

EL DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE ASPERGILLUS FUMIGATUS ES UNA NECESIDAD EN AMBIENTES CARBONÍFEROS

THE DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF ASPERGILLUS FUMIGATUS IS A MUST IN COAL ENVIRONMENTS

*Ibis Margarita De La Hoz De la Hoz*¹, *Aracely García Cuán*²

RESUMEN

El objetivo de ésta investigación fue determinar la importancia del diagnóstico diferencial de *Aspergillus fumigatus* como agente patógeno causante de afecciones respiratorias en ambientes carboníferos, mediante la identificación del gen gliotoxina P como marcador de patogenicidad puesto que en la actualidad los datos epidemiológicos son pocos, además no existen valores establecidos que evidencien el grado de contaminación microbiológica en el ambiente, ni tampoco su relación con pacientes enfermos del tracto respiratorio. Se realizó una revisión bibliográfica buscando la asociación de concentraciones de *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) como agente patógeno en el ambiente con el desarrollo de enfermedades bronquiales sobre todo en zonas carboníferas. También se desconocen los valores límite de exposición en bioaerosoles para prevenir las respuestas tóxicas o alérgicas pues los únicos estudios encontrados son muy obsoletos. Esta investigación permitirá, a través de la adopción de nuevas perspectivas de análisis, replantear criterios diagnósticos de las patologías infecciosas respiratorias, en búsqueda de identificar posibles agentes patógenos causantes de afecciones respiratorias como el *Aspergillus fumigatus*.

Palabras Clave: *Aspergillus fumigatus*, Ambientes carboníferos, Criterios diagnósticos, Afecciones respiratorias, Contaminación microbiológica.

ABSTRACT

The objective of this research was to determine the importance of the differential diagnosis of *Aspergillus fumigatus* as pathogen causing respiratory diseases in coal environments, gliotoxin by identifying the marker gene as pathogenicity P since at present epidemiological data are few, and there are no established values that demonstrate the degree of microbiological contamination environment nor their relationship with patients suffering from respiratory tract. A literature review was conducted seeking partnerships concentrations *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) as a pathogen in the environment with the development of bronchial diseases particularly in coal areas. The exposure limit values are also unknown in bioaerosols to prevent toxic or allergic responses because the only studies found are very outdated. This research will through the adoption of new analytical perspectives, rethink diagnostic criteria for respiratory infectious diseases, seeking to identify possible pathogens causing respiratory conditions such as *Aspergillus fumigatus*.

Keywords: *Aspergillus fumigatus*, Coal environments, Diagnostic criteria, Respiratory conditions, Microbiological contamination

Recibido: Julio 17 de 2014

Aceptado: Agosto 20 de 2014

1 Maestrante Microbiología Molecular Universidad Libre Seccional Barranquilla, Docente Investigadora Universidad de Santander sede Valledupar • ibismargarita@gmail.com

2 Magister en Biología Molecular y Biotecnología, Docente Investigadora, Directora Grupo IMB Universidad Libre seccional Barranquilla • aracely450@gmail.com

INTRODUCCIÓN

El género *Aspergillus* es un organismo de distribución ubicua, se encuentra en el agua, el suelo, el aire, en material en descomposición y otras localizaciones. Esta revisión de la literatura tiene como propósito establecer la distribución del hongo *Aspergillus fumigatus* y la importancia de su determinación como diagnóstico diferencial en las patologías reportadas por los laboratorios pues su sintomatología es muy similar a otras del aparato respiratorio.

En este documento se muestra una revisión del tema sobre el *Aspergillus fumigatus*, describiendo las patologías que produce, la asociación ambiental principalmente en los ambientes carboníferos, los criterios diagnóstico, y por último las técnicas de identificación o aislamiento del gen *Glip*, marcador de patogenicidad, pues desafortunadamente los pacientes expuestos no son evaluados para la detección de este patógeno, debido a que su manifestación clínica no es específica; sin embargo ejerce un impacto muy importante en morbilidad y mortalidad, especialmente en pacientes inmunosuprimidos

