



COMPARACIÓN DE DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO PARA EL AISLAMIENTO DE HONGOS ALERGÉNICOS A PARTIR DE AMBIENTES Y FOSAS NASALES

Héctor Raúl Concha Alarcón

Director (a)
Luz Dary Caicedo Bejarano M.Sc.
Director (a)
Mónica Chávez Vivas Ph.D

Universidad Santiago de Cali
Facultad de Ciencias Básicas,
Programa de microbiología
Cali, Colombia
2019

ISO 9001:2015

BUREAU VERITAS
Certification

N° C018.00577



Calle 5a Carrera 62 Campus Pampalinda A.A. 4102 / Teléfono: PBX 5183000
web: www.usc.edu.co / Nit. 890.303.797-1 / Santiago de Cali - Colombia





COMPARACIÓN DE DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO PARA EL AISLAMIENTO DE HONGOS ALERGÉNICOS A PARTIR DE AMBIENTES Y FOSAS NASALES

Héctor Raúl Concha Alarcón

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de:
Microbiólogo**

**Director (a)
Luz Dary Caicedo Bejarano M.Sc.
Director (a)
Mónica Chávez Vivas Ph.D**

**Línea de Investigación:
Aerobiología/Aislamiento de hongos patógenos
Grupo de Investigación:
Grupo de Investigación de Micología**

**Universidad Santiago de Cali
Facultad de Ciencias Básicas,
Programa de Microbiología
Cali, Colombia
2019**



ACTA DE SUSTENTACIÓN

ACTA DE SUSTENTACIÓN No. ___-2019

En Santiago de Cali, a los () días del mes de _____ del 2019; en el salón _____ de la Universidad Santiago de Cali, se reunieron _____ en calidad de Director del Programa de Microbiología, _____ en calidad de Director del Trabajo, _____ quien actuó como jurado calificador del estudiante **Hector Raúl Concha Alarcón**, identificado (a) con cédula de ciudadanía No 1114455537 de Gucari (VALLE) autor del trabajo de grado titulado **“COMPARACIÓN DE DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO PARA EL AISLAMIENTO DE HONGOS ALERGÉNICOS A PARTIR DE AMBIENTES Y FOSAS NASALES**. Inicialmente el estudiante realizó una exposición de su trabajo explicando el contenido y el método investigativo; luego el jurado interrogó ampliamente al estudiante acerca del tema y sus **respuestas fueron satisfactorias**, razón por la cual les fue dada la aprobación al trabajo y declarado debidamente sustentado.

Se declara entonces cumplido con el requisito legal de trabajo de grado.

Director del Programa de Microbiología

Director Trabajo de Grado

Director del Trabajo de Grado

Jurado Calificador





IMPACTOS

Relacione el (los) impacto(s) que presentó el Trabajo de Grado

IMPACTO	PRODUCTO	BENEFICIARIO(S)
Económico		
Responsabilidad social	Cuantificación y caracterización fúngica en ambientes laborales de la USC	Universidad Santiago de Cali
Científico	Trabajo de grado aprobado, requisito para optar el título de microbiólogo.	Estudiantes de la USC y comunidad en General. Grupos de investigación USC. Estudiante de la USC y comunidad en General
Indicadores de Gestión		
Tecnológico		
Técnico	Comparación de métodos de muestreo ambiental	Universidad Santiago de Cali y comunidad en general
Ambiental	Conocimiento de las condiciones ambientales de los edificios de la USC	Universidad Santiago de Cali y comunidad en general
Social	Cuantificación y caracterización fúngica en ambientes laborales de la USC. Presentación trabajo de grado	Contribución para el reconocimiento del grupo de investigación en micología - GIM
Cultural	Participación de eventos nacionales de divulgación científica	Contribución para el reconocimiento del grupo de investigación en micología- GIM

*Incluir los productos obtenidos derivados de la investigación como: apropiación social del conocimiento, generación de nuevo conocimiento entre otros.



COMPARACIÓN DE DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO PARA EL AISLAMIENTO DE HONGOS ALERGÉNICOS A PARTIR DE AMBIENTES Y FOSAS NASALES

Hector Raúl Concha Alarcón¹, Luz Dary Caicedo Bejarano¹, Álvaro León Rúa Giraldo², Monica³ Chávez Vivas³

¹ Grupo de investigación en Micología, Programa de Microbiología, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad Santiago de Cali, Calle 5 # 62-00, Santiago de Cali, Colombia. ² Docente, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquía, Cra. 51d #62-29, Medellín, Colombia. ³ Grupo de investigación GEFIME, Facultad de salud, Universidad Santiago de Cali, Calle 5 # 62-00, Santiago de Cali, Colombia.

RESUMEN

Se evaluaron diferentes medios de cultivos para la toma de muestras ambientales (Agar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol, CHROMagar Candida, Agar Avena y Sabouraud Dextrosa Agar + 5% NaCl) y muestras de fosas nasales (Agar semilla de girasol, Sabouraud Dextrosa Agar + 5% NaCl y CHROMagar Candida) de trabajadores de tres edificios de la Universidad Santiago de Cali. Se encontró que hubo diferencias estadísticas, $p > 0.05$, cuando se compararon CHROMagar Candida y DRBC con el método volumétrico. Sabouraud Dextrosa Agar + 5% NaCl recuperó el menor número de UFC/m³ $p < 0,0001$, cuando se compararon con los otros medios utilizados con el método gravimétrico y en el estudio de fosas nasales se encontró que Dextrosa Agar + 5% NaCl fue el medio de cultivo donde se obtuvieron los mayores recuentos. En este estudio el medio de cultivo Agar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol demostró que es el medio de elección para el aislamiento de hongos a partir de muestras ambientales y el agar Sabouraud para las muestras clínicas.

Palabras clave: Biodiversidad fúngica, medios de cultivo para hongos, ANOVA de Friedman.

SUMMARY

Different culture media were evaluated for the collection of environmental samples (Agar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol, CHROMagar Candida, Avena Agar and , Sabouraud Dextrosa Agar + 5% NaCl) and nasal fossa samples (Sunflower seed agar, SDA and CHROMagar Candida) of workers from three University buildings Santiago from cali. It was found that there were statistical differences, $p > 0.05$, when CHROMagar Candida and Agar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol were compared with the volumetric method. , Sabouraud Dextrosa Agar + 5% NaCl recovered the lowest number of UFC / m³, $p < 0.0001$ when compared with the other media used with the gravimetric method and in the study of nostrils it was found that SDA was the culture medium where the higher counts $P < 0.0001$. In this study, the Agar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol culture medium demonstrated that it is the medium of choice for the isolation of fungi from environmental samples and Sabouraud agar for clinical samples.

Keywords: fungi biodiversity, fungal culture media, Friedman ANOVA



1. INTRODUCCIÓN

Los hongos son organismos eucariotas, ubicuos, heterótrofos y aclorofílicos. Al tener formas especializadas, pueden dispersarse en espacios abiertos o confinados mediante corrientes de aire que los transportan desde y hacia el suelo, agua, plantas, animales y seres humanos [1][2][3]. Los lugares cerrados se ven expuestos a estos microorganismos y pueden presentar las condiciones adecuadas de humedad, pH, temperatura y sustratos para el crecimiento óptimo de éstos [4].

Los estudios a nivel mundial sobre contaminación fúngica en ambientes extramurales e intramurales son numerosos, Sin embargo, investigaciones que aborden la comparación de medios de cultivo para una mejor captación de esporas del aire son escasos, [5]. En Colombia existen algunos estudios relacionados con hongos ambientales [6][7][8] [9], los únicos realizados en la ciudad de Cali fueron en el año 1965, 2009, 2015 y 2018 [10] [11] [12]. La microbiota presente en la mucosa nasal es poco conocida, y al ser el lugar de entrada del aire exterior, se convierte en el reservorio inicial de los hongos ambientales, de allí que la relación existente entre hongos alérgenos presentes en la mucosa nasal y reacciones alérgicas aún son motivo de estudio [13].

Las personas que laboran en lugares cerrados o confinados permanecen un promedio de 80% del tiempo en el interior de estas áreas [14], lo que los deja expuestos a contaminantes químicos, físicos y biológicos, entre éstos los hongos, que tienen el potencial de afectar la salud cuando sus esporas se multiplican y propagan a través del aire. Estos microorganismos han ido cobrando importancia en los últimos años, produciendo en personas susceptibles o inmunosuprimidas alergias respiratorias, micotoxicosis y en el peor de los casos enfermedades fúngicas invasoras (EFIs) [15].

La prevalencia de alergia respiratoria se ha incrementado y se estima que en el 2025 afectará al 50% de la población mundial [16]. Las manifestaciones clínicas de estas patologías tienen un impacto negativo en la calidad de vida de los pacientes con una disminución importante de su productividad laboral. Por tanto, no solo tiene grandes costos directos de atención médica relacionados con el tratamiento, sino también tiene costos indirectos para la sociedad como resultado de la pérdida de la capacidad laboral [8]. Investigaciones que apunten a encontrar las fuentes de exposición y los métodos más precisos para identificar y cuantificar los hongos pueden ayudar a responder algunas preguntas que están aún por resolver como la relación entre concentración de hongos en ambientes y fosas nasales, que puedan inducir cuadros de alergia respiratoria.

Por lo anterior, se consideró importante conocer qué medios de cultivo podrían ser utilizados para encontrar las mejores condiciones de aislamiento de hongos alérgicos con los métodos gravimétrico y volumétrico, especialmente de ambientes interiores; además, se hizo la comparación de diferentes medios de cultivo para el aislamiento de hongos alérgicos a partir de la siembra de microorganismos obtenidos a partir de las fosas nasales de los trabajadores que allí se desempeñan.



2. MATERIALES Y MÉTODOS

Caracterización de los lugares de muestreo

Los edificios de la Universidad Santiago de Cali están situados en una zona urbana, en el barrio Pampalinda en el sur de la ciudad Santiago de Cali (Valle del Cauca), caracterizado por tener construcciones de aproximadamente 35 años, aunque recientemente en construcción y modernización de algunos bloques; medianamente arborizado y de mucho tráfico vehicular, cerca de un área montañosa, fresco y ventilado en las horas de la tarde; la mayoría de espacios tienen aire acondicionado central (Chiller). Se tomaron muestras en el interior de 3 bloques de la universidad bloque 1 (Fundadores), bloque 3 (Trabajadores) y bloque 4 (Laboratorios).

