



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

INVESTIGACIÓN DE TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS Y
MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN DE HONGOS CAUSANTES DE
INFECCIÓN.

CABEZAS GERMAN LOURDES VIVIANA
BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

MACHALA
2022



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

INVESTIGACIÓN DE TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS Y
MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN DE HONGOS
CAUSANTES DE INFECCIÓN.

CABEZAS GERMAN LOURDES VIVIANA
BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

MACHALA
2022



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

EXAMEN COMPLEXIVO

INVESTIGACIÓN DE TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS Y MOLECULARES PARA LA
DETECCIÓN DE HONGOS CAUSANTES DE INFECCIÓN.

CABEZAS GERMAN LOURDES VIVIANA
BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

SILVERIO CALDERON CARMEN ELIZABETH

MACHALA, 14 DE FEBRERO DE 2022

MACHALA
14 de febrero de 2022

Investigación de técnicas microbiológicas y moleculares para la detección de hongos causantes de infección.

por Lourdes Viviana Cabezas German

Fecha de entrega: 05-feb-2022 07:42p.m. (UTC-0500)

Identificador de la entrega: 1755661304

Nombre del archivo: eculares_para_la_detecci_n_de_hongos_causantes_de_infecci_n..txt (12.12K)

Total de palabras: 1779

Total de caracteres: 10153

CLÁUSULA DE CESIÓN DE DERECHO DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO DIGITAL INSTITUCIONAL

La que suscribe, CABEZAS GERMAN LOURDES VIVIANA, en calidad de autora del siguiente trabajo escrito titulado Investigación de técnicas microbiológicas y moleculares para la detección de hongos causantes de infección., otorga a la Universidad Técnica de Machala, de forma gratuita y no exclusiva, los derechos de reproducción, distribución y comunicación pública de la obra, que constituye un trabajo de autoría propia, sobre la cual tiene potestad para otorgar los derechos contenidos en esta licencia.

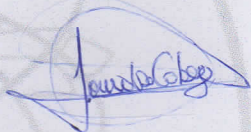
La autora declara que el contenido que se publicará es de carácter académico y se enmarca en las disposiciones definidas por la Universidad Técnica de Machala.

Se autoriza a transformar la obra, únicamente cuando sea necesario, y a realizar las adaptaciones pertinentes para permitir su preservación, distribución y publicación en el Repositorio Digital Institucional de la Universidad Técnica de Machala.

La autora como garante de la autoría de la obra y en relación a la misma, declara que la universidad se encuentra libre de todo tipo de responsabilidad sobre el contenido de la obra y que asume la responsabilidad frente a cualquier reclamo o demanda por parte de terceros de manera exclusiva.

Aceptando esta licencia, se cede a la Universidad Técnica de Machala el derecho exclusivo de archivar, reproducir, convertir, comunicar y/o distribuir la obra mundialmente en formato electrónico y digital a través de su Repositorio Digital Institucional, siempre y cuando no se lo haga para obtener beneficio económico.

Machala, 14 de febrero de 2022



CABEZAS GERMAN LOURDES VIVIANA
0705472702

RESUMEN

Hace 300 millones de años, aparecieron las primeras clases de hongos, pero a medida a que han ido mutando, han surgido varias especies, unas más patógenas que otras, estas se aprovechan de las personas inmunodeprimidas y aquellas que no poseen buena higiene, sin atención médica y sobre todo en hacinamiento. Ecuador se encuentra en una zona templada y fría que facilita el crecimiento y la adaptación de estos microorganismos como: mohos y levaduras, causando descamación, picazón o erupciones, conocidas como dermatofitosis. El presente trabajo se basa en la investigación del hongo "*ASPERGILLUS fumigatus*" causante de infecciones en el hombre, mediante las técnicas microbiológicas y moleculares se identifica este hongo que está causando morbimortalidad en los pacientes. Las técnicas fiables que nos permite identificar una fungemia son: hemocultivos, tinción de Gram, Espectrometría de masas, Inmunoensayo de ELISA, todas estas en un tiempo máximo de 3 días, ahorrando tiempo y dinero, finalmente la replicación de ADN, necesita más de 3 días y una inversión económica adicional para la identificación del microorganismo.

