparación (para muestras no tratadas previamente)

1. Depositar una a dos gotas de solución de azul de lactofenol en un portaobjeto limpio.
2. Cubrir con un cubreobjeto la preparación, esperar 2 min.
3. Examinar en el microscopio.

- **Agar Cloranfenicol Sabouraud**

Ingredientes	Gramos/Litro
Hidrolizado de caseína enzimica	5.000
Digerido peptico de tejido animal	5.000
Dextrosa	40.000
Cloramfenicol	0.050
Agar	15.000
pH final (at 25°C)	5.6±0.2

Descripción

Recomendado para el cultivo selectivo de levaduras y mohos, este medio fue descrito por Sabouraud para el cultivo de hongos, particularmente útil para los hongos asociados con lesiones de piel. El medio es a veces usado con antibióticos como el Cloramfenicol para el asilamiento de hongos patógenos desde materiales que contengan grandes cantidades de hongos y bacterias. El hidrolizado de caseína enzimica y el digerido péptico de tejido animal provee componentes nitrogenados. La dextrosa provee una fuente energética. El Cloramfenicol inhibe un amplio rango de bacterias Gram positivas y negativas, lo cual hace el medio selectivo para hongos. El

bajo pH favorece el crecimiento fúngico e inhibe las bacterias contaminantes desde las muestras clínicas.

Método de preparación

1. Suspender 65.0 gramos en 1000 ml de agua destilada.
2. Calentar hasta hervir para disolver el medio completamente.
3. Esterilizar mediante autoclave a 15 lbs de presión (121 °C) por 15 min.
4. Mezclar bien y verter en placas petri estériles.

ANEXO II: MÉTODOS DE ANÁLISIS

- **Montaje con azul de lactofenol mediante uso de cinta adhesiva**

1. Cortar una tira de cinta adhesiva transparente y poner sus extremos entre el dedo pulgar e índice con el lado adhesivo por fuera.
2. Formando un círculo al juntar los dedos, abrir la placa petri con la mano opuesta y presionar la cinta contra la colonia a identificar.
3. Poner una gota de azul de lactofenol en un portaobjeto previamente etiquetado.
4. Presionar la cinta contra el portaobjeto que tiene el lactofenol.
5. Arreglar la cinta contra el portaobjeto usando los dedos y gasa.
6. Depositar otra gota de lactofenol sobre la cinta adhesiva.
7. Poner un cubreobjeto grande (20x40 mm) sobre la cinta.
8. Examinar al microscopio a bajo (4x) y alto aumento (40x).

ANEXO III: REGISTRO DE RESULTADOS

Tabla N°1. Datos registrados del total de muestras

N° muestra/tipific		Nombre	Edad	Sexo	Grupo	Fecha
1	A1	Genova	15	H	A	7/08/09
2	A2	Silueta	4	H		
3	A3	Turión	3	M		
4	A4	Ramadilla	5	H		
5	A5	Ochín	8	H		
6	A6	Regalito	10	M		
7	A7	Vandana	10	H		
8	A8	Flor de cariño	7	H		
9	A9	Palermo	13	M		
10	A10	La posada	11	H		
11	B1	Regencia	5	H	B	7/08/09
12	B2	Lolol	10	M		
13	B3	Profeta	7	M		
14	B4	Turquesa	3	H		
15	B5	Kalina	12	H		
16	B6	Jónica	13	H		
17	B7	Nápoles	9	M		
18	B8	Habitante	15	M		
19	B9	Numancia	9	H		
20	B10	Seductora	4	H		
21	B11	Pintoresco	7	M		
22	B12	Paradigma	8	H		
23	B13	Rigurosa	5	H		
24	B14	Radiólogo	5	M		
25	B15	Keisy	12	H		
26	B16	Legacy	12	M		
27	B17	Thor	3	M		
28	B18	Kodavica	12	H		
29	B19	Topacio	3	H		
30	B20	Quijulla	6	H		
31	B21	Racista	5	H		
32	B22	Safari	5	M		
33	B23	Sorpresa	4	H		
34	B24	Sirenita	4	H		
35	B25	Queñual	6	H		
36	B26	Jelina	13	H		
37	B27	Kendal	12	M		
38	B28	Kempis	12	M		
39	B29	Holocausto	15	M		
40	B30	Secundant	22	M		
41	B31	Doñihue	19	M		
42	B32	Habitual	15	H		
						13/08/09

Tabla N°2. Resultados del crecimiento fúngico sobre el total de muestras positivas

