



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO
PROFESIONAL
ASIGNATURA TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

**CARACTERIZACIÓN DE LOS SUELOS DE UNA FINCA UBICADA EN
EL MUNICIPIO MONTALBAN COMO ASOCIACIÓN EPIDEMIOLÓGICA
DE PARACOCCIDIOIDOMICOSIS**

Autores: Barranca Mayra

Robles Nancy

Salvatore Fernando

Tutor: Lic. Yudith Elizabeth Angulo

Asesor Metodológico: Emilia Barrios

VALENCIA, OCTUBRE DE 2008

CONSTANCIA DE CERTIFICACIÓN DEL TUTOR

Yo, **Yudith Elizabeth Angulo**, por medio de la presente certifico que he tenido conocimiento del trabajo de investigación que lleva por título: **“CARACTERIZACIÓN DE LOS SUELOS DE UNA FINCA UBICADA EN EL MUNICIPIO MONTALBAN COMO ASOCIACIÓN EPIDEMIOLÓGICA DE PARACOCCIDIOIDOMICOSIS”**, desde su inicio hasta su culminación. El mismo fue realizado por los bachilleres: **Barranca Mayra, Robles Nancy y Salvatore Fernando**. Del cual considero reúne los requisitos suficientes para ser sometido a evaluación.

Lic. Yudith Elizabeth Angulo

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
 ESCUELA DE BIOANALISIS
 DEPARTAMENTO DE INVESTIGACION Y DESARROLLO PROFESIONAL
 ASIGNATURA TRABAJO DE INVESTIGACION

INSTRUCTIVO DE EVALUACION DEL CUARTO LAPSO

Título del Trabajo: **CARACTERIZACIÓN DE LOS SUELOS DEL MUNICIPIO MONTALBAN COMO ASOCIACIÓN EPIDEMIOLÓGICA DE PARACOCCIDIOIDOMICOSIS**

La calificación obtenida en la presentación y defensa del Trabajo fue:

Estudiante	P. Escrita (30%)	Diseño de la P. (10%)	P. Oral (20%)	Defensa y Discusión (10%)	Total
Br. Mayra Barranca	18 (5,4)	20 (2)	20 (4)	19 (4,9)	19 (13,3)
Br. Nancy Robles	18 (5,4)	20 (2)	20 (4)	19 (4,9)	19 (13,3)
Br. Fernando Salvatore	18 (5,4)	20 (2)	20 (4)	19 (4,9)	19 (13,3)

Emilia E. Barrios	Rosalina Rojas	ANA Alfaro
Nombre:	Nombre:	Nombre:
C.I.: 9636868	C.I.: 10.239726	C.I.: 3922509
 Firma	 Firma	 Firma

Valencia, 13 de Octubre de 2008

Instrumento Diseñado por las Profesoras Rosalina González y Yunedy Marcano. Actualizado por las Profesoras Vita Calzolaio y Amarily Perelli

DEDICATORIA

A nuestros padres por apoyarnos y bien encaminarnos siempre con nuestras decisiones. Todos nuestros éxitos se los debemos y se los dedicamos a ellos.

A nuestros hermanos y seres queridos en general que con su cariño y afecto nos animaron considerablemente en el desarrollo y éxito de nuestras metas.

Mayra Barranca, Nancy Robles y Fernando Salvatore

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar te agradecemos a ti Dios por permitirnos llegar hasta este momento tan importante de nuestras vidas y lograr otra meta más en nuestra carrera.

A nuestros Familiares, quienes han estado en todo momento en nuestro crecimiento personal y profesional, brindando su apoyo, amor y comprensión.

A nuestra a nuestra tutora Yudith Elizabeth Angulo por habernos guiado y aconsejado durante todo este tiempo, le debemos gran parte de nuestro éxito.

A nuestra profesora Emilia Barrios por su colaboración, consideración, paciencia y orientación en el trabajo.

A nuestro profesor Luis González por su incondicional apoyo en este trabajo.

A cada uno de los maestros que participaron en nuestro desarrollo profesional durante nuestra carrera, sin su ayuda y conocimientos no estaríamos en donde nos encontramos ahora.

A todos nuestros amigos que estuvieron con nosotros compartiendo experiencias, desveladas y éxitos. Gracias a cada uno por hacer que nuestra estancia en la Universidad fuera inolvidable.

A la Universidad de Carabobo por permitir desarrollarnos como profesionales

RESUMEN

CARACTERIZACIÓN DE LOS SUELOS DE UNA FINCA UBICADA EN EL MUNICIPIO MONTALBAN COMO ASOCIACIÓN EPIDEMIOLÓGICA DE PARACOCCIDIOIDOMICOSIS

Autores: Mayra Barranca, Nancy Robles y Fernando Salvatore.

Tutor: Lic. Yudith Elizabeth Angulo

Asesor: Prof. Emilia Barrios

Realizado en el Laboratorio de Practicas Profesionales de Bacteriología de la Universidad de Carabobo.

Las micosis sistémicas son enfermedades que originan lesiones en cualquier parte del cuerpo, pero ataca con preferencia los pulmones, ganglios linfáticos, piel, mucosas y glándulas suprarrenales. Son producidas especialmente por hongos dimórficos, uno de estos hongos es *Paracoccidioides brasiliensis* quien es común en los suelos ácidos de zonas que presenten un clima templado o calido. La infección por este hongo puede ser adquirida por ingestión o por inoculación de material contaminado con el mismo. A fin de conocer las características del suelo donde este hongo patógeno pueda sobrevivir se realizó un estudio de tipo no experimental de corte transversal, y de campo en la finca *El Triunfo del Querer* ubicada en el municipio Montalbán del estado Carabobo cuyas características ambientales coinciden con las condiciones necesarias que han sido implicadas para el desarrollo y supervivencia del microorganismo. Se analizaron 90 muestras de suelo de la zona, las cuales fueron cultivadas en medio Micosel a 37°C y a temperatura ambiente. Encontrándose una prevalencia del 50% de los tubos con *Mucor* spp. Causante de Zigomicosis; y otros hongos productores de micotoxinas como *Aspergillus Niger* 5.6% (Aflatoxinas), *Fusarium* spp 2.2% (Tricotecenos, zearolenona, fumonisinas), y Dematiaceos 20% (Aflatoxinas). No se logró aislar *Paracoccidioides brasiliensis*, lo que sugiere la posibilidad de que la zona de Montalbán a pesar de poseer condiciones favorables para la existencia de este hongo pueda presentar algún inhibidor no controlado o que las cantidades de nutrientes en el suelo sean insuficientes como para ofrecer un hábitat de reservorio para el mismo no así para otras especies como *Mucor* spp que ocasiona una infección micótica que se presenta principalmente en personas con trastornos inmunológicos.