PALABRAS CLAVE

ASPERGILLUS FUMIGATUS, ASPERGILLOSIS, DERMATOFITOSIS, FUNGEMIA, GALACTOMANOS.

ABSTRACT

The first classes of fungi appeared 300 million years ago, but as they have mutated, several species have emerged, some more pathogenic than others, they take advantage of immunosuppressed people and those who do not have good hygiene, without medical attention and especially in overcrowding. Ecuador is located in a temperate and cold zone that facilitates the growth and adaptation of these microorganisms such as: molds and yeasts, causing peeling, itching or rashes, known as dermatophytosis. The present work is based on the investigation of the fungus "*ASPERGILLUS fumigatus*" that causes infections in man, through microbiological and molecular techniques, this fungus that is causing morbidity and mortality in patients is identified. The reliable techniques that allow us to identify a fungemia are: blood cultures, gram stain, mass spectrometry, ELISA immunoassay, all of these in a maximum time of 3 days saving time and money, finally DNA replication, needs more than 3 days and an additional economic investment for the identification of the microorganism.

KEYWORDS

ASPERGILLUS fumigatus, ASPERGILLOSIS, DERMATOPHITOSIS, FUNGEMIA, GALACTOMANANS

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	3
DESARROLLO	6
1. LABORATORIO CLÍNICO	6
2. HONGOS	6
2.1 Hongos primarios	6
2.2 Hongos oportunistas	6
2.2.1 ASPERGILLUS fumigatus	6
3. INFECCIONES PRODUCIDAS POR HONGOS	6
3.1 FUNGEMIA	6
3.1.1 Levaduras	7
3.1.2 Mohos	7
4. INFECCIONES OCASIONADAS POR HONGOS OPORTUNISTAS	7
5. PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS	7
5.1 HEMOCULTIVOS	7
5.1.1 DETECCIÓN DE LEVADURAS	8
5.1.2 FUNGIGRAMA	8
5.1.3 TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS	8
6. SEROLOGÍA EN HONGOS	8
6.1 Detección de anticuerpos para aspergillus fumigatus	8
6.2 Detección de antígenos	8
7. PRUEBAS MOLECULARES	8
7.1 Espectrometría de masas	8
7.2 Amplificación de ácidos nucleicos	8
8. MATERIALES Y MÉTODOS	9
9. PREGUNTA A RESOLVER:	9
10. CONCLUSIÓN	10
11. BIBLIOGRAFÍA	11

INTRODUCCIÓN

Los microorganismos de todo tipo se encuentran distribuidos alrededor de la tierra, unos en mayor proporción que otros, aproximadamente hace 300 millones de años aparecieron las primeras clases de hongos, debido a sus mutaciones o cambios en su ADN se han originado distintas clases de especies de hongos, pero cabe destacar que las especies micóticas altamente patógenas han aumentado de manera considerable, siendo estas una de las principales especies en causar infecciones en humanos, de manera especial en aquellos pacientes que tienen su sistema inmunológico comprometido^{1,2,3}.

En los últimos tiempos las infecciones causadas por hongos se consideran un gran problema para la salud humana, debido a que a nivel mundial, alrededor de 300 millones de ciudadanos en diferentes rangos de edades sufren o han sufrido alguna vez una infección causada por hongos, donde solo el 1'660.000, es decir del 10 al 30% de las personas mueren cada año por una fungemia, teniendo en cuenta cada vez más la importancia a la morbilidad y mortalidad causada por éstos^{4,2,5,6}.

En Ecuador, debido a que posee una franja tropical con zonas templadas y frías, favorecen el crecimiento de los agentes micóticos, ya que existen muy pocos datos sobre las enfermedades causadas por hongos, debido a que nuestro país no cuenta con muchos laboratorios micológicos, la consulta frecuente al dermatólogo es por causa de la dermatofitosis, que es una infección que afecta la piel, ocasionándole descamación, picazón o erupciones también llamadas prurito, afectando así a gran parte de la población ecuatoriana^{7,2,5}.