N° muestra	Grupo	Grupo etario	Sexo	Géneros de hongos						
				Acrem	Alter	Asper	Clados	Mucor	Paecilo	Penici
1	A	4	H	-	-	-	+	-	-	-
2	A	1	H	-	+	-	-	-	-	+
3	A	1	M	-	-	+	-	-	-	+
4	A	2	H	+	+	-	-	-	-	-
5	A	2	M	-	-	-	+	-	-	-
6	A	2	H	-	+	-	+	-	-	-
7	A	3	M	-	-	+	+	-	-	-
8	A	3	H	-	-	-	-	-	-	+
9	B	1	H	-	-	-	-	-	-	+
10	B	2	M	-	-	+	-	-	-	+
11	B	2	M	-	-	-	+	-	-	-
12	B	1	H	-	-	+	-	-	-	-
13	B	4	M	-	-	-	-	+	-	+
14	B	1	H	-	-	-	+	-	-	+
15	B	2	M	-	-	-	+	-	-	-
16	B	2	H	-	-	+	-	-	-	-
17	B	1	H	-	-	-	-	-	-	+
18	B	1	M	-	-	-	-	-	+	+
19	B	3	H	+	+	-	-	-	-	-
20	B	3	M	-	-	-	+	-	-	-

21	B	1	H	-	-	+	-	-	+	-
22	B	1	H	-	-	-	+	-	-	+
23	B	1	M	-	-	-	-	-	-	+
24	B	1	H	-	-	+	-	-	-	+
25	B	1	H	+	-	-	-	-	-	+
26	B	1	H	-	-	-	-	-	-	+
27	B	3	M	-	-	-	+	-	-	-
28	B	3	M	-	-	-	+	-	-	+
29	B	4	M	-	-	+	-	-	-	-
30	B	5	M	-	-	+	-	-	+	-
31	B	5	M	-	-	-	-	-	-	+
32	B	4	H	-	-	-	-	+	+	-

Acrem: *Acremonium*

Clados: *Cladosporium*

Alter: *Alternaria*

Paecilo: *Paecilomyces*

Asper: *Aspergillus*

Penici: *Penicillium*

ANEXO IV: SITIOS WEB

DAVID MALLOCH, Department of Botany University of Toronto *Molds: Isolation, Cultivation and Identification* [Fecha de consulta: 3 de Junio 2009]. Disponible en: <<http://www.botany.utoronto.ca/ResearchLabs/MallochLab/Malloch/Moulds/Moulds.html>>

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMATICA, Universidad Interamericana de Puerto Rico *Cultivo de Hongos* [Fecha de consulta: 3 de Junio 2009]. Disponible en: <<http://bc.inter.edu/facultad/amlugo/biol2013/cultihongos.htm>>

DOCTOR FUNGUS *Fungi Descriptions* [Fecha de consulta: 2 de Octubre 2008]. Disponible en: <http://www.doctorfungus.org/thefungi/Description_index.htm>

FACULTAD DE MEDICINA, Universidad de Panamá *Atlas Virtual de Medicina* [Fecha de consulta: 15 de Junio 2009]. Disponible en: <http://www.telmeds.org/AVIM/Amico/hongos_contaminantes/hongos_contaminantes_comunes.htm>

MICROFUNGI RESEARCH Truman State University *Image Galleries* [Fecha de consulta: 8 de Junio 2009]. Disponible en: <<http://microfungi.truman.edu/galleries.php?nodisc=1>>

