

27
2 Gen

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

" IDENTIFICACION, ESTUDIO HISTOPATOLOGI -
CO Y DE PATOGENICIDAD EXPERIMENTAL -
DE DOS CEPAS DE MADUROMICOSIS "

T E S I S

Sustentante:

Díaz González Escamilla Isabel Marina
- Químico Farmacéutico Biólogo -

1 9 8 5



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

CONTENIDO	PAGINAS
Introducción	4 - 5
Objetivos	6
Generalidades	
<u>Capítulo I</u>	
Descripción del Eumicetoma	7 - 13
<u>Capítulo II</u>	
Agentes Etiológicos del Eumicetoma - Clasificación	14 - 27
<u>Capítulo III</u>	
Género Madurella y Criterios de Clasificación	28 - 54
<u>Capítulo IV</u>	
Parte Práctica	
Material y Métodos	55 - 76
Resultados	77 - 106
Conclusiones	107
Bibliografía	108 - 118

* * * *

* * *

* *

*

I N T R O D U C C I O N

De las micosis subcutáneas observadas en nuestro país, el micetoma ocupa el primer lugar por su frecuencia, afecta preferentemente el pie y más raramente extremidades superiores, tórax u otras partes del cuerpo. Ahora se sabe que el micetoma es un padecimiento esencialmente endémico en las regiones vecinas al Trópico de Cáncer, pero puede existir fuera de esta área de preferencia, éste trópico atraviesa México por su parte media hacia el norte, lo que explica que en esta nación los micetomas sean más abundantes, aunque se les ha encontrado en los demás países del continente.

Pinoy en 1915, destacó las diferencias entre los dos tipos de micetoma: los producidos por actinomicetos (bacterias) y los causados por hongos verdaderos. En América predominan los actinomicetomas sobre los eumicitomas, éstos últimos parece que sólo son más frecuentes en Argentina y en cambio en México son excepcionales.

La poca frecuencia de los micetomas causados por hongos verdaderos nos dá un capítulo totalmente obscuro en la mi co lo g í a m é d i c a , don de no se tiene información adecuada de las formas parasitarias y existe gran discrepancia en la literatura entre las características y clasificación de los distintos agentes etiológicos; hay criterios para dividir a los eumicetomas por el color de los granos que producen los diferentes hongos, dividiéndose en dos grupos, los que dan formas parasitarias blancas y negras, siendo éstos últimos los de mayor confusión.

En éste trabajo se hará un estudio determinativo de dos agentes de eumicetomas de granos negros, para tratar de estudiar sus diversas propiedades morfológicas y bioquímicas, su patogenicidad y la sensibilidad que tengan los agentes etiológicos a diversos fármacos "in vitro", ya que las posibilidades terapéuticas hasta nuestros días son propiamente nulas. Conjugando todos los resultados obtenidos en este estudio, se tratará de llegar a una clasificación de los agentes etiológicos y es por eso que este trabajo puede ser el punto de partida para otras investigaciones que tiendan a esclarecer el tan confuso capítulo de los eumicetomas.

O B J E T I V O S

- 1) A partir de los granos obtenidos de dos pacientes llegar al aislamiento de ambos agentes etiológicos.
- 2) Mediante diferentes técnicas histopatológicas, estudiar la estructura y afinidad tintorial de los granos.
- 3) Determinar las propiedades morfológicas, fisiológicas y bioquímicas de los dos agentes etiológicos.
- 4) Determinar la patogenicidad de ambas cepas en animales (ratones blancos) en condiciones favorables para la implantación del hongo, por inoculación en el cojinete plantar.
- 5) Determinar la sensibilidad " in vitro " de las dos cepas frente a diferentes fármacos.
- 6) Conforme a los resultados obtenidos en las investigaciones anteriores, llegar a la clasificación de los - - agentes etiológicos.

GENERALIDADES

CAPITULO I
DESCRIPCION DEL EUMICETOMA

*

C A P I T U L O I

DESCRIPCION DEL EUMICETOMA.

