



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
“ZARAGOZA”**

**“DETERMINACIÓN DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS Y
CUANTIFICACIÓN DE HONGOS EN PARTÍCULAS DE AEROSOL
COLECTADAS EN FILTROS DE TEFLÓN ESTÉRILES”**

**T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A:
RODRÍGUEZ PERALTA TRACY**

**DIRECTOR: DR. RUBÉN MARROQUÍN SEGURA
ASESORA: MTRA. DORA ALICIA PÉREZ GONZÁLEZ**

MÉXICO, D.F.

NOVIEMBRE 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedicatorias

A la persona que sin importarle una vida de sacrificio y esfuerzo, siempre me alentó con su apoyo, amor y confianza para culminar esta meta, por la cual viviré eternamente agradecida.

Dios te bendiga Padre.

A mi madre y a mis hermanas porque gracias a su amor incondicional y valiosos consejos, me dieron la fuerza que me ayudó para poder realizar este gran anhelo.

A Luis porque gran parte de esto te lo debo a ti y siempre estuviste a mi lado para escucharme y brindarme apoyo....pero sobre todo porque siempre tendrás un lugar especial en mi corazón.

Gracias

Tracy Rodríguez Peralta

Agradecimientos

A mi director de tesis: Dr. Rubén Marroquín Segura por su asesoría y el apoyo que me brindó desde el primer momento, con lo cual confirmo que es una persona que se gana el cariño y respeto de todo aquel que le conoce.

A mi asesora de tesis: Mtra. Dora Alicia Pérez González por su predisposición permanente e incondicional en aclarar mis dudas, pero sobre todo por ser una persona de admirable pensamiento.

A los profesores Dr. Horacio Tovalín A., Q.F.B. Ma. Galia Martínez F., M.C. Maurilio Flores P. y M. en C. Claudia Fabiola Martínez R., por sus substanciales sugerencias, sin las cuales no hubiese sido posible llegar a la culminación de este trabajo.

Gracias

Tracy Rodríguez Peralta

ÍNDICE

RESÚMEN.....	6
INTRODUCCIÓN.....	7
1. FUNDAMENTACIÓN.....	8
1.1 Endotoxinas bacterianas.....	8
1.1.1 Estructura de las endotoxinas.....	10
1.1.2 Métodos de detección de endotoxinas.....	12
1.1.2.1 Prueba en conejos.....	12
1.1.2.2 Detección de endotoxinas mediante el Ensayo de Coagulación de la Hemolinfa de Amebocitos de <i>Limulus</i> (LAL).....	13
1.1.2.2.1 Métodos del ensayo LAL.....	16
1.1.2.2.2 Fundamento bioquímico.....	18
1.1.2.2.3 Mecanismo de reacción.....	18
1.1.2.2.4 Aplicación del método LAL.....	19
1.1.3 Efectos producidos por inhalación de endotoxinas bacterianas.....	20
1.2 Hongos.....	21
1.2.1 Características generales de los hongos.....	22
1.2.2 Características estructurales de los hongos.....	23
1.2.3 Clasificación de los hongos.....	24
1.2.4 Efectos sobre la salud debido a la presencia de hongos.....	26
1.2.4.1 Micosis en el ser humano.....	26
1.2.4.2 Los hongos como aeroalergenos.....	29
1.2.4.2.1 Controles ambientales.....	33
1.2.5 Métodos para el estudio de los hongos.....	33

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	35
3. OBJETIVOS.....	36
4. HIPÓTESIS.....	37
5. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	38
6. MATERIAL Y EQUIPO.....	39
7. DIAGRAMA DE FLUJO.....	41
8. MÉTODOS.....	42
8.1 Pruebas preparatorias.....	42
8.2 Determinación de endotoxinas bacterianas.....	43
8.3 Cuantificación y aislamiento de hongos.....	45
9. RESULTADOS.....	46
10 DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	63
11 CONCLUSIONES.....	67
12. PROPUESTAS.....	68
13. ANEXOS.....	69
REFERENCIAS.....	74

RESÚMEN

Se determinaron las concentraciones de endotoxinas bacterianas mediante el método de gelificación de *Limulus* y se cuantificaron hongos en partículas de aerosol, colectadas en filtros de teflón estériles de 37 mm.

Las muestras analizadas correspondieron a cuatro sitios diferentes, identificados como: (T0) Distrito Federal, (T1) Estado de México, (T2) Hidalgo y (T3) Tlaxcala, se tomaron muestras de interiores y exteriores de hogares, así como muestras que representaban a las personas expuestas a contaminantes durante sus actividades, a las cuales denominamos personales.

Los resultados más significativos fueron los siguientes: la concentración de endotoxinas mayor se registró en exteriores de hogares del Estado de Tlaxcala (22.04 UE/mg), la menor en muestras personales del Estado de México (0.2513 UE/mg). El sitio con mayor número de colonias de hongos aisladas fue el Distrito Federal (245 colonias) y el género aislado con más frecuencia en todas las muestras ambientales fue *Penicillium sp.*

Discusión. La presencia de endotoxinas detectadas por la prueba de *Limulus* son indicadores de presencia de coliformes, que probablemente nos sugiera fecalismo al aire libre o descargas de agua negras a cielo abierto. La presencia de esporas de hongos en el ambiente debe correlacionar con mayor incidencia de alergias en la población contra éste tipo de microorganismos. Conclusión. Este tipo de información es muy importante pues debe influir en las políticas a seguir, por parte de las autoridades responsables del sector salud, así como de ecología.

INTRODUCCIÓN

La contaminación del aire constituye uno de los principales problemas ambientales de las zonas urbanas, particularmente de las megaciudades. El crecimiento poblacional y los mayores niveles de industrialización, han llevado inevitablemente a una mayor demanda de energía, consumo de combustibles fósiles, así como también a una mayor emisión de contaminantes hacia la atmósfera. Como resultado la contaminación del aire, además de ser uno de los principales problemas ambientales del siglo, tiene importantes consecuencias, en términos de la salud de las poblaciones y de costos económicos a la sociedad, es importante aumentar la comprensión de los problemas de la calidad del aire en las megaciudades mediante la medición y modelación de los contaminantes atmosféricos, además de fortalecer la base científica para la evaluación y el diseño de políticas dirigidas a la mejora de la calidad del aire mediante el desarrollo de información científica que ayude a entender mejor los procesos de generación de contaminantes.

En éste sentido, se sabe que las endotoxinas están implicadas en enfermedades asociadas con la calidad del aire ambiental, afectando así a la población que se expone a sus diversos componentes, por ello el ensayo utilizado más extensamente en la actualidad para la determinación de endotoxinas bacterianas es el ensayo de hemolinfa de *Limulus* (LAL) debido a que es una prueba simple, rápida, efectiva y confiable, y es un indicador de presencia de coliformes. Así mismo es muy importante la cuantificación e identificación de hongos en el aire, que tienen una importancia clínica por su potencial patogenicidad y por su capacidad para inducir alergias y atopias (cuadros asmáticos) en un porcentaje elevado de la población.

1. FUNDAMENTACIÓN

1.1 ENDOTOXINAS BACTERIANAS

Las endotoxinas son macromoléculas complejas que contienen lipopolisacáridos-lípido A-KDO; y forman parte integral de la membrana externa de la pared celular de las bacterias Gram negativas. Son liberadas durante la muerte bacteriana y en parte durante su metabolismo, poseen alta resistencia a la destrucción térmica y química, sobreviviendo a los métodos ordinarios de esterilización, sobre todo se caracterizan por su potente actividad biológica, por lo que son capaces de producir profundos cambios fisiológicos cuando son administradas por vía parenteral, de tal forma que al estar en contacto en el torrente sanguíneo del hombre provocan una serie de respuestas fisiológicas, en su mayoría de carácter perjudicial y en casos extremos la muerte dependiendo de la concentración a la que se encuentren.^{1,2}

(Cuadro 1)

Por ello al ser pirógenos muy potentes y estables a temperaturas elevadas y por estar asociadas a las bacterias Gram negativas, se encuentran en todas partes contaminando lo que nos rodea debido al fecalismo al aire libre de humanos y animales; mediante otras fuentes (plantas de tratamiento de aguas residuales, centros de manejo de desechos sólidos, vegetales, fuentes de agua) o simplemente del suelo, donde las bacterias de vida libre se multiplican rápidamente por requerir de muy pocos nutrientes.³

Ante esta presencia universal en el ambiente su concentración depende de sí se mide en el interior o en el exterior de una edificación y del uso que ésta tenga. En ambientes intramuros es más común medir los niveles de endotoxinas en depósitos de polvo, donde éste se recicla de manera continua y pasa otra vez del suelo al aire, según las actividades que ahí se realicen. Los valores presentan gran variación, pero en general podemos mencionar que se encuentran en un intervalo de 1 a 1000 UE/mg (unidades de endotoxinas por mg de polvo). Lo más frecuente es que se encuentren entre 10 y 100 UE/mg, incluyendo lugares como las escuelas.^{3,4}

CUADRO 1. CARACTERÍSTICAS DE LAS ENDOTOXINAS

Característica	Endotoxina
Fuente bacteriana	Desprendidas de las paredes celulares de las bacterias Gram negativas
Naturaleza química	Lipopolisacáridos-lípido A-KDO
Peso Molecular	Calculados entre 5000 y 9000000 daltons
Resistencia al calor	Resisten el autoclave. Solo se eliminan a 250 °C, 30 min
Inmunología	No forman toxoides
Farmacología	Varios efectos, pero principalmente causan fiebre, choque generalizado o hipersensibilidad
Dosis letal	Muy grande

Tomado y adaptado de: Jawetz.¹(1995).

1.1.1 ESTRUCTURA DE LAS ENDOTOXINAS

En su estado natural la endotoxina bacteriana es un complejo formado por lipopolisacáridos-lípido A-KDO, este complejo se caracteriza por poseer carga negativa y alto peso molecular.^{5,6} (FIGURA 1)

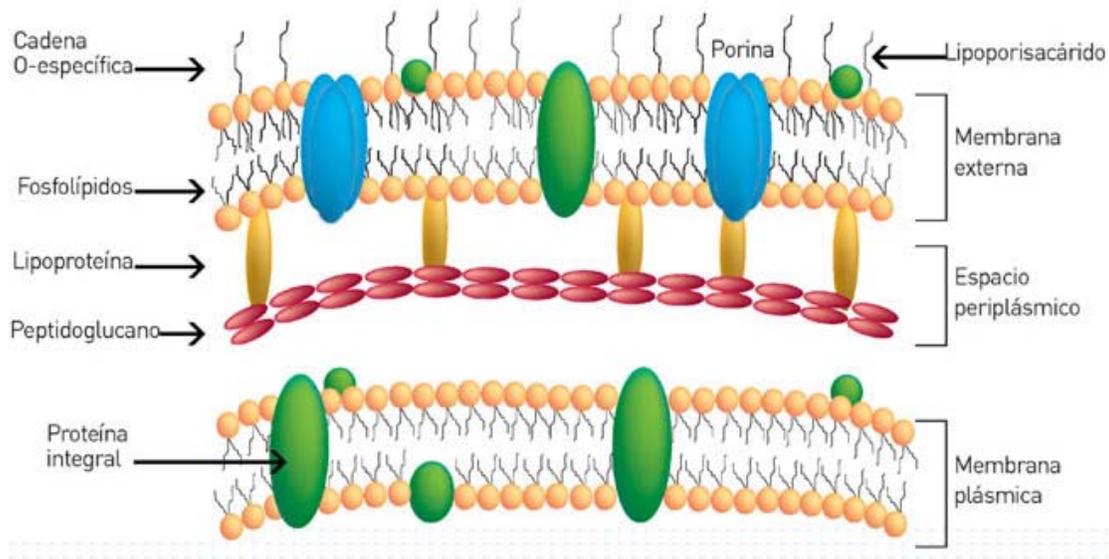


FIGURA 1. MEMBRANA CELULAR DE LAS BACTERIAS GRAM NEGATIVAS

Tomada de: Rosas et. al.³(2006).

Las endotoxinas altamente purificadas, no contienen proteínas y por su composición química se les considera como compuestos lipopolisacáridos, (LPS). Las endotoxinas aisladas de la membrana externa de las bacterias Gram negativas (LPS) son anfífilos (anfipático, un extremo hidrófilo y el otro extremo hidrófobo) con tres regiones principales covalentemente unidas: polisacárido O-específico (región I), polisacárido de base “núcleo” (región II) y lípido A (región III).⁵ (FIGURA 2)

REGIÓN I. DE CADENAS O-ESPECÍFICAS.

Es la región externa constituida por cadenas poliosídicas constituidas por la unión repetida de una gran variedad de azúcares. Algunos de ellos son comunes a la mayoría de los LPS (glucosa, galactosa, manosa, glucosamina) mientras que otros no existen más que en ciertos serotipos (galactosamida, tivelosa, colitosa, paratosa). Cada serotipo bacteriano sintetiza un solo tipo de LPS caracterizado por una composición química y una estructura especial de las cadenas y su

antigenicidad, por lo que existen tantos LPS diferentes como serotipos bacterianos; siendo así la región responsable de la inmunoespecificidad de la endotoxina.^{1,5,7,8}

REGIÓN II. POLISACÁRIDO DE BASE “NÚCLEO”.

En las bacterias del género *Salmonella*, la región del núcleo está formada por un heterooligosacárido corto, constituido por cinco componentes: el KDO (2-ceto-3-deoxioctonato), en la forma fosforilada, la N-acetilglucosamina, la D-glucosa, la D-galactosa, la L- glicerol- D- manoheptosa fosforilada.^{1,5}

La estructura del núcleo sólo está un poco modificada de una especie a otra, y no hay más que raras variaciones de la composición del núcleo en una misma especie bacteriana.

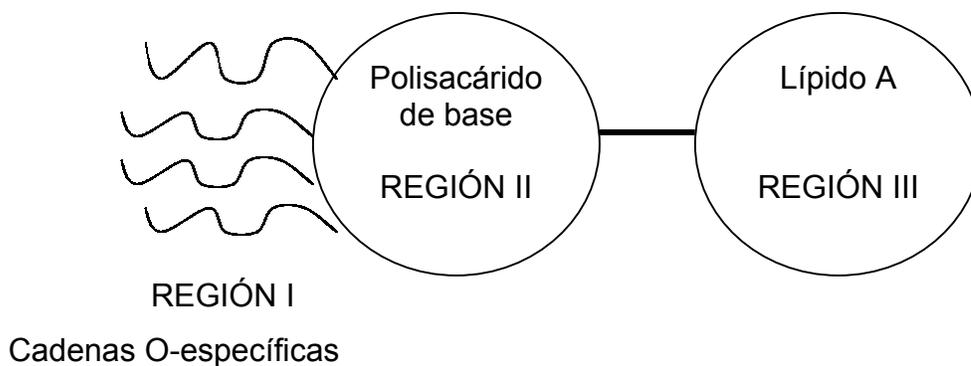


FIGURA 2. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA ESTRUCTURA DE UN LIPOPOLISACÁRIDO

REGIÓN III. LÍPIDO A.

Es la estructura básica más constante de los LPS. Se trata de un fosfoglicolípido de constitución original con propiedades anfífilas: en efecto, se forma de un disacárido de glucosamina, que está altamente sustituido con aminas y esterificado a un ácido graso de cadena larga; comúnmente es el ácido β -hidroximiriístico de catorce carbonos.^{1,5,8} (FIGURA 3)

Esta región es la responsable de la pirogenicidad y de la mayoría de las actividades biológicas de la endotoxina, por lo que también es responsable de su

hidrofobicidad por su carga negativa. El Lípido A no existe en estado libre, se obtiene por ruptura de su ligadura con el KDO o por síntesis química.^{1,9}

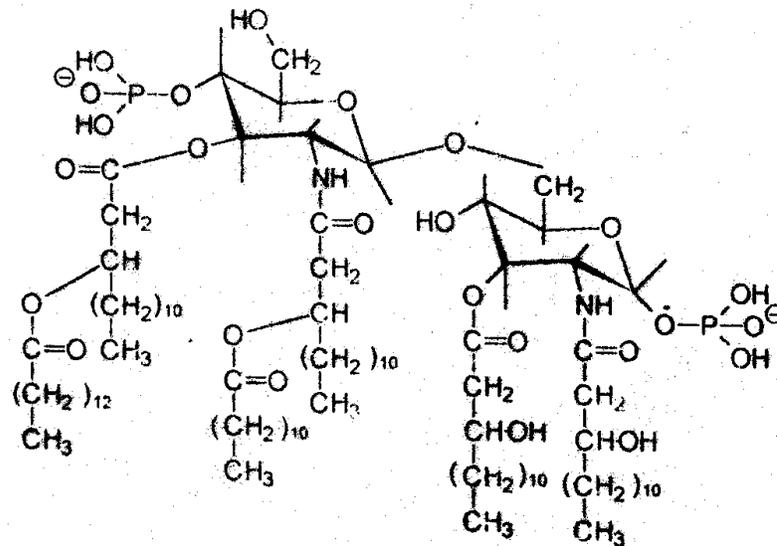


FIGURA 3. ESTRUCTURA DEL LÍPIDO A

Tomada de: Zinsser et. al.⁵(1998).