Palabras Clave: *Paracoccidioides brasiliensis*, micosis sistémicas, Zigomicosis

INDICE

	Página
Resumen	vi
INTRODUCCION	1
Objetivo General	11
Objetivos Específicos	11
METODOLOGIA	12
Tipo Investigación	12
Población	12
Muestra	12
Procedimiento Metodológico	12
Análisis de los Datos	15
RESULTADOS	16
DISCUSIÓN	20
CONCLUSIONES	24
RECOMENDACIONES	25
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	26
ANEXOS	33

INDICE DE TABLAS

Número de la tabla	Descripción	Página
1	Estadísticos descriptivos para la caracterización fisicoquímica de las muestras de suelo analizadas del municipio Montalbán finca “ <i>El Triunfo del Querer</i> ” de los Grupo A y B. 2008	16
2	Descripción de hongos aislados y su factor de patogenicidad. Pertenecientes a los grupos A y B en muestras de suelo del municipio Montalbán finca “ <i>El Triunfo del Querer</i> ” 2008.	18
3	Valores promedio de UFC aislados en función de la temperatura de cultivo de muestras de suelo del municipio Montalbán finca “ <i>El Triunfo del Querer</i> ”. 2008	19

INTRODUCCION

Las micosis sistémicas son enfermedades generalmente producidas por hongos dimórficos, que en ocasiones viven saprofitamente, en forma de hongo filamentoso, en áreas geográficas definidas y que una vez que ingresa al sistema respiratorio del hospedador, vive en forma parasitaria, bajo la morfología de levadura. Su ingreso al hospedero provoca una primoinfección, que puede progresar hacia distintas situaciones clínicas según el estado inmunológico del mismo (Iovanitti, 2001).

Los factores esenciales en el desarrollo de una micosis sistémica están dados por la relación hongo-huésped, es decir, por los mecanismos de defensa y resistencia que pueda ofrecer el huésped contra los factores de virulencia que pueda desarrollar el hongo una vez instalado en un tejido sano o debilitado, pudiéndose instalar una infección oportunista en personas con desórdenes metabólicos, discrasias sanguíneas o que están recibiendo drogas antibacterianas y/o esteroides los cuales son más susceptibles a las infecciones por hongos que los individuos sanos. Dentro del grupo de micosis de instalación primaria pulmonar o de probable origen pulmonar, se describen a la Histoplasmosis, Paracoccidioidomicosis, Blastomicosis, Aspergilosis y Criptococosis entre otras. El ataque de los hongos oportunistas y patógenos encuentra como vías favorables las heridas de la piel y los conductos naturales de comunicación externa como son: boca y nariz, para que en tiempos variables de incubación produzcan infecciones que en algunos casos conducen a un desenlace fatal o impidan la actividad normal del individuo (Casas, 1994).

La Paracoccidioidomicosis (PCM), es una micosis profunda sistémica, crónica, granulomatosa, causada por el hongo dimorfo térmico, *Paracoccidioides brasiliensis* (Serrano, 2001). Esta micosis sistémica origina lesiones en cualquier

parte del cuerpo, pero ataca con preferencia los pulmones, ganglios linfáticos, piel, mucosas y glándulas suprarrenales (Restrepo, 1996; Maldonado, 2001; Restrepo y col., 2004; Rezusta y col., 2006)

Paraccoccidioides brasiliensis (*P. brasiliensis*) es común en los suelos de cultivo y cría de ganado. La infección por este hongo puede ser adquirida por ingestión o por inoculación de material contaminado con el hongo, principalmente a pacientes del sexo masculino que realizan trabajos que requieran contacto directo con la tierra, así como también a inmigrantes de zonas endémicas o excursionistas. De estos se conoce que los únicos hospederos del *P. brasiliensis* conocidos hasta ahora son el hombre y el armadillo *Dasipus novencinctus* (Restrepo, 1996; Corredor y col., 1999; Cavallo, Díaz y Jiménez, 2001; Negroni y Muñiz, 2003).

En el mismo orden de ideas, la distribución geográfica de la Paracoccidioidomicosis se restringe a América Latina, especialmente Brasil, Colombia, Venezuela y Argentina (San Blas, 1993; Restrepo, 1996; Maldonado, 2001; Serrano y Novoa Montero, 2001; Murray y col., 2002; Arenas, 2003; Miranda y col., 2003; Negroni y Muñiz, 2003; Olivero y col., 2003; Tejos y col., 2003), en donde constituye una de las micosis sistémicas más prevalentes de la región, y una de las micosis profundas sistémicas más frecuente en Venezuela (Reviákina y col 2002). Los estados en los cuales se han diagnosticado el mayor número de casos autóctonos son: Carabobo, Lara, Monagas, Miranda, Aragua y Distrito Federal. Durante los últimos 14 años se han reportado 88 casos en el Estado Carabobo, 8 de los cuales son provenientes del Municipio Montalbán (Olivero y col., 2007). Este municipio presenta una superficie de 145 Km² a 670m sobre el nivel del mar, comprendida en su mayoría por caseríos, haciendas y zonas de cultivo, presentando una temperatura que oscila entre 22 y 24°C. Tales características se encuentran directamente relacionadas con el hábitat descrito de zonas donde ha sido aislado el agente causal en otras oportunidades. Los datos epidemiológicos en Venezuela no son exactos, pues no se trata de una enfermedad denunciabile, por no ser considerada desde el punto de

vista epidemiológico por el Ministerio de Salud como un problema de salud pública. La casuística se basa fundamentalmente en el acopio de casos publicados (Albornoz, 1996).

Los primeros síntomas que presenta el paciente con Paracoccidioidomicosis son: tos, fiebre, sudoración nocturna y pérdida de peso injustificada, el primer órgano infectado es el pulmón, y por medio del esputo empiezan a aparecer y evolucionar las lesiones bucales en forma de úlceras crónicas dolorosas que no sanan espontáneamente. Estas úlceras tienen la característica típica de una superficie granulomatosa purpúrea. El sitio de aparición más frecuente para estas lesiones son las encías, pero pueden observarse también en el paladar, lengua y el resto de la mucosa bucal (Oliveros, 2007). A medida que evolucionan, las úlceras adquieren un aspecto "de mora" que da a las lesiones un puntillado característico (Scully y de Almeida, 1992). En etapas avanzadas de la enfermedad, además del compromiso sistémico del paciente por la infección pulmonar, se puede observar destrucción ósea progresiva de los maxilares afectados, lo que da lugar a una recesión gingival con exposición de las raíces dentarias y pérdida dentaria. La mucosa gingival adquiere una consistencia blanda, eritematosa y edematosa (Migliari y col, 1998). También puede haber un compromiso de los tractos digestivo y respiratorio superiores (Do Valle y col, 1999).

En general los adultos tienden a presentar una lenta evolución, mientras que en los adolescentes y sobre todo en los niños la afección progresa rápidamente debido posiblemente a que el sistema inmunológico no está aún bien desarrollado, por lo que se disemina y puede llevar a la muerte en un lapso de semanas o meses. En los adultos con mayor predominio en el sexo masculino, el órgano centralmente afectado es el pulmón. Es frecuente la existencia de muchas lesiones pulmonares las cuales pueden imitar el aspecto radiológico de la tuberculosis pulmonar (bronconeumónica o focal) o el de la histoplasmosis pulmonar. En las formas diseminadas pueden aparecer grandes adenopatías, lesiones ulcerativas ó vegetantes en la piel y las mucosas e

incluso lesiones generalizadas con ataque a la médula ósea, las articulaciones y el hígado (Franco y col ,1998).

P. brasiliensis, se comporta como una levadura a 36-37°C y como un mohó por debajo de 26° C. Se desarrolla en zonas que presentan condiciones favorables para su sobrevivencia, como temperaturas entre 10 y 28°C que se observan en los bosques tropicales y subtropicales, precipitación de 500 a 2.500 mm de agua por año, clima templado a cálido y moderadamente húmedo, con altitudes entre 47 y 2000 metros sobre el nivel del mar, abundantes cursos de agua, suelos ácidos, con períodos de lluvia cortos y épocas secas con lluvias esporádicas. (Borregales, Solarte y García, 1999).