DEFINICION DEL MICETOMA.-

Es un padecimiento crónico, inflamatorio, indoloro, supurativo, caracterizado por deformación mas o menos manifiesta de la región afectada, con tendencia a la fistulización espontánea única o múltiple y la presencia en las lesiones de un líquido seropurulento que contiene los "granos", es decir, las microcolonias que el agente etiológico (actinomiceto u hongo) produce como forma parasitaria, los cuales pueden ser visibles a simple vista o por examen microscópico y cuya presencia establece el diagnóstico (5, 19, 20, 21, 28, 31, 34, 45, 48, 49, 51, 61, 68, 70).

Se caracteriza por:

- a) Inflamación
- b) Trayectos fistulosos
- c) Granos en el pus.

Por su etiología el micetoma se clasifica en actinomicético y eumicético. Del primero se han mencionado 6 especies de actinomicetos (bacterias) causantes y del segundo, aproximadamente unas 16 especies de hongos (32, 51, 55, 68)

El tamaño, color, forma, textura y estructura del grano así como las dimensiones de las hifas varían con la especie causante, el color de los granos puede ser negro o amarillo en el caso del eumicetoma.

Vistos al microscopio, revelan que están formados por cúmulos de hifas gruesas, septadas con paredes bien definidas y algunos con masas de clamidosporas (10, 14, 16, 27, 34, 40, 50, 57, 59, 65, 66, 69).

El micetoma asienta con más frecuencia en las extremidades inferiores, preferentemente el pie, pero puede aparecer en cualquier otra región invadiendo los huesos, ocasionalmente el pulmón y otras vísceras.

SINONIMOS: (11,27,39,68).

- Pie de Madura
- Maduromicosis
- Actinomicosis
- Maduromicetoma
- Eumicetoma.

HISTORIA DEL EUMICETOMA. -

Alrededor de 1840 los investigadores de la India observaron que en ese país existía una peculiar enfermedad de los pies en 1842, Gill médico de la ciudad de Madura, informa ciertas características de la enfermedad como son marcadas de formaciones y fístulas que secretaban líquidos fétidos y con marcada destrucción de las articulaciones, cartílagos y ligamentos (34, 35, 44).

Colebrook afirmó en 1846, que ésta enfermedad era designada en algunas partes de la India con el nombre de "Pie de Madura", nombre que ha quedado arraigado en la literatura médica. (13, 16, 34).

En 1858, Rustomji hizo notar la presencia en el pus de granos visibles sin necesidad de ningún aumento de color amarillo ó negro (34, 35, 51).

Vandyke Carter en 1860 y 1861, reconoció que esos granos estaban formados por hongos e introdujo la palabra "Micetoma" para designar esas tumoraciones inflamatorias micóticas de los pies, en las cuales los hongos causantes producían granos evidentes a simple vista. (34,35,44,51,58).

En 1902, Laveran observando el material obtenido de un caso de Micetoma de granos negros estudiado por Brumpt y colaboradores en Djibuti, reconoció que el hongo presente era diferente del Streptomyces madurae y lo bautizó con el nombre de Streptothrix mycetomi (13, 16, 35).

Brumpt en 1905, estudiando ese mismo material, consideró que el hongo en cuestión no era un *Streptothrix*, sino un -- Hyphomycete de filamentos gruesos y tabicados, para el cual creó el género *Madurella* y la especie *mycetomi* (Laveran -- 1902); desgraciadamente, el conocimiento de la especie nueva y del género fueron incompletos, puesto que únicamente se crearon basándose en las características parasitarias y no en las saprofiticas porque no se obtuvieron cultivos. Con el mismo criterio Brumpt creó la especie *Madurella bovoi* de un caso observado por P. Bovo en Génova (Italia), tratándose igualmente de un micetoma con granos negros y filamentos macrosifonados (34, 35).

Es muy probable que el primer caso por *Madurella mycetomi* del cual se obtuvieron cultivos, haya sido observado en los - Estados Unidos (Massachussets) por Wricht en 1898, éste autor describe el desarrollo de colonias vellosas con pigmento difusible pardo, sin micelio de fructificación, cuyos caracteres corresponden a la especie mencionada (35, 44).