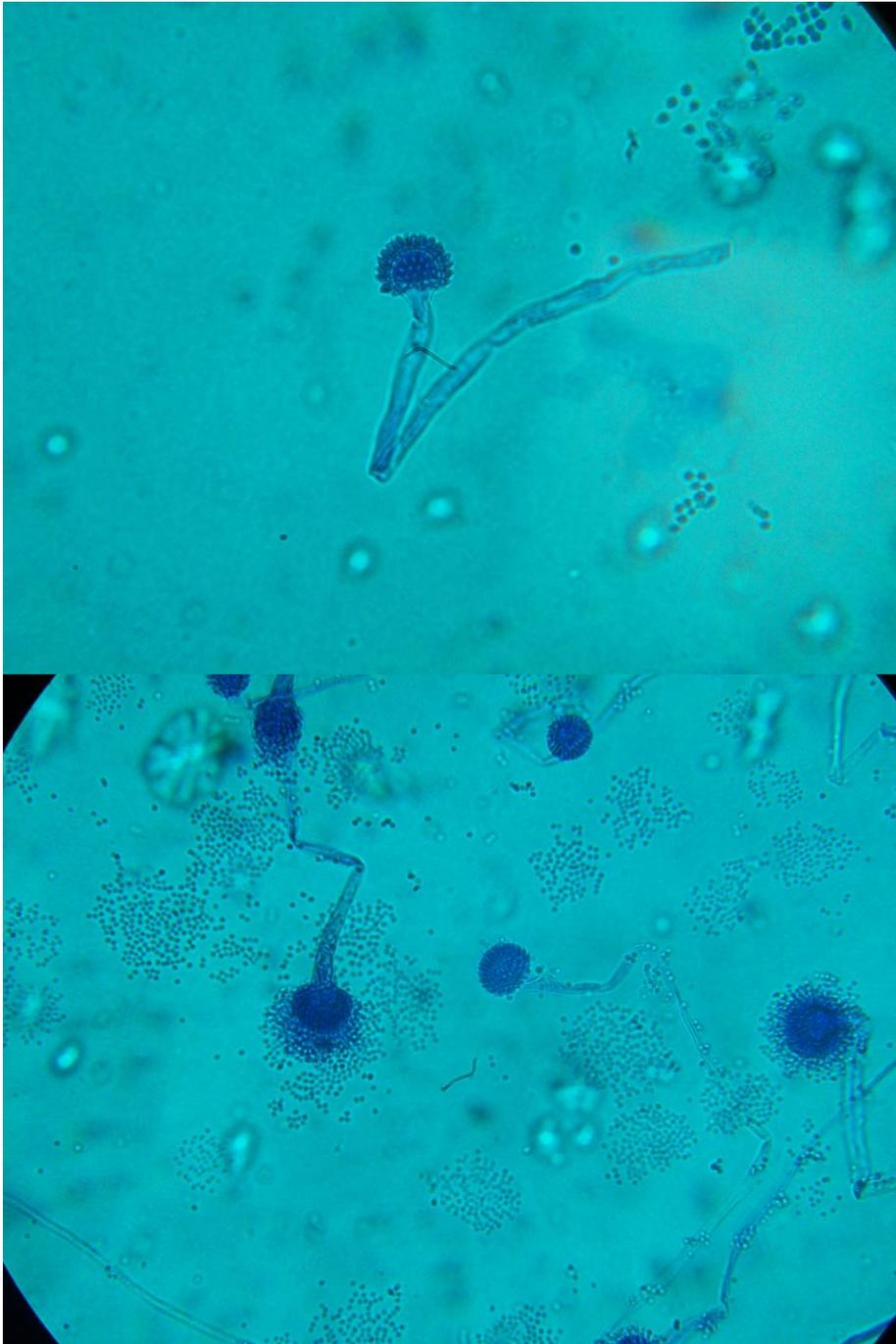
MYCOLOGY ONLINE Mycology Unit at SA Pathology and Hospital and School of Molecular & Biomedical Science at The University of Adelaide *Photo Gallery* [Fecha de consulta: 2 de Octubre 2008]. Disponible en: <<http://www.mycology.adelaide.edu.au/gallery/photos/>>

PFBD Pathogenic Fungi Database *Alphabetical List of Molds* [Fecha de consulta: 15 de Junio 2009]. Disponible en: <<http://timm.main.teikyo-u.ac.jp/pfdb/cover/mold.html>>

THE ASPERGILLUS WEBSITE Fungal Research Trust *Aspergillus* [Fecha de consulta: 2 de Octubre 2008]. Disponible en:
<http://www.aspergillus.org.uk/indexhome.htm?secure/image_library/speciesindex.php~main>