La transición de fase o dimorfismo térmico, como se conoce el fenómeno, es crucial para el proceso de infección. Si por cualquier razón el hongo no consigue desarrollar la fase patógena con estructuras redondeadas, el proceso infectivo se paraliza definitivamente. Por lo tanto, el análisis de los eventos que llevan al dimorfismo térmico nos plantea la posibilidad de bloquear el proceso y por ende, controlar la diseminación de la enfermedad. Señalando la pared celular como clave en la determinación de la morfología celular fúngica y su preservación vital, pues está constituida fundamentalmente por polímeros de azúcares similares, aunque no iguales, a la celulosa que vemos en el papel, el algodón o las telas no sintéticas y a los que se llaman con el nombre genérico de glucanes. En los estudios iniciales, como continuación a la línea de investigación de Kanetsuna y Carbonell (citados por Carmona, 2003), se sugiere la posibilidad de que un polisacárido específico de la fase levaduriforme de *P. brasiliensis* (alfa 1,3-glucán) estuviese ligado a la capacidad invasora de este hongo patógeno, siendo demostrado también en otros patógenos fúngicos, por lo cual se habla del dimorfismo térmico como fenómeno indispensable para su patogenicidad (Carmona, 2003).

En lo que respecta al aislamiento del *P. brasiliensis* en suelo, sólo existen tres referencias que han podido confirmar este hallazgo, el primero realizado por Albornoz (1971), quien afirma haber aislado el hongo en tres muestras de suelo de un total de 87 muestras del área de Paracotos, Edo. Miranda, Venezuela, mediante la técnica indirecta en ratones de experimentación. El segundo hallazgo, Negroni en Argentina para el año 1976, reportó el aislamiento del microorganismo del suelo. Más tarde Ferreira, en Brasil, refiere haber aislado y caracterizado a *P. brasiliensis* del alimento de un perro y señaló que probablemente esto se debió a la contaminación de dicho alimento con tierra (Borregales y col. 1999). Hasta ahora no se conocen estudios actuales referidos al hábitat de este agente en ningún otra región o país a pesar de los casos reportados en los últimos años. Igualmente en el estado Carabobo, se desconocen registros de aislamiento del *P. brasiliensis* en suelos, razón por la cual el hábitat de este hongo sigue siendo una inquietud por resolver (Olivero y col. 2007).

En 1999 Borregales y col., estudiaron el suelo de la población de Monay, Edo Trujillo en Venezuela, dado que reunía las características ambientales descritas y que han sido implicadas en el desarrollo y supervivencia del microorganismo y por haberse presentado un caso de paracoccidiodomicosis en esta zona; realizaron un estudio en los asentamientos campesinos Las Cocuizas y El Macoyal de Monay. Analizaron los sueros de 79 individuos considerados de alto riesgo para esta micosis del sexo masculino y oficio relacionado con el contacto estrecho con el suelo y edad entre los 20 hasta los 70 años, así como de los familiares del caso clínico, tres hombres y dos mujeres. Luego elaboraron preparados con 16 muestras de suelo de la zona, los cuales fueron cultivados en medio Sabouraud Dextrosa e inoculados a ratones albinos machos cepa NMRI. La serología, los cultivos y modelos experimentales inoculados con la suspensión de las muestras de suelos obtenidas en las zonas de estudio, resultaron negativos. Estos resultados sugirieron la probabilidad de que la zona de Monay a pesar de poseer condiciones favorables para la existencia del hongo patógeno en estudio, no sea la reservaria.

Igualmente Borregales y col., (1999) mencionan que se han realizado intentos fallidos en el propósito de aislar, identificar y caracterizar a este hongo a partir de muestras obtenidas del suelo, lo cual evidencia la dificultad en obtener resultados favorables en dicha tarea; por otra parte, hay que resaltar que en condiciones de laboratorio la mayoría de las cepas de *P. brasiliensis* no son virulentas para una gran cantidad de modelos animales de experimentación. Cabe señalar que dado que no hay reportes de estudios actuales se señala a investigadores como Restrepo quien en 1985 señaló la necesidad de inocular gran cantidad de levadura para producir regularmente infección en animales axénicos. Igualmente se conocen estudios de Naiff (1988) y Vidal (1995), quienes lograron aislar el *P. brasiliensis* del armadillo (*Dasipus novencinctus*) y afirman que este género está establecido como reservorio enzoótico para el hongo en Brasil (San Blas, 1993; Vidal, 1995).

En estudios recientes San Blas y col, (2002) lograron determinar los acontecimientos moleculares y bioquímicos que conducían a la transición morfológica del *P. brasiliensis* pues este agente es un modelo favorable para realizar estos estudios ya que la temperatura parece ser el único factor que regula este proceso, remontándose a los genes que controlan la síntesis del glucan, de la quitina de la pared celular y de otros procesos metabólicos. En efecto, por intermedio de estudios de biología molecular lograron el reconocimiento del *P. brasiliensis* como anamorfo en el phylum Ascomycota, orden Onygenales, familia Onygenaceae, el cual pertenecía anteriormente al phylum Deuteromicota y de clase Hyphomycetes.

Por ser esta una de las micosis profundas con mayor importancia en Venezuela ha sido objeto de numerosos estudios como el realizado por Olivero y col, durante 14 años (1992-2005) quienes estudiaron a 2.407 pacientes en el laboratorio de Micología de la Universidad de Carabobo (LMUC) utilizando métodos serológicos, micológicos e histopatológicos, diagnosticando 97 casos (4,0%) de Paracoccidioidomicosis, la mayoría se presentaron en el sexo masculino, con edades comprendidas entre 40-50 años (29,6 %) y en el femenino entre 62-72 años (37,5%). Los pacientes procedían

principalmente del estado Carabobo (88/97: 90,7 %) siendo el 9.1% procedentes del Municipio Montalbán teniendo el 88.7% ocupación de agricultor (Olivero y col, 2007).

Así mismo otra infección oportunista poco frecuente y potencialmente letal, es la Mucormicosis causada por hongos comunes que con frecuencia se encuentran en el suelo y entre la vegetación descompuesta pertenecientes a la familia Mucoraceae, de la que forman parte los géneros (*Mucor*, *Absidia* y *Rhizopus*) implicados en esta patología. La mayoría de las personas están expuestas a este hongo diariamente, pero aquellas que tengan trastornos inmunes pueden ser susceptibles a la infección. Afecta principalmente los senos paranasales, el cerebro o los pulmones y se presenta principalmente en personas con trastornos inmunológicos (Edwards, 1993).

En lo que respecta al aislamiento de hongos patógenos provenientes de muestras de suelo cabe señalar el estudio realizado por Mendoza y col, (2007) quienes aislaron *Sporothrix schenckii* de muestras obtenidas del suelo de la Colonia Tovar del estado Aragua, para ello utilizaron el método directo el cual fue más efectivo para el aislamiento del hongo del medio ambiente, obteniéndose tres aislamientos, y solo uno por el método indirecto, este último con la ventaja de aislarse en cultivo puro. La baja eficiencia de aislamiento en el ratón pudo estar relacionada con el grado de contaminación microbiológica de la muestra. En este trabajo, el aislamiento de *S. schenckii* fue relacionado con un caso clínico de Esporotricosis cutánea fija proveniente de la zona, la cual es considerada como endémica.