El primer cultivo clasificado como *Madurella mycetomi*, fué el obtenido por Brault en 1911, Pinoy asimiló igualmente, al género *Madurella*, la *Oospora tozeuri* cultivada del material recogido de un caso de micetoma observado por Nicolle y Pinoy en 1908 en el oasis de Tozeur. El estudio de éstos cultivos dió la oportunidad a Pinoy de modificar la definición - del género *Madurella* y según Vuillmenin la especie *Madurella mycetomi* correspondería, en realidad, al cultivo obtenido por Brault (35, 44).

En el año de 1919 se describieron tres nuevas especies de Madurella correspondientes a observaciones efectuadas en regiones muy apartadas, en Africa y Brasil: Madurella tabarkae (Blanc y Brun); Madurella oswaldoi (P.P.Horta) y Madurella ramiroi (Pirajá da Silva). La primera recibió su nombre de la región de Tabarka en Túnez, la segunda - en homenaje de Oswaldo Cruz, insigne investigador brasileño que descubrió el primer caso de micetoma de granos - negros en Acre (Brasil) y la tercera especie fué bautizada así por Pirajá da Silva en Homenaje al profesor de clínica médica de Bahía Cons. Ramio Alfonso Monteiro (34, - 35, 51).

Chattergee G.C. obtuvo cultivos sembrando el material obtenido de un paciente con micetoma del pie asistido en el Medical College Hospital de Calcuta (India). Las características del hongo en la vida parasitaria y en la saprofitica (cultivos), parecen corresponder a los de una Madurella. - (35, 58).

En 1927 Gammel describió dos nuevas especies: Madurella americana y Madurella ikedae, obtenidas de casos norteamericanos; dos años después, Gastaminza creó la especie - Madurella rifanum que tal vez no pueda ser considerada como una especie válida puesto que éste autor no cultivó el hongo. (35, 58).

En 1935 G.W. Dodge creó la nueva combinación de Madurella algeris para el hongo cultivado por Braut y Masselot - en 1911 que anteriormente había sido clasificado por Pinoy y Vuillemin como Madurella mycetomi (35,58)

En 1938 Hanan y Zuret bautizaron con el nombre de Madurella lackawanna al hongo obtenido de un caso de micetoma observado en un hombre nacido en Delhi (India), pero residente en los Estados Unidos. Esta especie se caracterizó por su desarrollo pobre en los medios de cultivo, necesitando ciertos factores de crecimiento que se encuentran en el hígado (35).

En 1949 debido a la imposibilidad de identificar a una cepa Sudamericana, con las anteriores descritas se crea otra especie que es Madurella grisea (Mackinnon, Ferrada, Montemayor). (13, 16, 25, 34, 35, 44, 51, 58).

HABITAT DE LOS AGENTES DEL EUMICETOMA

Se trata de hongos que viven seproffticamente en el suelo y - frecuentemente sobre restos vegetales; espinas de acacias (acacia arábica, acacia senegal, acacia mellifera y acacia nilotica) balanites aegyptica, espinas de pino, rebarbas de trigo y otros cereales, astillas de madera, clavos, piedras puntiagudas, huesos de pescado y garras que producen la herida. Se cree que la astilla contaminada penetra la piel y facilita la entrada del hongo al cuerpo (8, 14, 20, 31, 36, 39, 42, 51, 61, 66, 67).

DISTRIBUCION GEOGRAFICA DE LOS AGENTES DEL EUMICETOMA.

Los eumicetomas han sido señalados en todo el mundo, pero - con mayor frecuencia en las zonas de clima cálido y húmedo - que favorece la vegetación y ésta la supervivencia del parásito (5, 8, 14, 39).

Se reporta en áreas tropicales y subtropicales, de baja temperatura y se consideran zonas endémicas; India, Sudán, Senegal, Somalia, México, Venezuela, Estados Unidos; se han reportado casos aislados en Colombia, Alemania, Bucarest, -- Ceylán, Finlandia, Filipinas, Japón, Argentina, Brasil, Uruguay, Portugal, Paraguay, Chile, Madagascar, Italia, Túnez, (Africa del Norte), Arabia Saudita, Grecia, Francia, Puerto Rico, Algeria (Africa del Norte), Ecuador y en la Isla de Santa Cruz (Pequeñas Antillas). (8,10,16,28,31,39).