1.1.2 MÉTODOS DE DETECCIÓN DE ENDOTOXINAS

Los métodos para detectar endotoxinas son:

- Prueba en conejos
- Prueba del ensayo de coagulación de la hemolinfa de amebocitos de *Limulus* (LAL)

1.1.2.1 PRUEBA EN CONEJOS

La prueba en conejos es una prueba *in vivo*, la cual se basa en la capacidad que tienen los conejos para desencadenar una respuesta febril cuando existe la presencia de agentes pirogénicos, principalmente endotoxinas, de tal manera que la dosis umbral de endotoxina que existe para provocar una reacción pirogénica es igual tanto en el hombre como en el conejo por las características dadas. Los conejos de prueba deben de ser preferentemente de la misma variedad, sexo, adultos jóvenes, sanos, de un peso no mayor a 1.500 kg, además de que hayan sido alimentados con una dieta balanceada libre de antibióticos durante la semana anterior a la prueba. Así mismo, deben de mantenerse alojados en jaulas

individuales en un local con temperatura ambiente uniforme, sin ruido o factores que exciten a los animales.¹⁰

En los inicios del uso de productos parenterales y terapias intravenosas, Florence Seibert observó que enseguida de la aplicación de estos productos, se presentaba fiebre y otros efectos colaterales peligrosos, debido a la presencia en dichos productos de sustancias que provenían de microorganismos, ante esto demostró la necesidad de usar agua libre de estas sustancias para la detección de pirógenos en conejos, que consiste en registrar las variaciones de temperatura que siguen a la inyección intravenosa de soluciones de prueba en conejos.¹⁰

En 1942, este método es adoptado por la United States Pharmacopoeia (USP) como método oficial y confiable para determinar la concentración pirogénica. Por muchos años este método ha demostrado ser eficaz pero posee algunas desventajas y limitaciones como la necesidad de tener un bioterio con cierto número de conejos bajo condiciones específicas de alimentación, temperatura, humedad, contar con veterinarios para el cuidado y manejo del mismo; lo cual implica un costo elevado, además del tiempo prolongado para realizar la prueba, ya que para poder dar un resultado se necesita un tiempo mínimo de 3 horas 30 minutos. Sin embargo los defensores de la prueba señalan el tiempo de uso exitoso de la misma y que en general han funcionado muy bien en todos estos años; en muy raras ocasiones se han visto reacciones pirógenicas en humanos y negativas en conejos, por lo que ha demostrado ser un excelente control de calidad que permaneciera como herramienta importante para asegurar la inocuidad del arsenal de productos farmacéuticos parenterales.¹¹

1.1.2.2 DETECCIÓN DE ENDOTOXINAS MEDIANTE EL ENSAYO DE COAGULACIÓN DE LA HEMOLINFA DE AMEBOCITOS DE *LIMULUS* (LAL)

El método de LAL es una prueba *in vitro* utilizada más extensamente para la evaluación de la concentración de endotoxinas bacterianas la cual se basa en la capacidad que tiene la hemolinfa de amebocitos del cangrejo herradura (horseshoe crab) *Limulus polyphemus*, de reaccionar con la endotoxina para dar lugar a la formación de un coágulo.⁴

El cangrejo herradura posee un sistema primitivo de gelificación sanguínea como mecanismo de defensa contra bacterias Gram negativas. Se observó que cuando

el cangrejo es herido, está dispuesto a la invasión de endotoxinas o bacterias, ya que sus células sanguíneas o amebocitos, se agregan para formar una malla, encima de la cual se forma el gel proteínico. Esta prueba se basa en el fenómeno descubierto por Frederick Bang en 1956 el cual reporta la muerte por coagulación intravascular en el cangrejo herradura americano *Limulus polyphemus*.

En 1964 Bang junto a Jack Levin revelan que las endotoxinas son el vector causante de la coagulación de la hemolinfa del *Limulus*. Cuatro años más tarde llegaron a la conclusión de que la reacción de gelificación es de tipo enzimático ya que se lleva a cabo entre las proteínas coagulables de los amebocitos circulantes del cangrejo y de las endotoxinas; de esta forma son ellos los primeros en observar que en presencia de pequeñas cantidades de endotoxinas del orden de nanogramos, existe la presencia de la reacción de gelificación *in vitro*.¹²

Las primeras respuestas del porqué sustituir la prueba en conejos sobre el ensayo del LAL aparecen con los trabajos de James F. Cooper y cols. a principios de la década de los 70s. Cooper aplica por primera vez el LAL a un parenteral, radiofármacos de corta vida media, los cuales no podrían evaluarse por el método de conejos y reconoce la importancia de la equivalencia entre ambos ensayos. Posteriormente demuestra la equivalencia y que el LAL resultó ser al menos 10 veces más sensible. Refiere algunas ventajas del incipiente método como su simplicidad, requiere menos tiempo y volumen de muestra y es un método de cuantificación; además demuestra por primera vez que clínicamente los pirógenos son más tóxicos por vía intracisternal. Esta observación se había realizado ya por Bennet y cols., quienes establecieron que los efectos tóxicos de la endotoxina administrada por vía intracisternal en perros y conejos son 1000 veces más potentes para producir fiebre que la vía intravenosa.^{10,13,14} (CUADRO 2)

Los trabajos de Mascoli y Weary describen un monumental número de ensayos de pirógenos en conejos y LAL. Ellos concluyeron que las endotoxinas son el pirógeno principal, que el LAL es mucho más sensible y observaron considerablemente variabilidad del ensayo en conejos. Sin embargo, nunca observaron un negativo en LAL para un positivo en conejos.¹⁵ Reconociendo el potencial del ensayo del LAL para la industria farmacéutica, la compañía norteamericana Mallinckrodt, Inc. logró en 1971 la primera producción exitosa de

reactivo LAL a gran escala. Aunque la Food and Drug Administration de los Estados Unidos (FDA) reconoció tempranamente las múltiples ventajas del ensayo del LAL para la industria farmacéutica, no fue hasta 1983 que oficializó el método mediante el lanzamiento de la primera guía directiva para la validación del ensayo del LAL en la liberación de producto final de drogas parenterales de uso humano y animal, productos biológicos y accesorios médicos.¹⁵

Por otra parte durante el período de 1975 a 1980 el comité de Revisión de la Farmacopea de los Estados Unidos (United State Pharmacopoeia, USP), consideró la sustitución del ensayo de pirógenos en conejos de la USP por el ensayo del LAL, presentándolo como ensayo de endotoxinas bacterianas (Bacterial Endotoxin Test; BET capítulo 85), que fue publicado en el Forum de la Farmacopea, y luego en la USP XX, oficializada el 1 de julio de 1980.

CUADRO 2. COMPARACIÓN ENTRE LA PRUEBA DE *LIMULUS* Y LA PRUEBA EN CONEJOS

	Prueba de <i>Limulus</i>	Prueba en conejos
Sensibilidad	Detecta desde 0.01 ng/mL	Detecta desde 0.55 ng/mL/kg
Tiempo	1 h de análisis	3 h 30 min de análisis mínimo
Productos tóxicos	Puede utilizarse para productos tóxicos	No pueden ser aprobados por ellos
Análisis en sangre, suero y plasma	No se puede detectar	Si detecta
Compatibilidad	No es compatible para todos los productos	Si es compatible
Detección	Sólo detecta endotoxinas bacterianas	Detecta endotoxinas de cualquier origen

1.1.2.2.1 MÉTODOS DEL ENSAYO LAL

En la actualidad existen 3 variaciones básicas del ensayo del LAL:

- Método de gelificación o gel clot
- Métodos turbidimétricos
- Métodos cromogénicos

A) MÉTODOS TURBIDIMÉTRICOS

Estos métodos se fundamentan por el aumento de la turbidez en la mezcla de reacción provocado por el incremento de la concentración de coagulina insoluble, la cual se monitorea espectrofotométricamente. La proporción del aumento de turbidez está relacionada con la concentración de endotoxinas en la muestra. Los métodos turbidimétricos son los más sensibles, capaces de detectar hasta 0.001

UE/mL. Existen variaciones del método turbidimétrico: turbidimétrico de punto final y cinético.^{1,15}

B) MÉTODOS CROMOGÉNICOS

Los métodos cromogénicos son la modificación más sofisticada de la prueba de *Limulus* y su primera aplicación fue descrita por Nakamura y cols. en 1977. A partir de aquí han aparecido muchas versiones por lo que el método cromogénico posee las diferencias más notables en cuanto a los procedimientos descritos entre los fabricantes.^{1,15}

Estos métodos se fundamentan en el empleo de un sustrato cromogénico sintético incoloro compuesto por un pequeño péptido unido por la arginina C-terminal a una molécula del cromóforo p-nitroanilina (pNA). Una vez activada la cascada del LSL, la enzima coaguladora provoca la liberación de la molécula pNA de color amarillo, en donde el desarrollo de la coloración es proporcional a la concentración de endotoxinas en la muestra.^{1,15} Además, han sido empleados especialmente para la cuantificación de endotoxinas en muestras de plasma, sangre y otros fluidos biológicos.

Al igual que los métodos turbidimétricos, el equipo requerido y el uso de sustratos cromogénicos aumentan su costo, además de que estos son el componente más caro e inestable del kit; sin embargo es preciso y con buena reproducibilidad. Los métodos cromogénicos cuentan con dos versiones, pueden ser a punto final o cinéticas.^{4,15}

C) MÉTODO DE GELIFICACIÓN O GEL CLOT

El método de gel-clot es el ensayo clásico y el más elemental entre los métodos del LAL. La reacción se realiza comúnmente en tubos de vidrio y esencialmente la misma que ocurre *in vivo* en el cangrejo herradura frente a las endotoxinas. Este se basa en la activación de la enzima causando la gelificación de una proteína coagulable. Cuando la concentración de endotoxinas de la muestra excede el valor de la sensibilidad del reactivo LAL, se forma un gel consistente.^{1,15} De esta manera se pueden hacer determinaciones cualitativas del nivel de endotoxinas. El alcance del método esta limitado únicamente por la sensibilidad del reactivo LAL, es menos susceptible a inhibición y requiere de equipamiento más sencillo y menos costoso.¹³

Todas estas técnicas precisan de un patrón de endotoxinas para elaborar una curva de calibración. Los resultados de actividad de las muestras se expresan en UE/mL (unidades de endotoxina por mililitro), basadas en la endotoxina estándar de referencia de la USP. Después de acumular suficientes datos y experiencia con el lote de estándar de referencia primario de endotoxina EC-2, la FDA le asignó arbitrariamente una potencia de 5000 UE/vial o 5 UE/ng por lo tanto, 1 UE equivale a 0-2 ng de EC-2. Esta es una expresión de la actividad de las endotoxinas en el ensayo del LAL. Afortunadamente se ha logrado la armonización de los distintos estándares de endotoxinas entre la UP, la EP, la OMS y la FDA.^{1,15,16}

1.1.2.2.2 FUNDAMENTO BIOQUÍMICO

Actualmente la bioquímica de la reacción del LAL se conoce con detalle y el mecanismo en cascada de tipo enzimático parece ser el responsable de su extraordinaria sensibilidad.

1.1.2.2.3 MECANISMO DE REACCIÓN

El análisis de endotoxinas mediante el ensayo de coagulación de la hemolinfa de amebocitos de *Limulus* indica que se necesitan cuatro sustancias para que se lleve a cabo la reacción: la enzima-procoagulante que es la fracción de peso molecular alto y sensible al calor; las proteínas coagulables (coagulógenos), siendo la fracción más estable al calor y de bajo peso molecular; los cationes divalentes (Ca^{+2}); y las endotoxinas de las bacterias Gram negativas.^{1,8}

El mecanismo de reacción consiste en la activación de la proenzima o enzima procoagulante (serino proteasa) contenida en el LAL, debido a la presencia de cationes divalentes de Ca^{+2} y por las endotoxinas de las bacterias Gram negativas. Esta enzima activada, llamada coagulasa, es la serino proteasa que cataliza el desdoblamiento del coagulógeno produciendo dos fragmentos, un fragmento de gran masa molecular rico en puentes disulfuro: la coagulina, que se agrega y forma un gel, y un pequeño péptido llamado péptido C. (FIGURA 4) Por lo tanto, el reactivo LAL es un extracto acuoso de los amebocitos, compuesto por una cascada de enzimas serino proteasas tipo tripsina capaz de reaccionar frente a pequeñas cantidades de endotoxinas. El gel formado es estable, pero frágil sobre todo a las vibraciones que lo fracturan irreversiblemente.

Dado lo anterior, se deduce que esta prueba no es recomendable para detectar endotoxinas en sangre o sus derivados, tales como suero y plasma, porque pueden contener factores de coagulación activados que puedan dar resultados positivos aún en ausencia de endotoxinas. Así también, las soluciones inyectables que contienen agentes quelantes como el EDTA forman complejos con los cationes divalentes como el Ca^{+2} inhibiendo la reacción y para poder efectuar la prueba en ellas será necesario añadir una fuente de Ca^{+2} libre de pirógenos.^{1,4,8}

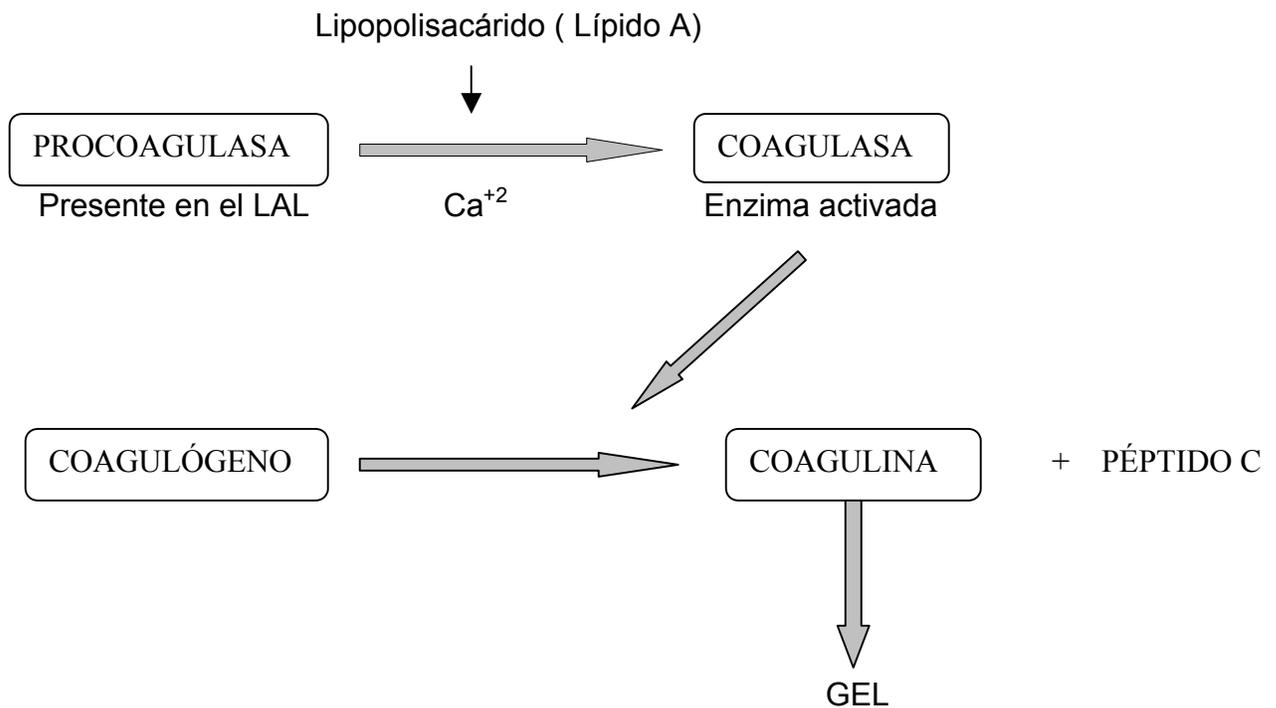


FIGURA 4. REACCIÓN DE GELIFICACIÓN (MÉTODO CLÁSICO DE *LIMULUS*)
Tomado y adaptado de: Gorny et al.⁴(1999).