El elevado número de diagnósticos serológicos positivos ratificados mediante estudios micológicos y/o histopatológicos indica la importancia de esta prueba, la cual ha sido durante años la de elección en el diagnóstico inicial de pacientes con sospecha de PCM; se ha determinado que tiene alta especificidad y sensibilidad ubicada entre 65-100 % (Pires y Fabiano, 2000). La prueba intradérmica en referencia es muy útil para definir las áreas endémicas de *P. brasiliensis*, no obstante, la

positividad de la prueba no necesariamente implica infección activa con el agente micótico. La prueba puede ser negativa en pacientes con PCM que presenten formas diseminadas y fases terminales de la enfermedad. (Perdomo y Pérez, 2006).

El material para Examen Diagnóstico lo constituyen las muestras proveniente de humanos tales como costras de la base de las lesiones ulcerosas granulomatosas, pus de nódulos linfáticos drenantes, esputos, lavado bronquial, jugo gástrico, material de biopsia. (Albornoz, 1996; Bianchi y col., 2000; Perdomo y Pérez, 2006). Así como muestras provenientes del ambiente, como lo son muestras de suelo, agua y vegetales; el material opaco es tratado con una gota de Hidróxido de Potasio (KOH) 10% o una mezcla de tinta Parker –KOH a partes iguales para aclarar y teñir las estructuras. La preparación debe ser colocada entre lámina y laminilla para ser observada al microscopio con lente de bajo aumento. (Casas, 1994; Perdomo y Pérez, 2006).

En cuanto al cultivo todos los materiales infectados se cultivan en Saboraud dextrosa agar con reacción neutra o vecina a la alcalinidad, en tubos e incubados a temperatura ambiente de 25-30°C. (Bianchi y col., 2000). Otras siembras se hacen sobre cultivos de agar-sangre, como infusión de carne glucosa agar, Saboraud dextrosa agar y son incubados a 37°C. A 25°C crece muy lentamente, en general la colonia aparece en 15 a 25 días. Puede necesitar diez días más para alcanzar un diámetro de 1 cm. El desarrollo de los cultivos “stock” (los permanentes de los cuales se toman las siembras) es más rápido (Perdomo y Pérez, 2006). Al transferirlo a Agar sangre e incubarlo a 37ª C., se produce la conversión del microorganismo a la fase de levadura. Debido a que no se producen conidias características a 25°C, para el diagnóstico es indispensable la conversión a la morfología típica de la forma de levadura. (Rippon, 1990; Restrepo, 2003; Perdomo y Pérez, 2006).

A 25°C el hongo crece en forma lenta y produce diversas formas coloniales; estas pueden ser desde una colonia no vellosa, coriácea, pardusca, plana con algunos penachos de micelio, aéreo, o una colonia rugosa, plegada, vellosa a aterciopelada, de

color blanco, rosa y después beige. El color del reverso varía de pardo amarillento a pardo. A 37°C el micelio se convierte a la fase de levadura, el microorganismo crece en forma lenta y produce una colonia blanquecina, rugosa, plegada no vellosa. (Restrepo, 2003; Perdomo y Pérez, 2006).

La morfología microscópica a 25°C., muestra una variedad de conidias, ninguna de las cuales es característica de la especie; todos los cultivos producen clamidoconidias intercalares e hifas en espiral. A 37°C se obtienen elementos micélicos deformes, de longitud variable, entreverados con células de levadura simples o con múltiples brotaciones. Las levaduras miden de 2 a 30 µm o más y son de forma oval o irregular. Tienen de una a varias yemas redondas de cuello delgado de tamaño uniforme o variable. (Rippon, 1990 Restrepo, 2003; Perdomo y Pérez, 2006).

El diagnóstico de la paracoccidioidomicosis en pacientes procedentes de varios estados del país reafirma a los mismos como zonas endémicas de la enfermedad en Venezuela. El mayor número de pacientes procedentes del estado Carabobo se debe, tanto a la presencia de la micosis en la región como a la ubicación del LMUC. El estado Carabobo está situado en la parte norte-centro del país y por su territorio atraviesa de este a oeste el Sistema Montañoso de la Costa, por lo que posee condiciones ambientales similares a las descritas como favorables para el desarrollo del hongo. La mayoría de los municipios que lo conforman son de predominio rural y poseen áreas agrícolas de extensiones variables (Olivero y col 2007).

Comúnmente los pacientes con Paracoccidioidomicosis son referidos a los centros asistenciales tardíamente pues esta micosis la mayoría de la veces pasa desapercibida y cuando finalmente se diagnostica el hongo ya ha llegado al parénquima de los pulmones pudiendo diseminarse por vía sanguínea o linfática a otras partes del cuerpo (Restrepo, 2004). Por ello surge la necesidad de ampliar los estudios sobre esta micosis en las áreas cuyas características ambientales sean las

apropiadas para el desarrollo del hongo, además de poseer una población susceptible de adquirir la misma.

Este estudio permite conocer las características de los suelos de una localidad asociada a casos clínicos de Paracoccidioidomicosis, así como también la posible exposición a otros hongos oportunistas. También permite retomar una inquietud que aun no ha sido descrita como es, cuál es el hábitat del *P. brasiliensis*, por lo cual y por lo antes expuesto se plantean las siguientes interrogantes.

¿Representa el Municipio Montalbán una zona reservaria para *P. brasiliensis*?

¿Cuáles son las características ambientales asociadas a la presencia de Paracoccidioidomicosis y las condiciones fisicoquímicas del suelo de esta zona?

Objetivo General

Evaluar las características del suelo y la presencia del *Paracoccidioides brasiliensis* en asociación epidemiológica de Paracoccidioidomicosis en una finca del Municipio Montalbán.

Objetivos Específicos

- Caracterizar el área que presente las condiciones favorables para el crecimiento de *Paracoccidioides brasiliensis* en los suelos de una finca del Municipio Montalbán.
- Determinar las características de superficie del suelo.

- Determinar la presencia de *Paracoccidioides brasiliensis* de las muestras de suelo del Municipio Montalbán a través de cultivos.
- Describir la presencia de otros hongos de interés clínico en la muestra evaluada.

METODOLOGIA

Tipo de Investigación

Fue de tipo no experimental de corte transversal, y de campo dado que las muestras de suelo fueron evaluadas en su contexto natural y los datos fueron recolectados en un solo momento, en un tiempo único, a partir de los cuales se obtuvo el estudio de las variables determinadas en las muestras directamente del suelo, se analizó bajo un diseño de bloques al azar completamente aleatorio y con sub muestreo tomando como factor influyente la temperatura del cultivo (Hernández, Fernández, Baptista, 2003).

Población y Muestra

La población estudiada estuvo constituida por suelos del Municipio Montalbán Estado Carabobo, con pH ácido como criterio de inclusión específicamente de áreas de la finca “*El Triunfo del Querer*” en un área de 60 x 40m lineales Los suelos fueron divididos en cinco lotes. De cada lote se tomaron cinco muestras de las cuales se seleccionaron al azar tres muestras por bloque para cumplir con el diseño y a su vez de cada muestra se hicieron seis submuestras obteniendo así un total de 90 muestras o unidades de análisis de suelo del Municipio, que presentaron las condiciones ambientales apropiadas para el desarrollo del hongo. Las muestras fueron recolectadas durante el mes de Mayo del 2008.