Se considera que el micetoma se presenta en las regiones -- comprendidas en el Trópico de Cáncer entre las latitudes de 15°S y 30°N, en estas áreas hay zonas áridas con períodos de lluvias de 6 meses, con una humedad relativa de 60-80% y una temperatura constante de 30-37°C. Este trópico atraviesa México un poco al norte de su parte media, lo que explica que sea éste país en América en donde los micetomas son más abundantes. Los casos reportados en México son en los estados de Guerrero, Morelos, Puebla, Nayarit, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Yucatán y Nuevo León.

(8, 14, 27, 31, 34, 56, 66, 61, 67).

Las especies de hongos productores de eumicetoma que se han reportado en México, son:

Madurella grisea, Madurella mycetomi, Petrillidium boydii, Cephalosporium sp. y Fusarium sp. (10,14,28,29,34,53,54, 66, 61, 67).

CAPITULO II

AGENTES ETIOLOGICOS DEL EUMICETOMA

CLASIFICACION

CLASIFICACION DEL EUMICETOMA Y DE SUS AGENTES.-

El eumicetoma puede ser dividido de acuerdo al color de los granos que produzca el agente etiológico en:

- a) Eumicetoma de granos negros.
- b) Eumicetoma de granos blanco - amarillentos (10, 11, 14 - 39).

AGENTES ETIOLOGICOS DE GRANOS

Blanco - Amarillentos

Petrillidium boydii

Cephalosporium falciforme

Cephalosporium recifei

Cephalosporium granulomatosis

Neotestudina rosatii

Fusarium sp

Cafés - Negros

Madurella mycetomi

Madurella grisea

Phialophora jeanselmei

Pyrenochaeta romeroi

Leptosphaeria senegalensis

Leptosphaeria tompkinsii

De ésta forma, en 1949 Mackinnon et al (33,34) hacen la división - de los agentes productores de eumicetoma de granos negros, la que incluye 5 tipos, siendo éstos:

- | | |
|----------|--------------------------------|
| Tipo I | <u>Madurella mycetomi</u> |
| Tipo II | <u>Madurella grisea n.sp.</u> |
| Tipo III | <u>Phialophora jeanselmei</u> |
| Tipo IV | <u>Glenospora clapierei</u> |
| Tipo V | <u>Monosporium sclerotiale</u> |

Esta clasificación se basa en las características de asimilación de compuestos nitrogenados, hidrocarbonados, acción proteolítica, temperatura óptima de crecimiento, hidrólisis de almidón, su aspecto en los cultivos tanto macro como microscópico, distribución geográfica y características de los granos. (11, 14, 16, 25, 27, 29, 32, 34, 35, 50, 51, 53, 58, 59, 62, 66, 67, 69.).

CLASIFICACION DE LOS AGENTES DEL MICETOMA (28, 29, 68).

		<u>ACTINOMICETOS (bacterias)</u>		
		<u>FAMILIA</u>	<u>GENERO</u>	<u>ESPECIES</u>
ACTINOMICETICOS			<u>Nocardia</u>	<ul style="list-style-type: none"> <u>Nocardia brasiliensis</u> <u>Nocardia caviae</u> <u>Nocardia asteroides</u>
		Nocardiaceae	<u>Actinomadurae</u>	<ul style="list-style-type: none"> <u>Actinomadurae pelletieri</u> <u>Actinomadurae madurae</u>
		Streptomyce- taceae	<u>Streptomyces</u>	<ul style="list-style-type: none"> <u>Streptomyces somaliensis</u> <u>Streptomyces paraguayensis</u>
		<u>A S C O M I C E T O S</u>		
MICOSICOS		Aspergiláceae	<u>Petrillidium</u>	<u>Petrillidium boydii</u> ++
			<u>Leptosphaeria</u>	<ul style="list-style-type: none"> <u>Leptosphaeria senegalensis</u> <u>Leptosphaeria tompkinsii</u>
			<u>Neotestudina</u>	<u>Neotestudina rosatii</u>
		Pleosporáceae	<u>Pyrenochaeta</u>	<u>Pyrenochaeta romeroi</u>
		Esporoforado	<u>Cephalosporium</u>	<ul style="list-style-type: none"> <u>Cephalosporium recifei</u> <u>Cephalosporium falciforme</u> <u>Cephalosporium granuloma- tosis.</u>
			<u>ADELOMICETOS U HONGOS IMPERFECTOS</u>	
	Himoficetos	<u>Madurella</u>	<ul style="list-style-type: none"> <u>Madurella mycetomi</u> <u>Madurella grisea</u> 	
	Fialidados	<u>Phialophora</u>	<u>Phialophora jeanselmei</u>	
		<u>Fusarium</u>	<u>Fusarium sp.</u>	