Método de muestreo ambiental y de fosas nasales

Por ser un estudio de tipo relacional, observacional de corte transversal, cada toma de muestra se hizo trimestralmente durante un año (marzo/18, julio/18, noviembre/18, marzo/19). Estas se tomaron de lunes a sábado, en un horario de 9:00 A.M. a 12:30 P.M., para garantizar que el personal estuviera dentro de las instalaciones a analizar. En el periodo de muestreo, equivalente a un mes, la toma de muestras se realizó con una diferencia de una semana por edificio. Se escogieron diez espacios del interior de cada bloque, teniendo en cuenta una distribución homogénea de análisis por piso, también se tomaron dos muestras exteriores en cada edificio. Para el muestreo de ambientes se emplearon dos métodos: el volumétrico, el cual hace impactar aire al medio de cultivo durante 1 minuto para un total de 100L de aire, según instrucciones del equipo muestreador *de Air ideal 3p* (BioMérieux). Antes de cada ensayo, la rejilla se desinfecta con alcohol al 75%, hasta que este se evapora, para proceder a la toma de la muestra; el gravimétrico, consistió en dejar caer las esporas de los microorganismos en la caja de Petri con ayuda de la gravedad, se dejó cada medio de cultivo aproximadamente veinte minutos. En los dos estudios se tomaron en total 576 muestras (24 por edificio * 3 edificios * 4 muestreos * las dos metodologías utilizadas) [17]. Cada uno de los ensayos se ejecutaron de manera simultánea en el sitio de muestreo a 1 m del suelo, fueron correctamente codificadas y transportadas al laboratorio a través de contenedores de poliestireno expandido (EPS). El muestreo de fosas nasales fue realizado en trabajadores de tres edificios de la Universidad, que permanecían por tiempo prolongado en su espacio laboral. En total fueron 1512 muestras (126 trabajadores * 3 medios de cultivo * 4 muestreos). Para obtener las muestras cada trabajador introdujo un escobillón estéril en ambas coanas, penetrando un mínimo de 15 mm y rotándolo con suavidad para conseguir una muestra representativa. Los escobillones se conservaron en 1 mL de solución fisiológica estéril hasta su cultivo posterior, que se realizó en un máximo de 18 horas después de la recolección.

Los datos ambientales de humedad relativa y temperatura se realizaron en el momento de la toma de la muestra con un termohigrometro digital (TERMO-METER TA218) en cada punto de muestreo durante toda la toma de muestras. Los datos meteorológicos fueron tomados del Edificio Cañaveralejo CVC -AUT

Aislamiento de hongos:

Los medios de cultivo utilizados para la toma de muestras ambientales con el método volumétrico fueron agar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC) (Charlau) y ChromAgar Candida (BBL) y con el método gravimétrico DRBC, agar Sabouraud (Merck) con 5% de cloruro de sodio y agar Avena, preparación casera (50 g de avena molida (Quaker), 5 g de extracto de levadura (Merck), 20 g de agar bacteriológico y 50 mg de Cloranfenicol (Colmed International) para un litro de agua destilada. En cada muestreo, las cajas de Petri fueron transportadas a los sitios de muestreo dentro de neveras de icopor, luego llevadas de nuevo al laboratorio para su posterior incubación.



Los medios de cultivo utilizados para el barrido de fosas nasales fueron Sabouraud Dextrosa Agar (Merck) Agar semilla de Girasol, según Pal y Baxter y en CHROM agar™ Candida. En cada muestreo, los tubos de ensayo con las muestras, fueron debidamente marcados y transportados dentro de neveras de icopor para su posterior siembra e incubación. De cada vial se sembró en superficie 0,1 mL en los medios seleccionados. Las muestras ambientales y de fosas nasales se incubaron a 25 ± 2 °C durante un periodo de 5 a 8 días, observándose diariamente para determinar la presencia de hongos. A todas las cajas Petri con los medios de cultivo se les realizó control de esterilidad, dejando las cajas a temperatura ambiente durante 5 días, tiempo en el cual no se observó crecimiento microbiano.

Recuento del número de colonias e identificación de hongos

Se realizó el recuento definitivo del número de colonias desarrolladas y la cantidad de éstas fue expresada en unidades formadoras de colonias (UFC/m³ o mL) [18]. Para la identificación y descripción de los hongos se tuvo en cuenta las características macroscópicas, textura, topografía y color observados a través de un estereomicroscopio (Serie SMZ 161 LED). Las observaciones microscópicas se hicieron por disociación de las colonias mediante el sistema de la cinta adherente, ambos en azul de lactofenol. Las observaciones se realizaron en dos microscopios, uno marca Olympus BH2 de doble cabezal y otra marca Olympus HX 21. Para la identificación morfológica se utilizó las descripciones y claves Hoog [39] y de otros investigadores [19] [35]. De igual forma la verificación de las colonias identificadas, enviando un número representativo de éstas a la Escuela de Microbiología de la Universidad de Antioquia, para ser caracterizadas por un segundo evaluador.

Base de datos y análisis estadístico

Se realizó la prueba de Shapiro-Wilks para ver la normalidad de los datos; lo cual permite saber que método estadístico utilizar (Paramétricos o no paramétricos). Para comparaciones múltiples se aplicó el Índice de Friedman (IF) el cual compara la suma de rangos; del mismo modo se hicieron los gráficos de cajas y bigotes para observar las diferencias significativas. Para describir, comparar y representar gráficamente las variables se utilizó el programa InfoStat versión 2018 (Versión libre) [20]. El software Excel se usó para la confección de algunos gráficos y ordenar las matrices de datos. Se aceptó un nivel de significancia con un error $\alpha = 0.05$. Por último, Se efectuó la clasificación de Yadad y Madelin [21], para determinar la frecuencia de aparición y biodiversidad de los hongos.

Aspectos éticos legales:

En el presente estudio se respetó la privacidad del participante y se cumplieron los preceptos de investigación en seres humanos, según la Resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia [22], por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud. Al trabajador se le invitó a participar del estudio en forma voluntaria y los que aceptaron, firmaron un consentimiento para mayores de 18 años (anexo 2). Con la firma del consentimiento informado el participante autorizó a la investigadora principal a tener acceso a la información suministrada en la encuesta. Se respetó la confidencialidad de la información acorde a las regulaciones legales establecidas para ello.



3. RESULTADOS

Los resultados obtenidos en los muestreos de ambientes (Volumétricos y gravimétricos) y Fosas nasales tomados en la universidad Santiago de Cali en los bloques 1, 3 y 4, se evaluaron con el test de Shapiro-Wilk, para determinar si los datos seguían una distribución paramétrica o no paramétrica, esta prueba se realizó por método de muestreo, comparando los recuentos totales de los medios de cultivo (UFC/m³ o mL), en cada uno de ellos nos dio como resultado un $p < 0.0001$, en este caso hay evidencias para rechazar la H_0 la cual sostenía que los datos obtenidos tienen una distribución normal, aceptando la Hipotesis alternativa H_1 que nos indica lo contrario [18].

Comparación de medios de cultivo para el aislamiento de hongos ambientales con el método volumétrico:

Al comparar el número total de UFC/m³ de hongos obtenidas en los dos medios de cultivo se encontró que hubo diferencias estadísticas significativas con un $p=0.0114$, siendo los recuentos en CHROMagar Candida mayores que los del medio de cultivo DRBC (Figura 1).

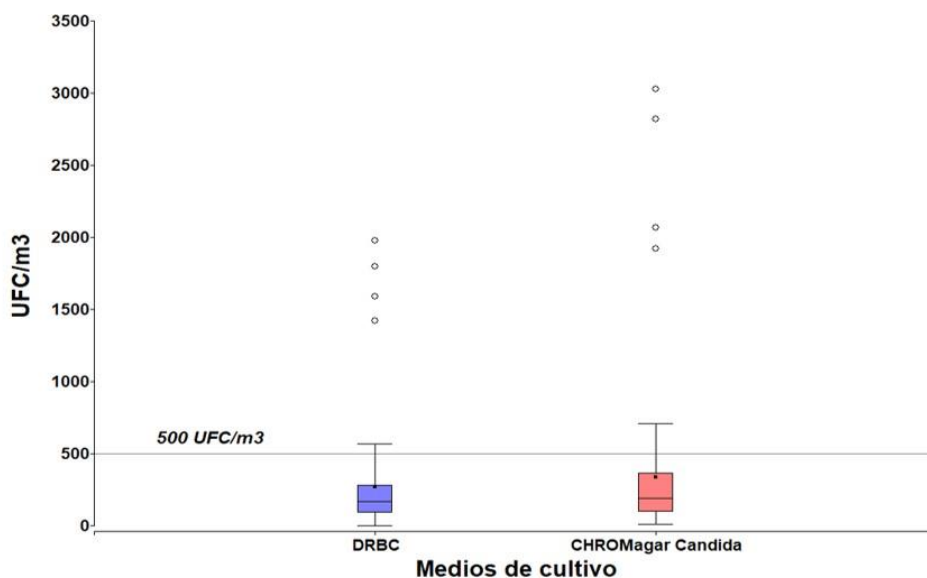


Figura 1. Diagrama de Cajas de los valores totales de UFC/m³ obtenidos a partir del estudio de ambientes de tres edificios de la Universidad Santiago de Cali, con la técnica volumétrica y comparando dos medios de cultivos diferentes.

Al comparar los medios de cultivo para el aislamiento de hongos alergénicos de interiores y exteriores, se encontró que en ambientes exteriores los medios de cultivo se comportan de manera similar y las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p= 0$.

F 2074, Friedman), sin embargo, en ambientes interiores el medio de cultivo DRBC recuperó un número menor de UFC/m³ de hongos y estas diferencias fueron significativas ($p = 0.0287$, Friedman) (Figura 2).