Según el Instituto Nacional de Higiene y Seguridad en el Trabajo en España en muchas ocasiones “la determinación de hongos cultivables se utilizan solo para representar la exposición a los alérgenos, y la mayor parte de las determinaciones proceden de los puntos de acumulación de estos agentes o de las muestras del aire ambiental” (1). En una investigación realizada en el departamento del Cesar, Colombia en 2013, se aisló la cepa de *Aspergillus fumigatus*, agente causante de aspergilosis pulmonar invasiva en 85% de los filtros de los equipos de monitoreo ambiental (2). De igual forma, un estudio realizado en Medellín en 2010 mostró la asociación de concentraciones de *Aspergillus fumigatus* como agente patógeno

en el ambiente con el desarrollo de enfermedades bronquiales (3)

Actualmente a nivel nacional las políticas de aseguramiento de la calidad ambiental están orientadas a monitorear el ambiente en las distintas regiones del país en lo concerniente al Material Particulado (PM₁₀ y PM_{2,5}) (4), es decir, contaminante complejo por sus características físicas (distribución de tamaño de partícula, morfología y densidad) y por sus características químicas (compuestos orgánicos e inorgánicos, metales, contaminantes primarios y secundarios), especialmente en aquellas donde se desarrollan actividades de explotación minera (5), dejando de lado la contaminación microbiológica, pues no incluyen dentro de sus parámetros los niveles de contaminación por microorganismos conocidos con el nombre de bioaerosoles, pues en la actualidad no están establecidos los rangos o concentraciones que especifiquen si es alarmante o no su presencia.

ASPERGILLUS FUMIGATUS

El *Aspergillus fumigatus* es un hongo filamentoso hialino, ubicuo en la materia orgánica, saprofito, perteneciente al filo *Ascomycota*. Su nombre se deriva del latín *aspergillus-i* (aspergilo, hisopo para rociar agua bendita) y *fumigatus-a-um* (ahumado) (6); se encuentra formado por hifas hialinas septadas, puede tener reproducción sexual (con formación de ascosporas en el interior de ascas) y asexual (con formación de conidios) (7). Se conocen unas 900 especies de *Aspergillus* (8) que Rapper y Fennell clasifican en 18 grupos, de los que sólo 12 de ellos, se relacionan con enfermedad humana, entre estos el *Aspergillus fumigatus* que es la especie más patógena y la más frecuentemente aislada en los cuadros invasivos (9), cuya transmisión se produce generalmente por inhalación de esporas (10).

PATOLOGÍAS DEL ASPERGILLUS

En la especie humana el hongo puede producir un amplio espectro de patologías correlacionado con el tipo e intensidad de la respuesta inmune del paciente que condiciona la invasividad del microorganismo, agrupables en cuatro síndromes principales: Aspergilosis broncopulmonar alérgica, Aspergiloma, Aspergilosis pulmonar necrotizante crónica y Aspergilosis invasiva, además de otras formas de infección tras diseminación hematogena o contaminación quirúrgica (11).

Uno de los microorganismos que se puede encontrar como contaminante ambiental en una alta incidencia es el *Aspergillus fumigatus* el cual es considerado como un hongo emergente que tiene incidencia del 90% en infecciones fúngicas invasoras (12). La importancia de efectuar investigaciones radica en que la Aspergilosis es una enfermedad con prevalencia de 1 a 2 % a nivel mundial, aunque esta cifra realmente no es alarmante, los estragos que causa este microorganismo en casos de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) marca un alto índice de aparición para Aspergilosis pulmonar invasiva que es una enfermedad grave, con tasa de mortalidad elevada, entre 91% y 95%. Un factor relevante son las dificultades diagnósticas, derivadas de la inespecificidad de la presentación clínica y de la ausencia de pruebas complementarias no invasivas que puedan considerarse definitivas (13).

El mecanismo molecular por el cual el hongo se establece y causa la infección aún no ha sido totalmente elucidado, aunque se han realizado estudios *in vitro*, en donde se ha demostrado que al emplear filtrados de cultivo de *A. fumigatus* se producen daños en el epitelio respiratorio humano. Se considera que este daño está asociado a la existencia de un compuesto de bajo peso molecular identificado como Gliotoxina (14).

Por otro lado, no se debe desconocer la relevancia de estas enfermedades como causas predisponentes a diferentes tipos de cáncer pulmonar y de la pleura, de manera independiente y sinérgica a otros cancerígenos (15), con base en esto en la actualidad se ha tratado de incluir la identificación de éste microorganismo en muestras ambientales y en pacientes con sintomatología de afección respiratoria (16), pues hoy en día se desconocen las relaciones dosis-respuesta entre muchos contaminantes biológicos y enfermedades en los seres humanos, y este quizás, sea el mayor obstáculo a la hora de establecer criterios que faciliten la evaluación de las personas expuestas a dichos contaminantes (17).