ANEXO V: FOTOGRAFÍAS

Fotografía N°1. *Aspergillus spp*



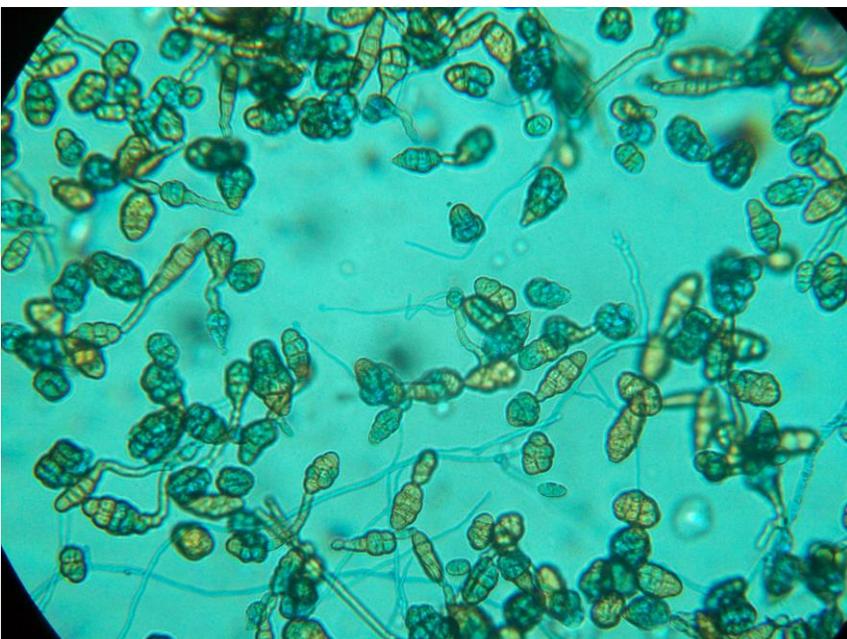
(Imágenes propias, 2009)

Fotografía N°2. *Mucor spp*



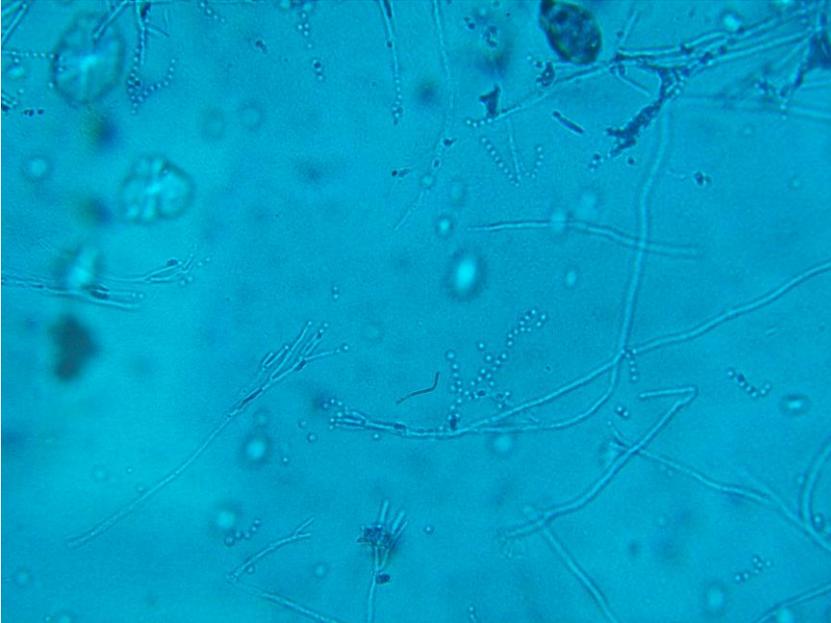
(Imagen propia, 2009)

Fotografía N°3. *Alternaria spp*



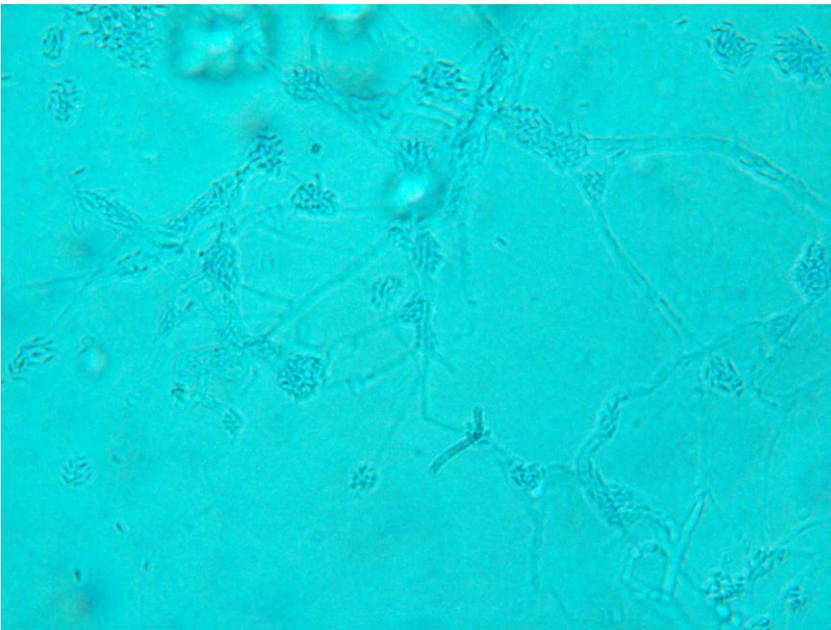
(Imagen propia, 2009)