1.1.2.2.4 APLICACIÓN DEL MÉTODO LAL

En la actualidad el método LAL permite garantizar la calidad de productos que contribuyen al mejoramiento de la calidad humana ya que se ha utilizado en la industria farmacéutica con gran auge para detectar pirógenos en productos parenterales, productos biológicos inyectables, artículos médicos, en producción de agua, procesos de formulación, validación de procesos de despirogenización, etc. Hoy por hoy la mayoría de las monografías para inyectables en las principales Farmacopeas exigen el ensayo del LAL para pirógenos en producto terminado.¹⁷

Así mismo, en el área clínica muchos autores han investigado su eficacia para el diagnóstico de septicemia por Gram negativos, artritis pirogénica Gram negativa, detección de endotoxinas en placas dentales y enfermedad periodontal, así como para el diagnóstico de meningitis bacteriana Gram negativa, el cual se ha aplicado con éxito.⁸

Por otro lado, también suele utilizarse en alimentos, ya que la primera vez que se utilizó fue para descubrir la alteración microbiana de la carne; actualmente también se utiliza para controlar los microorganismos de la leche y productos lácteos, así como para determinar la calidad microbiológica del pescado fresco.¹⁸

1.1.3 EFECTOS PRODUCIDOS POR INHALACIÓN DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS.

Dentro de los compuestos presentes en las partículas contaminantes, susceptibles de ser inhalados, las endotoxinas han recibido especial atención ya que generan diversos efectos sobre la salud: fiebre, tos, dolor de cabeza, náuseas, irritación de las mucosas, inflamación y obstrucción de las vías respiratorias.^{3,9}

Los macrófagos pulmonares, al ser estimulados por las endotoxinas, inician la producción de citocinas, las cuales a su vez inducen la producción de mediadores, como las prostaglandinas que actúan de forma directa sobre los centros de control de temperatura en el cerebro. Sin embargo, las citocinas inducidas por las endotoxinas son multifuncionales, y pueden presentar funciones que se superponen y pueden mediar diferentes respuestas del huésped y regular múltiples células blanco de manera que en un caso pueden actuar como iniciadores beneficiosos o incrementadores y en otro presentarse como un supresor o hasta un mediador de efectos tóxicos. Por ej., la IL-1 no sólo es un pirógeno endógeno sino que también induce IL-6 que es un mediador para la respuesta hepática de la fase aguda tardía.^{1,5,8} Aunque el recurso inflamatorio es algo deseable y benéfico para el organismo, éste puede volverse exagerado y adverso ante la inhalación de endotoxinas en concentraciones altas o persistentes, frente a la penetración de endotoxinas al torrente circulatorio o ante la exposición a endotoxinas en individuos susceptibles. En la actualidad se sabe que la inhalación cotidiana de endotoxinas en las partículas contaminantes puede

prevenir o estimular un ataque de asma, dependiendo de la cantidad y el tiempo en el que esto ocurra, así como de la edad del individuo en que se empiezan a inhalar y de las características genéticas del sujeto.^{3,8,19}

Por ello las actividades del ser humano, que introducen al ambiente bacterias Gram negativas representan un riesgo para la salud, sobre todo cuando existen endotoxinas que llegan al tracto respiratorio. Esta es una de las razones más importantes para el control del fecalismo al aire libre de animales y humanos, cuestión donde las normas aún no se aplican con suficiente rigor, y donde aún hay mucho por hacer en cuanto a infraestructura básica y educación.^{3,20}

1.2. HONGOS

Los hongos constituyen un grupo de microorganismos de gran interés práctico y científico para los microbiólogos; en el pasado se consideraban causas relativamente insignificantes de infección, sin embargo, esta visión se modificó recién cuando los laboratorios clínicos se interesaron en proporcionar servicios de diagnóstico micológico. En la actualidad hay más de 50 000 especies reconocidas de hongos, pero solo de 100 a 150 se consideran causas de enfermedad en seres humanos, mientras que las de interés alergológico no exceden las 4 decenas.

Ahora se sabe que la contaminación ambiental por hongos es debida básicamente a hongos filamentosos y levaduras, que llegan a producir determinadas patologías, las cuales no se contagian en forma habitual por transmisión interpersonal o de animal a persona, los seres humanos se convierten en un huésped accidental por la inhalación de esporas o por su ingreso en los tejidos por un traumatismo.^{21,22}

La clase y número de microorganismos fúngicos del aire varía según el medio. Los microorganismos del aire libre están influenciados por las condiciones meteorológicas y por el tipo de terreno. Las partículas inertes y microbianas que flotan en el aire son llevadas a grandes distancias por los vientos. En los grandes depósitos de agua, las olas dispersan las partículas que contienen microorganismos pues al levantarse con el agua son transportados por muchos kilómetros. En el aire de las habitaciones existe la posibilidad de encontrar microorganismos fúngicos productores de enfermedades bastante mayor que en el aire libre puesto que están mucho menos esparcidos.²³

Muchas especies de hongos se pueden diferenciar, identificar y clasificar según su morfología, estructura, mecanismo de formación y elementos formadores de las esporas, las cuales pueden ser suficientes para identificarlos.

1.2.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS HONGOS

Los hongos son microorganismos eucarióticos quimiorganotróficos, pueden ser unicelulares o pluricelulares. Las levaduras son hongos unicelulares con forma oval (5-30 μm), inmóviles y que se dividen por mecanismos diversos, especialmente por gemación. La mayoría de los hongos, sin embargo, son pluricelulares o filamentosos y se caracterizan por estar constituidos por filamentos ramificados o hifas que se desarrollan y entrelazan formando el micelio. Existe un micelio vegetativo adosado a la superficie del sustrato (suelo, plantas, alimentos) y un micelio aéreo o reproductor, donde se forman las esporas (asexuales y sexuales).^{22,24,25}

Los hongos filamentosos y levaduras son en su mayoría saprófitos, hallándose libres en la naturaleza, especialmente en la materia orgánica en descomposición, algunas especies son parásitas, formando parte de la flora normal del hombre, como por ejemplo *Candida albicans*, que es una levadura y puede comportarse como oportunista y resultar patógena cuando se produce una disminución en los mecanismos de resistencia del individuo. Otras especies de hongos pueden producir durante su desarrollo sustancias tóxicas o micotoxinas. Por otra parte, algunos hongos son dimórficos, es decir, unas veces se comportan como hongos filamentosos y otras pueden comportarse como levaduras. Los hongos toleran y se desarrollan en concentraciones de acidez relativamente elevadas. Soportan escalas de pH entre 2 a 9.0, pero el pH óptimo para casi todas las especies es 5.6.^{24,26}

Aunque necesitan humedad para su desarrollo y pueden obtener agua de la atmósfera y del medio, pueden sobrevivir en ambientes deshidratados. Casi todos los hongos son aerobios obligados o facultativos; se desarrollan en condiciones de temperatura muy variadas, pero entre 22 a 30°C es la óptima para la mayor parte de las especies. La glucosa es una fuente de carbono muy aprovechada por muchos hongos y algunas otras se sirven del nitrógeno inorgánico. Para su

desarrollo necesitan pequeñas cantidades de hierro, fósforo, potasio, zinc, cobre, manganeso y molibdeno. En condiciones apropiadas, transforman carbohidratos a alcoholes y ácidos orgánicos.^{24,25,27}

1.2.2 CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DE LOS HONGOS

A) ESTRUCTURA VEGETATIVA

La estructura vegetativa de un hongo se llama a menudo talo. El talo fúngico más típico está compuesto por filamentos, que generalmente están ramificados. Cada filamento individual se denomina hifa, y al conjunto de hifas se le llama micelio. En muchos casos el micelio forma una estructura visible a simple vista, el cual se extiende por la superficie o hacia dentro de la fuente de alimento en que está creciendo el hongo.^{21,28}

Las levaduras son también unicelulares, aunque en muchas de ellas es posible tanto el desarrollo unicelular como el filamentos, dependiendo de las condiciones ambientales. El crecimiento del tipo de las levaduras se produce por un proceso de gemación en el que la célula hija se separa de la madre tan pronto como ha madurado, mientras que el desarrollo filamentos se lleva a cabo por la prolongación continua de las puntas de las hifas. Algunos hongos patógenos de animales presentan dimorfismo, desarrollándose bien como formas de aspecto de levadura o como micelios, cuando crecen a temperaturas alrededor de los 37°C, el hongo presenta aspecto de levadura, pero cuando crece en medios de laboratorio a temperaturas más bajas, el organismo presenta forma micelial.^{21,28}

B) ESTRUCTURAS PRODUCTORAS DE ESPORAS

En ciertas épocas del año, el aire puede tener una concentración tan grande de esporas de hongos que estas pueden causar problemas a las personas que padecen de alergias. La mayoría de los hongos producen esporas cuya función es asegurar la dispersión de la especie a nuevos lugares o capacitar al organismo para soportar condiciones ambientales extremas y, por tanto, mantener la especie en los tiempos difíciles. Se reconocen dos tipos generales de esporas, asexual y sexual, las asexuales son generalmente resistentes a la sequedad o a la radiación, pero no especialmente al calor y no presentan un período de latencia; son capaces de germinar cuando hay humedad, a menudo incluso en ausencia de

nutrientes. Las esporas sexuales son por lo general más resistentes al calor que las asexuales, aunque ninguna espora fúngica muestra la extrema resistencia al calor característica de la endospora bacteriana. Además, presentan a menudo latencia, germinando solamente cuando han sido activadas de alguna manera, por ejemplo por un calentamiento suave o por ciertas sustancias químicas.^{26,28}

1.2.3 CLASIFICACIÓN DE LOS HONGOS

Dentro de los seres vivos, los hongos han sido ubicados en el Reino Fungi y se encuentran incluidos en el Phylum Mycota. En primer lugar, la clasificación de los hongos se basa en las características de las esporas sexuales y los cuerpos fructificantes presentes durante los estadios sexuales en sus ciclos biológicos.²⁴

En la FIGURA 5 se muestra la clasificación de los hongos esquematizada, en la cual hay dos subdivisiones, Eumycotina (hongos verdaderos) y Myxomycotina (mohos limosos verdaderos). La subdivisión Eumycotina se compone de ocho clases y otra clase tentativa que se basa en las características morfológicas y los métodos de reproducción. La subdivisión Myxomycotina comprende la clase mixomicetos con dos subclases que se diferencian por su manera de esporulación. Una subclase produce esporas externas en tallos individuales; en cambio, otras, las producen internas.

Con base a los conocimientos actuales, la clasificación de los mohos limosos, no es muy ordenada. Sus diferencias son tan grandes que los “hongos limosos endoparásitos” se colocan en la clase Plasmodioforomicetos, en la subdivisión Eumycotina. Los mohos limosos que forman mallas han sido clasificados en el orden de los Acrasiales. Los mohos limosos que forman mallas han sido clasificados en el orden de los Labyrinthales.^{21,24}

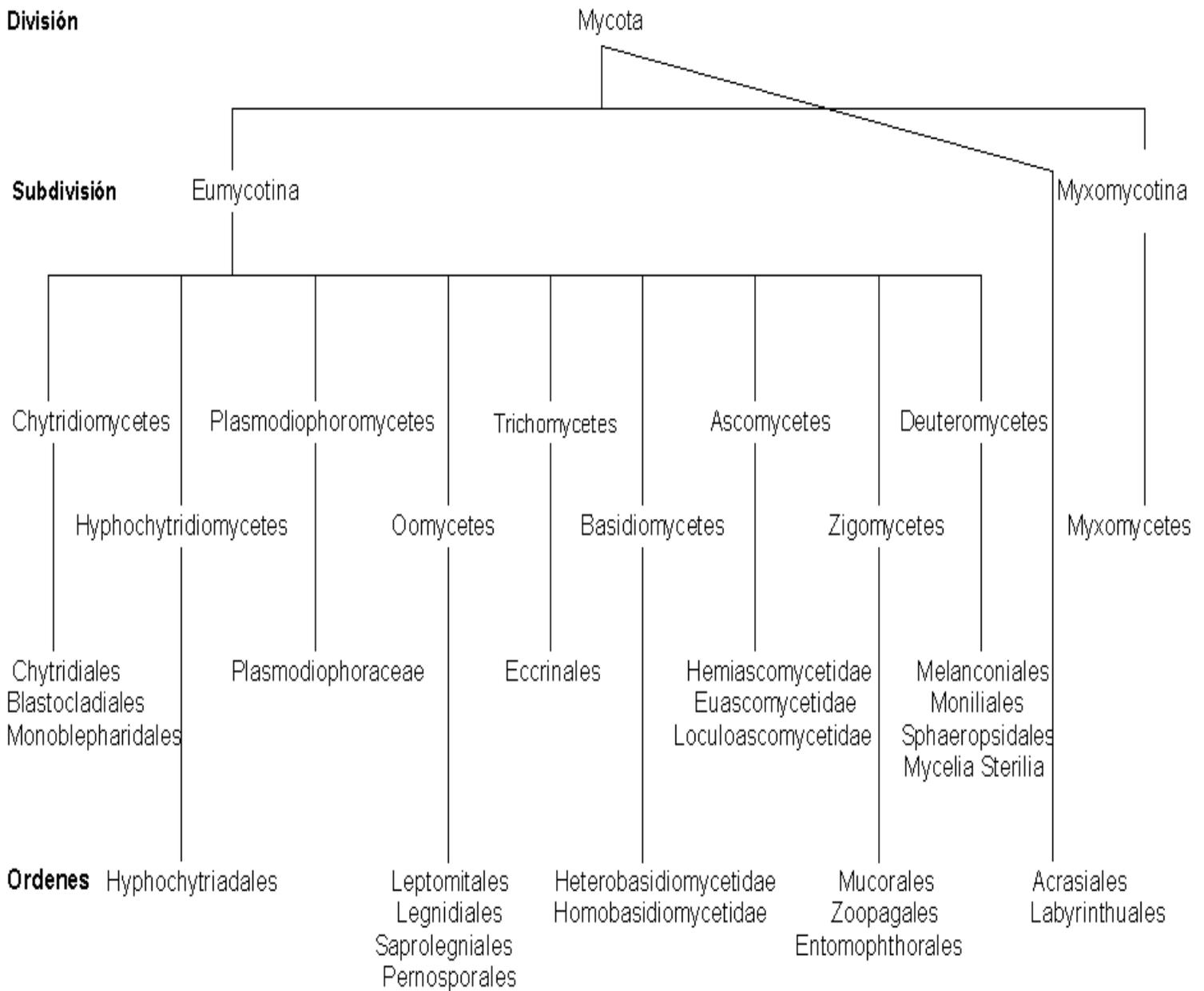


FIGURA 4. CLASIFICACIÓN DE LOS HONGOS

1.2.4 EFECTOS SOBRE LA SALUD DEBIDO A LA PRESENCIA DE HONGOS

1.2.4.1 MICOSIS EN EL SER HUMANO

En contraste con las bacterias, los hongos sólo raramente son patógenos para el hombre o los animales; se ha estimado que únicamente son patógenas unas cincuenta especies. Aún más, esos hongos no producen muchos tipos de enfermedades graves. La mayoría de los hongos patógenos no están restringidos al huésped en su crecimiento porque su hábitat primario es el suelo; son meramente invasores oportunistas de individuos con una resistencia disminuida a la infección.²¹

Las micosis vienen condicionadas por tres factores principales: la vía de entrada en el huésped, su estado inmunológico y la agresividad del patógeno. La posibilidad de invadir los tejidos del organismo y producir enfermedad, depende de la virulencia y cantidad del agente infeccioso, vía de infección, inmunidad del huésped, el órgano afectado y la coexistencia con otras infecciones o enfermedades. Según Richardson, para que un hongo actúe como patógeno se precisa que posea los siguientes atributos:²⁹

- Adherencia al estrato córneo o a las superficies mucosas
- Capacidad de penetración en los tejidos del huésped para facilitar el acceso a los órganos o líquidos corporales “diana”
- Facilidad para multiplicarse in vivo y adaptación a las condiciones fisicoquímicas del huésped
- Capacidad de eludir los mecanismos de defensa del huésped

Las enfermedades fúngicas del hombre, pueden dividirse en cuatro categorías de micosis: micosis profundas o sistémicas, subcutáneas, superficiales y oportunistas. (CUADRO 3)

A) MICOSIS SISTÉMICAS

Las micosis sistémicas se adquieren a través del aparato respiratorio por la inhalación de las esporas y por lo tanto se localizan principalmente a nivel pulmonar de donde posteriormente tienden a diseminarse por vía hematógena a diferentes órganos y sistemas del cuerpo, éste grupo de infecciones micóticas son producidas por agentes que intrínsecamente pueden ser muy virulentos, e invadir con profundidad los tejidos y órganos, además de tener la capacidad de

diseminarse con amplitud por todo el organismo. Desde una perspectiva clásica, la mayoría de estas infecciones fueron producidas por hongos dimórficos.^{21,30}

B) MICOSIS SUPERFICIALES

Las micosis superficiales son causadas primariamente por hongos miceliares. Esos organismos, llamados frecuentemente “dermatofitos”, presentan una afinidad por regiones queratinizadas tales como la piel, el pelo y las uñas y habitualmente pueden digerir esta proteína.