Procedimiento de Toma de muestra

Se inició con la exploración de la zona y medición de pH para cumplir los criterios de inclusión. De cada una de estas muestras se tomaron aproximadamente 2g de material el cual se colocó en un tubo de ensayo con agua neutra estéril y se le midió el pH con una tira estándar. Para la caracterización de la zona se tomó como

criterio de inclusión aquellas zonas cuyo suelo presentó un pH ácido que osciló entre 4 y 6. Una vez seleccionada el área se dividió el terreno en lotes, señalando los puntos por muestreo en cada lote, en forma de zig-zag, en cada sitio de muestreo, se limpio el terreno con una pala y se procedió a tomar la muestra haciendo un hoyo en forma de "V" con una profundidad de 4 cm, se procedió a la toma de la muestra en placas de Petri estériles, y se rotularon según el número de muestras y el área (Edafofinca, 2008). Luego las muestras se trasladaron al Laboratorio de Prácticas Profesionales de Bacteriología de la Universidad de Carabobo. Además, se realizó un pool de las veinticinco muestras originales en un balde y se mezclaron hasta homogeneizar bien la tierra, tomándose 1 Kg. de esta mezcla la cual se transfirió a una bolsa plástica estéril para el estudio fisicoquímico.

Procesamiento de la muestra para cultivo

En un primer ensayo como prueba de validación y control de proceso se analizó un total de 10 muestras por lote en cultivos a temperatura ambiente y a 37°C tomándose 5 g de muestra de tierra con 5 mL de agua destilada y 3 g de perlas de vidrio estériles. Los tubos fueron agitados durante 1 minuto en vórtex, y se dejaron reposar durante 20 minutos. Pasado el tiempo 0,5 mL se inocularon en los tubos de ensayo de 20 cm x 22 cm con medio de cultivo Sabouraud Dextrosa Agar con Cloranfenicol (en cuña) y 0,5 mL para el examen directo con hidróxido de Potasio al 10%. Los cultivos se estudiaron desde el punto de vista macroscópico y microscópico (Rippon, 1990)

El procedimiento de cultivo para análisis se realizó en el medio Micosel (en cuña). Se utilizaron noventa tubos de ensayo de 20 cm x 22 cm para un total de 6 por cada muestra. Antes de inocular se mezcló en un tubo de vidrio estéril 5 g (pesados en balanza digital) de muestra de tierra, con 5 mL de agua destilada y 3 g de perlas de vidrio estériles. Los tubos fueron agitados durante 1 minuto en vórtex, y se dejaron reposar durante 20 minutos. Pasado el tiempo, 1 mL de sobrenadante fue tomado de

cada tubo de ensayo con pipetas estériles (Mendoza, 2007), del cual 0,5 mL se emplearon en el examen directo con hidróxido de Potasio al 10% y 0,5 mL se inocularon en los tubos con medio de cultivo y llevados cuarenta y cinco a temperatura ambiente 25° C representando el grupo A y cuarenta y cinco a 37 °C representando el grupo B durante cuarenta y cinco días antes de ser descartados como negativos. Se procesó control de esterilidad y control de fertilidad del medio tratado así como control ambiental dada las condiciones del laboratorio bajo el mismo esquema de los cultivos de prueba y se realizó la lectura y caracterización de las colonias microscópica y microscópicamente. El recuento de la primera lectura fue realizado a una semana de cultivo para el análisis estadístico.

Preparación del Medio de Cultivo Agar Sabouraud Dextrosa con Cloranfenicol

Se resuspendieron 65,5 g del medio comercial en un litro de agua destilada y se llevó a ebullición. Se dejó en el autoclave durante 10 minutos a 121°C para esterilizar evitando el sobrecalentamiento que afectaría a la gelificación. En la cámara de extracción se distribuyeron en tubos de baquelita estéril dejándolo enfriar y una vez solidificado el medio se colocaron los tubos durante 24 horas en la estufa de cultivo a 37 °C, pasado este tiempo se observaron los tubos, desechando los que presentaron contaminación.

Método de Microcultivo:

El preparado de microcultivo (también conocido como cultivo en portaobjeto) se realizó de la siguiente manera:

En la superficie de una caja de Petri se colocó un pedazo de papel de filtro y dos varillas de vidrio, cortadas de un tamaño adecuado. Se colocó una lamina portaobjeto sobre las varillas y se esterilizó, cortándose con una hoja de bisturí un pequeño bloque de agar papas vertido previamente en una caja de Petri con una profundidad

de 4 mm., con el mismo bisturí estéril se colocó el bloque de agar sobre la superficie del portaobjeto. Con un asa ó aguja estéril se removió porciones pequeñas de la colonia de hongos y se inocularon en cuatros cuadrantes del bloque de agar, luego de la inoculación, se colocó un cubreobjeto estéril sobre la superficie del agar controlando que el papel estuviese húmedo y se incubó.

Se examinó el montaje periódicamente para determinar si la colonia maduro y estaba lista para ser observada microscópicamente. Una vez evidenciado el crecimiento, se retiró cuidadosamente el cubreobjetos con pinzas estériles y se colocó en una lámina portaobjetos con una gota de lactofenol azul (Cardona, 2007).

Análisis fisicoquímico

Un pool de muestra de los cinco lotes de aproximadamente 1 Kg. se empleó en la caracterización fisicoquímica del suelo, y fue enviado al Laboratorio de Suelos, Aguas, Abonos y Foliáres (EDAFOFINCA, CA), en Cagua, Edo Aragua, donde la muestra fue analizada aplicando el método de Walkey- Black para la determinación de carbono orgánico, el Método de Olsen para la determinación de fósforo, y el método de Kjeldahl para la determinación de nitrógeno.

Análisis de los Datos

Para el análisis de los datos obtenidos del cultivo se determinaron las frecuencias absolutas y relativas de los aislamientos obtenidos, de las muestras ambientales y se colocaron en una tabla de distribución, especificando el porcentaje de colonias y posteriormente se procedió a realizar un diagrama de barras para reflejar la distribución de los agentes aislados. Las condiciones y características de los suelos se expresaron en una tabla de distribución. Así como las medias de los tratamientos. El análisis estadístico se hizo utilizando los programas STATISTIX versión 8.0 y SPSS versión 12.0.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos en el presente estudio pertenecen a un total de 25 muestras de suelo subdivididas cuarenta y cinco (45) cultivos en medio Micosel a 25°C (Grupo A) cuarenta y cinco (45) cultivos en medio Micosel a 37°C (Grupo B).

Tabla 1. Estadísticos descriptivos para la caracterización fisicoquímica de las muestras de suelo analizadas del municipio Montalbán finca “El Triunfo del Querer” de los Grupo A y B. 2008

Identificación	Pool de muestras	
Profundidad (cm)	4cm	
ANALISIS DE RUTINA	Resultado	Interpretación
Arena (2-0.05 mm) %	50.0	
Limo (0.05-0.002 mm) %	25.0	
Arcilla(<0.002 mm) %	25.0	
Clase Textural (Bouyoucos mod)	Faa (franco arcilloso arenoso)	Media o Franca
pH de la Pasta Saturada	5.61	
Suspensión 1:2 pH	5.71	Moderada
Suspensión 1:2 *CEs mS/cm	0.31	Normal o No Salino
Carbono Orgánico (W & B) %	1.39	Bajo
Nitrogeno Total (Kjeldahl) %	0.133	Bajo
Relación Carbono/Nitrogeno	10.5	Medio
Fosforo (Olsen) ppm	20	Medio
Potasio (NH4OAc IN) ppm	140	Medio
Carbonatos %	0	Muy bajo
Acidez Intercambiable me/100g H+	-	
Acidez Intercambiable me/100g Al+++	0	
BASES INTERCAMBIABLES		
Calcio me/100g	9.05	Medio
Magnesio me/100g	4.69	Alto
MICROELEMENTOS		
Hierro ppm	41.0	Medio
Cobre ppm	1.4	Medio
Zinc ppm	3.0	Medio
Manganeso ppm	34.5	Medio

CEs mS/cm multiplicado por 100 es equivalente al antiguo CE x 10⁵

En la tabla 1 se expresan las características fisicoquímicas del suelo en estudio, tales como la consistencia del suelo, pH y la cantidad de elementos y microelementos, entre otros, encontrados para el momento de la toma de muestra. Se aprecia un bajo nivel de carbono y de nitrógeno; así como niveles medios para minerales tales como hierro, manganeso, cobre y zinc.