Se debe enfatizar que la dermatofitosis es frecuente y variable a nivel mundial, debido a que esta se sostiene de varios factores ambientales y sobre los agentes presentes en los ecosistemas, también se debe considerar que la venta de antimicóticos en las farmacias facilitan la resistencia antimicótica, en nuestro país no existen estudios determinados a una población para la determinación de las incidencias y prevalencias de la dermatofitosis o micosis, por eso se habla de manera general, en México la dermatofitosis se encuentra dentro de las enfermedades olvidadas o frecuentemente llamadas desatendidas, afectan de forma común a las personas que se encuentran en pobreza y vulnerabilidad, la población que se encuentran con bajos recursos económicos no poseen un buen acceso a los servicios de salud, higiene y generalmente viven en hacinamiento^{8,9}.

El presente trabajo se basa en la investigación del hongo "*ASPERGILLUS fumigatus*" causante de infecciones en el hombre, conocimiento de las técnicas microbiológicas y moleculares que poseen mayor fiabilidad para la determinación de hongos que puedan llegar a ser causa de mortalidad.

OBJETIVOS:

OBJETIVO GENERAL

- a) Investigar el hongo *ASPERGILLUS fumigatus* causante de infecciones, mediante revisión bibliográfica para la aplicación de técnicas microbiológicas y moleculares.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar las diferencias entre mohos y levaduras causantes de infección.
- b) Conocer las técnicas microbiológicas y moleculares capaces de determinar fungemias.
- c) Investigar la fiabilidad de las técnicas microbiológicas y moleculares para la determinación de hongos.

DESARROLLO

1. LABORATORIO CLÍNICO

El laboratorio clínico posee áreas como: hematología, uroanálisis, química clínica y microbiología, esta última área cumple un papel muy importante para la identificación de una infección presente en el cuerpo humano, que puede ser causada por viremia, bacteriemia o fungemia, lo realizamos por medio de los diagnósticos microbiológicos y moleculares a partir de muestras o fluidos biológicos¹⁰.

En estos tiempos nos encontramos con equipos de alta automatización dentro del laboratorio clínico y a su vez con diversidad de técnicas metodológicas que permiten que el diagnóstico microbiológico sea de más precisión y rapidez, otorgando resultados confiables¹¹.

2. HONGOS

Estos organismos son parte fundamental en la subsistencia de la biosfera, debido a que ayudan a descomponer la materia orgánica, están constituidos por células eucariotas, pueden ser unicelular o multicelulares, no pueden constituir tejidos pero pueden adecuarse a diferentes ambientes, agua, tierra o aire, su forma de reproducción puede ser sexuada o asexuada^{1,3}.

2.1 Hongos primarios

Son esporas que pueden ocasionar una infección al ser inhaladas, que desarrollaría la neumonía o lesiones pulmonares¹².

2.2 Hongos oportunistas

Estos microorganismos pueden ocasionar una infección en el huésped, siempre y cuando éste proporcione los nutrientes fundamentales y condiciones ambientales para su reproducción y su crecimiento, es decir en aquellas personas que poseen un sistema inmunológico bajo^{2,3}.

2.2.1 ASPERGILLUS fumigatus

Es un hongo que posee relación con la "Aspergilosis pulmonar", debido a que sus conidios miden de 2 a 6 μm , esto les facilita el paso por epitelio ciliar y así llegar hasta los alvéolos a ocasionar la enfermedad.

3. INFECCIONES PRODUCIDAS POR HONGOS

3.1 FUNGEMIA

Esta infección es producida por hongos en la sangre, su origen es frecuente en la infección de catéteres, su aumento se da en las personas que poseen un sistema inmunológico deprimido, a estas se las da a conocer como infecciones oportunistas^{6,13}.

3.1.1 Levaduras

Son Organismos encapsulados, no producen hifas y pueden ser consideradas por la constitución de artroconidios, apresorios y conidiación meristemática, pueden producir infecciones de gravedad que desencadenan una elevada mortalidad¹.

3.1.2 Mohos

También llamados hongos filamentosos, poseen un tallo llamado soma vegetal que es similar a las plantas, son filamentosos y microscópicos, menos alargados y ramificados constituídos la mayoría por quitina¹⁴.