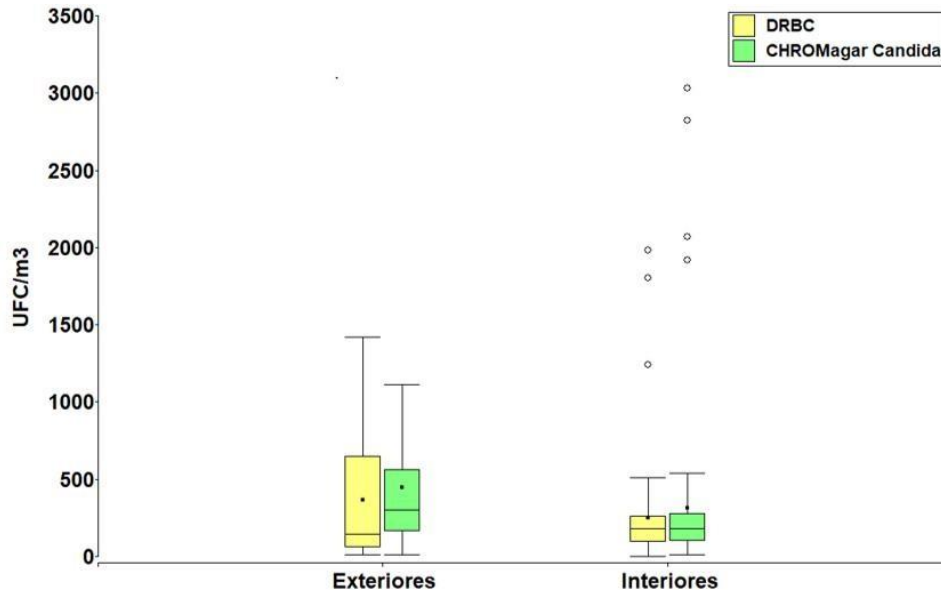


Figura 2. Diagrama de Cajas de los valores de UFC/m³ de hongos encontrados en el estudio de ambientes de interiores y exteriores de tres edificios de la Universidad Santiago de Cali, con la técnica volumétrica y comparando dos medios de cultivos diferentes.

Al comparar los medios de cultivos en los aislamientos de hongos en los ambientes de los diferentes edificios se logró determinar que no hubo diferencias estadísticas significativas entre los bloques 1 y 3 ($p = 0.2909$ Friedman) pero si en el bloque 4 ($p = 0.0212$ Friedman) siendo los recuentos de UFC/m³ mayores en el medio de cultivo CHROMagar Candida (Figura 3).

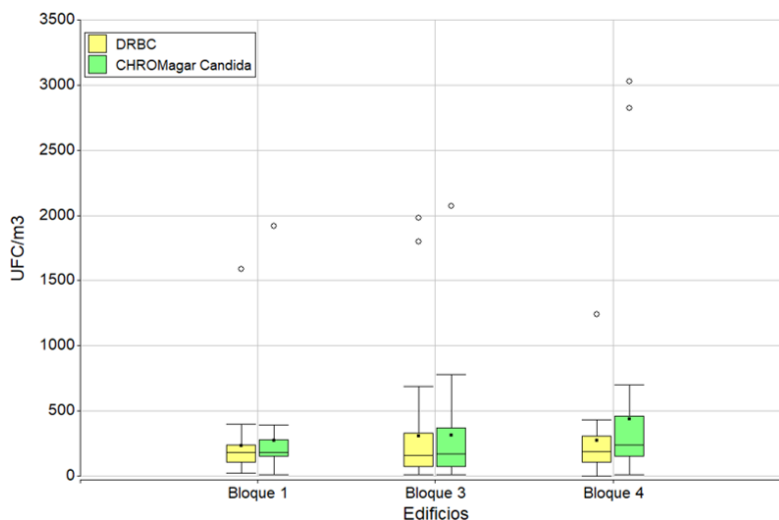


Figura 3. Diagrama de Cajas de los valores de UFC/m³ de hongos aislados en ambientes de tres edificios de la Universidad Santiago de Cali, con la técnica volumétrica y comparando dos medios de cultivo.



Al comparar los valores obtenidos en los medios de cultivos en los diferentes tiempos estudiados se logró establecer que sólo hubo diferencias significativas en el segundo muestreo, mes de julio de 2018 ($p= 0.0002$ Friedman) encontrándose mayores recuentos de UFC/m³ en el medio de cultivo CHROMagar Candida (Figura 4).

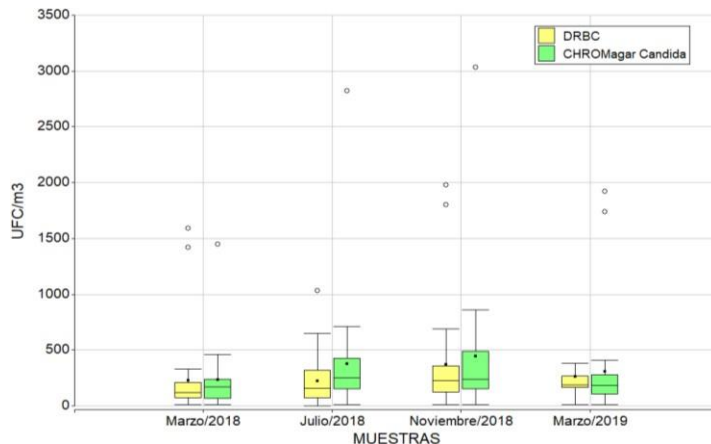


Figura 4. Diagrama de Cajas de los valores de UFC/m³ de hongos obtenidos en los diferentes tiempos estudiados (marzo/18 a Marzo/19) con la técnica volumétrica y comparando dos medios de cultivo.

Comparación de medios de cultivo para el aislamiento de hongos ambientales con el método gravimétrico:

Al comparar el número total de UFC/m³ de hongos obtenidas en los tres medios de cultivo se encontró que hubo diferencias estadísticas significativas ($p=<0,0001$, Friedman) para el medio de cultivo agar Sabouraud con 5% de NaCl, en el cual se observó la menor cantidad de colonias de hongos, pero no para el agar DRBC y agar Avena, que son similares y mejores en la recuperación de UFC/m³ de hongos (Figura 5).

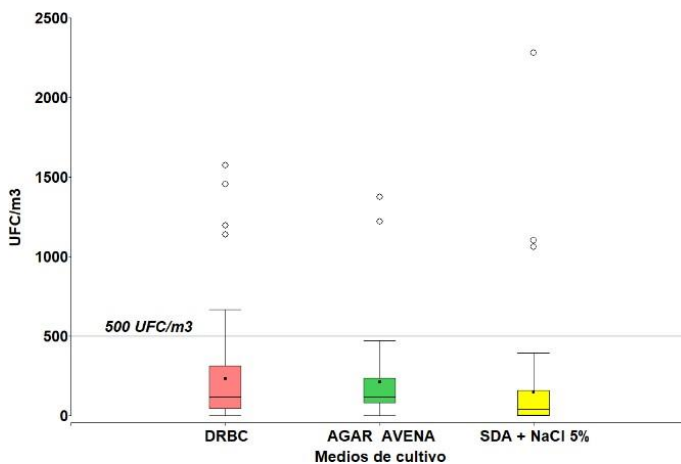


Figura 5. Diagrama de Cajas de los valores totales de UFC/m³ obtenidos a partir del estudio de ambientes de tres edificios de la Universidad Santiago de Cali, con la técnica gravimétrica y comparando tres medios de cultivos diferentes.



Al comparar los medios de cultivo, para el aislamiento de hongos alergénicos de interiores y exteriores, se encontró que, para los recuentos de exteriores, no hubo diferencias significativas, a diferencias del interior en el cual el medio DRBC no mostró diferencias estadísticas significativas, cuando se comparó con el agar avena ($P=0,6390$ Friedman), pero si con agar Sabouraud con 5% de NaCl ($P=<0.0001$ Friedman) el cual presenta los menores valores de UFC/m³ (Figura 6).

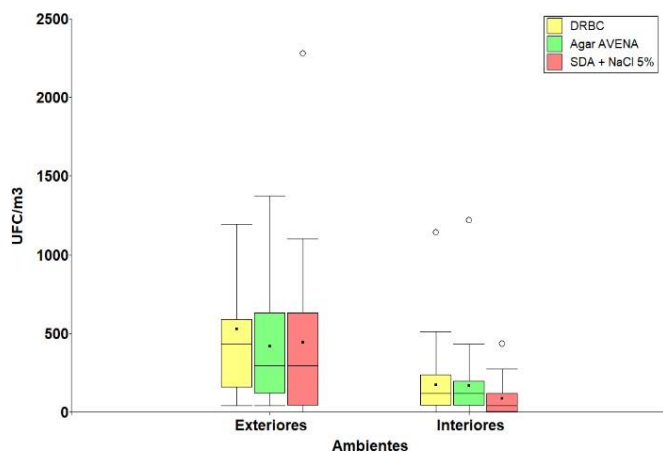


Figura 6. Diagrama de Cajas de los valores de UFC/m³ de hongos encontrados en el estudio de ambientes de interiores y exteriores de tres edificios de la Universidad Santiago de Cali, con la técnica gravimétrica y comparando tres medios de cultivos diferentes.

Al comparar los medios de cultivos en los aislamientos de hongos en los ambientes de los diferentes edificios se logró determinar que no hubo diferencias estadísticas significativas en el edificio 3 ($p=0.3280$ Friedman) pero si en el 1 ($p=0.0012$, Friedman) y el 4 ($p=<0.0001$, Friedman) con menores recuentos el agar Sabouraud con 5% NaCl. No hubo diferencias significativas entre los otros medios de cultivos. Agar CHROMagar Candida y agar DRBC (Figura 7).