En relación a la presencia de *Paracoccidioides brasiliensis* en las muestras de suelo analizadas del municipio Montalbán hacienda “*El Triunfo del Querer*” de los Grupo A y B. 2008 no se observo crecimiento transcurridos los 45 días de cultivo para este estudio.

Tabla 2. Descripción de hongos aislados y sus toxinas, pertenecientes a los grupos A y B en muestras de suelo del municipio Montalbán finca “*El Triunfo del Querer*” 2008.

Género y especie	Frecuencia por cultivo (%)	Toxina que puede producir como factor de interés clínico
<i>Micelia esterilia</i>	24 (26,7)	Saprófitos
<i>Aspergillus niger</i>	5 (5,6)	Aflatoxinas
Mucor spp	45 (50)	Aflatoxinas
Fusarium spp	2 (2,2)	Tricotecenos, zearolenona, fumonisinas
Dematiaceos	10 (11,1)	Aflatoxinas
Penicilium spp	4 (4,4)	ácido ciclopiazónico, patulina

En la presente tabla se puede observar la mayor frecuencia para el género Mucor con un total de 45 cultivos positivos con presencia del mismo, seguido por géneros del grupo de los Dematiaceos, Aspergillus, Penicilium, Fusarium; en cuanto

al grupo Micelia esterilia corresponde a los géneros no identificados los cuales no presentaron formas de reproducción.

Tabla 3.
Valores promedio de Unidades formadoras de colonias (UFC) aislados en función de la temperatura de cultivo de muestras de suelo del municipio Montalbán finca “El Triunfo del Querer”. 2008

	Aislamientos	
	25 °C	37°C
Cultivos	90	90
n	45	45
media	12,8	8,8
SD	5,42	3,6
C.V.	42,42	41,24
Mínimo	2	2
Máximo	26	16

En relación a los resultados de la presente tabla se puede observar que tanto para los cultivos a 25 °C y 37°C la desviación estándar y el coeficiente de variación se encuentran en rango estadístico aceptable con respecto a las medias obtenidas.

DISCUSION

Actualmente en Venezuela la Paracoccidioidomicosis tiene bajos niveles de infección y por tanto de morbilidad, como consecuencia se subestima el verdadero número de personas infectadas con esta micosis. El estado Carabobo cuenta con áreas geográficas con características bioclimáticas idóneas para el crecimiento y reproducción de este hongo, uno de ellos es el municipio Montalbán. Siendo las zonas agrícolas las de mayor reporte de casos de esta enfermedad en tal sentido, se estudió las características del suelo y la presencia del *Paracoccidioides brasiliensis*, en la finca “*El Triunfo del Querer*”, ubicada en una zona agrícola del Municipio Montalbán.

En este estudio se realizó como base fundamental la caracterización de los suelos, encontrando que poseían los elementos necesarios para suplir los requisitos nutricionales para el desarrollo y crecimiento de una flora fúngica, presentando niveles bajos de carbono, nitrógeno y niveles medios de fósforo, hierro, calcio, zinc, potasio; además de un pH ácido de 5,61, el cual permite el desarrollo de numerosas levaduras, así como también patógenos para plantas. Sin embargo, existe la probabilidad de que los niveles de estos compuestos orgánicos no sean suficientes para el desarrollo del *Paracoccidioides brasiliensis* o que exista la presencia en el suelo un agente inhibidor, el cual no esté siendo considerado o la falta de un nutriente esencial para la supervivencia de *Paracoccidioides brasiliensis*.

Como se ha mencionado anteriormente los aislamientos del *Paracoccidioides brasiliensis* han sido reportados en escasas ocasiones, en Venezuela (1971) por Albornoz quien lo aisló en tres oportunidades de 87 muestras tomando como única referencia un pH ácido para el desarrollo óptimo del hongo; otros investigadores han realizado intentos fallidos con el propósito de aislar este hongo a partir de muestras obtenidas del suelo, lo cual coincide con los resultados de esta investigación salvo

que en los mismos no hay reportes de las propiedades organolépticas del suelo quedando en evidencia la dificultad en obtener resultados favorables en dicha tarea; por otra parte, hay que resaltar que no existen datos de la caracterización de los suelos de donde se logró aislar *Paracoccidioides brasiliensis*, lo que constituye un punto sin comparación y sin referencias con el presente estudio.

Para evaluar la presencia de *Paracoccidioides brasiliensis* en el Municipio Montalbán, a diferencia de los estudios referidos por otros autores se consideró el muestreo por bloques para determinar la homogeneidad de la muestra donde de un total de 90 cultivos se obtuvo un 100% de recuperación de hongos que incluyen patógenos para el hombre, del total de las cepas obtenidas no se logró el aislamiento de *Paracoccidioides brasiliensis* a diferencia de Negroni (1971), el cual no especifica el número de cultivos realizados por muestra

A la luz de nuestros resultados, 50% de los cultivos presentó un crecimiento de *Mucor* spp. El cual es un hongo filamentoso que crece en el suelo, las plantas, frutas y hortalizas. Además de ser omnipresente en la naturaleza puede causar infecciones en el hombre, las ranas, anfibios, el ganado y los cerdos. La mayoría de las especies de *Mucor* no crecen a 37 ° C y las cepas aisladas de infecciones humanas por lo general son unas de las pocas termo-tolerantes (Hogg, 2000).

El género *Mucor* está representado por varias especies siendo las más comunes *Mucor amphibiorum*, *Mucor circinelloides*, *Mucor hiemalis*, *Mucor indicus*, siendo este último el de mayor relevancia en el hombre; perteneciente al grupo de hongos causantes de infecciones conocidas como Zigomicosis. Aunque el término *Mucormicosis* ha sido a menudo utilizado para este síndrome, *Zigomicosis* ahora es el término preferido para esta angio-enfermedad invasiva, mucocutánea y rinocerebral, así como artritis séptica, la diálisis asociada a peritonitis, infecciones renales, gastritis y las infecciones pulmonares (Frater, 2001). Siendo la cetoacidosis diabética, inmunosupresión, insuficiencia renal, quemaduras extensas, y el uso de drogas

intravenosas factores predisponentes para el desarrollo de la Zigomicosis. (Nosari 2000).

La Zigomicosis es reportada de todos los continentes predominando los casos de Suramérica, África, Europa, Asia y Norteamérica. Los esporos por inhalación pueden alojarse en los senos y pulmones del hombre y los animales; también son ingeridos con los alimentos e inician la infección en el tracto intestinal o introducirse dentro del tejido subcutáneo para iniciar una infección crónica (Tapia, 2008)

Cabe señalar el aislamiento de ciertos hongos productores de Aflatoxinas perteneciente a la familia de micotoxinas, las cuales son sustancias químicas producidas por numerosas cepas toxigénicas de hongos, principalmente *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus niger* pueden causar enfermedad y muerte, tanto en animales como en seres humanos (Williams, 2004). De éstos en el presente estudio fue aislado *Aspergillus Niger*.