4. INFECCIONES OCASIONADAS POR HONGOS OPORTUNISTAS

- Aspergilosis
- Candidiasis
- Criptococosis
- Scedosporiosis
- Mucormicosis
- Peniciliosis
- Fusariosis

5. PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS

5.1 HEMOCULTIVOS

La mayoría de los cultivos está basada en la lisis y en la eliminación de los componentes celulares, buscando aislar y concentrar microorganismos¹⁵.

- **Lisis-centrifugación:** en este método la sangre se mezcla con los componentes: lisante, polipropilenglicol, sps y edta, consiguiendo separar los microorganismos de los compuestos sanguíneos¹⁸.
- **Lisis-filtración:** después de la lisis de las células de la sangre se filtra para retener los microorganismos y se siembra en varios medios de cultivo¹⁸.
- **Medio bifásico:** este medio posee una fase sólida y una líquida, al invertirlo se puede realizar un subcultivo, es un buen método para determinar bacteriemias y fungemias en corto tiempo¹⁸.
- **Agar glucosado de saboraud:** este medio de cultivo permite aislar, identificar y conservar hongos y levaduras¹⁹.
- **Agar mycosel:** es un medio selectivo, específico para hongos patógenos y dermatofitos²⁰
- **Agar patata dextrosa:** es un medio que ayuda a identificar levaduras y la morfología de los hongos que poseen micelios²¹

5.1.1 DETECCIÓN DE LEVADURAS

Se realiza la siembra en varios medios de cultivos que se basan en la presencia de sustratos para una o varias enzimas para la identificación rápida de levaduras¹⁵.

5.1.2 FUNGIGRAMA

Su importancia se basa en conocer la actividad de los medicamentos antifúngicos, determinando cuál es el más sensible para iniciar la actividad terapéutica¹⁷.

5.1.3 TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS

- **Tinción de KOH 20%:** nos ayudará a encontrar las levaduras intracelulares³.
- **Tinción con blanco de calcoflúor:** a través de esta tinción evidenciamos las levaduras como los hongos con filamentos¹⁸.
- **Tinción de lactofenol:** es una tinción simple para identificar hongos miceliales como los dermatofitos¹⁸.

6. SEROLOGÍA EN HONGOS

Permite la detección de antígenos o anticuerpos fúngicos⁴.

6.1 Detección de anticuerpos para aspergillus fumigatus

- **Inmunoensayo enzimático (ELISA):** se utiliza para detectar anticuerpos o 6a que posee una sensibilidad de 89% y una especificidad del 98%⁴.

6.2 Detección de antígenos

Se las utiliza en el diagnóstico de micosis invasivas, generalmente se la detecta en el líquido cefalorraquídeo⁴.

- **ELISA para Galactomanos:** debido a que el galactomanano forma parte del hongo ASPERGILLUS mediante esta técnica es de fácil y rápida identificación⁴.

7. PRUEBAS MOLECULARES

7.1 Espectrometría de masas

Usando el equipo MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-of-Flight), permite identificar una pequeña huella peptídica o proteínas ribosomales, creando un espectro de masas de una especie específica y así poder reconocerla, cabe destacar que es un proceso confiable y preciso y rápido para poder detectar especies fúngicas⁴.

7.2 Amplificación de ácidos nucleicos: se realiza mediante la amplificación de secuencias de ADN de los diferentes fragmentos de ADN por la reacción de la cadena de la polimerasa y la PCR anidada⁴.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

OBJETO DE ESTUDIO: Hongos (*ASPERGILLUS fumigatus*)

TIPO DE ESTUDIO: Descriptivo

MÉTODO: El presente estudio es de tipo descriptivo, puesto a que nos ayudará a comparar la fiabilidad de las pruebas microbiológicas y moleculares para la detección de hongos, de una manera rápida y precisa.

MATERIAL DE ESTUDIO: Artículos científicos, análisis comparativo.