ASOCIACIÓN CON AMBIENTES CARBONÍFEROS

El impacto ambiental producido por las esporas del hongo *Aspergillus spp.* tiene gran relevancia, si se orienta a que las afecciones respiratorias causan discapacidad laboral y genera incremento en los gastos en el sector salud, definidos en los tratamientos para las infecciones respiratorias agudas(18).

En la última década el departamento del Cesar ha incrementado su economía basada en la explotación de minas de carbón a cielo abierto liderada por empresas multinacionales como Drummond, y otras más, principalmente en el municipio de El Paso y La Jagua de Ibirico.(19)

Este sector supera ampliamente al agropecuario 36,4% vs. 18,9% (PIB departamental en 2005). Por otro lado esta explotación minera en el centro del Cesar ha disparado los indicadores de enfermedades asociadas con la alta polución generada por micro partículas de carbón suspendidas en el ambiente del área de influencia del complejo minero, muchas de las cuales demandan la intervención de los profesionales en el área de la salud (20).

El Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial (MAVDT) es la autoridad encargada de tomar las medidas de carácter normativo y político para controlar la contaminación ambiental, y para el caso del departamento del Cesar la autoridad ambiental es CORPOCESAR la cual se encuentra encargada de operar el Sistema Especial de Vigilancia de la Calidad del Aire de la Zona Carbonífera del Cesar SEVCA_ZCC, este sistema cuenta con un laboratorio en La Jagua de Ibirico (21).

Existen numerosas investigaciones sobre los contaminantes del aire ocasionados por la explotación minera, las cuales han establecido que dependiendo del período de análisis o tiempo de exposición, existe un mayor riesgo de enfermar y morir por patologías respiratorias y cardiovasculares de las personas expuestas a este ambiente (19). Aunque hasta el momento no se ha considerado el estudio ambiental de los niveles de contaminación por microorganismos causantes de patologías respiratorias en esas zonas, si existen estudios que demuestran que el *Aspergillus* se encuentra disperso en el ambiente y que éste puede ser detectado en el aire no filtrado, en los sistemas de ventilación contaminados, en plantas ornamentales y en alimentos, por lo que existen también equipos con colector de aire tipo ciclón, para la detección de *Aspergillus fumigatus* mediante Q-PCR o PCR en tiempo real (real time PCR), en muestras de aire (22).

Un estudio publicado por la Revista de Información Minera de Colombia 2008, reveló que en 600 habitantes del municipio de la Jagua de Ibirico fueron detectadas deficiencias a nivel pulmonar (asma, faringitis, bronquitis), lo cual hace probable que hongos como *Aspergillum fumigatus* esten entre los agentes etiológicos, pues estos microorganismos se encuentran incluidos en el rango de diámetro de las partículas de la fracción inhalable (23).

En la Universidad de Santander sede Valledupar se llevó a cabo un estudio de aislamiento e identificación de bacterias, hongos y macropartículas en ambientes carboníferos de la Jagua de Ibirico – Cesar. Este demostró que el mayor porcentaje 85% de microorganismo aislados los filtros de monitoreo ambiental en esta zona corresponde a *Aspergillus fumigatus*, lo cual es alarmante para esta población considerando las patologías ocasionadas por este agente etiológico.

Determinar cuál es la capacidad de carga para un contaminante es bastante difícil por la cantidad de ensayos que deben realizarse; debido a esto se toman los contaminantes considerados peligrosos y se determina la capacidad de carga del medio ambiente (24).

La evaluación de la exposición a contaminantes biológicos tiene el inconveniente de que, por el momento, no existen criterios de valoración numéricos que permitan interpretar la situación analizada (25). En general, las temperaturas bajas inhiben el crecimiento de muchos microorganismos; no obstante, algunos de ellos (por ejemplo, mohos y levaduras) se desarrollan bien en ambientes fríos, otras especies microbianas (por ejemplo, *Aspergillus*, *Legionella pneumophila* o *Thermoactinomyces vulgaris*), alcanzan su desarrollo óptimo a temperaturas elevadas.