Las aflatoxinas son frecuentemente aisladas de alimentos como maíz, arroz, maní y otros, que han tenido un mal manejo postcosecha (Williams, 2004) Este dato es de gran importancia dado que los suelos de la finca “*El Triunfo Del Querer*” está destinado a la siembra de Maíz. El género *Fusarium* spp presente en este estudio, produce la tóxina Zearolenona, la cual eleva los niveles de estrógeno y se ha correlacionado con cáncer del cuello uterino (Gómez, 2008). En un estudio realizado por Creppy (2002), se demostró que esta micotoxina se encontró en el tejido endometrial de 49 mujeres con una incidencia de 27 adenocarcinomas endometriales, 11 hiperplasias endometriales y 11 endometrios proliferativos normales.

La aflatoxina B1 es el factor que más obstaculiza el desarrollo fetal, con mayor capacidad de provocar o acelerar el cáncer, y es además el tipo de aflatoxina que provoca mayores cambios repentinos y permanentes en los genes, entre estos, puede

inducir una mutación específica en el codón 249 del gen supresor P53, relacionado con la génesis de tumores (Bogantes 2004)

CONCLUSIONES

- No hubo crecimiento de *Paracoccidioides brasiliensis*, aun así se determinó la presencia de hongos de interés clínicos en los suelos.
- La comprensión de los mecanismos de patogénesis y el conocimiento sobre el hábitat del Paracoccidioidomicosis sigue siendo incompleta.

RECOMENDACIONES

Es necesario desarrollar nuevas técnicas que permitan el diagnóstico rápido de la Paracoccidioidomicosis, para una iniciación temprana de la terapia antifúngica.

Se sugiere continuar realizando estudios con la finalidad de conocer con exactitud el hábitat del *Paracoccidioides brasiliensis* y así completar el eslabón fundamental de su cadena epidemiológica

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Albornoz, M. (1971). Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. *Sabouraudia*, 9, 248-253.
- Albornoz, M. (1996). *Temas de Micología Médica*. 1era Edición. Caracas, Venezuela. Editora: María de Albornoz.
- Arenas, R. (2003). *Paracoccidioidomicosis*. (p. 173-178). México: Mc Graw-Hill Interamericana.
- Bianchi, M., Robles, A., Vitale, L., Helou, S., Arechavala, A. y Negroni, R. (2000). The usefulness of blood culture in diagnosing HIV-related systemic mycoses: evaluation o a manual lyses centrifugation method. *Medical Mycology*, 38,77-80.
- Bogantes, P., Bogantes, D., y Bogantes., Sixto (2004) Aflatoxinas. *Acta méd. costarric*, 46, 174-178.
- Borregales, J., Solarte, L. y Garcia, L. (1999). Algunos aspectos epidemiológicos de la paracoccidioidomicosis en la población de Monay del estado Trujillo, Venezuela. *Kasmera*, 27, 19-28.
- Casas, G. (1994). *Micologia general: generalidades humanas, animal, vegetal, industrial, contaminantes, procesos de laboratoio*. Caracas, Venezuela: 2da Edición.
- Cardona, A. (2007). Guia de Practicas de Microbiologia Farmaceutica. Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco. Disponible: <http://www.abmcusco.org/ANAHI%20CARDONA/GUIA%20PRACTICA%20E%20MICROBIOLOGIA%20APLICADA.pdf> Citado 1/10/08
- Carmona, O. Notas Bibliograficas: Gioconda San Blas. (2003) *Sociedad. Venezolana de Microbiología*. 23, (1), 5-6.

- Cavallo, M., Díaz, A. y Jiménez, M. (2001). Estudio epidemiológico de la paracoccidioidomicosis en la comunidad de Guapa, municipio Andrés Bello, estado Lara, Venezuela. *Revista Sociedad Venezolana de Microbiología*, 22, 158-163.
- Corredor, G., Castaño, J., Peralta, L., Díez S., Arango, M., McEwen, J. y Restrepo, A. (1999). Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from the nine-banded armadillo *Dasypus novemcinctus*, in an endemic area for paracoccidioidomycosis in Colombia. *Revista Iberoamericana de Micología*, 16, 216-220.
- Creppy, E. (2002). Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters* 127: 19-28.
- Do Valle A., Aprigliano F., Moreira J., Wanke B. (1999). Clinical and endoscopic findings in the mucosae of the upper respiratory and digestive tracts in post-treatment follow-up paracoccidioidomycosis patients. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 37, (5), 407-413.
- Edafofinca., (2008) Manual para la toma de muestras de suelo EDAFOFINCA, Calle Jose Colmenas #13-27, Cagua Edo. Carabobo
- Edwards, J.(1993) *Zygomycosis.. Infectious diseases: A modern treatise of infectious processes*. Philadelphia, Harper and Row,
- Franco, L., Navjar, L., Gómez, B., Restrepo, S., Graybill, J y Restrepo, A (1998) Experimental pulmonary fibrosis induced by *Paracoccidioides brasiliensis* conidia: Measurement of local host responses. *American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 58, 424-430.
- Frater, L., Hall, G., Procop, W. (2001). *Histologic features of zygomycosis - Emphasis on perineural invasion and fungal morphology*. *Arch Pathol Lab Med*. 125:375-378.
- Gomez, J.(2008) Micotoxinas, cancer y malformaciones. Disponible: <http://encolombia.com/medicina/materialdeconsulta/Toxicologia/Micotoxinas.htm>
Citado 7/10/08

- Hernández, R., Fernández, C. y Baptista, P. (2003), Metodología de la investigación. México: Mc Graw-Hill.
- Hoog, S., Figueras M. (2000). *Atlas of Clinical Fungi*, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands. 2nd ed, vol. 1.
- Iovanitti, C., (2001), Introducción a la micología médica. Buenos Aires, Argentina: 4ta Edición
- Maldonado, B. (2001). Respuesta inmune en paracoccidioidomicosis. *Sociedad Venezolana de Microbiología*, 21(2),54-61.
- Mendoza, M., Díaz, E., Alvarado, P., Romero, E., y Bastardo, M., (2007) Aislamiento de *Sporothrix schenckii* del medio ambiente en Venezuela. *Iberoamericana de Micología*, 24, 317-319.
- Migliari, D., Sugaya, N., Mimura, M., Cucé, L., (1998). Periodontal aspects of the juvenile form of paracoccidioidomycosis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 40,1, 15-18.
- Miranda, A., Albuquerque, J., Setti, E., Venâncio da Cunha, R., De Oliveira, G., Londero, A. y Wanke, B. (2003). Paracoccidioidomicosis: Estudio clínico epidemiológico de 422 casos observados no Estado de Mato Grosso do Sul. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36, (4),455-459.
- Murray, P., Rosenthal K., Kobayashi, G. y Pfaller, M. (2003). *Microbiología Médica*. p.646-647. (4^{ta}. edición). Venezuela: Mosby.
- Naiff, R. (1988). *Encuesta epidemiológica de histoplasmosis, Paracoccidioidomicosis y Leishmanniasis mediante pruebas cutáneas*. Boletín O.P.S, 104 (1),35-49.
- Negróni, R. y Múñiz, F. (2003). Micosis Sistémicas tropicales asociadas al SIDA. *Enfermedades Emergentes*, 5(1),27-40