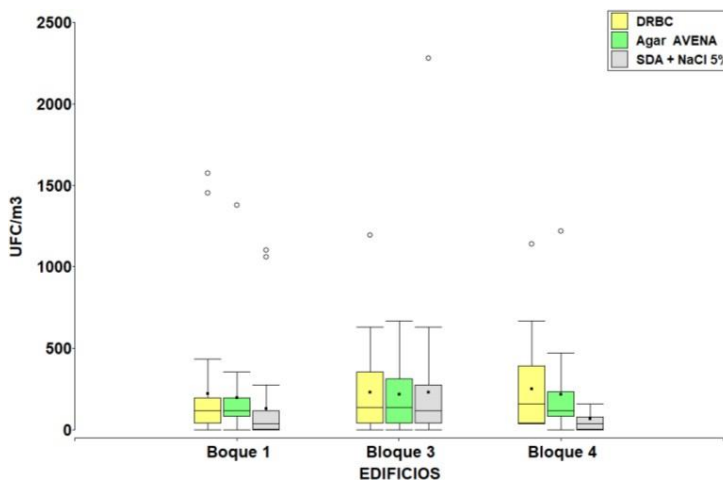


Figura 7. Diagrama de Cajas de los valores de UFC/m³ de hongos aislados en ambientes de tres edificios de la Universidad Santiago de Cali, con la técnica gravimétrica y comparando tres medios de cultivo.



Al comparar los valores obtenidos en los medios de cultivos en los diferentes tiempos estudiados, se logró establecer que hubo diferencias significativas en el primer muestreo, marzo de 2018 ($p= 0.0027$ Friedman) y en el tercer muestreo, noviembre de 2018 ($p= 0.0003$ Friedman) encontrándose los menores recuentos de UFC/m³ en el medio de cultivo agar Sabouraud con 5% de NaCl (Figura 8).

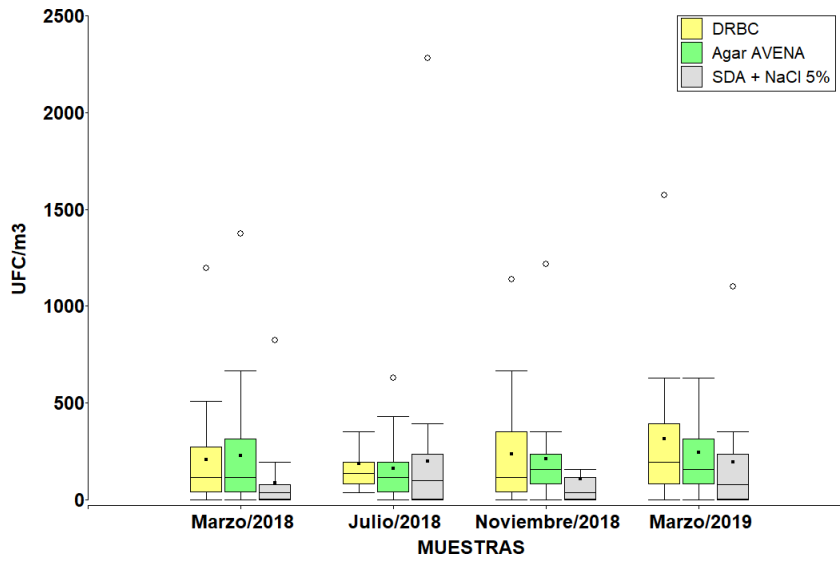


Figura 8. Diagrama de Cajas de los valores de UFC/m³ de hongos obtenidos en los diferentes tiempos estudiados (marzo/18 a Marzo/19) con la técnica gravimétrica y comparando tres medios de cultivo.

Comparación de diferentes medios de cultivo para el aislamiento de hongos a partir de las fosas nasales:

Al comparar el número total de UFC/mL de hongos aislados a partir de muestras de fosas nasales en tres medios de cultivos se logró establecer que hubo diferencias estadísticas significativas entre CHROMagar Candida y los medios de cultivos agar Sabouraud y agar semilla de Girasol ($p < 0.0001$, Friedman), siendo éstos últimos los que obtuvieron mayores recuentos de UFC/m³ de hongos (Figura 9).

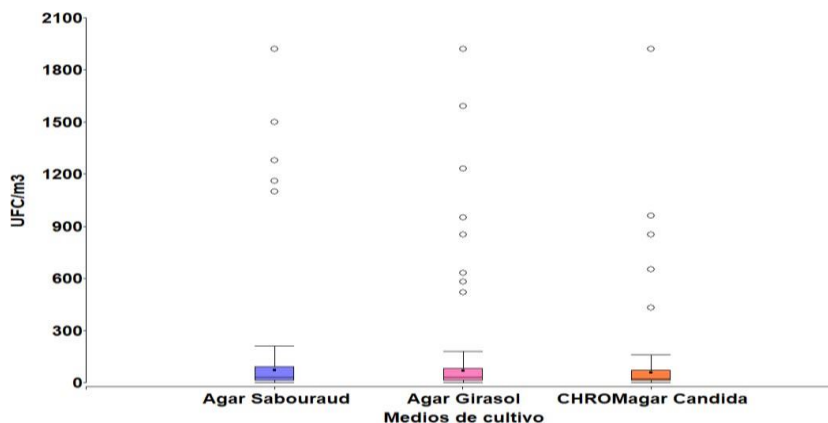


Figura 9. Diagrama de Cajas de los valores totales de UFC/m³ obtenidos a partir muestras de fosas nasales en tres medios de cultivos diferentes.



Al comparar los medios de cultivos utilizados en los aislamientos de hongos a partir de las fosas nasales de los trabajadores de los tres edificios se encontró que sólo hubo diferencias significativas entre los medios utilizados para los aislamientos hechos a los trabajadores del bloque 1 ($p = 0.0457$, Friedman) con los otros medios no se presentaron diferencias significativas en este edificio. En los trabajadores de los otros edificios 3 y 4 no hubo diferencias entre los diferentes medios utilizados (Figura 10)

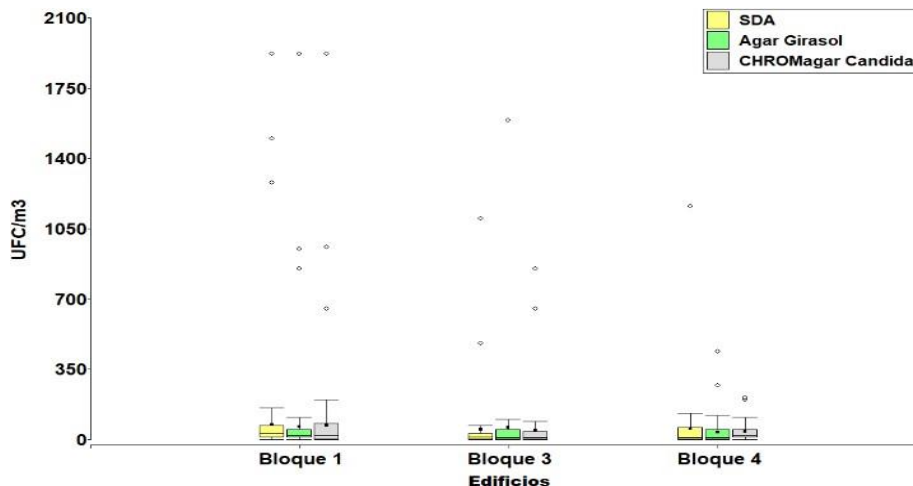


Figura 10. Diagrama de cajas de los valores de UFC/m³ de hongos aislados a partir de las fosas nasales de los trabajadores de tres edificios de la Universidad Santiago de Cali, con diferentes medios de cultivo.

Al comparar los valores obtenidos en los medios de cultivos en los diferentes tiempos estudiados se logró establecer que sólo hubo diferencias significativas en el segundo muestreo, julio de 2018 ($p = 0.0152$ Friedman) encontrándose los menores recuentos de UFC/m³ en el medio de cultivo agar CHROMagar Candida (Figura 11).

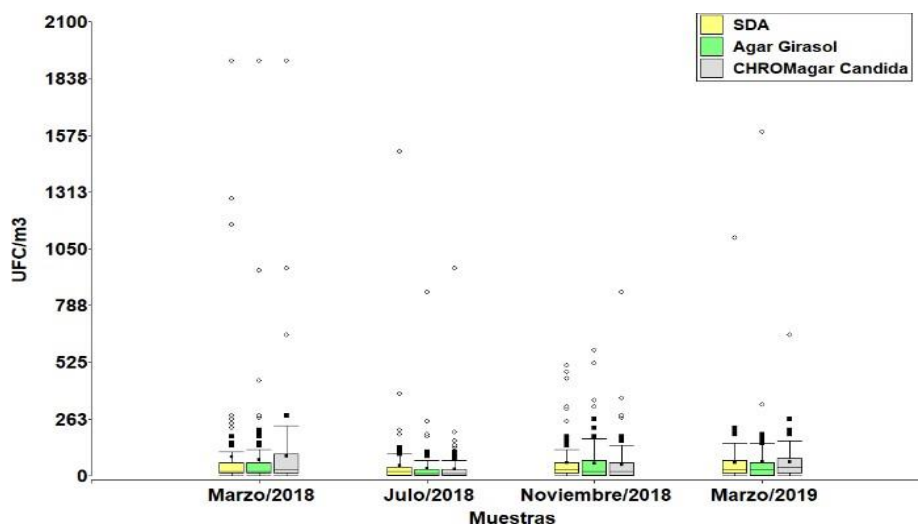


Figura 11. Diagrama de Cajas de los valores de UFC/m³ de hongos obtenidos en los diferentes tiempos estudiados (marzo/18 a Marzo/19) comparando tres medios de cultivo en el aislamiento de hongos de las fosas nasales de los trabajadores de la Universidad Santiago de Cali.



Se aislaron e identificaron morfológicamente aproximadamente 37 géneros de hongos en los Bloques 1,3 y 4, con mayor prevalencia en todos los medios de cultivo del género *Cladosporium*, *Penicillium* y *Aspergillus*.

Los hongos aislados en los diferentes ensayos, estudio de ambientes con el método volumétrico, estudio de ambientes con el método gravimétrico y el estudio de las fosas nasales se clasificaron en categorías con base en su frecuencia de aislamiento según el criterio propuesto por Yadad & Madelin, (Tabla 1, 2 y 3).

Tabla 1 Clasificación de Yadad y Madelin

Clasificación de Yadav y Madelin		
	Categoría	Frecuencia de aparición
	Muy común	80-100 %
	Común	61-80 %
	Frecuente	41-60 %
	Ocasional	21-40 %
	Raro	0.1-20 %
	No encontrado	

Tabla 2 Frecuencia de aislamiento de hongos ambientales para el muestreo volumétrico de ambientes de tres edificios de la Universidad Santiago de Cali.