Las tiñas producidas por dermatofitos son padecimientos cosmopolitas, aunque se presentan casi siempre en climas cálidos y húmedos; el sólo contacto de las esporas de los dermatofitos con la piel y anexos, es capaz de generar la enfermedad. Así mismo es de igual importancia los malos hábitos higiénicos, el uso de zapatos cerrados, ropa sintética, etc. Aunque son padecimientos totalmente benignos, es importante el reconocimiento de ellos para evitar los focos de diseminación, el cual cobra mayor importancia en ciertos grupos o sectores como deportistas, soldados, escolares, etc., que pueden propagar la enfermedad, por el uso en común de baños, o por fomites.^{21,30}

C) MICOSIS SUBCUTÁNEAS

Son un grupo de enfermedades micóticas en las cuales están afectadas tanto la piel como el tejido subcutáneo, pero no se produce diseminación a órganos internos, o es muy rara. Los agentes se clasifican en varios géneros independientes y tienen las siguientes características en común: son básicamente saprofitos del suelo de muy poca virulencia y capacidad invasora; y en la mayor parte de infecciones humanas y de animales, entran en la economía a consecuencia de una implantación traumática en el tejido (por ej., por espinas, astillas de madera, clavos, piedras, mordeduras de reptiles, etc.)^{21,30}

CUADRO 3. CLASIFICACIÓN DE LAS MICOSIS HUMANAS HALLADAS CON MAYOR FRECUENCIA Y SUS AGENTES ETIOLÓGICOS

	Microorganismo causal	Enfermedad
Micosis superficiales	<p><i>Piedraia hortae</i></p> <p><i>Malassezia furfur</i></p> <p><i>Phaeoannellomyces wernickii</i></p> <p>Especies de <i>Microsporum</i>, <i>Trichophyton</i>, <i>Epidermophyton floccosum</i></p> <p>Especies de <i>Fusarium</i>, <i>Aspergillus</i>, <i>candidum</i> <i>Geotrichum</i></p>	<p>Piedra negra</p> <p>Pitiriasis versicolor</p> <p>Tiña negra</p> <p>Dermatomicosis</p> <p>Queratitis micótica</p>
Micosis subcutáneas	<p>Especies de <i>Acremonium</i>, <i>Exophiala jeanselmei</i>, Especies de <i>Nocardia</i></p> <p><i>Sporothrix schenckii</i></p> <p><i>Cladosporium carrionii</i>, Especies de <i>Fonsecaea</i></p>	<p>Maduromicosis (micetomas)</p> <p>Esporotricosis</p> <p>Cromoblastomicosis</p>
Micosis profundas	<p><i>Blastomyces dermatitidis</i></p> <p><i>Coccidioides immitis</i></p> <p><i>Histoplasma capsulatum</i></p>	<p>Blastomicosis</p> <p>Coccidioidomicosis</p> <p>Histoplasmosis</p>
Micosis oportunistas	<p><i>Aspergillus fumigatus</i>, <i>A. flavus</i>, <i>A. niger</i>.</p> <p><i>Candida albicans</i> y otras especies de <i>Candida</i></p> <p><i>Geotrichum candidum</i></p>	<p>Aspergilosis</p> <p>Candidiasis</p> <p>Geotricosis</p>

Tomado de: Koneman et.al.²¹(1999)

D) MICOSIS OPORTUNISTAS

Son las producidas por hongos que se encuentran normalmente en el suelo, agua o plantas, que raras veces producen infecciones en pacientes de salud normal, sin embargo, son capaces de aprovechar los estados de debilidad orgánica de pacientes inmunocomprometidos para llegar a producir en estos enfermos infecciones incluso mortales. Además de estas condiciones predisponentes del huésped para presentar oportunismo también existen condiciones para que el hongo sea capaz de comportarse como oportunista, las cuales radican en soportar una temperatura de 3°C o más, realizar un cambio bioquímico, morfológico y efectuar contacto con el huésped, hay algunos casos que no se requiere un contacto exógeno debido a que ciertos hongos pertenecen a la flora habitual de cuerpo, por lo tanto estos tipos de enfermedades son endógenas, por ej., la candidiosis, actinomicosis, geotricosis, etc.³⁰

1.2.4.2 LOS HONGOS COMO AEROALERGENOS

La aerobiología es una ciencia que se ocupa del origen, liberación, transporte, depósito y efecto de las partículas biológicas transportadas por el aire. Los alergenitos inhalables son partículas relativamente grandes y complejas, como los pólenes, hongos, ácaros y el polvo de las viviendas, capaces de provocar reacciones alérgicas en personas susceptibles. Se pueden clasificar de acuerdo a la fuente de proceden en dos grupos: los derivados de fuentes naturales y los generados por actividad doméstica o profesional humana. Por lo que es común, que alergenitos tales como las esporas fúngicas posean características de ambas categorías.³¹

La enorme diversidad de los hongos y sus notables mecanismos de adaptación hacen inevitable la exposición a ellos, ya que se propagan por esporas microscópicas transportados por el viento y se sedimentan cuando el aire está tranquilo, por lo tanto, dependen de la turbulencia y las corrientes de convección para permanecer en el aire. Sin embargo, puesto que constituye un requisito básico para el crecimiento fúngico la existencia de una pequeña cantidad de humedad y oxígeno, las regiones áridas y las situadas a gran altitud se encuentran relativamente libres de hongos, a efectos de las tomas de muestras y los métodos de cultivo convencionales.^{32,33}

En la actualidad determinar el contenido atmosférico de alergenios fúngicos es importante por varias razones, ya que permite establecer la carga de conidios en el aire de diferentes zonas geográficas y determinar con ello si es viable establecer algún patrón ambiental de la misma manera que con los calendarios de polinización. Puede ayudar además en el diagnóstico de la enfermedad alérgica, determinando que conidios prevalecen en el medio y se puede sugerir el tipo de extracto fúngico a usarse para diagnóstico y tratamiento. De igual manera, en el tratamiento el alergólogo puede orientar al paciente en cuanto a las medidas que se deben tomar para disminuir la presencia del alérgeno.³⁴

Además del ámbito ocupacional, en muchas ocasiones el ambiente del hogar es la principal fuente de alergenios, en el que cabe destacar que muchos de los alérgenos de interior son los mismos que se encuentran en el exterior de los edificios, penetrando por ventanas y puertas, sistemas de ventilación, o por grietas u otras aberturas en las paredes, así como también pueden ser introducidos en los edificios a través de la tierra arrastrada por los zapatos. De ahí que surgiera el interés de algunos investigadores por conocer las condiciones de exposición a los contaminantes intradomiciliarios. En este sentido, se han identificado como reservorios importantes de alergenios intradomiciliarios las alfombras, el tapiz de los muebles, los colchones, sitios de humedad en las paredes y los muebles. Sarrazola y cols., observaron ello, además de que estos reservorios prevalecían siempre que existían fuentes humidificantes, de ahí que los hongos específicamente *Alternaria*, *Cladosporium* y *Aspergillus* incrementaran sus concentraciones intradomiciliarias durante la temporada de lluvias en la ciudad de México.^{35,36}

Otros autores han reportado que es posible asociar algunas características de la construcción de edificios con la presencia de ciertas especies, por ej., *A. alternata* la cual prevalece en construcciones con cubiertas de aislamiento térmico.³⁷

En 1987 se hizo una investigación en el estado de Tabasco en la que se incluyeron 152 niños con alergia respiratoria. Los resultados para hongos fueron interesantes: el 57.2% de la población presentó prueba cutánea positiva a pólenes y hongos, el 30.9% solo dio positiva a hongos y el 11.8% únicamente a pólenes. Además realizaron la identificación de los hongos y los más frecuentes fueron

Curvularia, *Penicillium* y *Rhizopus*. Este resultado no se esperaba ya que los pólenes son los aeroalergenos más frecuentemente reconocidos, sin embargo, en climas cálidos y húmedos se ha reportado una frecuencia a hongos entre el 35.9% y el 63%. En este caso sí fue posible relacionar alergenos-padecimientos mediante pruebas cutáneas, y se encontró que en los pacientes con asma predominan *Monilia*, *Curvularia* y *Rhizopus*; en el grupo de rinitis fueron *Rhizopus*, *Curvularia* y *Cladosporium*; y en los niños con asociación asma-rinitis predominaron *Penicillium*, *Rhizopus* y *Alternaria*.^{23,26}

A pesar de que en los últimos años se ha trabajado intensamente en el estudio detallado de las propiedades químicas e inmunológicas de la mayoría de los hongos, no se han identificado aún todos los alergenos responsables de desencadenar enfermedades alérgicas, sin embargo, se ha observado que el número total de esporas fúngicas en el aire puede variar de menos de 200 a más de un millón por metro cúbico, las cuales pueden modificarse con el momento del día, la estación del año, la localización geográfica, etcétera. Hoy por hoy las principales investigaciones se han centrado en los hongos que se consideran universales, en función de su prevalencia y capacidad de generar hipersensibilidad, entre los cuales los más frecuentes sobresalen los deuteromicetos, zigomicetos y basidiomicetos. (CUADRO 4)

CUADRO 4. CLASIFICACIÓN, SUBSTRATOS PRINCIPALES E IMPORTANCIA ALERGÉNICA DE LOS HONGOS

Clasificación	Substratos principales	Importancia alérgica
Deuteromicetos		
<i>Alternaria</i>	Plantas, hojas y paredes húmedas; aumentan en exteriores en días cálidos y secos.	Grande
<i>Cladosporium</i>	Plantas en putrefacción, aumentan en exteriores en días cálidos y secos.	Grande
<i>Aspergillus</i>	Alimentos estropeados y detritos orgánicos; aumentan en interiores.	Grande
<i>Penicillium</i>	Alimentos estropeados y detritos orgánicos, aumentan en interiores.	Moderada
<i>Fusarium</i>	Tierra y apilamientos de abonos; aumentan en tiempo húmedo.	Moderada
<i>Aureobasidium</i>	Hojas, tierra y madera.	Escasa
Zigomicetos		
<i>Rhizopus</i>	Tierra y hojas; aumentan en tiempo seco; se encuentran en interiores húmedos.	Moderada
<i>Mucor</i>	Tierra y hojas; aumentan en tiempo seco; se encuentran en interiores húmedos.	Moderada
Basidiomicetos		
Tizones	Hierba y campos de cereales.	Grande
Royas	Hierba y campos de cereales.	Grande
Setas	Regiones boscosas húmedas; aumentan en tiempo lluvioso.	Escasa

Tomado de: Lawlor et.al.³¹(1985).

1.2.4.2.1 CONTROLES AMBIENTALES

La mayoría de los hongos domésticos de interiores, que provienen principalmente de la vegetación exterior, crecen en ambientes fríos y húmedos, como sótanos, cortinas de duchas y marcos de las ventanas. Aunque es imposible una erradicación completa de los hongos, son de suma importancia las medidas de control ambiental, las cuales deben reflejar las necesidades individuales de cada paciente ya que la presencia de hongos puede producir en sus habitantes determinadas patologías entre las que cabe destacar asma y alveolitis alérgicas.²³

Las medidas ambientales para prevenir alergias respiratorias a hongos atmosféricos, solamente pueden ser útiles en ambientes interiores. Es casi imposible realizar un control de las esporas del medio exterior. Por ello la prevención de la exposición a los alérgenos fúngicos intra-domiciliarios consiste fundamentalmente en eliminar los focos detectables de hongos en la estructura de la vivienda, así como en los elementos decorativos: muebles, libros y papeles, alimentos mal conservados, etc. Sobre todo es necesario evitar las humedades que favorecen la instalación y desarrollo de los mohos.

De igual manera se puede hacer uso de dispositivos mecánicos para el control ambiental que ayudan a modificar el ambiente de la vivienda como lo son los acondicionadores de aire, filtros limpiadores de aire y humidificadores y deshumificadores.²³

1.2.5 MÉTODOS PARA EL ESTUDIO DE LOS HONGOS

El cultivo de los hongos no es por lo general especialmente difícil; los requerimientos nutritivos son habitualmente simples, y pueden prepararse fácilmente los medios de cultivo adecuados. Muchos hongos crecen bastante lentamente incluso en condiciones óptimas; sin embargo, los únicos problemas reales para el cultivo de los hongos de crecimiento lento son la desecación del medio de agar durante el prolongado tiempo de incubación y la posibilidad de contaminación con otros hongos de crecimiento más rápido transportados por el aire.²⁶

Existen condiciones óptimas para cada especie, la mayoría de los hongos crecen entre 0°C y 55°C, teniendo un rango de temperatura entre 20°C y 30°C. Los hongos oportunistas y patógenos pueden crecer entre 35°C y 40°C. A diferencia

de las bacterias los hongos son acidófilos, siendo el pH óptimo de 5.6 para la mayoría. La luz no es vital, sin embargo, para muchas especies ésta juega un papel importante en la esporulación. Para su crecimiento son indispensables fuentes de carbono (carbohidratos), nitrógeno (sales de nitrógeno, proteínas, agua y los iones inorgánicos básicos).^{28,30}

En los medios de cultivo utilizados se añadirán antibióticos antibacterianos para inhibir el crecimiento de las bacterias que suelen contaminar las muestras. Los más usados son el cloramfenicol, gentamicina y estreptomina; así mismo pueden utilizarse colorantes como el rosa de Bengala que son también útiles para aislar hongos del suelo ya que reduce la extensión de las colonias. Teniendo así medios para aislamiento primario como agar Dextrosa Sabouraud, Sabouraud con cloramfenicol y gentamicina, etc.; así como medios para aislamientos especiales como el medio de Czapek, medio de Martin, medio agar rosa de Bengala y cloranfenicol, entre otros.^{38,39}

Generalmente se utilizan varios medios de cultivo diferentes, ya sea en placa o en tubo. Los medios en placa tienen la ventaja de ofrecer una gran superficie para el aislamiento pero, para soportar la deshidratación durante el largo periodo de incubación a que van a ser sometidos, han de contener una gruesa capa de medio; además son más peligrosos a la hora de su manipulación y fáciles de contaminar. Por el contrario, los medios en tubo tienen una superficie de trabajo mucho más pequeña, pero ofrecen máxima seguridad en su manipulación y buena resistencia a la deshidratación y a la contaminación.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los efectos pirogénicos de las endotoxinas sobre la salud son evidentes y se conocen desde la antigüedad, ya que las bacterias Gram negativas se presentan en el medio ambiente, debido a que el aire participa como vehículo de transporte para diferentes microorganismos; por ello la inhalación experimental de bacterias Gram negativas o endotoxinas en voluntarios sanos ha sido muy estudiada en los últimos años y se ha constatado la aparición de fiebre, tos, dolor difuso, náuseas, disnea, y obstrucción aguda al flujo del aire debido a la presencia de endotoxinas.

Por tal motivo es de gran trascendencia la realización de pruebas confiables que determinen la concentración de endotoxinas bacterianas transportadas por el aire y el polvo establecido, con el fin de evaluar la calidad del aire ambiental. Ante esto el método basado en la reacción de coagulación de la hemolinfa de amebocitos de *Limulus* (LAL), es el ensayo utilizado más extensamente en la actualidad, ya que es una prueba simple, rápida, efectiva y confiable. Con ello se pretende conocer y reducir la producción y amplificación de bacterias Gram negativas que pueden ser la fuente de producción de endotoxinas, separando y efectuando limpieza del material contaminado.

De igual manera es importante determinar la calidad microbiológica mediante el aislamiento de hongos ya que los habitats naturales de muchos hongos son el agua, los suelos y los restos orgánicos en descomposición, por lo que los seres humanos se convierten en un huésped accidental por la inhalación de esporas o por su ingreso en los tejidos por un traumatismo, produciendo infecciones micóticas.

3. OBJETIVOS

Generales:

- ❖ Evaluar la calidad del aire ambiental en partículas de aerosol, capturadas en filtros de teflón estériles; tomadas de muestras de aire de monitores colocados en el Distrito Federal; Estado de México; Hidalgo; y Tlaxcala respectivamente. El presente trabajo forma parte de la campaña “Megacity Initiative Local and Global Research Observations 2006” (MILAGRO 2006).

Específicos:

- ❖ Determinar la presencia de endotoxinas bacterianas realizando la prueba clásica de *Limulus* en filtros de teflón.
- ❖ Realizar la cuantificación y aislamiento de hongos en filtros de teflón.

4. HIPÓTESIS

Tomando en consideración la importante contaminación del aire ambiental, se espera que la presencia de endotoxinas bacterianas y de hongos sea mayor en ambientes más contaminados.

5. DESARROLLO EXPERIMENTAL

El desarrollo de éste trabajo sobre la detección de endotoxinas bacterianas (pirógenos) con el reactivo LAL (Lisado de Amebocitos de *Limulus*) y la cuantificación de hongos en muestras de aire se realizó bajo las siguientes especificaciones:

TIPO DE ESTUDIO:

La investigación se realizó de acuerdo a un estudio de tipo observacional, transversal y descriptivo.

POBLACIÓN:

Se estudiaron un conjunto de muestras de aire de cuatro sitios seleccionados de tal manera que representaran la trayectoria esperada de los contaminantes del aire de la zona metropolitana de la Ciudad de México, D.F., en su salida del valle hacia regiones cercanas; dichas muestras a su vez fueron de uso personal, así como de interiores y exteriores de hogares. Los sitios donde se instalaron los monitores son las siguientes ciudades y están denominados como T0, T1, T2 y T3:

T0: sitio dentro del Distrito Federal.

T1: sitio dentro del Estado de México.

T2: sitio dentro del Estado de Hidalgo.

T3: sitio dentro del Estado de Tlaxcala.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN:

- ❖ Sitios que representan la trayectoria esperada de los contaminantes del aire de la zona metropolitana de la Ciudad de México, D.F., en su salida del valle hacia regiones cercanas (T0, T1, T2 y T3).
- ❖ Sitios sujetos a la problemática y el interés de participación por parte de las instituciones o entidades responsables de cada sitio.
- ❖ Muestras tomadas antes del inicio de la estación de lluvias.
- ❖ Muestras tomadas de interiores, exteriores y de exposición personal.