++ Petrillidium boydii tiene su estado conidial que es:
Monosporium apiospermum.

PROPIEDADES FISIOLÓGICAS DE LOS HONGOS CAUSANTES DE EUMICETOMA DE GRANOS NEGROS (6,33,39,62).

AGENTES ETIOLÓGICOS (+ = +)

Asimilación de	"1"	"2"	"3"	"4"	"5"
Glucosa	+	+	+	no se conoce	+
Maltosa	+	+	+	no se conoce	+
Lactosa	+	-	<u>±</u>	no se conoce	-
Galactosa	+	+	+	no se conoce	+
Sacarosa	-	+	+	no se conoce	+
Nitrato de Potasio	+	+	+	no se conoce	<u>±</u>
Sulfato de Amonio	+	+	No se conocen		no se - conoce
Asparagina	+	+	+	no se conoce	no se - conoce
U r e a	+	+	no se conoce	no se conoce	+
Hidrólisis de Al- midón	+	+	no se - conoce	no se conoce	no se - conoce.
Actividad Proteo- lítica:					
Suero	<u>±</u>	<u>±</u>	no se - conoce	no se - conoce	no se - conoce
Leche	<u>±</u>	<u>±</u>	no se co- noce.	no se - conoce	no se - conoce
Licuefacción de = gelatina:	+	<u>±</u>	no se - conoce.	no se - conoce.	-
Crecimiento a:					
37°C	++	+	+	+	+
30°C	+	++	+	++	++
Pigmentos difusi- bles al medio:	café	<u>±</u> café	café rosa	-	-
(+=+)"1" <u>Madurella mycetomi</u>				"2" <u>Madurella grisea</u>	
(+=+)"3" <u>Leptosphaeria senegalensis</u>				"4" <u>Pyrenochaeta romeroi</u>	
(+=+)"5" <u>Phialophora jeanselmei</u> ó (<u>Exophiala jeanselmei</u>)					

BREVE DESCRIPCION DE LOS AGENTES DEL EUMICETOMA DE GRANOS NEGROS

Madurella mycetomi

Produce granos negros redondos o lobulados, de consistencia dura o quebradiza. El tamaño varía de 0.5 a 3 mm de diámetro, a veces se agrupan y llegan a medir hasta 5 mm; al examen directo con potasa al 20% se observan hifas fúngicas de 1 a 2 micras de diámetro y clamidosporas, todo esto unido por una substancia llamada "cemento"

Madurella mycetomi es poco estable en sus propiedades macromorfológicas, la colonia aparece blanca - verdosa, cambia a un color ocre, café oscuro y algunas cepas pierden su color quedando blancas - beige, después de repetidos sub cultivos, la superficie de la colonia es granular o filamentososa y pueden aparecer en los tubos de cultivo esclerotes negros. Su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C - (8, 14, 32, 34, 39).

Madurella grisea. -

Produce también granos negros que miden aproximadamente 1 mm de diámetro o mayores, son duros muestran secciones ó áreas centrales sin pigmentar, al observarse con potasa se ven formados por hifas gruesas con gránulos intracelulares - cafés.