Una investigación realizada en Aranda- Bogotá en 2005 demostró que no sólo son las bacterias presentes en el aire las responsables de las enfermedades respiratorias, sino que hay un gran número importante de patógenos oportunistas, que pueden causar infecciones en los ojos, piel, vías urinarias, articulaciones y meninges; cuando el individuo está inmunosuprimido (26).

CRITERIOS DIAGNÓSTICOS

El diagnóstico hongo puede tardar varios días (3-5) puesto que debe crecer en un medio de cultivo en el laboratorio para su identificación, lo cual se convierte en un riesgo para el paciente, debido a que esta enfermedad puede ser mortal y el tratamiento debe comenzar lo antes posible (27). Esta mortalidad varía en relación con la inmunodepresión del paciente, estimándose hasta un 95% en pacientes sometidos a trasplante de médula ósea y de un 13-80% en leucemias. El *A. fumigatus* es responsable de aproximadamente 30% de las infecciones por hongos en pacientes que mueren de cáncer y se estima que la Aspergilosis invasiva ocurre entre el 10-25% de los pacientes con leucemia en los que la tasa de mortalidad es del 80 a 90%, incluso con tratamiento.

A nivel mundial este hongo ha sido causante del cierre de quirófanos y salas de hospitalización por su potencial peligrosidad (28), esto debido al tamaño de sus esporas y a su gran capacidad para permanecer suspendidas en el aire, lo cual influye en que estas permanezcan en el ambiente durante largos periodos de tiempo.

Los criterios de diagnóstico son varios, entre estos están: Episodios de obstrucción bronquial (asma), Eosinofilia periférica, Test de reactividad cutánea al antígeno de *Aspergillus*, Precipitación de anticuerpos para el antígeno de *Aspergillus*, Elevación de la Inmunoglobulina E en sangre (29).

Las formas agudas de presentación se caracterizan por la aparición de neuropatía intersticial con infiltración linfocitaria y granulomas. Clínicamente con un cuadro de tos, disnea, fiebre elevada con escalofríos, mialgias y malestar general. En las formas crónicas la fibrosis pulmonar se hace progresiva, difusa e irreversible, asociada a debilidad general, pérdida de peso y disnea severa (30).

El diagnóstico de aspergiloma se realiza con base en criterios de imagen "cavidad pulmonar con bola redondeada", típicamente en lóbulos superiores, y evidencia microbiológica del *Aspergillus* como agente causante (31).

Así mismo dentro de los criterios de diagnóstico está la clasificación del *Aspergillus*, la cual se basa en las siguientes características morfológicas del hongo: Tamaño y forma de las cabezas conidiales, morfología de los conidióforos, fiálides y métulas, presencia de células de Hülle y de esclerocios (32), características macroscópicas de las colonias de *Aspergillus fumigatus* desarrolladas con rapidez sobre medio de cultivo ASD o Czapek a 25°C, y detección de actividades enzimáticas del *Aspergillus* por el método API ZYM (33).

TÉCNICAS DE AISLAMIENTO DEL GEN

Existen muchas metodologías para diferenciar un microorganismo de otro, e identificarlos. Éstas se han basado tradicionalmente en la observación macro o microscópica del microorganismo; si bien es cierto, se han logrado importantes avances en la identificación de muchos de los hongos de importancia médica, aún existen dificultades para el adecuado reconocimiento de ciertos géneros y especies de este grupo de organismos. En los casos en que se puede llegar a la identificación de especie, los procedimientos microbiológicos tradicionales llegan a requerir (especialmente en el caso de los hongos filamentosos), días o semanas. Estas circunstancias plantean la necesidad de desarrollar métodos alternativos, que ofrezcan mayor rapidez en la obtención de resultados y ampliar la identificación de microorganismos de forma confiable. Las técnicas moleculares son una de las opciones que cumplen estos requisitos.

El avance en los estudios investigativos de las últimas tres décadas ha permitido la detección e identificación de microorganismos por técnicas

moleculares que se basan en el análisis de los ácidos nucleicos extraídos de los microorganismos en forma directa, o bien de una muestra que lo contenga (34).

Dentro de las ventajas de las técnicas moleculares de detección se encuentran: Especificidad (pueden detectar solo la molécula o microorganismo de interés), sensibilidad (son capaces de detectar la presencia de un solo microorganismo), rapidez (se puede identificar un microorganismo en menos de 24 horas) y automatización (permiten tener un diagnóstico en un menor tiempo y reducir los costos) (35).