VARIABLES

- ❖ Lugar al que pertenecen los filtros

6. MATERIAL Y EQUIPO

MATERIAL DE VIDRIO

Cajas Petri Pyrex

Capilares sin heparina 75 mm Corning

Matraces Erlenmeyer 500 mL Pyrex

Matraces Erlenmeyer 1000 mL Pyrex

Pipetas graduadas 10 mL Pyrex

Pipeta micrométrica 10-1000 μ L Biohit

Pipeta micrométrica 20-250 μ L Biohit

Portaobjetos 25 x 75 mm Corning

Probeta graduada de 100 mL Pyrex

Probeta graduada de 500 mL Pyrex

Cubreobjetos 22 x 22 mm Corning

Tubos de ensayo 10 x 75 Pyrex

Tubos de ensayo con tapón de vaquelita 18 x 150 Pyrex

INSTRUMENTOS Y EQUIPOS

Autoclave de 21L Presto H. Steele

Agitador Vortex Cente Mod. K-550G

Balanza Analítica Noffman-Pinther H33AR

Balanza Granataria Ohaus

Baño de agua Precision 25

Estufa de secado Riossa Mod. EC

Microscopio Carl Zeiss

Refrigerador Phillips

Termómetro de -20°C a 300°C LH de México

SUSTANCIAS Y REACTIVOS

Ácido láctico JT Baker

Agua destilada Theissier

Agua libre de pirógenos Mallinckrodt

Fenol JT Baker

Glicerol JT Baker

Limulus Amebocyte Lysate (LAL) Endosafe Mallinckrodt

Estreptomicina solución inyectable Sulfestrep Laboratorios Pisa

COLORANTES

Azul de algodón de lactofenol Mallinckrodt

Rosa de Bengala Mallinckrodt

MEDIOS DE CULTIVO

Agar Dextrosa Sabouraud Dibico

MATERIAL DIVERSO

Algodón

Espátula

Filtros de teflón 37 mm estériles Millipore.

Gasa

Gradillas metálicas

Dextran EM Science.

Jeringas estériles 10 mL BD Plastipak

Lápiz diamante Curtin

Mechero Bunsen

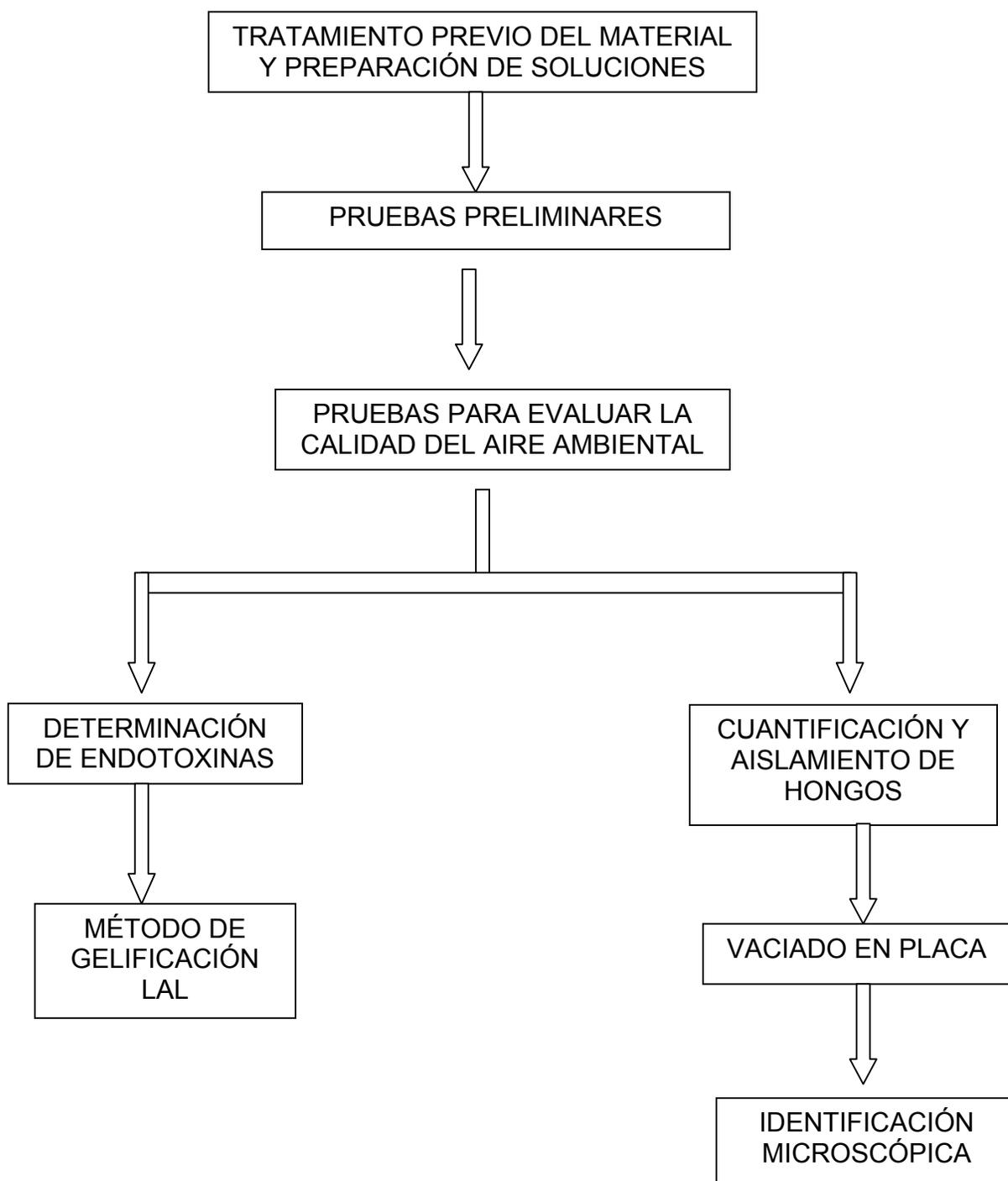
Puntas estériles para pipeta micrométrica

Tijeras

Tripié

7. DIAGRAMA DE FLUJO

En el siguiente diagrama de flujo se muestra el método utilizado en el presente trabajo.



8. MÉTODOS

8.1 PRUEBAS PREPARATORIAS

I. Lavado y esterilizado de material

Todo el material de vidrio utilizado se lavó con dextran y enjuagó con agua destilada.

Se colocaron tapones de aluminio a tubos de vidrio de 12 x 75 que posteriormente se sometieron a un ciclo para eliminar pirógenos de origen bacteriano en una estufa de secado durante 3 h a 200°C.

Los capilares sin heparina se colocaron en una estufa de secado durante 3 h a 200°C (recomendación del proveedor Mallinckrodt).

Las cajas de Petri utilizadas se esterilizaron a 15 lb de presión (121°C) durante 15 min.

II. Toma de muestras

Se utilizaron bombas SKC con filtros de teflón de 37 mm e impactadores para (partículas menores de 2.5 µm) PM 2.5 en interiores y exteriores de hogares, así como de exposición personal por un periodo de tiempo de monitoreo de 24 h.

Después del periodo, los filtros se almacenaron en un refrigerador a <4°C, para pesarse posteriormente. Este procedimiento fue realizado por el Centro Nacional de Investigación y Capacitación Ambiental (CENICA).

III. Manejo de muestras

Cada filtro de teflón fue colocado en un tubo de ensayo de 10 x 75 mm libre de pirógenos adicionando 2.5 mL de agua libre de pirógenos. Se agitó cada tubo durante 2 min a temperatura ambiente en un agitador Vortex e inmediatamente después se guardaron durante 24 h en refrigeración para realizar el aislamiento y cultivo de hongos y determinación de endotoxinas.

8.2 DETERMINACIÓN DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS

1. Se prepararon :
- A) Serie control estándar de endotoxina
 - B) Control negativo (-)
 - C) Control positivo (+)
 - D) Muestra problema

A) Serie control estándar de endotoxina

A partir del vial reconstituido (CSE) se prepararon una serie de diluciones que consistieron en 4 concentraciones correspondientes a 2λ , λ , 0.5λ y 0.25λ .

($\lambda = 0.125$ UE/mL), como sigue:

Se colocaron en un tubo libre de pirógenos $1\mu\text{L}$ del vial reconstituido CSE con 2mL de agua libre de pirógenos; para obtener una concentración de 2λ .

En otro tubo libre de pirógenos se agregaron $500\mu\text{L}$ de la dilución anterior con $500\mu\text{L}$ de agua libre de pirógenos; para obtener una concentración de λ .

De la dilución anterior se tomaron $500\mu\text{L}$ con $500\mu\text{L}$ de agua libre de pirógenos y se depositaron en un tubo estéril libre de pirógenos; para obtener una concentración de 0.5λ .

Finalmente se tomaron $500\mu\text{L}$ de la dilución anterior + $500\mu\text{L}$ de agua libre de pirógenos y se depositaron en un tubo estéril, para obtener una concentración de 0.25λ .

B) Control negativo (-)

Se agregaron $100\mu\text{L}$ de agua libre de pirógenos en un tubo estéril.

C) Control positivo (+)

Depositar $100\mu\text{L}$ de una concentración 2λ de endotoxina estándar (anteriormente preparada) en un tubo libre de pirógenos.

D) Muestra problema

Las muestras problema sin diluir fueron el agua libre de pirógenos en la que se colocaron los filtros. Aquellas muestras que resultaron positivas se les realizó las siguientes diluciones: 1:10, 1:20, 1:40 y 1:80 en tubos libres de pirógenos.

2. Una vez preparada la muestra problema:

El reactivo de *Limulus* y la muestra sin diluir se agregaron por capilaridad en un capilar estéril en volúmenes iguales (este procedimiento se realizó con mucho cuidado evitando tocar extremos del capilar) mezclando suavemente. Los capilares fueron incubados a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 60 ± 2 min, evitando cualquier tipo de vibración y se mantuvieron en reposo absoluto todos los capilares de prueba. Al finalizar el periodo de incubación, tomándose cuidadosamente cada capilar, con la ayuda de un lápiz diamante se cortaron a la mitad cada uno de ellos.

Un resultado positivo(+) se caracterizó por la formación de un gel firme.

Un resultado negativo(-) se identificó por la ausencia de un gel firme.

Aquellas muestras que presentaron un resultado positivo(+), se procedió a realizar de la misma manera, la técnica antes mencionada en cada una de las diluciones de la muestra problema, para indicar el punto final en el cual se presentó un resultado positivo.

Se efectuó el mismo procedimiento para la serie control estándar de endotoxina, para el control positivo (+) y para el control negativo (-).

3. Cálculos de concentración de endotoxina (E):

Para cada muestra se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$E \text{ (UE/mL)} = \lambda \text{ (recíproco de la dilución del punto final)}$$

en donde: $\lambda = 0.125 \text{ UE/mL}$.

8.3 CUANTIFICACIÓN Y AISLAMIENTO DE HONGOS

Se prepararon cajas Petri con medio de cultivo de aislamiento sometidas 24 h a prueba de esterilidad, inoculando 1 mL de la muestra problema (anteriormente preparada); y mezclando inmediatamente mediante movimientos rotatorios sobre una superficie horizontal. Los cultivos fueron mantenidos a temperatura ambiente hasta 1 semana, observando diariamente su crecimiento. Se contaron todas las colonias desarrolladas en las placas, no importando las características que presentaron; y se efectuó un reporte de las características macroscópicas observadas.

Las placas que desarrollaron crecimiento, a todas las colonias se les realizó la tinción con azul de algodón-lactofenol y Gram para observar sus características microscópicas e identificar su género.

9. RESULTADOS

I. DETERMINACIÓN DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS

1. Muestras analizadas

Se analizaron muestras de aire, de uso personal, de interiores y exteriores de hogares pertenecientes a cuatro sitios diferentes de monitoreo. De acuerdo a ello, en la siguiente tabla se muestra el número total de muestras analizadas, así como el número total de muestras que resultaron positivas detectables a endotoxinas bacterianas, con una λ (sensibilidad del reactivo LAL) = 0.125 UE/mL.

TABLA 1. TOTAL DE MUESTRAS ANALIZADAS Y TOTAL DE MUESTRAS POSITIVAS DETECTABLES

SITIO	TOTAL DE MUESTRAS ANALIZADAS	MUESTRAS POSITIVAS *		
		PERSONAL	INTERIORES	EXTERIORES
Distrito Federal	184	5 / 25	25 / 64	24 / 95
Edo. de México	93	3 / 14	5 / 28	14 / 51
Hidalgo	70	4 / 14	8 / 22	8 / 33
Tlaxcala	39	-	3 / 6	2 / 8
TOTAL	386			

*Relación de muestras positivas / muestras analizadas

2. Sitio T0 (Distrito Federal) Muestras positivas

TABLA 2-A. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE CONCENTRACIÓN DE
ENDOTOXINAS SITIO T0 PERSONALES

MUESTRA	TÍTULO DEL PUNTO FINAL (UE/ mL)	PESO (mg)	CONCENTRACIÓN DE ENDOTOXINAS (UE/mg) *
5	1:2 (0.250)	0.275	0.9090
14	1:2 (0.250)	0.202	1.2376
16	1:20 (2.5)	0.142	17.605
18	1:20 (2.5)	0.211	11.848
24	1:2 (0.250)	0.364	0.686
			MEDIA 1.2913 SD 4.1319

* Resulta del Título del punto final / Peso

TABLA 2-B. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE CONCENTRACIÓN DE
ENDOTOXINAS SITIO T0 INTERIORES

MUESTRA	TÍTULO DEL PUNTO FINAL (UE/mL)	PESO (mg)	CONCENTRACIÓN DE ENDOTOXINAS (UE/mg)*
1	1:2 (0.250)	0.155	1.6146
2	1:2 (0.250)	0.157	1.5940
8	1:2 (0.250)	0.152	1.6465
14	1:10 (1.25)	0.108	11.5919
16	1:2 (0.250)	0.103	2.4311
18	1:2 (0.250)	0.121	2.0689
19	1:10 (1.25)	0.079	15.8562
20	1:2 (0.250)	0.047	5.3380
23	1:20 (2.5)	0.092	27.2232
25	1:20 (2.5)	0.121	20.6896
28	1:2 (0.250)	0.109	2.2970
32	1:2 (0.250)	0.104	2.4077
33	1:10 (1.25)	0.105	11.9236
34	1:10 (1.25)	0.067	18.7032
36	1:2 (0.250)	0.069	3.6232
46	1:2 (0.250)	0.118	2.1186
47	1:2 (0.250)	0.012	20.8333
52	1:10 (1.25)	0.057	21.9298
54	1:2 (0.250)	0.085	2.9411
55	1:2 (0.250)	0.1	2.5
64	1:2 (0.250)	0.195	1.2820
			MEDIA 2.8220 SD 6.3545

* Resulta del Título del punto final / Peso

TABLA 2-C. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE CONCENTRACIÓN DE
ENDOTOXINAS SITIO T0 EXTERIORES

MUESTRA	TÍTULO DEL PUNTO FINAL (UE/mL)	PESO (mg)	CONCENTRACIÓN DE ENDOTOXINAS (UE/mg)*
1	1:2 (0.250)	0.235	1.0638
8	1:2 (0.250)	0.060	4.166
10	1:2 (0.250)	0.116	2.1551
11	1:2 (0.250)	0.123	2.0233
18	1:2 (0.250)	0.138	1.8115
19	1:2 (0.250)	0.158	1.5822
20	1:2 (0.250)	0.222	1.1261
23	1:2 (0.250)	0.078	3.2051
27	1:2 (0.250)	0.105	23.8095
29	1:2 (0.250)	0.105	2.3809
34	1:2 (0.250)	0.085	2.9411
35	1:10 (1.25)	0.082	15.2439
36	1:10 (1.25)	0.082	15.2439
37	1:2 (0.250)	0.080	3.125
38	1:2 (0.250)	0.016	15.625
41	1:2 (0.250)	0.091	2.7472
60	1:2 (0.250)	0.07	3.5714
69	1:2 (0.250)	0.064	3.9062
79	1:2 (0.250)	0.15	1.6666
89	1:2 (0.250)	0.154	1.6233
90	1:2 (0.250)	0.281	0.8896
92	1:2 (0.250)	0.282	0.8865
93	1:10 (1.25)	0.285	4.3859
95	1:10 (1.25)	0.211	5.9241
			MEDIA 1.2748 SD 3.7001

*Resulta del Título del punto final / Peso

3. Sitio T1 (Estado de México) Muestras positivas

TABLA 3-A. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE CONCENTRACIÓN DE ENDOTOXINAS SITIO T1 PERSONALES

MUESTRA	TÍTULO DEL PUNTO FINAL (UE/mL)	PESO (mg)	CONCENTRACIÓN DE ENDOTOXINAS (UE/mg)*
1	1:2 (0.250)	0.275	0.9090
4	1:2 (0.250)	1.578	0.1584
6	1:2 (0.250)	0.102	2.4509
			MEDIA 0.2513 SD 0.6779