La colonia es oscura, negra o verdosa, cuando el cultivo es viejo da tonos café - rojizos, tienen micelio aéreo corto y sin pigmento difusible al medio, al examen microscópico de

las colonias se observan hifas de 1 a 3 micras de diámetro o más anchas de 3 a 5 micras, ramificadas y septadas, - las clamidosporas están ausentes o son raras.

Su temperatura óptima de crecimiento es de 30°C (10, 14, 26, 28).

Leptosphaeria senegalensis. -

Produce granos negros de 1 mm de diámetro. Su colonia - es de crecimiento rápido, de color gris o café, al reverso - negra, con tintes rosas en el agar, sin pigmento difusible - al medio, al examen directo de la colonia se observan hi- - fas hialinas o fuliginosas con micelios ramificados delgados las clamidosporas se encuentran raramente, después de 1 ó 2 meses de cultivo en Agar Papa Zanahoria, presenta pe- - queños cuerpos negros llamados "peritecios" de un diámetro de 100 a 300 micras dentro de los cuales se encuentran las ascas (17 a 22 x 80-110 micras) con 6 a 8 ascosporas - - (8-10 x 23-30 micras) cubiertas por material mucilagino- so.

Su temperatura óptima de crecimiento es de 20°C (10, 14, 32, 34, 39, 53).

Leptosphaeria tompkinsii. -

De características muy similares a la anterior en cuanto a sus granos y colonias, difiere en que su peritecio es de - mayor tamaño (300 micras o más), dentro del cual se - encuentran las ascas (20 a 35 x 90 a 115 micras), se pue- den encontrar otras aún mayores de (21.5 x 108 micras) - las ascas contienen 8 ascosporas (8 a 11 x 32 a 45 micras o mayores de 10.3 x 38.5 micras) también están cubiertas por una substancia mucilaginosa.

Su temperatura óptima de crecimiento es de 20°C (10, 14, - 32, 34, 39, 53).

Pyrenochaeta romeroi. -

Produce al igual que las anteriores, granos negros tubulares - que miden 0.5 a 1.5 mm de diámetro y son de consistencia - blanda.

En el cultivo, sus colonias son grises oscuras, vellosas, con pigmento verde o blanco en la periferia, el reverso de la colonia es negro y se encuentran "picnidias" en la superficie - del medio, las cuales son de color café - negruzco con dimensiones de 50 a 150 x 100 a 300 micras con tabiques hialinos - que dividen en picnidiosporas elípticas de 1 a 1.3 x 2 a 5 mi cras.

Su temperatura óptima de crecimiento es de 30°C (10, 14, 32 33, 34, 39, 53).

Phialophora jeanselmei. -

Produce granos negros irregulares que miden aproximadamen- te 1 mm de diámetro.

Sus colonias son de color verde olivo oscuro a negro, levadu riforme cubiertas de un micelio aéreo corto. Al examen mi- crosκόpico se encuentran hifas ramificadas, septadas que mi- den 1-3 micras de ancho con conidias sobre las fialides, és- -tas varían en dimensión desde 1.5 a 3.5 micras con una longi tud de 5 a 15 micras, las fialosporas son elípticas, hialinas - con dimensiones de 0.75 a 1 x 1 a 2 micras aunque varían - hasta 2-3 x 4 a 6 micras.

Su crecimiento es mejor a 30°C que a 37°C. (10, 14, 32, 34, 39, 52).

EPIDEMIOLOGIA. -

El micetoma ocurre con más frecuencia en granjas y áreas rurales debido a que los pacientes tienen mayor exposición a los agentes etiológicos por traumatismos generalmente ocurridos durante sus labores (14,39,68)

Este padecimiento se reporta en regiones tropicales y subtropicales con temperaturas entre 15 y 37°C; se localiza en las regiones entre el trópico de Cáncer, en las latitudes de 15°S y 30°N donde hay zonas áridas con período de lluvias corto, humedad relativa de 60 a 80%, temperatura constante de 30 - 37°C de día y noche, algunas con una humedad relativa de 12 a 30% y temperaturas de 45 a 60°C y nocturnas de 15 a 18°C. La mayoría de los casos de micetoma ocurren en áreas con 50 a 1000 mm de lluvia por año. (14, 39)

En México tenemos las siguientes condiciones climatológicas:

Rango de temperatura:	11 a 20°C ó más.
Pluvialidad:	500 a 1000 mm de lluvia - /año.