Debido a la dificultad que representa detectar antígenos o anticuerpos contra *Aspergillus spp*, desde el año 2002 se ha intentado hacer diagnóstico molecular. En los primeros ensayos se utilizaba la ampliación por PCR de subunidades ribosomales altamente conservadas en hongos filamentosos, incluido el género *Aspergillus*; recientemente se se logró secuenciar un fragmento de DNA de *A. fumigatus* de un kb y con este PRIMER se ha logrado detectar aspergilosis de manera temprana (Méndez, 2003) y, de igual forma, se ha demostrado el potencial hepatotóxico y cancerígeno de muchos metabolitos como las aflatoxinas y ocratoxinas de diversas especies de *Aspergillus*; y otras, como el gen gliotoxina del *Aspergillus fumigatus* han mostrado efecto inmunosupresor (36).

Las técnicas de aislamiento del genoma son muy útiles al momento de realizar un diagnóstico de forma rápida, y para el caso del *A. fumigatus* mucho más, pues la demora en su identificación complica la situación del paciente afectado (37), debido a que este patógeno ha demostrado en los últimos tiempos resistencia a los agentes anti fúngicos; así mismo, estudios de microbiología molecular han logrado confirmar la existencia de un teleomorfo de *A. fumigatus* que podría tener grandes repercusiones desde un punto de vista clínico, debido a que se podría originar una descendencia con mayor virulencia y/o resistencia.

(38). Una revisión de las modalidades de análisis y su uso en el establecimiento de un diagnóstico de Aspergilosis es muy oportuna teniendo en cuenta la gravedad de la enfermedad (39). Además, la PCR es una de las técnicas moleculares más ventajosas cuando la demostración histopatológica es nula, cuando los criterios de Aspergilosis y la presencia de hifas concuerdan, pero los pacientes presentan resultados de cultivos negativos (40).

Es preciso mencionar que el *Aspergillus* tiene sus propios mecanismos para lesionar los tejidos y para facilitar la invasión en un organismo; las conidias de los *Aspergillus* liberan ciertas toxinas que inhiben el movimiento ciliar, un marcador de patogenicidad es el gen de gliotoxina (41). Se ha demostrado que la Gliotoxina disminuye el movimiento de los cilios y produce lesiones en el epitelio de la mucosa. Aunque la capacidad del *Aspergillus fumigatus* para la producción de gliotoxina ha recibido atención en los últimos años, no ha habido la suficiente difusión de los hallazgos. La gliotoxina ha demostrado tener una potente actividad inmunodepresora *in vitro* ya que inhibe la adherencia de macrófagos pulmonares y peritoneales, y puede producir apoptosis de los macrófagos y algunas otras células de la línea hematopoyética. (18)

DISCUSIÓN

Recientemente, las técnicas moleculares han sido aplicadas para el diagnóstico de hongos y para la identificación de especies, lo que también ha permitido hallar nuevas especies de hongos que son morfológicamente similares al *A. fumigatus* (42), algunas de las cuales han sido implicadas en casos graves de invasión ósea trabecular, cutánea, cerebral, hepática y Aspergilosis pulmonar (43); estas especies podrían ser principalmente resistentes a anti fúngicos, azoles o a la anfotericina B (44), mientras que *A. fumigatus* es generalmente susceptible a los anti fúngicos que están disponibles para el tratamiento clínico (45). Esto ha permitido que se

modifiquen los esquemas de tratamiento iniciando con la identificación del agente causal primero, para establecer luego los criterios de tratamiento adecuados (46). Teniendo en cuenta que *A. fumigatus* puede representar una parte considerable de los casos clínicos de Aspergilosis, su caracterización molecular es esencial para la correcta identificación de las especies dentro de la sección *Fumigati*.

El uso de estas herramientas moleculares para la identificación del genoma de *Aspergillus*, permite identificar las subespecies en poco tiempo (47). De igual forma, se han logrado aislar y purificar compuestos genotóxicos y citotóxicos de moldes de aire interior, contaminado por *Aspergillus fumigatus* y uno de estos compuestos fue identificado como gliotoxina, un metabolito secundario que le confiere patogenicidad al *Aspergillus* (48).