	Muestreo Volumétrico					
	AGAR DRBC			CHROMagar Candida		
	N	%		N	%	
<i>Cladosporium</i>	106	83.5%		111	87.4%	
<i>Aspergillus</i>	52	40.9%		68	53.5%	
<i>Penicillium</i>	71	55.9%		44	34.6%	
<i>Micelio estéril</i>	88	69.3%		88	69.3%	
<i>levadura</i>	40	31.5%		46	36.2%	
<i>Fusarium</i>	31	24.4%		29	22.8%	
<i>Chrysonilia</i>	18	14.2%		23	18.1%	
<i>Paecilomyces</i>	20	15.7%		15	11.8%	
<i>Curvularia</i>	12	9.4%		6	4.7%	
<i>Eurotium</i>	6	4.7%		1	0.8%	
<i>Rhodotorula</i>	5	3.9%		3	2.4%	
<i>Acremonium</i>	4	3.1%		8	6.3%	
<i>Sin identificar</i>	3	2.4%		4	3.1%	
<i>Nigrospora</i>	1	0.8%		1	0.8%	
<i>Cylindrocarpon</i>	-	-		1	0.8%	
<i>Mucor</i>	-	-		-	-	
<i>Aureobasidium</i>	-	-		-	-	
<i>Alternaria</i>	2	1.6%		1	0.8%	
<i>Rhizopus</i>	1	0.8%		-	-	
<i>Verticillium</i>	-	-		1	0.8%	
<i>Trichosporon</i>	1	0.8%		-	-	
<i>Phoma</i>	1	0.8%		2	1.6%	
<i>Gliocladium</i>	-	-		-	-	
<i>Neosartorya</i>	-	-		2	1.6%	
<i>Beauveria</i>	1	0.8%		-	-	
<i>Ustilago</i>	4	3.1%		2	1.6%	
<i>Chaetomium</i>	1	0.8%		-	-	
<i>Trichoderma</i>	1	0.8%		2	1.6%	
<i>Veronaea</i>	1	0.8%		-	-	
<i>Syncephalastrum</i>	-	-		1	0.8%	
<i>Acremonium</i>	-	-		-	-	
<i>Zygosporium</i>	-	-		-	-	
<i>Epicocum</i>	-	-		-	-	
<i>Lomentospora</i>	-	-		-	-	
<i>Exophiala</i>	-	-		-	-	



Tabla 3 Frecuencia de aislamiento de hongos ambientales para el muestreo gravimétrico de ambientes de tres edificios de la Universidad Santiago de Cali.

Muestreo Gravimétrico									
	AGAR DRBC			AGAR AVENA			AGAR SDA + NaCl 5%		
	N	%		N	%		N	%	
<i>Cladosporium</i>	61	48.0%		62	48.8%		56	44.1%	
<i>Aspergillus</i>	21	16.5%		24	18.9%		26	20.5%	
<i>Penicillium</i>	24	18.9%		20	15.7%		21	16.5%	
<i>Micelio estéril</i>	70	55.1%		73	57.5%		42	33.1%	
<i>levadura</i>	22	17.3%		17	13.4%		17	13.4%	
<i>Fusarium</i>	13	10.2%		14	11.0%		8	6.3%	
<i>Chrysonilia</i>	23	18.1%		17	13.4%		9	7.1%	
<i>Paecilomyces</i>	7	5.5%		3	2.4%		3	2.4%	
<i>Curvularia</i>	7	5.5%		16	12.6%		2	1.6%	
<i>Trichoderma</i>	6	4.7%		5	3.9%		1	0.8%	
<i>Rhodotorula</i>	4	3.1%		1	0.8%		5	3.9%	
<i>Acremonium</i>	3	2.4%		4	3.1%		5	3.9%	
<i>Sin Identificar</i>	4	3.1%		2	1.6%		-	-	
<i>Nigrospora</i>	3	2.4%		9	7.1%		2	1.6%	
<i>Cylindrocarpon</i>	1	0.8%		3	2.4%		-	-	
<i>Mucor</i>	1	0.8%		1	0.8%		-	-	
<i>Aureobasidium</i>	-	-		2	1.6%		-	-	
<i>Alternaria</i>	-	-		3	2.4%		1	0.8%	
<i>Rhizopus</i>	-	-		-	-		2	1.6%	
<i>Verticillium</i>	-	-		-	-		1	0.8%	
<i>Trichosporom</i>	-	-		2	1.6%		-	-	
<i>Phoma</i>	-	-		6	4.7%		-	-	
<i>Gliocladium</i>	-	-		1	0.8%		-	-	
<i>Neosartorya</i>	-	-		1	0.8%		-	-	
<i>Beauveria</i>	-	-		1	0.8%		-	-	
<i>Ustilago</i>	-	-		1	0.8%		-	-	
<i>Chaetomium</i>	3	2.4%		-	-		-	-	
<i>Trichoderma</i>	1	0.8%		-	-		-	-	
<i>Veronaea</i>	2	1.6%		-	-		-	-	
<i>Syncephalastrum</i>	1	0.8%		-	-		-	-	
<i>Acremonium</i>	-	-		-	-		2	1.6%	
<i>Zygosporium</i>	-	-		1	0.8%		-	-	
<i>Epicocum</i>	-	-		2	1.6%		-	-	
<i>Lomentospora</i>	-	-		1	0.8%		-	-	
<i>Exophiala</i>	1	0.8%		-	-		-	-	



Tabla 4 Frecuencia de aislamiento de hongos a partir de las fosas nasales de los trabajadores de tres edificios de la Universidad Santiago de Cali.

Muestreo de Fosas Nasales									
	AGAR SDA + NaCl 5%			AGARSEMILLA DE GIRASOL			CHROMagar <i>Candida</i>		
	N	%		N	%		N	%	
<i>Cladosporium</i>	152	39.9%		132	34.6%		153	40.2%	
<i>Aspergillus</i>	83	21.8%		80	21.0%		76	19.9%	
<i>Penicillium</i>	33	8.7%		59	15.5%		75	19.7%	
Micelio estéril	175	45.9%		152	39.9%		153	40.2%	
<i>Levadura</i>	42	11.0%		28	7.3%		52	13.6%	
<i>Fusarium</i>	48	12.6%		61	16.0%		50	13.1%	
<i>Chrysonilia</i>	13	3.4%		10	2.6%		9	2.4%	
<i>Paecilomyces</i>	7	1.8%		8	2.1%		12	3.1%	
<i>Curvularia</i>	9	2.4%		12	3.1%		4	1.0%	
<i>Eurotium</i>	-	-		-	-		-	-	
<i>Rhodotorula</i>	3	0.8%		6	1.6%		6	1.6%	
<i>Acremonium</i>	9	2.4%		15	3.9%		6	1.6%	
Sin identificar	-	-		-	-		-	-	
<i>Nigrospora</i>	-	-		1	0.3%		-	-	
<i>Cylindrocarpon</i>	1	0.3%		-	-		-	-	
<i>Mucor</i>	1	0.3%		2	0.5%		3	0.8%	
<i>Aureobasidium</i>	4	1.0%		1	0.3%		1	0.3%	
<i>Alternaria</i>	1	0.3%		1	0.3%		1	0.3%	
<i>Rhizopus</i>	2	0.5%		1	0.3%		2	0.5%	
<i>Verticillium</i>	-	-		-	-		-	-	
<i>Trichosporon</i>	-	-		-	-		-	-	
<i>Phoma</i>	-	-		2	0.5%		3	0.8%	
<i>Gliocladium</i>	-	-		-	-		-	-	
<i>Neosartorya</i>	-	-		-	-		-	-	
<i>Beauveria</i>	-	-		-	-		-	-	
<i>Ustilago</i>	-	-		-	-		-	-	
<i>Chaetomium</i>	-	-		3	0.8%		-	-	
<i>Trichoderma</i>	7	1.8%		7	1.8%		7	1.8%	
<i>Veronaea</i>	-	-		-	-		-	-	
<i>Syncephalastrum</i>	1	0.3%		-	-		-	-	
<i>Acremonium</i>	-	-		2	0.5%		6	1.6%	
<i>Zygosporium</i>	-	-		4	1.0%		1	0.3%	
<i>Epicocum</i>	-	-		-	-		-	-	
<i>Lomentospora</i>	1	0.3%		1	0.3%		-	-	
<i>Exophiala</i>	-	-		-	-		-	-	



Al comparar los diferentes medios de cultivo utilizados para el aislamiento de hongos alergénicos a partir de muestras de ambientes exteriores e interiores con el método gravimétrico se encontró sólo hubo diferencias significativas para el género *Cladosporium* y *Penicillium*, presentando los mayores valores el medio de cultivo DRBC (Tabla 4).

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,0500$)

Hongos alergénicos	MEDIA (rangos)			p - Friedman
	Agar Sabouraud +5% NaCl	Agar Avena	Agar DRBC	
<i>Cladosporium</i>	1,87a	1,99b	2,14b	0,0380
<i>Aspergillus</i>	1,96a	1,98a	2,06a	0,1851
<i>Penicillium</i>	1,96a	2,01a	2,02a	0,7720
<i>Fusarium</i>	2,00a	2,09a	2,03a	0,3831
<i>Alternaria</i>	1,48a	1,51a	1,49a	0,3192

Tabla 5. Comparación de la media de rangos de las UFC/m³ de los principales hongos alergénicos aislados en agar Sabouraud, agar semilla de girasol y CHROMagar Candida a partir de las fosas nasales de los trabajadores de tres edificios de la Universidad Santiago de Cali

Al comparar los diferentes medios de cultivo utilizados para el aislamiento de hongos alergénicos a partir de muestras de ambientes exteriores e interiores con el método volumétrico se encontró sólo hubo diferencias significativas para los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* presentando los mayores valores el medio de cultivo DRBC. Tabla 5.

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,0500$)

Hongos alergénicos	MEDIA (rangos)		p - Friedman
	Agar DRBC	CHROMagar Candida	
<i>Cladosporium</i>	1,43a	1,47a	0,0763
<i>Aspergillus</i>	1,59a	1,41b	0,0020
<i>Penicillium</i>	1,60a	1,40b	0,0050
<i>Fusarium</i>	1,51a	1,49a	0,7532
<i>Alternaria</i>	1,50a	1,50a	0,5657

Tabla 6. Comparación de la media de rangos de las UFC/m³ de los principales hongos alergénicos aislados en agar Sabouraud 5% NaCl, agar avena y agar DRBC a partir de ambientes interiores y exteriores de tres edificios de la Universidad Santiago de Cali utilizando el método gravimétrico con la fórmula de Omeliansky.