*Resulta del Título del punto final / Peso

TABLA 3-B. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE CONCENTRACIÓN DE ENDOTOXINAS SITIO T1 INTERIORES

MUESTRA	TÍTULO DEL PUNTO FINAL (UE/mL)	PESO (mg)	CONCENTRACIÓN DE ENDOTOXINAS (UE/mg)*
3	1:2 (0.250)	0.027	9.2592
10	1:2 (0.250)	0.069	3.6231
12	1:2 (0.250)	0.109	2.2935
26	1:2 (0.250)	0.282	0.8865
28	1:2 (0.250)	0.22	1.1363
			MEDIA 0.6142 SD 1.8820

*Resulta del Título del punto final / Peso

TABLA 3-C. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE CONCENTRACIÓN DE
ENDOTOXINAS SITIO T1 EXTERIORES

MUESTRA	TÍTULO DEL PUNTO FINAL (UE/mL)	PESO (mg)	CONCENTRACIÓN DE ENDOTOXINAS (UE/mg)*
3	1:2 (0.250)	0.090	2.7777
4	1:2 (0.250)	0.089	2.8089
5	1:10 (1.25)	0.105	11.9047
6	1:2 (0.250)	0.202	1.2376
7	1:2 (0.250)	0.109	2.2935
8	1:10 (1.25)	0.067	18.6567
28	1:2 (0.250)	0.106	2.3584
29	1:2 (0.250)	0.11	2.2727
34	1:20 (2.5)	0.072	34.72
46	1:2 (0.250)	1.397	0.1789
47	1:2 (0.250)	1.603	0.1559
48	1:2 (0.250)	0.294	0.8503
50	1:2 (0.250)	0.128	1.9531
51	1:2 (0.250)	0.171	1.4619
			MEDIA 1.6398 SD 5.6533

* Resulta del Título del punto final / Peso

4. Sitio T2 (Hidalgo) Muestras positivas

TABLA 4-A. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE CONCENTRACIÓN DE
ENDOTOXINAS SITIO T2 PERSONALES

MUESTRA	TÍTULO DEL PUNTO FINAL (UE/mL)	PESO (mg)	CONCENTRACIÓN DE ENDOTOXINAS (UE/mg)*
6	1:2 (0.250)	0.058	4.2857
8	1:2 (0.250)	0.392	0.6372
9	1:2 (0.250)	0.093	2.6758
15	1:2 (0.250)	0.571	0.4375
			MEDIA 0.5742 SD 1.2867

*Resulta del Título del punto final / Peso

TABLA 4-B. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE CONCENTRACIÓN DE
ENDOTOXINAS SITIO T2 INTERIORES

MUESTRA	TÍTULO DEL PUNTO FINAL (UE/mL)	PESO (mg)	CONCENTRACIÓN DE ENDOTOXINAS (UE/mg)*
1	1:10 (1.25)	0.090	13.8376
5	1:2 (0.250)	0.144	1.6968
7	1:2 (0.250)	0.140	1.7814
11	1:2 (0.250)	0.072	3.4562
12	1:2 (0.250)	0.117	2.4306
17	1:10 (1.25)	0.018	69.44
21	1:20 (2.5)	0.018	138.8888
22	1:20 (2.5)	0.038	65.7894
			MEDIA 13.5009 SD 34.2569

*Resultado del Título del punto final / Peso

TABLA 4-C. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE CONCENTRACIÓN DE
ENDOTOXINAS SITIO T2 EXTERIORES

MUESTRA	TÍTULO DEL PUNTO FINAL (UE/mL)	PESO (mg)	CONCENTRACIÓN DE ENDOTOXINAS (UE/mg)*
10	1:2 (0.250)	0.089	2.7985
12	1:20 (2.5)	0.043	57.6923
17	1:2 (0.250)	0.041	6.0483
20	1:2 (0.250)	0.038	6.5789
30	1:2 (0.250)	0.073	3.4246
31	1:2 (0.250)	0.026	9.6158
32	1:2 (0.250)	0.224	1.1160
33	1:2 (0.250)	0.159	1.5723
			MEDIA 2.6923 SD 10.1316

*Resultado del Título del punto final / Peso

5. Sitio T3 (Tlaxcala) Muestras positivas

TABLA 5-A. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE CONCENTRACIÓN DE ENDOTOXINAS SITIO T3 INTERIORES

MUESTRA	TÍTULO DEL PUNTO FINAL (UE/mL)	PESO (mg)	CONCENTRACIÓN DE ENDOTOXINAS (UE/mg)*
2	1:2 (0.250)	0.017	14.2857
5	1:2 (0.250)	0.033	7.4626
6	1:2 (0.250)	0.047	5.2631
			MEDIA 4.5019 SD 5.7597

*Resulta del Título del punto final / Peso

TABLA 5-B. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE CONCENTRACIÓN DE ENDOTOXINAS SITIO T3 EXTERIORES

MUESTRA	TÍTULO DEL PUNTO FINAL (UE/mL)	PESO (mg)	CONCENTRACIÓN DE ENDOTOXINAS (UE/mg)*
2	1:10 (1.25)	0.029	169.4915
7	1:2 (0.250)	0.036	6.8493
			MEDIA 22.0426 SD 59.6265

*Resulta del Título del punto final / Peso

Conforme a los resultados obtenidos, se presentan una serie de gráficas, que corresponden a las medias de la concentración de endotoxinas para cada sitio de monitoreo, así como para el lugar en el que se encontraron.

Concentración de endotoxinas Personales

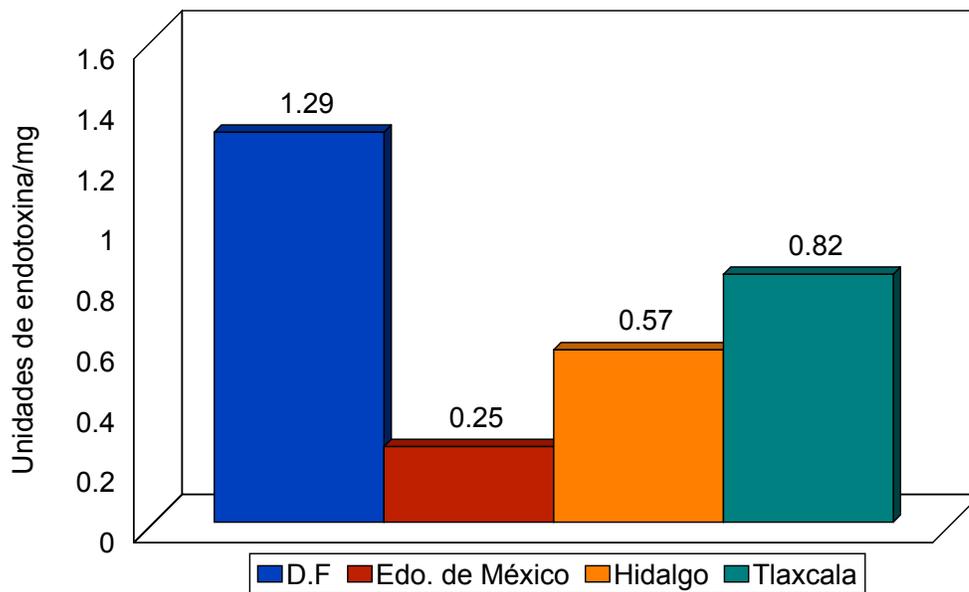


FIG 6. Concentración de endotoxinas personales por cada sitio.

Concentración de endotoxinas

Interiores

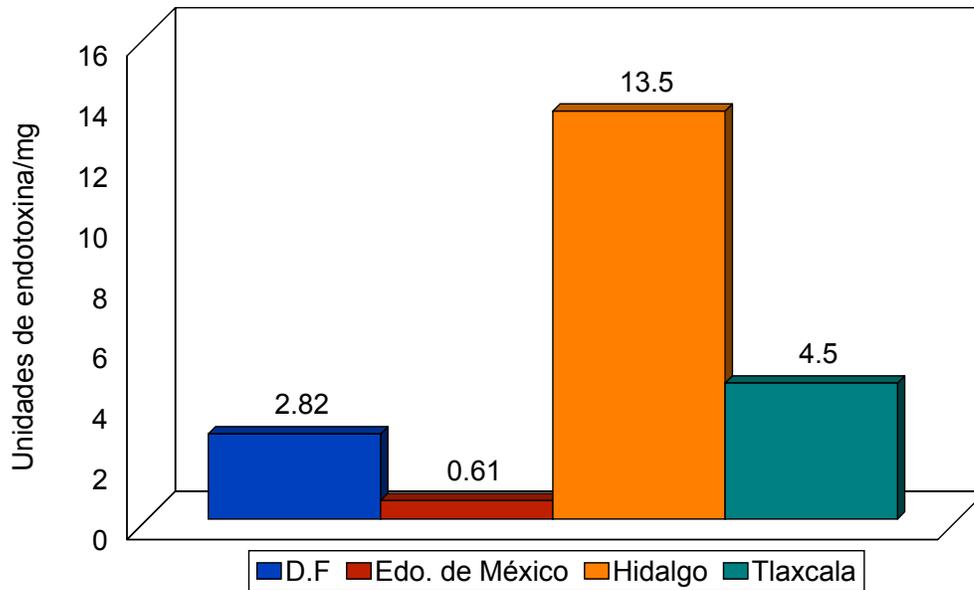


FIG 7. Concentración de endotoxinas presentes en interiores por cada sitio.

Concentración de endotoxinas

Exteriores

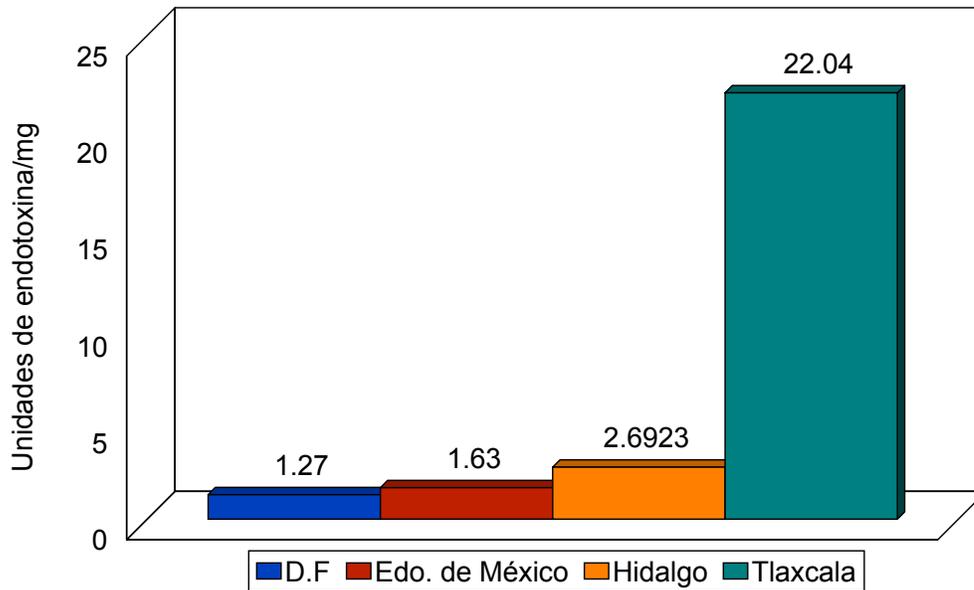


FIG 8. Concentración de endotoxinas presentes en exteriores por cada sitio.

Concentración de endotoxinas

Distrito Federal

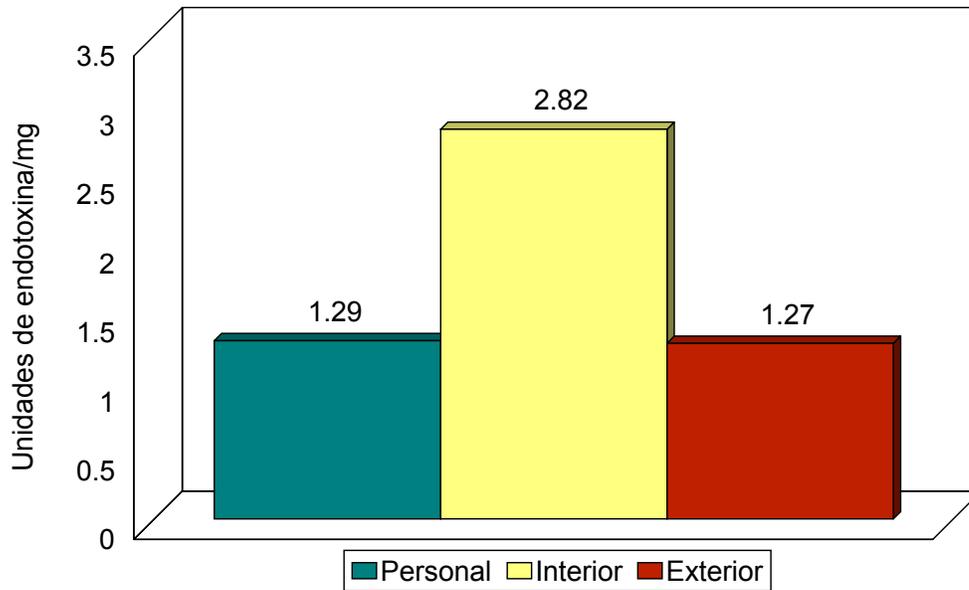


FIG 9. Concentración en general de endotoxinas presentes en el Distrito Federal.

Concentración de endotoxinas

Estado de México

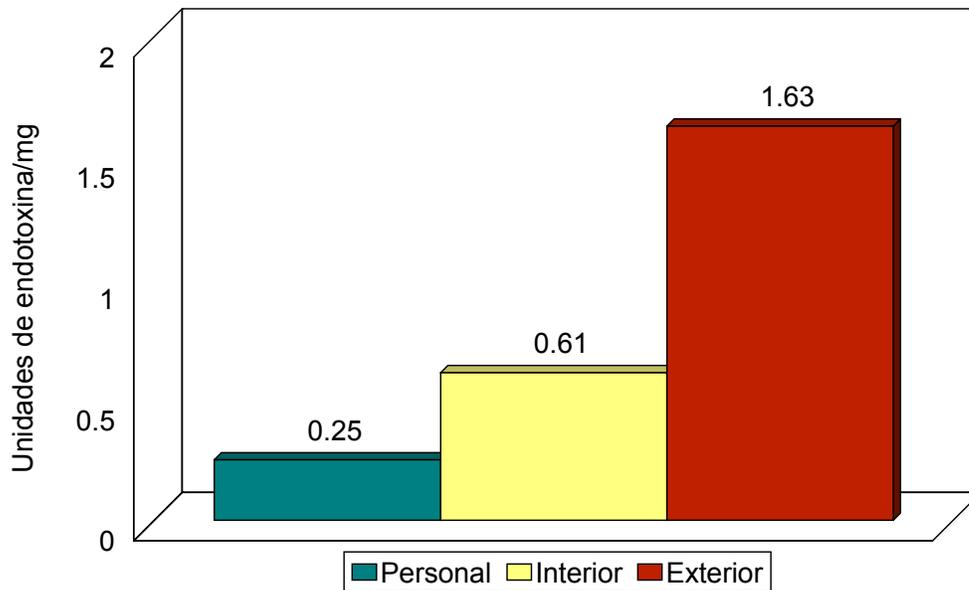
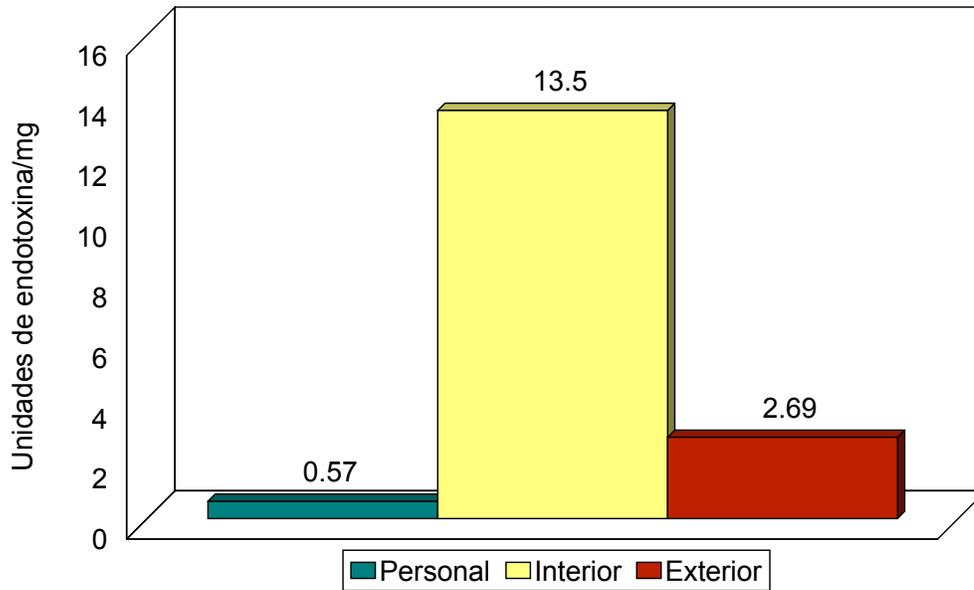


FIG 10. Concentración en general de endotoxinas presentes en el Estado de México.