Por lo que la frecuencia de microorganismos causantes de micetoma es:

Nocardia brasiliensis, Nocardia asteroides, Actinomadurae -
madurae, Streptomyces somaliensis, Petrillidium boydii, - -
Actinomadurae pelletieri y algunos casos de Madurella gri-
sea, Madurella mycetomi, Cephalosporium sp. y Fusarium
sp. (39).

SINTOMATOLOGIA. -

La primera lesión identificable puede ser:

- 1) Pequeña pápula.
- 2) Nódulo diminuto fijo
- 3) Area indurada coronada por una vesícula.
- 4) Pequeños abscesos

La enfermedad progresa con lentitud, al principio se caracteriza por períodos de remisión y recaídas, apareciendo cada vez nuevos elementos nodulares que finalmente fistulizan y en término de varios meses ó años, se constituye el cuadro clínico clásico de tumoraciones fistulosas de consistencia leñosa a medida que la infección se extiende y profundiza, se invaden los músculos, aponeurosis, tendones y huesos.

Los sitios donde se localiza el micetoma, particularmente cuando asienta en el pie o en manos adoptan la forma globosa en la que se observan múltiples nódulos, fístulas y cicatrices, las fístulas drenan un líquido seropurulento o serosanguinolento en el que están contenidos los granos (microcolonias) del agente causal cuya observación microscópica establece el diagnóstico. (10, 11, 14, 39, 66, 67).

INMUNOLOGIA. -

Como métodos diagnósticos del micetoma se emplean:

- Difusión en gel (Método de Ouchterlony) en el que habrá bandas de precipitación, entre los antígenos y anticuerpos hay identidad, esta reacción puede dar resultados poco satisfactorios para la identificación de la especie del actinomiceto (bacteria), pero no habrá reacciones cruzadas entre el agente etiológico de un eumicetoma y el de un actinomicetoma (4 0).
- Para la medición de anticuerpos y sus niveles, en los sueros de pacientes con micetoma se pueden emplear la Contra inmunolectroforesis (CIE) y el Método de ELISA. Se ha encontrado que este último es más sensible, pero puede dar reacciones cruzadas (24, 45).
- Comparando la CIE y la Inmunodifusión, se ha comprobado que la sensibilidad de la primera es mayor. La CIE se emplea en la detección de anticuerpos (24).
- Los métodos serológicos son de gran valor para el diagnóstico del micetoma debido a que son técnicas simples y específicas con ventajas como:
 - a) Detectan la presencia del micetoma.
 - b) Se puede diferenciar entre los agentes etiológicos

La prueba de fijación del complemento dá reacciones cruzadas, por lo que es poco aconsejable en el caso de identificación de los agentes etiológicos del micetoma (10,14)

Se pueden usar pruebas cutáneas para la identificación entre el eumicetoma y el actinomicetoma pero son poco específicas en cuestión de especie causante. (39, 47, 49).

Para hacer la medición de la Inmunidad Celular en los pacientes con micetoma, se emplean las siguientes pruebas:

- Tuberculino Reacción
- Transformación Morfológica de los linfocitos periféricos.
- Fitrohemaglutinación Mitógena.
- Sensibilización con 1-cloro-2, 2 dinitrobenceno (DNCB/4)

Las pruebas para medir la Inmunidad Humoral son:

- Determinación de los niveles de Inmunoglobulinas (IgG, - IgM, IgA) en el suero de los pacientes.

Con las determinaciones anteriores se ha comprobado que hay deficiencias en la Inmunidad Celular de los pacientes que padecen micetoma y pocos cambios con lo que respecta a la Inmunidad Humoral (24, 38, 39, 40, 41).