Al comparar los diferentes medios de cultivo utilizados para el aislamiento de hongos alergénicos a partir de muestras de fosas nasales de los trabajadores de tres edificios de la Universidad Santiago de Cali se encontró sólo hubo diferencias significativas para los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* presentando los mayores valores el medio de cultivo DRBC (Tabla 6).



Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,0500$)

Hongos alergénicos	MEDIA (rangos)			p - Friedman
	Agar <u>Sabouraud</u>	Agar Semilla de Girasol	<u>CHROMagar Candida</u>	
<u>Cladosporium</u>	2,09a	1,99b	1,91b	0,0001
<u>Aspergillus</u>	2,04a	2,03a	1,94b	0,0045
<u>Penicillium</u>	2,06a	1,96b	1,99b	0,0108
<u>Fusarium</u>	2,00a	2,09b	1,92c	<0,0001
<u>Alternaria</u>	2,00a	2,00a	2,00a	>0,9999

Tabla 7. Comparación de la media de rangos de las UFC/m³ de los principales hongos alergénicos aislados en agar DRBC y CHROMagar Candida a partir de ambientes interiores y exteriores de tres edificios de la Universidad Santiago de Cali utilizando el método volumétrico.

En la tabla 8 se describen los promedios de los datos de temperatura y humedad relativa encontrada en los diferentes ambientes de los tres edificios de la Universidad Santiago de Cali en los diferentes tiempos de muestreo.

Tabla 8 Comparación de Temperatura de los tres edificios de la universidad Santiago de Cali

Edificio	Temperatura Promedio (DE)	Humedad Relativa promedio (DE)
Bloque 1	25,5 °C ± 1,14 °C	54,9 % ± 2,95 °C
Bloque 3	26,9 °C ± 1,69 °C	55,0 % ± 1,78 °C
Bloque 4	24,3 °C ± 1,93 °C	57,3 % ± 4,76 °C

Tabla 9 descripción de los valores de los datos meteorológicos encontrados en la ciudad de Cali durante el desarrollo del estudio. Marzo 2018 – Marzo 2019.

Datos meteorológicos	Marzo/2018	Julio/2018	Noviembre/2018	Marzo/2018
T°C	24,3	23,9	23,8	24,7
TM°C	31	29,8	30	32,5
Tm°C	19,2	19,3	19	19,7
H%	73,5	75,6	72,3	71,6
PPmm	20,07	2,28	42,92	35,36
V Km/h	9,8	10,2	10	9,5
VM Km/h	24,8	21,6	23,2	23,5

T°C: Promedio de temperatura; TM°C: Temperatura máxima; Tm°C: Temperatura mínima; H%: Porcentaje de humedad; PPmm: Precipitación pluvial en mm; V Km/h: Velocidad en kilómetros/hora y VM Km/h: Velocidad máxima en kilómetros/hora.



De acuerdo a los resultados obtenidos, no se presentó contaminación bacteriana en ninguno de los dos medios de cultivos utilizados con el método volumétrico, de igual forma, las levaduras según la clasificación de Yadad y Madelin[21][29] se presentaron de manera ocasional (pendientes de identificar) con mayor variabilidad de géneros de mohos en CHROMagar Candida; el micelio estéril, (*Mycelia sterilia*), se aisló el mismo número de veces en los dos medios y *Chrysonilia sitophila* (hongo no deseado en el laboratorio) se aisló un poco más en CHROMagar Candida, sin llegar a ser significativo. Cuando se realizaron los análisis estadísticos se encontró que hubo diferencias estadísticas significativas ($P=0.0114$) cuando se comparó el número total de UFC/m³ de hongos aisladas en los dos medios de cultivo a partir de ambientes externos e internos de la Universidad Santiago de Cali en los diferentes tiempos estudiados. El promedio de aislamiento de UFC/m³ fue superior al encontrado con DRBC, aunque la mediana fue similar; de igual forma en este medio se encontraron mayores valores por encima de 500 UFC/m³ y datos atípicos, los cuales se tuvieron en cuenta porque eran reales y las diferencias estadísticas sin tenerlos en cuenta continuaba siendo significativa. En DRBC, las colonias de levaduras presentar formas y colores similares, excepto el género *Rhodotorula*, lo que le da una ventaja al CHROMagar Candida.

4. DISCUSIÓN

El conocimiento de la carga fúngica alergénica en espacios interiores y exteriores es esencial para establecer si existe un factor de riesgo ocupacional y tomar las medidas necesarias para evitar los problemas relacionados con la salud de las personas que ocupan estos espacios [23]. En este trabajo se comparan diferentes medios de cultivo para la toma de muestras de ambientes con dos métodos de muestreo, volumétrico y gravimétrico y los medios para la toma de muestras de fosas nasales en trabajadores de tres edificios de la Universidad Santiago de Cali.

Uno de los medios utilizados fue CHROMagar Candida es un medio de cultivo diferencial que permite el aislamiento y la identificación presuntiva de algunas especies de *Candida*, especialmente de *Candida albicans*, *Candida tropicalis* *Candida krusei*[24][25]; es ampliamente usado para muestras clínicas, ya que facilita el reconocimiento de infecciones mixtas en un mismo paciente y es un medio de cultivo que fue probado para el crecimiento de 19 de 23 hongos dermatofitos, 41 de 43 mohos patógenos y/o contaminantes como *Aspergillus*, *Acremonium*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Scopulariopsis*, *Trichoderma*, *Verticillium*, *Cunninghamella*, *Chaetomium*, *Curvularia*, *Hendersonula*, *Madurella*, *Phoma*, *Pseudallescheria*, *Neoscytalidium*, *Ustilago*, entre otros (a) muchos de éstos aislados en ambientes internos y externos[25][26]. Además, ninguna de las bacterias que fueron probadas en este medio de cultivo crecieron después de 72 horas de incubación a 37°C, entre éstas *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Morganella morganii*, y *Streptomyces albidus* y de las 339 muestras clínicas de flujo vaginal, cavidad oral y anorectal, solo se aislaron 4 cepas de *E. coli* (0,01%). En términos generales el medio CHROMagar Candida es un método rápido y con alta sensibilidad y especificidad para la identificación de algunas especies de *Candida*, además permite el crecimiento de una variedad de hongos patógenos, saprófitos ambientales y alergénicos; aunque su costo puede ser una limitante para su uso de rutina en el laboratorio de micología. De acuerdo a las cualidades de este medio de cultivo se decidió usarlo, porque además permitiría conocer si en una misma muestra había especies de levaduras diferentes.



DRBC es un medio utilizado para el recuento de células viables de mohos y levaduras con actividad de agua mayor de 0.95, normalizado para control de calidad en alimentos según Norma ISO 21527-1:2008; La combinación de Diclorán (2,6-dicloro-4-nitroanilina) y rosa de bengala (4,5,6,7-tetrachloro-2', 4', 5', 7'-tetrayodofluoresceína) limita el desarrollo de las colonias de los hongos filamentosos de esta forma se reprime el crecimiento exacerbado de algunas colonias y que enmascare a las más lentas y, al mismo tiempo, facilita el recuento. El cloranfenicol y el pH 5,6 impiden notablemente el crecimiento bacteriano[27]. El diámetro ideal de las colonias de mohos aisladas de ambientes y alimentos debería ser de 10 mm, con la formulación del DRBC, pH 5,6 los investigadores lograron este equilibrio entre crecimiento e inhibición de los hongos en este tipo de muestras[7][28].

Cuando se compararon los aislamientos de hongos en los dos medios de cultivos en ambientes exteriores e interiores se encontró que solo hubo significancia estadística en el ambiente interior ($P=0.0287$), lo que podría explicarse por el mayor número de UFC/m³. De igual forma se podría explicar los datos obtenidos en los tres edificios, donde sólo hubo diferencias significativas ($P=0.0212$) en el bloque 4. Resultados que podrían explicarse por las condiciones ambientales de mayor humedad relativa y menor temperatura encontradas en el edificio 4 en el mes de julio/18, lo que posiblemente condicionó un mayor número de UFC/m³ de hongos que fueron mejor captadas en CHROMagar Candida.

Para el muestreo ambiental con el método gravimétrico se utilizaron tres medios de cultivos, agar DRBC, agar Avena y Agar Sabouraud con 5% de NaCl. El agar avena se suplemento con 0,5% extracto de levadura, brindándole las condiciones adecuadas de nitrógeno, carbono, proteínas, vitaminas y nutrientes esenciales para el crecimiento y esporulación de los hongos[26]. Además, se encontró que permite una buena recuperación de estructuras de reproducción sexual como cleistotecios, peritecios, gimnotecios entre otros y de reproducción asexual como picnidios y sinemas o coremios. El medio de cultivo agar Sabouraud, es un medio simple, confiable, de bajo costo, muy utilizado en clínica y en la industria[30][31] con una fuente de Carbono y nitrógeno en una relación 2:1[26] que se convierte en diferencial cuando se agrega antibióticos que inhiben el crecimiento bacteriano y cuando se le agrega NaCl en diferentes concentraciones, reprime el crecimiento de algunos hongos fastidiosos como *Chrysonilia sitophila* que enmascaran la presencia de otros. Por esta razón es un medio útil para aislamiento de ambientes que puedan estar contaminados con *Chrysonilia*, sin embargo, no se puede utilizar sólo por que inhibe a otros hongos saprófitos, mohos y levaduras interfiriendo con los resultados. El NaCl disminuye la actividad del agua (aw) y algunos autores consideran que aw es el factor que más influye sobre el crecimiento de los microorganismos[32] y que juega un papel importante en la estabilidad de los mismos[33].