Reactivo práctico: En el estudio realizado en Perú, por el Instituto de Medicina Tropical “Daniel Carrión” formaron parte 123 pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica, 99 varones y 24 mujeres, el tipo de muestra fue esputo, siendo *ASPERGILLUS fumigatus* más frecuente en 111 pacientes con 90.3%, *ASPERGILLUS niger* en 9 con un 7.3%, *ASPERGILLUS terreus* en 2 con 1.6% y *ASPERGILLUS spp* en 8 con un 6.5%¹⁹.

A las muestras se les realizó tinción de Gram, un cultivo en Agar Saboraud que es propio para hongos, incubándolos de 32° a 37° Celsius, a las 24 horas ya teníamos crecimiento, se identificaron sus colonias mediante el microscopio y la espectrometría de masas y fungigrama, pero para la identificación del *ASPERGILLUS* de las diferentes clases, se lo determinó mediante muestra sérica, por método de inmunodifusión doble de Ouchterlony que determina antígenos y anticuerpos en menos tiempo¹⁹.

9. PREGUNTA A RESOLVER:

¿Qué técnicas pueden emplearse en el laboratorio clínico para determinar hongos de forma fiable?

Las técnicas para determinar hongos de manera fiable que se realizaron en este estudio fueron: hemocultivo, tinción de gram para identificar las colonias, Espectrometría de masas para identificar la Especie y el Inmunoensayo de ELISA para determinar cuáles eran las clases de *Aspergillus* presentes en los pacientes, esto demostró que su proceso demoró 3 días^{14,20}.

Las pruebas de PCR o amplificación de fragmentos de ADN también es una técnica fiable para la determinación de hongos, aunque está técnica es muy poco usada debido a que es muy costosa y tiene un proceso largo.

10. CONCLUSIÓN

- a) Los mohos son hongos filamentosos similares a las plantas, constituidos por quitina y las levaduras son encapsuladas que no engendran hifas que son constituidos por artroconidios, apresorios y conidiación causando enfermedades que conllevan a la muerte.
- b) Las técnicas que nos ayudan a determinar fungemias son: cultivos, tinción de Gram, pruebas inmunológicas o de inmunoensayo, pruebas serológicas y las pruebas de ADN, cada una posee un período de tiempo para su determinación, siendo la más extensa de todas la prueba de ADN .
- c) Todas las técnicas que se encuentran en el desarrollo de este trabajo práctico cuentan con fiabilidad al momento de determinar cuál prueba usar, pero cabe destacar que para la detección de *ASPERGILLUS fumigatus* es mejor el método de Elisa con una especificidad del 98%, debido a que así podremos determinar si el paciente posee o está próximo a sufrir una enfermedad causada por este hongo, claro que si medimos los factores tiempo y dinero, obtendremos una respuesta más rápida y precisa mediante las pruebas inmunológicas o de inmunoensayo, como las técnicas de ELISA O MICROELISA.

11. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Guarro, J. TAXONOMÍA Y BIOLOGÍA DE LOS HONGOS CAUSANTES DE INFECCIÓN EN HUMANOS. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **2012**, 30 (1), 33-39. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.09.006>.
- (2) Aguinaga Chalacán, M. E. INFECCIONES FÚNGICAS OPORTUNISTAS EN PACIENTES DEL HOSPITAL CARLOS ANDRADE MARÍN EN EL PERIODO 2015-2017. *J. Chem. Inf. Model.* **2018**, 53 (9), 1-56.
- (3) Gómez, F. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS HONGOS E INFECCIONES SISTÉMICAS Y OPORTUNISTAS DE LAS MICOSIS TROPICALES. *Micología* **2015**, 5, 1–20.
- (4) Feria, E. F. Diagnóstico Micológico Por Técnicas No Convencionales En El Siglo XXI Mycological Diagnosis by Non-Conventional Techniques in the 21 St Century. *Rev. Cubana Med. Trop.* **2020**, 72 (3), 1–24.
- (5) Zurita, J. Infecciones Micóticas: Esas Enfermedades Relegadas de La Salud Pública. *Bionatura* **2017**, 2 (3), 344–347. <https://doi.org/10.21931/rb/2017.02.03.2>.
- (6) Guna Serrano, M. R.; Larrosa Escartín, N.; Marín Arriaza, M.; Rodríguez Díaz, J. C. Microbiological Diagnosis of Bacteraemia and Fungaemia: Blood Cultures and Molecular Methods. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **2019**, 37 (5), 335–340. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2018.03.005>.
- (7) Albán Jácome, G. E.; Fernández Andreu, C. M.; Illnait Zaragozaí, M. Dermatofitosis En Ecuador. *Rev. científica Digit.* **2021**, 5 (1), 1–8.
- (8) Albán Jácome, G. E.; Fernández Andreu, C. M.; Illnait Zaragozaí, M. Dermatofitosis En Ecuador. *Rev. científica Digit.* **2021**, 5 (1).
- (9) Capitis, T. Tiña de La Cabeza y Micosis Podales En Niños y Adolescentes En Situación de Vulnerabilidad. **2019**, 17 (3), 172–178.
- (10) Marco, F. MÉTODOS MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO DE SEPTICEMIA. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **2017**, 35 (9), 586–592. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2017.03.002>.
- (11) Sánchez-Romero, M. I.; García-Lechuz Moya, J. M.; González López, J. J.; Orta Mira, N. RECOGIDA, TRANSPORTE Y PROCESAMIENTO GENERAL DE LAS MUESTRAS EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **2019**, 37 (2), 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2017.12.002>.