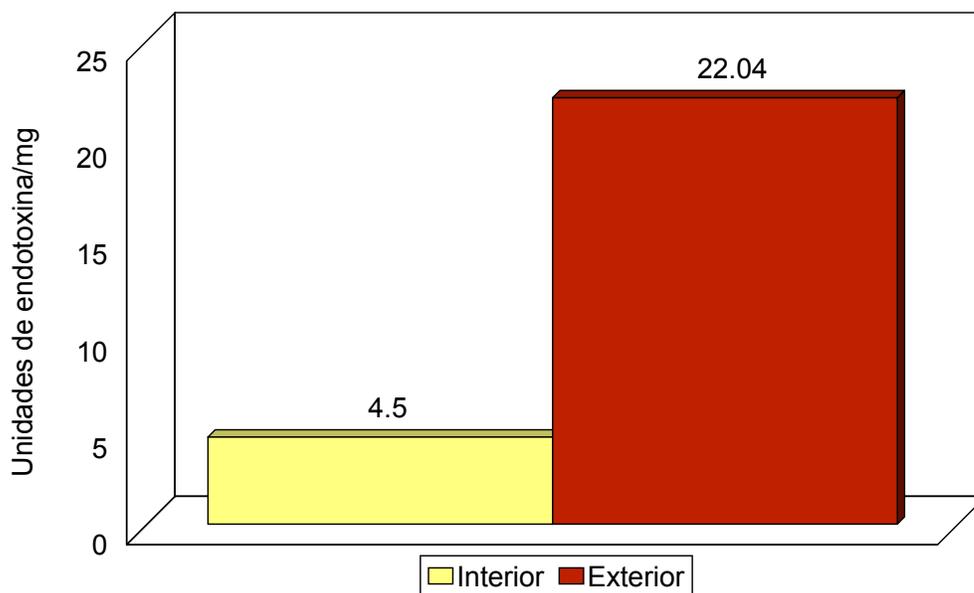
Concentración de endotoxinas

Hidalgo



Concentración de endotoxinas

Tlaxcala



II. AISLAMIENTO DE HONGOS

Se analizaron muestras de aire de uso personal, de interiores y exteriores de hogares pertenecientes a tres sitios diferentes de monitoreo. De acuerdo a ello, en las siguientes tablas se muestra el número total de muestras analizadas, así como el número total de colonias de hongos que se aislaron, conforme a los sitios de monitoreo.

TABLA 6. TOTAL DE MUESTRAS COLECTADAS Y TOTAL DE AISLAMIENTOS

	TOTAL DE MUESTRAS	TOTAL DE AISLAMIENTOS	%
PERSONALES	54	90	20.93%
INTERIORES	145	145	33.72%
EXTERIORES	187	195	45.34%
TOTAL	386	430	100%

TABLA 7. TOTAL DE AISLAMIENTOS DE ACUERDO A LOS SITIOS DE MONITOREO

SITIO	PERSONAL	INTERIORES	EXTERIORES	TOTAL
Distrito Federal	35	85	125	245
Edo. de México	20	40	55	115
Hidalgo	35	10	15	60
Tlaxcala	0	10	0	10
TOTAL	90	145	195	430

TABLA 8. No. DE COLONIAS AISLADAS POR GÉNEROS DE MUESTRAS PERSONALES

GÉNEROS	No. DE COLONIAS	%
<i>Acremonium sp</i>	15	16.66
<i>Cladosporium sp</i>	5	5.55
<i>Geotrichum sp</i>	5	5.55
<i>Microsporum sp</i>	15	16.66
<i>Penicillium sp</i>	35	38.88
<i>Rhizopus sp</i>	5	5.55
Levaduras	10	11.11
TOTAL	90	100%

TABLA 9. No. DE COLONIAS AISLADAS POR GÉNEROS EN MUESTRAS DE INTERIORES

GÉNEROS	No. DE COLONIAS	%
<i>Acremonium sp</i>	10	6.88
<i>Alternaria sp</i>	5	3.44
<i>Aspergillus sp</i>	10	6.88
<i>Cladosporium sp</i>	15	10.34
<i>Fusarium sp</i>	5	3.44
<i>Geotrichum sp</i>	5	3.44
<i>Microsporum sp</i>	15	10.34
<i>Phaeoannelomyces sp</i>	15	10.34
<i>Penicillium sp</i>	30	20.68
<i>Trichophyton sp</i>	5	3.44
Levaduras	30	20.68
TOTAL	145	100%

TABLA 10. No. DE COLONIAS AISLADAS
POR GÉNEROS EN MUESTRAS DE EXTERIORES

GÉNEROS	No. DE COLONIAS	%
<i>Acremonium sp</i>	15	7.68
<i>Alternaria sp</i>	10	5.12
<i>Aspergillus sp</i>	15	7.68
<i>Cladosporium sp</i>	20	10.25
<i>Fusarium sp</i>	5	2.56
<i>Geotrichum sp</i>	5	2.56
<i>Microsporum sp</i>	15	7.68
<i>Penicillium sp</i>	80	41.02
<i>Trichophyton sp</i>	10	5.12
Levaduras	20	10.25
TOTAL	195	100%

De acuerdo a los resultados obtenidos, la frecuencia de aislamiento para cada género identificado fue la siguiente:

Personales

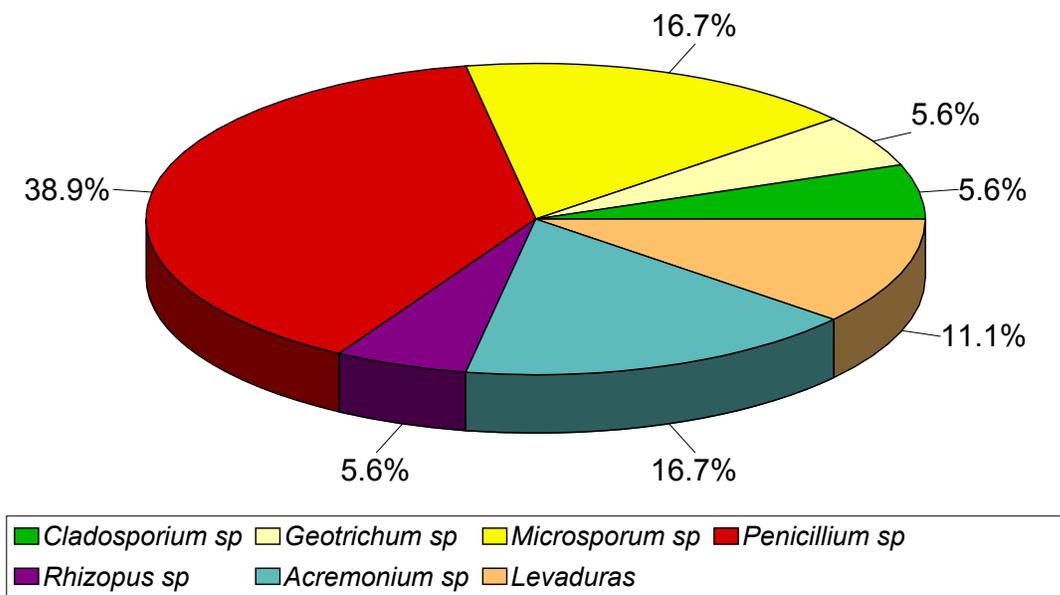


FIG 13. Frecuencia del número total de aislamientos personales.

Interiores

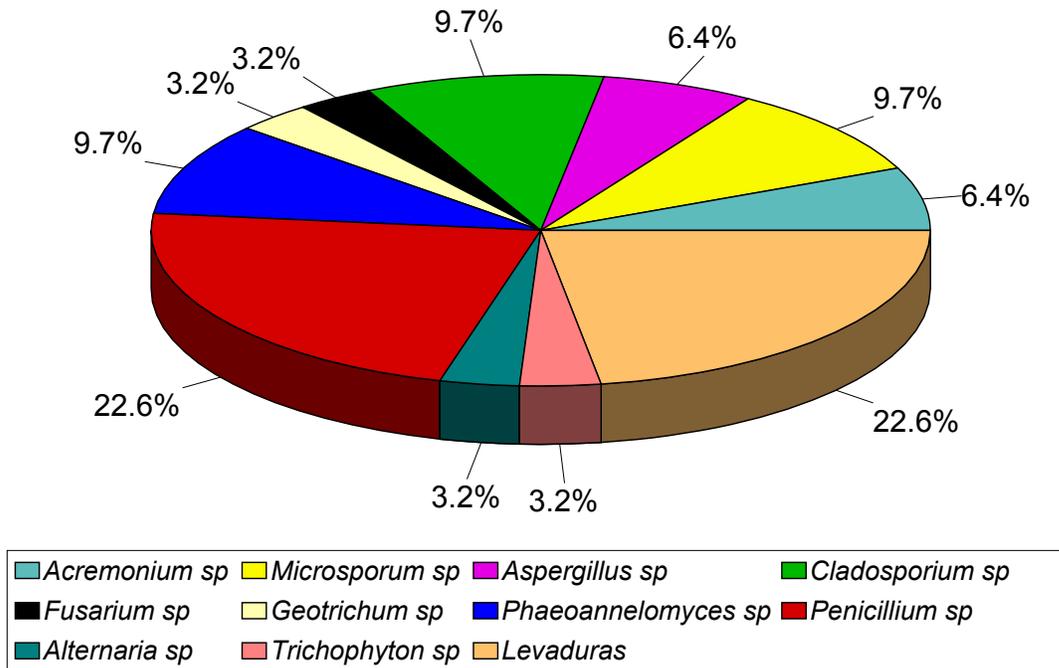


FIG 14. Frecuencia del número total de aislamientos en interiores.

Exteriores

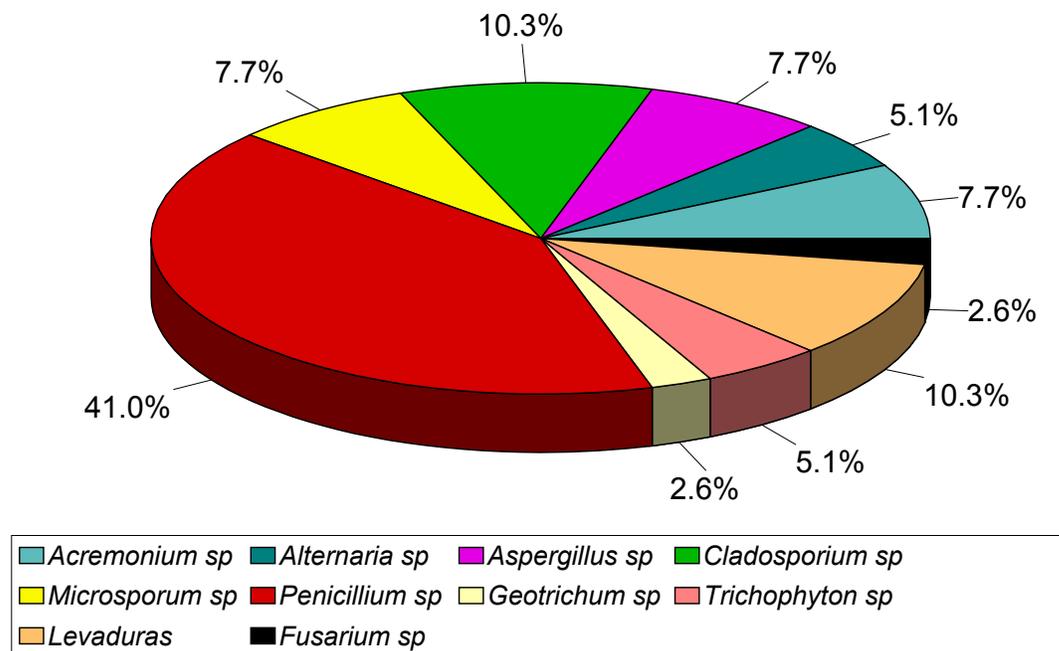


FIG 15. Frecuencia del número total de aislamientos en exteriores.

10. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

De acuerdo a los resultados obtenidos, con respecto a la concentración de endotoxinas bacterianas, indicados en las tablas 1-7; se logra observar, con respecto a las medias, que todos los sitios y sus respectivos ambientes estudiados mostraron tener presencia de endotoxinas; y que el valor más alto corresponde a las muestras de exteriores de hogares del estado de Tlaxcala (22.04 UE/mg); la presencia de LPS indican bacterias Gram negativas que llegan a contaminar lo que nos rodea, a través del fecalismo al aire libre, de humanos y animales, así como otras fuentes como son las descargas de aguas negras a cielo abierto y los centros de manejo de desechos sólidos de materia orgánica, donde se multiplican rápidamente éstas bacterias por requerir de muy pocos nutrientes.

En cuanto a interiores de hogares, los valores encontrados fueron los siguientes: Hidalgo (13.50 UE/mg), Tlaxcala (4.50 UE/mg), Distrito Federal (2.82 UE/mg) y Estado de México (0.61 UE/mg); lo cual indica que los niveles más altos de endotoxinas en este caso, nos sugiere que se debe a problemas de higiene, resultado del mal manejo de excretas, sobre todo en los estados rurales donde hay menor control higiénico; además de que es importante la ventilación que haya en cada hogar, ya que se incrementa la cantidad considerablemente cuando hay menores corrientes de aire, además de ser influenciado por las actividades que ahí se realicen.

Con respecto a las muestras de exposición personal, a lo que están expuestas las personas durante sus actividades (a las cuales denominamos personales), se obtuvieron las siguientes concentraciones: Distrito Federal (1.2913 UE/mg), Hidalgo (0.5742 UE/mg) y el Estado de México (0.2513 UE/mg); estos resultados dejan ver que la contaminación ambiental generada por el crecimiento poblacional y los mayores niveles de industrialización también influyen de manera importante en la presencia de endotoxinas bacterianas, ya que la Ciudad de México posee características fisiográficas y climáticas únicas que contribuyen de manera determinante en la severidad de los problemas de contaminación de la ciudad y esto a su vez a sus habitantes que realizan sus actividades y continuamente cambian de ambientes. Sin embargo cabe señalar que éstas diferencias encontradas, aunque son importantes y se hallan reportadas en la literatura, en

éste trabajo no son muy significativas dado que el número de muestras no fue uniforme en todos los casos e incluso en algunas es muy heterogénea la cantidad utilizada. Por otra parte dado que las endotoxinas conservan su actividad aún cuando las bacterias estén muertas, no se emplearon métodos cuantitativos que se basaran exclusivamente en el número de bacterias viables, sino que se realizó el ensayo de coagulación de la hemolinfa de amebocitos de *Limulus*. El cual es un método *in vitro* que detecta con alta sensibilidad la presencia de endotoxinas bacterianas, a diferencia de la prueba en conejos que es capaz de detectar cualquier sustancia pirogénica.

La reacción desarrollada es esencialmente la misma que ocurre *in vivo* en la hemolinfa del cangrejo herradura frente a las endotoxinas, determinada por la formación de un gel o coágulo insoluble mediante una reacción enzimática donde la enzima activada (coagulasa), hidroliza los enlaces específicos de la proteína presente en el reactivo LAL (Lisado de Amebocitos de *Limulus*) (coagulógeno) dando resultado a la coagulina, que forma un coágulo que indica la presencia de endotoxinas.

El método utilizado resultó ser simple, rápido, efectivo y confiable; sin embargo, tiene la desventaja de una posible destrucción accidental del gel durante la incubación o la lectura por lo que deben efectuarse ciertas medidas, ya que se interrumpe la reacción de gelificación en forma irreversible, puede reflejar falsos negativos; además el alcance del método está limitado únicamente por la sensibilidad del reactivo y no se pueden cuantificar endotoxinas por debajo de ésta.

Además de ello, durante la metodología empleada se controlaron diversas posibles interferencias: se utilizó agua libre de pirógenos; la endotoxina control estándar (CSE) y el reactivo LAL se reconstituyeron al momento de su uso, se verificó su caducidad y se almacenaron a la temperatura indicada en el marbete; en cuanto al material utilizado, tanto el de vidrio como el de plástico fueron usados una sola vez y libres de material pirogénico.

Por otro lado, en cuanto al análisis de hongos, se aislaron 430 colonias en total, en los diferentes sitios de monitoreo, obteniendo las mayores cantidades en ambientes exteriores de hogares (195 colonias), seguido de interiores (145

colonias) y posteriormente las de exposición personal (90 colonias). Éstos resultados eran de esperarse, ya que en el aire existe una gran cantidad de partículas fúngicas, que son llevadas a grandes distancias por los vientos y así logran estar ampliamente distribuidas en la naturaleza; y por medio de sus esporas aseguran su dispersión y supervivencia en condiciones ambientales extremas; estas condiciones como la humedad, la temperatura, materia orgánica, contaminación y actividades humanas reúnen las condiciones óptimas, para que puedan estar presentes e influye de manera determinante en la proliferación y propagación de las partículas fúngicas hacia los espacios interiores. Sin embargo, al crecer en el interior de casas, también logran concentrarse en gran cantidad ya que los vientos de poca velocidad favorecen su acumulación y se concentran en los desechos alimenticios, las alfombras sucias y los contenedores de basura, contaminando a su vez pisos, aparatos electrónicos, etc.