Al comparar los resultados obtenidos con los tres medios de cultivo se encontró que no hubo contaminación bacteriana y que el cloranfenicol a una concentración de 100mg/L es eficaz para inhibir el crecimiento de estos microorganismos, esta concentración es la que se usa habitualmente en la preparación de medios de cultivo. Cuando se compararon los valores totales de UFC/m³ se logró determinar que hubo diferencias significativas entre los medios de cultivo, siendo el agar Sabouraud con NaCl donde se obtuvieron los menores recuentos, $p < 0,0001$, resultados que podrían explicarse por la baja aw de este medio que induce una alta concentración de sales para prevenir el crecimiento y el metabolismo fúngico debido a alteraciones en las propiedades del citosol, cambios en la turgencia y la energía requerida para sintetizar y retener solutos compatibles. [Araujo et al., 2019]. Entre los medios de cultivo DRBC y avena no se presentaron diferencias estadísticas significativas. Un comportamiento similar se encontró cuando se analizaron los tres medios en ambientes exteriores e interiores. Al analizar el comportamiento de los medios de cultivo en los tres edificios se encontró que hubo diferencias significativas en los bloques 1 y 4, pero no en el bloque 3, posiblemente por la mayor carga fúngica xerófila encontrada en este edificio como especies de *Aspergillus* y *Penicillium*. Al comparar los medios de cultivo en los cuatro tiempos estudiados se encontraron diferencias significativas entre agar Sabouraud 5% NaCl y los otros dos medios en los meses de marzo y noviembre de 2018, período en los cuales se alcanzaron temperaturas entre 30 y 31°C, que posiblemente influyeron en una mayor presencia de hongos xerófilos. Agar avena suplementado con antibiótico es un buen medio de cultivo para estudios de hongos patógenos y/o ambientales y podría servir para tener una mejor captación de estados sexuales y algunas estructuras que generalmente no se presentan en el agar Sabouraud, medio de cultivo utilizado de rutina en los laboratorios de micología.

Agar semilla de girasol, es utilizado en el laboratorio de micología, para diferenciar *C. albicans* de *C. dubliniensis*, para la búsqueda del complejo *Cryptococcus neoformans*, entre otros [34]. Contiene sustratos fenólicos o polifenólicos que son utilizados por el complejo *Cryptococcus neoformans* y otras especies de *Cryptococcus* mediante la enzima feniloxidasasa para producir melanina [34]. La lacasa enzimática presente en la levadura actúa sobre estos sustratos fenólicos generando quinonas, que se someten a un proceso de autopólimerización y se convierten en melanina [35][36]. El objetivo de la utilización de este medio de cultivo fue determinar la posible presencia de *C. neoformans* en las fosas nasales de los trabajadores, de igual forma es un medio que permite una buena esporulación de los hongos ambientales. Al comparar los tres medios de cultivo con el recuento total de mohos y levaduras se logró determinar que solo hubo diferencias significativas en el bloque 1 para agar semilla de girasol y durante el mes de julio/18 para CHROMagar Candida. A pesar de las pequeñas diferencias que se presentaron entre los tres medios de cultivo, es importante recalcar que permitieron el aislamiento de un buen número de UFC/mL y una buena diversidad de especies y para estudios similares se recomienda usar por los menos dos o tres medios de cultivo, uno simple y otros diferenciales.

Los géneros de hongos encontrados en los diferentes ensayos concuerdan con los trabajos realizados por [1][19][16][4]; *Cladosporium* fue el género de mayor frecuencia en todos los medios de cultivo evaluados, esto se puede relacionar a la temperatura y humedad la cual



tuvieron una mediana de 25.8 °C y 56% respectivamente, estos valores fueron menores que los obtenidos por el trabajo [19] y similares a los que dieron en los trabajos [1], [21].

Al comparar el crecimiento de los principales hongos alergénicos de ambientes utilizando los métodos gravimétricos y volumétricos y los aislamientos de a partir de muestras de fosas nasales de los trabajadores de tres edificios de la Universidad Santiago de Cali se encontró que el agar semilla de girasol posiblemente por su contenido de nutrientes estimulo una buena esporulación de algunos hongos entre éstos el género *Fusarium*. El género *Alternaria*, no se encontró o fue un hallazgo muy raro según la clasificación de Yadav y Madelin, por esta razón los datos estadísticos no permitieron establecer bien la significancia estadística. Los géneros *Cladosporium*, *Aspergillus* y *Penicillium* presentaron los mayores valores de UFC/m³ en los medios de cultivo tradicionales, agar Sabouraud y DRBC [7][37][27], datos que confirman la importancia de estos medios de cultivo para el aislamiento de hongos a partir de muestras clínicas, de alimentos y diferentes ambientes. Los géneros *Cladosporium*, *Penicillium* y *Aspergillus*, fueron los hongos alergénicos que presentaron los mayores recuentos de UFC, se les ha asociado con signos y síntomas de fatiga, conjuntivitis, rinitis, asma, entre otras enfermedades alérgicas[13], pueden liberar esporas o moléculas químicas relacionadas con el Síndrome del edificio enfermo y micotoxicosis[6][8][38]. La biodiversidad de los géneros de hongos encontrados en los tres ensayos con los diferentes medios de cultivo fue similar.



5. CONCLUSIONES

Los géneros de hongos alergénicos, *Cladosporium*, *Aspergillus* y *Penicillium* presentaron los mayores valores de UFC/m³ en los medios de cultivo tradicionales, agar Sabouraud para las muestras de fosas nasales y DRBC para las muestras ambientales, demostrando en este estudio que son los medios de cultivo más adecuados para la realización de estudios similares.

La Biodiversidad de hongos encontrados en los diferentes medios de cultivo, tanto para el estudio de ambientes y de fosas nasales fue similar, sin embargo, la utilización de dos o tres medios permitiría recuperar un mayor número de UFC y una mayor diversidad, incluyendo los aislamientos de hongos con estructuras de reproducción sexual como cleistotecios, peritecios y de reproducción asexual como sinemas o coremios y picnidios.

El medio de cultivo SDA 5% NaCl, presentó los menores valores de UFC de *Chrysonilia*, hongo muy contaminante, sin embargo, es importante acompañarlo de otro medio de cultivo, ya que el NaCl puede inhibir algunos hongos ambientales. De igual forma el agar avena mostró ventajas en la esporulación de los hongos, en especial de los mohos negros y en obtener una mayor biodiversidad.



6. AGRADECIMIENTOS

A la Dirección General de Investigación de la Universidad Santiago de Cali por la financiación del Proyecto (DGI-COCEIN-No. 521-621116-D65).

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] L. Medina, A. Tuozzo, J. Herrera, Y. Perozo, y L. González, "Estudio de hongos en bibliotecas de la universidad de Carabobo-Valencia," *Dch*, vol. 3, no. 1, pp. 1-17, 1999.
- [2] R. Pavan y K. Manjunath, "Indoor Study on Airborne Fungi in Swine House of Bangalore, India," *Int. J. Curr. Sci.*, Vol. 9, pp. 77–82, 2013.
- [3] R. Pavan y K. Manjunath, "Qualitative Analysis of Indoor and Outdoor Airborne Fungi in Cowshed," *J. Mycol.*, Vol. 10, pp. 1–8, 2014.
- [4] H. Aydogdu, A. Asan, M. T. Otkun, and M. Ture, "Monitoring of fungi and bacteria in the indoor air of primary schools in Edirne City, Turkey," *Indoor Built Environ.*, Vol. 14, no. 5, pp. 1-16, 2005.
- [5] J. M. Ríos-Yuil, R. Arenas, R. Fernández, M. Calderón-Ezquerro, and R. Rodríguez-Badillo, "Aeromycological study at the intensive care unit of the General Hospital," *Brazilian J. Infect. Dis.*, vol. 16, no. 5, pp. 432–435, 2012.
- [6] M. A. Daza, D. X. Martínez and P. A. Caro, "Contaminación microbiológica del aire al interior y el síndrome del edificio enfermo," *Biociencias*, vol. 10, no. 2, pp. 37–50, 2015.
- [7] Caicedo Bejarano L. D., " Estudio de la micota ambiental de tres edificios de laboratorios de la Universidad del Valle, Colombia, y su relación con los síntomas de alergias respiratorias que manifiestan los trabajadores.", Tesis de Maestría, Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, 2015.
- [8] R. Y. Cardozo and L. G. Araque, "Caracterización de bioaerosoles en tres edificaciones administrativas de Bogotá , 2012-2013," *Rev. Cienc. en Desarro.*, vol. 6, no. 1, pp. 41–54, 2015.
- [9] C. A. Romero Bohórquez, D. F. Castañeda Alvarado, and G. S. Acosta Peñaloza, "Determinación de la calidad bacteriológica del aire en un laboratorio de microbiología en la Universidad Distrital Francisco José de Caldas en Bogotá, Colombia" vol. 57, no. 1, pp. 103–111, 2016.
- [10] L. A. Molina-valero, "Los hongos de Colombia - vi. reconocimiento e identificación de ustilaginales en colombia," *Caldasia*, vol. 13, no. 61, pp. 49–96, 2005.
- [11] M. Giraldo-castrillón, C. Torres-gonzáles, and J. E. Díaz-ortiz, "Aislamiento de hongos celulolíticos causantes del biodeterioro de la Biblioteca Central de la Universidad del Valle (Cali-Colombia)," *Rev. Mex. Micol.*, vol. 29, pp. 9–14, 2009.
- [12] Á. Daza-perez. D. Martinez-Benavides y P. A. Caro-Hernandez "Sick Building Syndrome and Microbiological Quality of the Air in a University in the Colombian Southwest," vol. 1, no. 8, pp. 7–16, 2018.
- [13] M. Sellart-Altisent, J. M. Torres-Rodríguez, S. Gomez De Ana, and E. Alvarado-Ramírez, "Microbiota fúngica nasal en sujetos alérgicos y sanos," *Rev. Iberoam. Micol.*, vol. 24, no. 2, pp. 125–130, 2007.
- [14] K. G. Landry, N. M. Ascension, D. C. I. Armelle, G. K. Hortense, and E. François-Xavier, "Assessment of Indoor Microbial Quality of Library's Premise: Case of Central Library of the University of Yaoundé I" *Open J. Prev. Med.*, vol. 08, no. 04, pp. 109–120, 2018.
- [15] K. Lagrou, R. F. Duarte, and J. Maertens, "Standards of CARE: what is considered 'best practice' for the management of invasive fungal infections? A haematologist's and a mycologist's perspective," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 74, pp. 113–118, 2019.