- (12) Corp., M. S. & D. Generalidades sobre las micosis - Enfermedades infecciosas - Manual MSD versión para profesionales <https://www.msmanuals.com/es/professional/enfermedades-infecciosas/hongos/generalidades-sobre-las-micosis> (accessed Jan 25, **2022**).
- (13) Salgüero Fernández, I.; Nájera Botello, L.; Orden Martínez, B.; Roustan Gullón, G. Disseminated Fungemia by *Saprochaete Clavata*. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **2019**, *37* (4), 283–284. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2018.05.003>.
- (14) Identificación Molecular de Hongos Filamentosos y Su Potencial Biotecnológico *. **2022**, *20* (1), 194–206.
- (15) Siller-Ruiz, M.; Hernández-Egido, S.; Sánchez-Juanes, F.; González-Buitrago, J. M.; Muñoz-Bellido, J. L. Métodos Rápidos de Identificación de Bacterias y Hongos. Espectrometría de Masas MALDI-TOF, Medios Cromogénicos. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **2017**, *35* (5), 303–313. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2016.12.010>.
- (16) Rodríguez, A. M.; Santamaría Pérez, C. Hemocultivos. *Nueva Enferm.* **1980**, No. 9, 19–21. <https://doi.org/10.11565/arsmed.v26i1.1265>.
- (17) Castro Méndez, C.; García Sánchez, E.; Martín-Mazuelos, E. ACTUALIZACIÓN DE LOS MÉTODOS DE ESTUDIO DE SENSIBILIDAD IN VITRO A LOS ANTIFÚNGICOS. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **2019**, *37* (Supl 1), 32–39. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(19\)30180-6](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(19)30180-6).
- (18) Meléndez, R. C. G.; Sánchez, M. O. *Las Tinciones Básicas En El Laboratorio de Microbiología : Un Enfoque Gráfico*; **2020**.
- (19) Molinos-Castro, S.; Pesqueira-Fontán, P. M.; Rodríguez-Fernández, S.; Rodríguez-Framil, M.; Barbeito-Castiñeiras, G.; Gayol-Fernández, M. C.; Varela-García, P. M.; Padín-Paz, E. M.; Rial-Rama, P.; Pérez del Molino-Bernal, M. L.; García-Suárez, F.; Díaz-Peromingo, J. A. FACTORES CLÍNICOS ASOCIADOS A ENFERMEDAD PULMONAR POR ASPERGILLUS SPP. EN PACIENTES CON ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **2020**, *38* (1), 4–10. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2019.06.007>.
- (20) Béjar, V.; Villanueva, F.; León, S. R.; Guevara-Granados, J. M.; Uribe, A.; Vergaray, G.; Cuadra, A.; Sabogal, I. Identificación Molecular de *Aspergillus Fumigatus* Aislados de Pacientes Con Aspergilosis Invasiva. *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Publica* **2019**, *36* (1), 81. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2019.361.3403>.