Las técnicas moleculares para la detección de microorganismos son muy beneficiosas. Los grandes avances de la biología molecular han permitido monitorear la cinética de reacción, conocer la cantidad de ADN, y detectar la presencia de variaciones genéticas, y detecta genes que le confieren la virulencia y/o resistencia a anti fúngicos o antimicrobianos (49). Aunque se debe aclarar que estos métodos no sustituyen los convencionales sino que los complementan, pues la integración de ellos lleva a resultados eficaces.

Es importante direccionar los trabajos de investigación hacia la determinación de la patogenicidad o virulencia de estos microorganismos a través de estudios moleculares donde se evidencie la presencia del gen patogénico, puesto que de esta forma se mostraría el impacto del hallazgo de éstos.

CONCLUSIÓN

Hasta la fecha, la mayor parte de los trabajos de investigación realizados en calidad del aire, se centran en estudiar la contaminación atmosférica generada

por fuentes móviles y fuentes fijas en zonas urbanas, sin embargo, son pocos los trabajos relacionados con los contaminantes de procedencia biológica (bioaerosoles), y/o fragmentos tóxicos a partir de microorganismos vivos. Aunque en el mundo existen múltiples países con importantes áreas de explotación minera a cielo abierto, las cuales son fuente fugitiva de material particulado con un gran impacto ambiental sobre las poblaciones aledañas, no hay especificaciones sobre los niveles que incluir estos parámetros en las mediciones de contaminación.

Investigar más sobre este patógeno ambiental ofrece un aporte a la comunidad académico-científica y a las personas que trabajan en el sector salud (médicos, bacteriólogos, microbiólogos entre otros), pues a partir de ello se pretende incentivar la inclusión en protocolos de diagnóstico diferencial a los pacientes que ingresen con afecciones respiratorias que habiten en zonas de influencia minera o ambientes carboníferos. Por otro lado el incluir los parámetros microbiológicos en los monitoreos ambientales que busquen la presencia del hongo *Aspergillus fumigatus* sería de gran provecho para las comunidades donde existe una alta contaminación por partículas, puesto que permitiría establecer los valores de carga microbiana ambiental como sistema de gestión de la calidad del aire. Al tener otra opción de diagnóstico de afecciones respiratorias se podrían establecer, a tiempo, patologías de gran interés médico, como también avanzar en estudios de comportamiento o perfil epidemiológico a través de la epidemiología molecular.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mendoza R. *Aspergillus spp.* Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el trabajo. Fichas de Agentes Biológicos Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS). Base d'Observation gents Biologiques. 2012.
2. De La Hoz I, De La Hoz D, Salinas V. Aislamiento e Identificación de Bacterias, Hongos y Estudios