- [16] Ocampo, J., Gaviria, R., Sánchez J. Prevalence of asthma in Latin America. Critical look at ISAAC and other studies. *Rev Alerg Mex.* 2017;64(2):188-197.
- [17] S. Borrego and M. Garcia, "Comportamiento de la concentración microbiana aérea en la Fototeca del Archivo Nacional de Cuba," *Rev. CENIC Ciencias Biológicas*, vol. 42, no. 2, pp. 61–67, 2011.
- [18] NTC-ISO:31000, "Norma Técnica Colombiana Ntc-Iso 31000," *Icontec*, no. 571, p. 34, 2011.
- [19] E. L. Arias and P. A. Piñeros, "Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestras de suelo de los páramos de guasca y cruz verde", 2008.
- [20] W. H. Drummond *et al.*, "InfoStat: Real-Time Data Acquisition for Information-Intensive Critical Care Environments," *Pediatr. Res.*, vol. 45, no. 4, Part 2 of 2, pp. 39A-39A, 2008.
- [21] F. L. Villafañe, O. R. Castro, D. Olier-Castillo and P. M. Pinilla, "Determination of the anemophilic fungal load in six sectors of the city of cartagena de indias," vol. 1, no. 1, pp. 15– 20, 2009.
- [22] R. de C. Ministerio de Salud, "Resolucion 8430 de 1993 - 1," *Repub. Colomb. Minist. Salud*, vol. 1993, pp. 1–12, 1993.
- [23] D. S. Nitiu, A. C. Mayo, L. A. Eliades, M. N. Saparrat and H. R. Vasquez, "Monitoreo de la carga fúngica ambiental y de otros bioaerosoles en un depósito de restos MoMificados del noa del Museo de la plata (argentina): un estudio de caso," *Mnsc*, vol. 50, no. 4, pp. 22–22, 2011.
- [24] S. Kidd, C. Halliday, H. Alexiou, and D. Ellis, "Descriptions of Medical Fungi," Vol. 3, 2016.
- [25] M. Mendoza, "Importancia de la identificación de levaduras," vol. 25, no.1, pp. 103-117, 2005.
- [26] A. Rezusta Lopez, A. Sanchez, J. Gil, "Fundamentos básicos para el diagnóstico micológico," *Guía Práctica de Identificación y Diagnóstico en Micología Clínica*, pp. 1–22, 2007.
- [27] D. R. Perez, M. E. Zarate, "Determinación de la flora micológica del maíz seco y su harina en la parroquia San Juan-Canton Gualaceo," pp. 1–85, 2015.
- [28] L. MICROKIT, "Rosa bengala cloranfenicol agar," no. 34, pp. 1–4, 1999.
- [29] P. Esquivel, M. Mangiaterra, G. Giusiano, and M. A. Sosa, "Anemophilous microfungi in outdoor environments of two cities in Argentinian northeastern," *Boletín Micológico*, vol. 18, pp. 21–28, 2003.
- [30] P. Ilie, J. Bozie and S. Ilie "Microbiological Air Contamination in Hospital," vol. 7, no. 2, pp. 183-191, 2018.
- [31] T. Scognamiglio, R. Zinchuk, P. Gumpeni, and D. H. Larone, "Comparison of inhibitory mold agar to sabouraud dextrose agar as a primary medium for isolation of fungi," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 48, no. 5, pp. 1924–1925, 2010.
- [32] M. Sautour, C. Soares Mansur, C. Divies, M. Bensoussan, and P. Dantigny, "Comparison of the effects of temperature and water activity on growth rate of food spoilage moulds," *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 28, no. 6, pp. 311–315, 2002.
- [33] J. Krulj *et al.*, "The effect of storage temperature and water activity on aflatoxin B 1 accumulation in hull-less and hulled spelt grains," *J. Sci. Food Agric.*, vol. 99, no. 7, pp. 3703– 3710, 2019.
- [34] "Medios de cultivo y reactivos utilizados en el laboratorio de micología," vol. I, 2013.
- [35] R. D. S. Pedroso, K. R. C. Da Costa, J. C. Ferreira, and R. C. Candido, "Avaliação da produção de melanina por espécies de *Cryptococcus* em quatro diferentes meios de cultura," *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, vol. 40, no. 5, pp. 566–568, 2007.
- [36] R. Ikeda, T. Sugita, E. S. Jacobson, and T. Shinoda, "Laccase and Melanization in Clinically Important," *Society*, vol. 40, no. 4, pp. 1214–1218, 2002.
- [37] Vilchez M. Maria Victoria, "Contaminación fúngica ambiental en las líneas de transporte público urbano de la ciudad de Ayacucho," vol. 1, pp. 62, 2018.
- [38] G. Ortiz and V. Catalan, "Componentes biológicos de aerosoles," Vol. 1, No. 40, pp. 26–31, 2007.
- [39] G.S. de Hoog, J. Guarro, J. Gené, S. Ahmed, A.M.S. Al-Hatmi, M.J. Figueras and R.G. Vitale . Atlas of clinical fungi. 2019



ANEXOS

ANEXO 1. Cuestionario adaptado a partir de un modelo estandarizado (El International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) en su versión validada al español

SOBRE LA CALIDAD DEL AIRE DEL ENTORNO DE TRABAJO RELACIONADA CON POSIBLES REACCIONES ALÉRGICAS PROVOCADAS POR HONGOS

Fecha: _____ Edificio _____ Laboratorio _____
Iniciales del nombre y apellidos _____ Firma: _____
Código: _____

1. Tienes el diagnóstico médico de padecer alergia: SI () NO ()
1.1 Asma bronquial () 1.2 conjuntivitis () 1.3 Rinitis () 1.4 Eccema o urticaria: () 1.5 otro () ; especificar: _____
1.6 ¿Te han especificado que alérgenos te afectan? () Indicar cuál (es) _____

2. Si has marcado **NO** en la anterior pregunta:

2.1 ¿Presentas algunos de estos síntomas fuera de los procesos gripales o Resfríos comunes?

2.2 Estornudos: ()

2.3 Secreción abundante de moco nasal: ()

2.4 Obstrucción y congestión nasal: ()

2.5 Picor ocular: ()

2.6 Lagrimeo: ()

2.7 Dificultad para respirar con ruidos (pititos) en el pecho: ()

2.8 Otros, síntomas: ()

2.9 Indicar cuáles: _____

3. ¿En los últimos meses cuando ha presentado los síntomas anteriores? _____

3.1 Primer trimestre () 3.2 Segundo trimestre 3.3 Tercer trimestre ()

3.4 Cuarto semestre 3.5 Verano: () 3.6 Invierno ()

4. Los síntomas indicados ¿Dónde suelen presentarse con mayor frecuencia?

En ambientes exteriores 4.1.1 Urbano: () 4.1.2 Rural: ()

En ambientes interiores 4.2.1 Casa: () 4.2.2 Laboratorio ()

5. Tienes interés en que te practiquen pruebas en piel (Prick test) para determinar si eres alérgico a 5 antígenos de hongos: SI () NO ()



ANEXO 2 CONSENTIMIENTO INFORMADO

Lo invito a participar como voluntario en la investigación “Hongos alergénicos en ambientes internos y fosas nasales de trabajadores de la Universidad Santiago de Cali y su relación con los síntomas de alergias respiratorias que manifiestan los trabajadores”.

El objetivo es conocer los hongos ambientales de estos edificios y analizar su relación con la presencia de síntomas de alergias respiratorias en los docentes, empleados y trabajadores que allí se desempeñan. Participarán trabajadores, empleados y docentes.

Si decide voluntariamente participar en esta investigación, se le tomarán cuatro (4) muestras (una cada dos meses) de las fosas nasales con un escobillón estéril que se introducirá con suavidad en ambas fosas y dependiendo de los resultados obtenidos de éstas, a algunos individuos al final del estudio, un médico alergólogo les hará la prueba de Prick test que consiste en hacer una punción artificial con una lanceta especial para introducir una gota del extracto antigénico estéril. Todos los materiales serán estériles, desechables, la lanceta tiene una punta de 1 mm de longitud, lo cual facilita la penetración homogénea del alérgeno y evita el sangrado. Además, deberá responder por escrito cuatro (4) cuestionarios (uno cada tres meses). Los procedimientos anteriores se llevarán a cabo en un tiempo aproximado de 30 minutos por visita.

Su participación ayudará a encontrar una respuesta a la pregunta de investigación y permitirá completar la información existente para dar las recomendaciones necesarias para mejorar el ambiente de trabajo. La investigación no implica gastos para el participante, no recibirá contribución económica y no podrá hacer exigencias o remuneración por el mismo.

Su participación en esta investigación es totalmente voluntaria. Usted puede retirarse en el momento que lo desee. Con la firma del consentimiento informado el paciente autoriza al investigador a tener acceso a la información suministrada en la encuesta, el cual respetará la confidencialidad de la información. Para las encuestas se utilizará un código asignado para el estudio y NO serán marcados con el nombre, a esta información no podrán acceder personas diferentes a la investigadora, igualmente, en ningún caso el nombre aparecerá en ninguna publicación. Estas encuestas serán guardadas bajo custodia en la oficina de la responsable, Luz Dary Caicedo Bejarano.

Aceptación: Si usted no entiende el propósito de este estudio o de la información contenida en este documento, por favor pregunte. No participe si algo no es claro para usted.

Su firma abajo indicará que usted ha leído este documento (o se lo han leído) y que ha decidido participar en el proyecto. Usted firmará dos copias de este formato y es libre de guardar una copia de este documento.

Su firma indica que usted ha decidido participar voluntariamente en este estudio.



Código del trabajador :	Nombre (en letra clara)	Documento de Identidad	Lugar/fecha	Firma

Testigo: Observé el proceso de consentimiento. El paciente leyó este formato (o le ha sido leído), tuvo oportunidad de hacer preguntas, estuvo conforme con las respuestas y firmó para entrar al estudio.

Testigos	Nombre (en letra clara)	Documento de Identidad	Lugar/fecha	Firma
Testigo 1				
Testigo 2				



La Santiago
transforma
tu mundo