Fotografía N°4. *Paecilomyces spp*



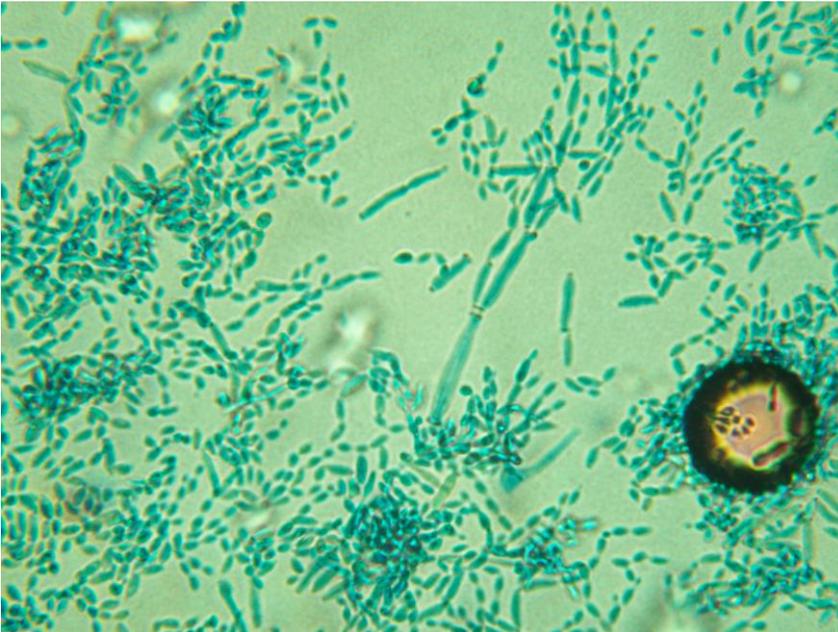
(Imagen propia, 2009)

Fotografía N°5. *Acremonium spp*



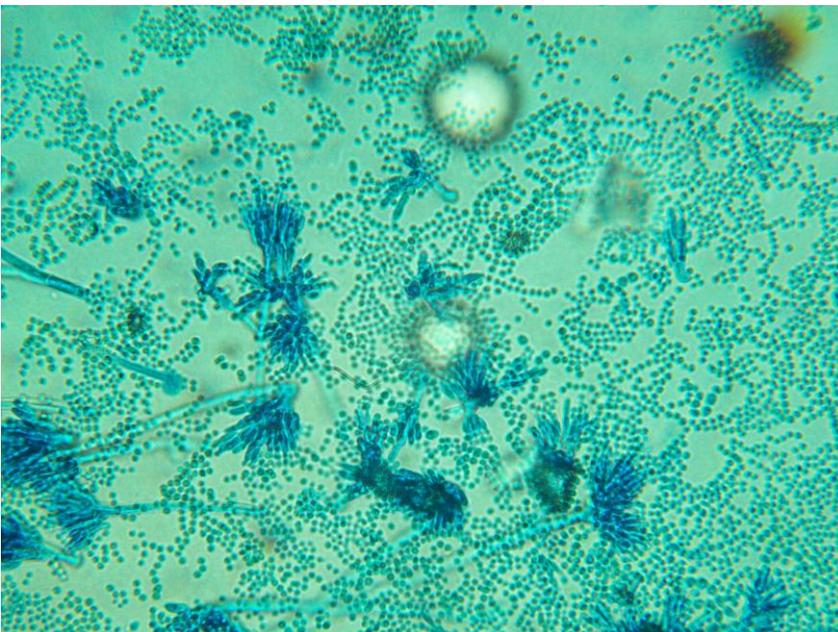
(Imagen propia, 2009)

Fotografía N°6. *Cladosporium spp*



(Imagen propia, 2009)

Fotografía N°7. *Penicillium spp*



(Imagen propia, 2009)

Fotografía N°8. Pesebreras grupo A



(Gentileza Dr. Pablo Larraguibel, 2009)

Fotografía N°9. Pesebreras grupo B



(Imagen propia, 2009)