- de Partículas en Ambientes Carboníferos de la Jagua de Ibirico Cesar 2013. Universidad de Santander UDES sede Valledupar. 2013.
3. Sánchez J, Zuluaga S, Cardona R, Sensibilización a aero-alergenos en pacientes alérgicos de Medellín, Colombia. *Revista Alergia México CMICA*.2012; 59(3).
 4. Resolución 610 de 2010 Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. Niveles Máximos Permisibles para Contaminantes Criterio.
 5. Angulo L, Huertas J, Restrepo G. Caracterización de Partículas Suspendidas (PST) y Partículas Respirables (PM 10) producidas en área de Explotación Carbonífera a Cielo Abierto. *Información tecnológica*.2011; 22(4): 23-34
 6. Bial – Arístegui. *Aspergillus fumigatus* Fresenius *Revista iberoamericana*. 2002; 10-18.
 7. Pontón J, Gené J, Guarro J, Quindós G. *Hongos y Actinomicetos Alergénicos Bilbao: Universidad Autónoma de México*; 2002.
 8. Alcalá L, Muñoz P, Peláez T, Bouza E. *Aspergillus y aspergilosis. Control de Calidad SEIMC*. Servicio de Microbiología. España: Hospital General 3niversitario Gregorio Marañón; 2006.
 9. Soto Leonardo CM. Producción de Aspergílinas y antisueros Anti- *A. fumrgatus*, anti-flavus y anti Níger para el diagnostico de Aspergilosis pulomonas Universidad de San Carlos -Guatemala facultad de Ciencias Químicas y farmacia; 2003.
 10. Casas Fernández de Tejerina JM, Arrieta Acha V, Suárez López A, Martínez Litago E, Oteiza Otasso J, Elxerberria Iekuona D. *Aspergiloma Pulmonar*. Servicios de Medicina Interna del Complejo Hospitalario de Navarra. Pamplona – Norte de Santander; 2012.
 11. Serrano R, Gusmao L, Amorin A, Araujo R. Rapid identification of *Aspergillus fumigatus* within the section *Fumigati*. *BMC Microbiology*. Universidad de Porto, Portugal – España. 2011. The electronic version of this article is the complete one and can be found online at: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/11/82>
 12. Álvarez Lerma F, Rey Pérez A. Aspergilosis Pulmonar en un paciente critico no inmuno-deprimido. *Revista Iberoamericana de Micología*.2012; 29: 90-2.
 13. Valle JM, González Barcala J, Álvarez Dobaño J M, Valdés L. La aspergilosis pulmonar invasiva en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica. *Revista Médica de Chile*.2010; 138: 612-20
 14. Moreno Ramos C, Valdés Martínez SE, Cervantes Olivares RA. Evaluación de la producción de gliotoxina en 10 cepas de *Aspergillus fumigatus* obtenidas de aislamiento clínico. *Técnica Pecuaria en –México*.2002; 40 (2):139-48.
 15. Kim Leal JA, Polo Olivar N, Utilidad de la detección antigénica de Galactomanano de *Aspergillus spp* en lavado broncoalveolar y suero para diagnóstico precoz de Aspergilosis invasiva en pacientes con cáncer. Colombia: Universidad Javeriana, facultad de ciencias, Programa de Bacteriología; 2008.
 16. Alsina T, Benitez R, Cacace M, Ferreira A. Aspergilosis broncopulmonar alérgica en un adolescente. Reporte de un caso. *Revista Anacem*. 2012; 6 (2).
 17. Ausina Ruíz V. *Micosis profunda causada por hongos oportunistas*. España: Editorial Hartcourt S.A; 2009.

18. Calleja Hernández A. Contaminación Biológica- Criterios de Valoración. Licencia en Ciencias Biológicas. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo NTP 409; 1999.
19. Boletín Informativo. Corporación Autónoma del Cesar- CORPOCESAR; 2011.
20. Ministerio de Minas y Energía, Dirección de Minería Empresarial Comportamiento de la Producción Minera y Exportaciones de Colombia Primer Trimestre de 2014. Sistema de Información Minero Colombiano.
21. Guías para la calidad del aire. Oficina Regional para Europa de la OMS Sistema de Información sobre la Gestión de la Calidad del Aire (AMIS, por sus siglas en inglés; 2000.
22. Vásquez Hidalgo A., Caracterización biológica del hongo *Aspergillus* sp y su impacto en la salud. Repositorio Institucional de la Universidad de El Salvador Sistema Bibliotecario. Revista la Universidad de El Salvador. 2008; 3: 5-23.
23. Documento Instituto de Vigilancia Ambiental y Salud. Revista de información Minera de Colombia; 2008
24. Cezar Fontana MB. Estudio Epidemiológico de Alergia a Hongos y Otros Neumoalergenos, en estudiantes de Medicina de la Universidad Autónoma de Barcelona, con Relación a los Niveles Fúngicos Ambientales. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona, Unitat de Botànica Departament de Biologia Animal, Biologia Vegetal y Ecologia; 2009
25. Angulo L. Caracterización de Partículas Suspendidas (PST) y Partículas Respirables (PM 10) producidas en área de Explotación Carbonífera a Cielo Abierto. *Información tecnológica*.
26. Rodriguez Rey RM, Fula Huertas YM. Evaluación de la contaminación del aire por microorganismos patógenos en los bioaerosoles, en una zona de alta actividad industrial y flujo vehicular de la localidad de Puente Aranda-Bogota. Bogota D.C: Universidad de la Salle; 2005.
27. Cuervo-Maldonado S I, Gómez JC, Rivas P, Guevara FO. Actualización en Aspergilosis con énfasis en aspergilosis invasora. Artículo de Revisión. Revista de *Infectología*. 2010; 14(52):131-S144 .
28. Bellangera A. P., Contribución de un colector de aire en líquido de tipo ciclón para la detección de *Aspergillus Fumigatus*. Journal of Occupational and Environmental Hygiene; 2012.
29. David W, Denning M. Treatment of pulmonary aspergilosis, en UptoDate. Waltham (Last literature review versión 19) Editorial Burton; 2011.
30. MSD salud Infecciones en personas con las defensas bajas. Manual de Merck, Información médica para el Hogar, capítulo 188. 2005.
31. D.Servicios, C. F. *Aspergiloma Pulmonar*. Pamplona: Servicios de Medicina Interna del Complejo Hospitalario de Navarra. 2012
32. *Aspergillus, Limpieza y desinfección hospitalaria*.. Recuperado el 07 de 02 de 2014, de <http://www.saludambiental.net/> 2006 y Unda F, A. J. Identificación de hongos de importancia clínica mediante técnicas moleculares. *Enfermedades infecciosas, Microbiología Clínica*. 2010 .
33. Méndez. M., Micosis por Oportunistas. México: Departamento de Microbiología y parasitología. 2003. y Robledo C. Uso de técnicas moleculares para realizar estudios de biodiversidad microbiana en ambientes petroleros. Revista de Divulgación Científica. 2009.