- Nosari, A., Oreste, P., Montillo, M., Carrafiello, J., Draisci, M., Muti, G., Molteni, A.,(2000). *Mucormycosis in hematologic malignancies: an emerging fungal infection*. *Haematologica*. 85:1068-1071.
- Ojeda, J. (1997). *Métodos de microscopía electrónica de barrido en Biología*. Santander- España: Universidad de Cantabria.
- Olivero, R., Domínguez, A., Sánchez, O., Lugo, R., Diliberti, D. y Briceño, J. (2003, Junio). *Diagnóstico de Paracoccidioidomycosis infección y enfermedad en agricultores, Manuare. Venezuela, Estado Carabobo 2001-2002*. Ponencia presentada en el IV Congreso Virtual de Micología "Hongos Patógenos en América Latina", Caracas
- Olivero, R., Dominguez, A., Sanchez, C. (2007). Paracoccidioidomycosis diagnosis during 14 years (1992-2005) at the Mycology Laboratory of Universidad de Carabobo. *Sociedad Venezolana de Microbiología*, 27(1), 349-363
- Perdomo, H. y Pérez, R. (2006). *Guía Práctica de Micología*. (1^{ra} Versión). Universidad de Carabobo, Facultad de Ciencias de la Salud, Escuela de Bioanálisis, Departamento de Microbiología, Asignatura Micología, Sede Aragua
- Pires, Z. y Fabiano, M. (2000). *Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of Paracoccidioid-omycosis*. *Iberoamericana de Micologia*, 17, 41-8
- Restrepo, A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: A puzzle still unsolved. *Sabouraudia; J. Med. Vet. Mycol*. 1985; 23: 323-334.
- Restrepo, A. (1996). *Paracoccidioidomycosis*. En, A. Restrepo, J. Robledo, V. Bedoya, M. Restrepo, D. Botero, E. Leiderman, J. Betancur, C. Gómez y L. Vélez (Eds.), *Fundamentos de Medicina: Enfermedades Infecciosas*. (5^{ta} edición, pp. 297-306). Medellín, Colombia: Corporación para Investigaciones Biológicas.
- Restrepo, A. (2003) *Paracoccidioidomycosis*. En , W. E. Dismukes, P. G. Pappas, and J. D. Sobel (ed.), *Clinical mycology*.(328-345) New York: Oxford University Press.

- Restrepo, A., Aristizabal, B., González, A., Jiménez, M, Gómez, B., McEwen, J. y Cano, L. (2004). *Características de las conidias de Paracoccidioides brasiliensis*. Medellín: Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB).
- Reviákina, V., Panizo, M., Dolande, M., y Maldonado, B. (2002). Micosis profundas sistémicas: Casuística del Departamento de Micología del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" durante cinco años (1997-2001). *Revista Sociedad Venezolana de Microbiología*, 22(2), 164-8.
- Rezusta, A., Gil, J., Rubio, M. y Revillo, M. (2006). Micosis Importadas. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología *en línea*. Disponible: http://www.seimc.org/control/revi_Mico/Micoimpor.htm. (Consulta: 2006, Marzo 23).
- Rippon, J. (1990). *“Tratado de Micología Medica”*. 3ª Edición, México: Interamericana
- San Blas, G. (1993). *Paracoccidioides brasiliensis*, agente causal de una micosis sistémica de alta prevalencia en América Latina. *Gaceta médica. Caracas*, 3, 218-226.
- San Blas, G., Niño-Vega, G. y Iturriaga, T. (2002). *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. *Medical Mycology*, 40, 225-242
- Scully, C., De Almeida, O. (1992). Orofacial manifestations of the systemic mycoses. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 21 (27), 289-94.
- Serrano, J. y Novoa, D. (2001) Review of human mycoses in South América. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 21(2), 67-77.
- Serrano, J., Sandoval, A., Ramirez, N. y Ventosa, A. (2003) Método simplificado para el estudio morfológico por microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido de actinomicetos halófilos. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 23(1), 42-46.

Tapia, C. (2008).Zigomicosis. Programa de Micología y Microbiología. Universidad de Chile. Disponible en: https://www.u-cursos.cl/medicina/2008/2/TM1MICR23/1/material_alumnos/objeto/20206.

Citado 3/10/08

Tejos, L., Pérez, R., Cavallera, E., Oliver, M. (2003). Paracoccidioidomicosis: Presentación inusual. *Dermatología Venezolana*, 41(3),19-22.

Vidal, M. (1995). Paracoccidioides brasiliensis, a mycologic and immunochemical study of a sample isolated from an Armadillo (*Dasipun novencincius*). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 37(1), 43-49.

Williams J, Phillips D, Jolly E, Stiles K, Jolly M, Aggarwal D.(2004) Aflatoxinas humanas en países en desarrollo: revisión de toxicología, exposición, consecuencias potenciales a la salud, e intervenciones. *American Journal of Clinical Nutrition*, 80 (1), 1106-22.

ANEXOS

TOMA DE MUESTRA



TMA-1

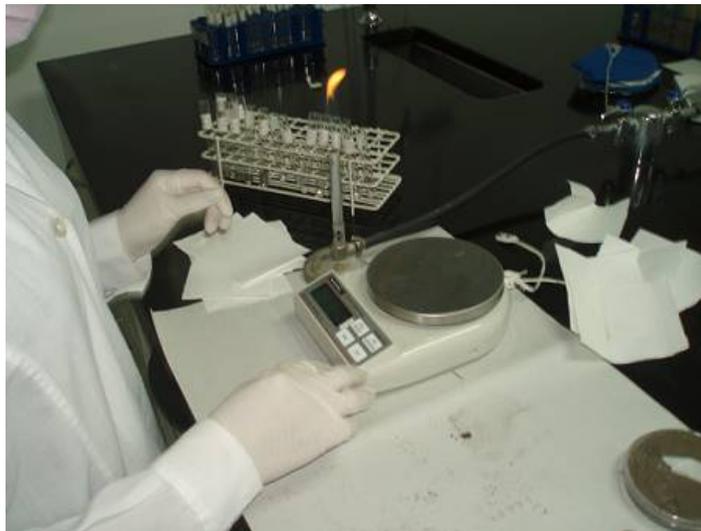


TMA-2



TMA-3

PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS



TMA-1



TMA-2



TMA-3

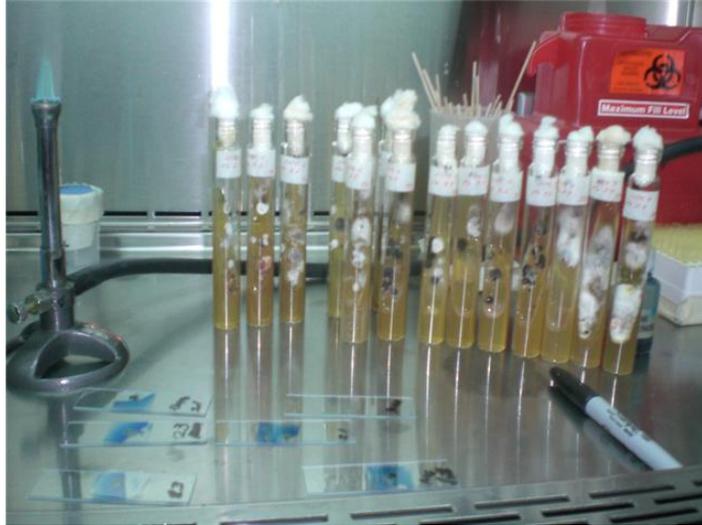
IDENTIFICACION DE LAS COLONIAS



TMA-1



TMA-2



TMA-3



TMA-4