Por estos motivos se consideró importante conocer los niveles de biota fúngica tanto en interiores y exteriores de hogares, así como a los que están expuestos las personas durante sus actividades ya que su importancia radica no sólo en su capacidad de estar en los diferentes ambientes que rodean al ser humano produciendo esporas, sino también al ser inhaladas, constituyendo un riesgo para la salud, induciendo alergias y atopias en un porcentaje elevado de la población, así como también generando micosis en los huéspedes susceptibles.

En las tablas 8-10 se detallan los géneros aislados, así como el número de colonias y sus correspondientes porcentajes; en el que se muestra que el género predominante tanto en interiores y exteriores, así como los personales fue *Penicillium sp* el cual, en gran medida forma parte de la biota normal del ambiente. Cabe destacar que las esporas de hongos del suelo y la vegetación constituyen aeroalergenos importantes, y aunque la sensibilidad a los hongos es menos común que la alergia al polen, las esporas de *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Rhizopus* constituyen alergenos importantes para algunos individuos, como lo cita Nadel (1968) los cuales se encontraron en todos los aislamientos realizados, sin embargo cobra importancia en las muestras personales y de los interiores, ya que éstos son los que se

encuentran mayormente en contacto con las personas y seguramente correlacionan con mayor incidencia de alergias en la población.

Por otra parte se lograron aislar hongos que se conocen llegan a producir enfermedades micóticas, los cuales fueron: *Microsporum*, *Trichophyton*, *Acremonium*; *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Fusarium* y *Geotrichum*; ante ello es de suma importancia el hecho de que se hubiese identificado género y especie para aseverar con mayor exactitud la prevalencia y los microorganismos generadores de dichas afecciones en el ser humano.

Así mismo, cabe señalar que los aislamientos por sitio, representados en la tabla 7 de resultados ilustran que existieron diferencias, entre el número de aislamientos ya que las zonas tienen características ambientales diferentes, lo cual influye de manera determinante sobre los aislamientos de los hongos ambientales.

Por otra parte, en cuanto a la metodología empleada para realizar la cuantificación y aislamiento de hongos, se utilizó agar Dextrosa Sabouraud con rosa de Bengala y estreptomina, tomando como referencia las mismas concentraciones y proporciones que posee el medio de cultivo Martín. Esta modificación resultó ser efectiva, ya que el rosa de Bengala utilizado permitió aislar los hongos reduciendo el crecimiento radial de las colonias sin afectar la germinación de las esporas; por su parte, la estreptomina utilizada inhibió el crecimiento bacteriano, mediante la acción sobre los ribosomas de las bacterias inhibiendo la síntesis de proteínas. Sin embargo aún cuando resultó ser eficiente se recomienda reemplazarlo por otro antibacteriano ya que en algunas muestras hubo crecimiento de bacterias, aunque éstas no fueron significativas.

A partir del crecimiento fúngico se procedió a hacer recuento de colonias y se realizó la identificación macroscópica, basándose en la morfología colonial para una identificación presuntiva, sin dejar de considerar que las mismas especies de hongos pueden no parecer iguales cuando se cultivan en condiciones ambientales y medios de cultivo diferentes. Posteriormente se examinaron con la tinción de azul de algodón y aquellas colonias que presentaron un aspecto cremoso con una superficie lisa, que a veces simulan colonias bacterianas se examinaron con tinción de Gram, para poder asegurar que se trataban de levaduras.

11. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede concluir que si bien el problema de contaminación del aire por endotoxinas bacterianas se encuentra en todos los lugares estudiados; en general se hayan en los intervalos permisibles, citados por Rosas y cols. de 1 a 1000 UE/mg, de los cuales es más frecuente que se sitúen entre 10-100 UE/mg. Sin embargo, el mayor problema se encontró en los exteriores de hogares del Estado de Tlaxcala (22.04 UE/mg), lo que indica que las zonas rurales tienen una presencia mas alta, sugiriendo un mayor fecalismo al aire libre, así como descargas de aguas negras a cielo abierto.

En cuanto al análisis de hongos, se lograron aislar una amplia gama de géneros, los cuales van desde la biota normal encontrada en el ambiente, hasta aquellos capaces de producir alergias y enfermedades micóticas en el ser humano; presentándose una mayor cantidad en los exteriores de hogares, lo que significa que existen las condiciones para que se desarrollen esporas, que se correlacionan por su potencial patogenicidad con una variedad de afecciones en un porcentaje elevado de la población.

Dado lo anterior esta información es muy importante, con el fin de contribuir a identificar los niveles de los contaminantes del aire en áreas vecinas o frontera a la Ciudad de México, y éstos a su vez proporcionan elementos de juicio para entender la importancia de la contaminación del aire en conjunto; de tal forma que influyan en las políticas a seguir, por parte de las autoridades responsables del sector salud, así como de ecología.

12. PROPUESTAS

- ❖ Determinar la presencia de esporas de hongos en el ambiente en diferentes estaciones del año y establecer su correlación con la incidencia de alergias y atopias, en la población susceptible a estos microorganismos.
- ❖ Llevar a cabo un estudio similar en otras megaciudades importantes del país, con el fin de conocer la influencia del crecimiento poblacional y la contaminación que se genera sobre la salud de sus habitantes.

13. ANEXOS

ANEXO 1. REACTIVOS

A. SOLUCION STOCK DE ROSA DE BENGALA 100X (3 µg/mL)

Pesar 0.075 g de rosa de Bengala en una balanza analítica y se transfiere a un matraz Erlenmeyer de 500 mL con 250 mL de agua destilada.

B. SOLUCION STOCK DE ESTREPTOMICINA 100X (30µg/mL)

Reconstituir con 2 mL de agua libre de pirógenos una ampolleta de estreptomicina inyectable; de dicha solución se toman 10 µL y depositan en un vaso de precipitado el cual tendrá contenido 9.9 mL de agua libre de pirógenos.

C. REACTIVO LIOFILIZADO “LISADO DE AMEBOCITOS DE *LIMULUS*”

Reconstituir con 1.2 mL de agua libre de pirógenos el vial liofilizado LAL.

D. CONTROL ESTANDAR DE ENDOTOXINA (CSE)

Reconstituir con 5 mL de agua libre de pirógenos el vial CSE y proceder a agitar vigorosamente durante 5 min.

ANEXO 2. MEDIO DE AISLAMIENTO

A. AGAR DEXTROSA SABOURAUD

Peptona especial	10 g
Dextrosa	40 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 000 mL

Preparación del medio de aislamiento:

Se pesaron y rehidrataron 65 g del medio deshidratado agar Dextrosa Sabouraud en un litro de agua destilada. Se mezcló bien agitando frecuentemente, en presencia de calor hasta el punto de ebullición durante un minuto para disolverlo por completo; posteriormente se distribuyeron 15 mL, en tubos de ensayo con tapón de vaquelita. A cada tubo se le agregaron 150 μ L de la solución stock de rosa de Bengala y se esterilizaron en autoclave a 121°C (15 lb de presión) durante 15 min. Después de esterilizar el medio de cultivo, se conservó en baño maría a 45°C y se le adicionaron a cada uno 100 μ L de solución stock de estreptomicina.

Se vació el contenido de cada tubo en cajas Petri previamente esterilizadas y se mezclaron mediante movimientos rotatorios sobre una superficie horizontal. Se dejaron que solidificaran y se conservaron hasta su uso a temperatura ambiente.

ANEXO 3. TINCIONES

A. TINCIÓN DE AZUL DE ALGODÓN-LACTOFENOL

Ácido láctico	20 mL
Fenol en cristales	20 g
Glicerol	40 mL
Azul de algodón	0.5 g
Agua destilada	20 mL

Técnica :

1. Poner un portaobjetos limpio sobre una superficie transparente e iluminada, si esto no es posible, podrá ponerse sobre una hoja blanca.
2. Poner una gota pequeña de azul de algodón-lactofenol en el centro del portaobjetos.
3. Tomar un fragmento de la colonia con una asa recta o con aguja de disección.
4. Montar la preparación depositando suavemente un cubreobjetos sobre el portaobjetos.
5. Sellar la preparación con esmalte incoloro de uñas.
6. Observar a 10x y 40x.

B. TINCIÓN DE GRAM

1. *Cristal violeta (solución concentrada)*

Cristal violeta	20 g
Alcohol etílico absoluto	100 mL

2. *Solución concentrada de oxalato*

Oxalato de amonio	1 mL
Agua destilada	100 mL

Mezclar la solución 1 con la 2.

3. *Solución de yodo (lugol)*

Yodo	1 g
Yoduro de potasio	2 mL

Disolver completamente en 5 mL de agua destilada y agregar 240 mL de agua destilada.

Bicarbonato de sodio al 5% en solución acuosa 60 mL

Mezclar bien y conservar en frasco ámbar con tapón esmerilado.

4. *Alcohol acetona*

Alcohol etílico absoluto	250 mL
Acetona	250 mL

Mezclar y conservar en frasco con tapón esmerilado.

5. *Solución de safranina concentrada*

Safranina O	2.5 g
Alcohol etílico absoluto	100 mL

Solución de trabajo: diluir safranina 1:5 ó 1:10 con tapón esmerilado.

Técnica:

1. Fijar el frote con calor.
2. Cubrir el frote con cristal violeta y dejar durante 10 segundos.
3. Escurrir el colorante y lavar con agua.
4. Cubrir la preparación con lugol, dejar 10 segundos y lavar con agua.
5. Decolorar con alcohol-acetona durante 10 segundos e inmediatamente enjuagar con agua.
6. Cubrir la preparación con safranina durante 10 segundos.
7. Lavar con agua y dejar secar al aire.
8. Examinar al microscopio con aceite de inmersión (100x).

REFERENCIAS

1. Jawetz E, Mellinck JL. Microbiología Médica. 14^a ed. México: El Manual Moderno;1995. p.143-49, 333-56.
2. Homma JY, Kanegasaki S, Lüderitz O, Shibaand T, Westphal O. Bacterial Endotoxin. Chemical, biological and Clinical Aspects. Germany: Verlag Chemie;1984. p. 351-94.
3. Rosas PI, Salinas CE, Osornio VA. Endotoxinas Daño imperceptible. Ciencia y Desarrollo 2006;32(193):7-11.
4. Gorny RL, Douwes J, Versloot P, Heederik D, Dutkiewicz J. Application of the classic *Limulus* test and the quantitative kinetic chromogenic LAL method for evaluation of endotoxin concentration in indoor air. Ann Agric Environ Med 1999;6:45-51.
5. Zinsser S, Wolfgang KJ, Hilda PW, Amos DB. Microbiología. 20^a ed. España: Médica Panamericana;1998. p.111-126.
6. Martí SM, Espadalé AM, Aubert CA. Centro Nacional de Condiciones de Trabajo [serial online]1994. Available from: URL:http://www.mtas.es/insht/ntp/ntp_422.ht
7. Wesley AV, David CB, Robert JK, Thomas PJ. Essentials of Medical Microbiology. 4a ed. USA: Lippincott Company; 1991. p. 190-192,244-248.
8. Prior BR. Clinical Applications of the *Limulus* Amoebocyte Lysate Test. New York: CRC Press; 1990. p. 2-38.
9. Pradeau D. Análisis Químicos Farmacéuticos de Medicamentos. México: Limusa; 1998. p.858-868.
10. Ruth E, Wachtel, Tsuji K. Comparison of *Limulus* Amebocyte Lysate and Correlation with the United States Pharmacopeial pyrogen test. Applied and Environmental Microbiology 1977;33(6):1265-1269.
11. Rico CN. Validación del proceso de despirogenización para ampollita de 2mL. (tesis licenciatura). UNAM. FES Zaragoza. México D.F. 2004.
12. Levin J, Bang FB. The role of endotoxin in the extracellular coagulation of *Limulus* blood. Bull Johns Hopkins Hosp 1964;115:265-270.
13. Panigrahi L, Pattnaik S, Ghosal SK. *Limulus* Amebocyte Lysate Test. Pharmacology 2002;5:15-34

14. Wildfeuer A, Berno H, Scherifer KH, Hafferkamp O. Investigations on the Specificity of the *Limulus* Test for the Detection of Endotoxin. *Appl Microbiol* 1974;28(5):867-71.
15. Perdomo MR. Ensayo del Lisado de amebocitos del *Limulus* (LAL). *Revista cubana de farmacia [serial online]* 2004 Enero-Abril; 38(1). Available from: URL: <http://www.scielo.sld.cu/scielo.php>
16. Nowotny A, Spitzer J, Ziegler EJ. Endotoxin Research Series. Cellular and molecular aspects of endotoxin reactions. New York: Excerpta Medica; 1990. vol. 1. p. 465-78.
17. Carrillo C, Ospina J, Aldana D, Arias J, Echeverri C. Valoración de endotoxinas bacterianas en ranitidina y penicilina G sódica inyectable mediante la prueba de lisado del amebocito de *Limulus*. *Rev Fac Ciencias US* 2006;11:15-28.
18. James JM. Microbiología de los alimentos. 3a ed. New York: Elsevier. 1994. p. 154-158.
19. Viet MS, Buchan R, Stallones L. Acute respiratory effects and endotoxin exposure during wheat harvest in northeastern Colorado. *App Occupational and Environmental Hygiene* 2001;16(6): 685-97.
20. Bouillard L, Michel O, Dramaix M, Devleeschouwer M. Bacterial contamination of indoor air, surfaces, and settled dust, and related dust endotoxin concentrations in healthy office buildings. *Ann Agric Environ Med* 2005;12:187-92.
21. Koneman WE, Allen DS, Janda MW, Schreckenberger PC, Winn CW. Diagnóstico microbiológico. Texto y atlas color. 5ª ed. Argentina: Médica Panamericana; 1999. p. 653-668.
22. Baron EJ, Tenover FC, Tenover FC, Bailey Scott. Diagnóstico microbiológico. 8ª ed. Argentina: Médica Panamericana; 1993. p. 738-775.
23. Brial M, Aristegui B. Alergia a los hongos. *Rev Iberoam Micol [serial online]* 2002 Available from: URL: <http://www.hongos-alergenicos.reviberoammicol.com>
24. Pelczar MJ, Reid RD, Chan ECS. Microbiología. 2a ed. México: McGraw-Hill; 1982. p. 247-267.
25. Davise HL. Medically important fungi. A guide to identification. 4a ed. Washington D.C: 2002.

26. Bunnang C, Dhorraintra B, Plangpatana PA. A comparative study of the incidence of indoor and outdoor mold spores in Bangkok, Thailand. *Ann Allergy* 1982;48:333-39.
27. Guerrero AT, Ruiz SD, Martínez CF, García Y, Álvarez CR, Wong CM, et al. Aislamiento de hongos en instalaciones deportivas de la UNAM. *Rev Fac Med UNAM* 2003;46(3):93-96.
28. Brock DT. *Biología de los microorganismos*. 2ª ed. España: Omega; 1978. p.702-723.
29. Goldstein BD, Tardiff RG. Methods for assessing exposure of human and non human biota. (Scope.46). New York: John Wiley & Sons; 1991. p. 100-09, 357-69.
30. Bonifaz A. *Micología Médica Básica*. México: Méndez Cervantes; 1990.
31. Lawlor GJ, Fischer TJ. *Manual de alergia e inmunología. Diagnóstico y tratamiento*. España: Salvat; 1985. p. 37-51.
32. Lockey R F, Bukantz S C. *Inmunología y alergia*. Argentina : Medica Panamericana; 1989. p. 73-83,321-325.
33. Campbell R. *Ecología microbiana*. México: Limusa ; 1990. p.207-26.
34. Olivera M, Ribeiro H, Abreu I. Annual variation of fungal spores in atmosphere of Porto: 2003. *Ann Agric Environ Med* 2005;12:309-315.
35. Zhang Y, Chen J, Chen Y, Dong J, Wei Q, Lou J. Environmental mycological study and allergic respiratory disease among tobacco process in workers. *J Occup Health* 2005;45:181-87.
36. Sarrazola SD, Salas RM, Segura MN, Medrano S, Martínez CS. Exposición a contaminantes y alérgenos en el niño asmático en comparación con el niño sano. *Alergia* 1997;1:13-16.
37. Wickman M, Gravesen S, Nordal SL, Pershagen G, Sundell J. Indoor viable dust - bound microfungi in relation to residential characteristics , living habitats , and symptoms in atopic and control children. *J Allergy Clin Immunol* 1992;89:752-59.
38. Carrillo L. Los hongos de los alimentos y forrajes. *Rev Iberoam Micol* [serial online] 2002 Available from: URL:<http://www.unsa.edu.ar/matbib/hongos>

39. Laboratory Methods in Food Microbiology. 3a ed. New York: Acid Free paper; 1998. p. 408-09, 452.
40. Fassatirová O. Moulds and filamentous fungi in technical microbiology. Progress in industrial microbiology. New York : Elsevier Science Publishing; 1986. vol. 22.
41. Nadel JA. Mechanisms of airway response to inhaled substances. Arch Environ Health 1968;16:171.