34. Rodríguez R. Detección de Microorganismos por técnicas moleculares. Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma. 2009.
35. Yaguchi TH. Molecular phylogenetics of multiple genes on *Aspergillus* section *Fumigati* isolated from clinical specimens in Japan. *Jpn J Med Mycol*, 48. 2007
36. Kupfahl C., Heinekamp T., Geginat G, Ruppert T., Härtl A., Hof H., and Axel A. Brakhage. Deletion of the gliP gene of *Aspergillus fumigatus* results in loss of gliotoxin production but has no effect on virulence of the fungus in a low-dose mouse infection model. *Molecular Microbiology*. 2006.
37. Hope W., Diagnóstico de laboratorio de la Aspergilosis invasiva. *Revista Infectious Disaeses*.
38. Tratamiento de la Aspergilosis: Guías para la práctica clínica de la Sociedad de Enfermedades Infecciosas de los Estados Unidos de América (IDSA). *Clinical Infectious Diseases*, 327. 2005.
39. Serrano R., G. L Rapid identification of *Aspergillus fumigatus* within the section *Fumigati*. *BMC Microbiology*. 2011
40. Antioquia, U. D. Manual de procedimientos y técnicas de laboratorio para la identificación de los principales hongos oportunistas causantes de micosis humanas. *Medicina & Laboratorio,, Instituto Nacional de Salud*, 2010.
41. Araujo R., Rapid method for testing the susceptibility of *Aspergillus fumigatus* to amphotericin B, itraconazole, voriconazole and posaconazole by assessment of oxygen consumption. *J Antimicrob Chemother*, 2008;62.
42. Nieminen S., R. K. Isolation and Identification of *Aspergillus fumigatus* Mycotoxins on Growth Medium and Some Building Materials. *American Society for Microbiology Applied And Environmental Microbiology*. 2002
43. Tovar LJ. Aspergilosis. *Laboratorio de Investigación Médica, Hospital de Especialidades C.M.N. Siglo XXI. Catálogo UNAM*. 2012
44. Pérez S., et al Sensibilidad y patogenicidad en *Aspergillus fumigatus*: ¿existe alguna relación. *Revista Iberoamericana de Micología*. 2009 *Published by Elsevier España* .
45. Colegio Mayor de Cundinamarca. La PCR y La Biología Molecular. *Dogma Central De La Biología Molecular*. 2009.
46. Espinosa H., T. C. Caracterización morfológica, fisiológica y molecular de tres cepas fúngicas productoras de pigmentos. . *Universidad Autónoma de Coahuila. Saltillo Coahuila, México.*, p 85. 2004.
47. Rendón N. *Determinación de la presencia gen codificador de la aflatoxina por Aspergillus flavus en la castaña por PCR (Reaccion e n cadena de la polimerasa)*. La Paz, Bolivia: facultad de Medicina. 2007.
48. Moreno Ramos C, Valdés Martínez S E, Cervantes Olivares R A. Evaluación de la producción de gliotoxina en 10 cepas de *Aspergillus fumigatus* obtenidas de aislamiento clínico. *Tecnica Pecuaria en -México*.
49. Balajee S A, Mistaken identity: *Neosartorya pseudofischeri* and its anamorph masquerading as *Aspergillus fumigatus*. *Journal Clin. Microbiol*, 3:5996-5999. 2005