DIAGNOSTICO DIFERENCIAL. -

- Micetoma Actinomicósico.
- Elefantiasis
- Cromomicosis
- Sarcoma de Kaposi
- Osteomielitis Crónica (Micetoma Oseo)
- Osteitis Sifilítica vx Micetoma Oseo
- Tuberculosis
- Leishmaniasis cutánea
- Esporotricosis

P R O F I L A X I S . -

Educar a los habitantes de zonas endémicas sobre la enfermedad y la conveniencia de usar zapatos para la protección de sus extremidades inferiores, implantar medidas protectoras para el campesino y sobre todo el diagnóstico oportuno para el cual es necesario que el médico conozca la enfermedad - - 39, 61) .

TRATAMIENTO. -

El micetoma actinomicético es el que puede ser tratado, pues to que el eumicetoma es difícil de tratar o requiere cirugía - en algunos casos.

Para los micetomas causados por N. brasiliensis se pueden - emplear combinados Diamino - difenil - sulfona (DDS) y Ganta - nol - trimetoprim (G-T); el tratamiento ideal consiste en la - administración de 100 a 200 mg de DDS al día con 4 tabletas de gantanol - trimetoprim (G-T) hasta la curación clínica de - las lesiones y continuar por tiempo indefinido con 100 mg de - DDS, (9, 61).

Otras sulfas de eliminación lenta como la sulfametoxi y dime- toxipiridazina a dosis de 500 mg/día, la estreptomina, las - tetraciclinas, también han demostrado actividad terapéutica, - por lo cual pueden hacerse varios planes de tratamiento en el actinomicetoma.

Los actinomicetomas por otros agentes etiológicos obedecen - mal a los medicamentos señalados, al igual que los micetomas eumicéticos. En este último caso, la Anfotericina B es una - buena opción (9, 63).

Se debe tomar en cuenta en el eumicetoma la combinación de - la cirugía conservativa seguida de quimioterapia para evitar - recidivas; dentro de los medicamentos probados se encuentran:

- a) Anfotericina B (Intravenosa) (7,42, 14, 68).
- b) Ketoconazol en dosis oral de 400 a 600 mg después de ha ber hecho la extirpación quirúrgica del tejido afectado. (12, 15).

- c) En el caso de eumicetomas por M. grisea también es útil la cirugía seguida de la administración de fármacos como el Ketoconazol, Dapsone (diamino difenil sulfona) (15, 50)
- d) En casos de eumicetomas por M. mycetomi se puede emplear la combinación de Clotrimazol y Griseofulvina, en pacientes en que el estado inmunológico es bueno se han empleado como tratamiento la Griseofulvina y la Penicilina; la Anfotericina B puede ser usada intravenosa o intralesionalmente después de la extirpación quirúrgica del micetoma cuando su localización lo permite (10, 38, 40, 60).

La intervención quirúrgica incluye la exploración y drenaje de los trayectos fistulosos, retirando el tejido enfermo y los aglomerados que pudieran estar dentro de los huesos cuando están afectados (61).

El tratamiento quirúrgico, es decir la amputación, debe ser limitada a pacientes que muestran resistencia al tratamiento médico, ya que el riesgo de recidiva en el muñón es muy alto en -- cambio, el uso de aparatos ortopédicos, de zapatos especiales - puede hacer útil un miembro afectado por micetoma (61).

Debido a que la cirugía es la terapéutica de elección en el micetoma, - se debe tomar en consideración que:

- a) Es peligrosa porque se pueden presentar recidivas o metástasis a otros órganos, por lo que debe hacerse la amputación entre ganglios para evitarla.
- b) El agente etiológico no se esteriliza "in vivo" ni física, ni química, ni biológicamente, ésto se debe tomar en cuenta al efectuar la amputación del miembro afectado, se debe tener bajo observación al paciente después de la cirugía para evitar que se presenten recidivas. (60, 67).

CAPITULO III

GENERO MADURELLA Y CRITERIOS DE CLASIFICACION

DEFINICION DEL GENERO MADURELLA Y SUS ESPECIES

Brumpt en 1905, define el género *Madurella* como: mucédinea - con tallo blanco, viviendo como parásito en diversos tejidos animales (huesos, músculos, tejido conjuntivo) tienen en su vida - vegetativa filamentos de un diámetro superior de 1 micra y pueden alcanzar de 5 a 10 micras; éstos filamentos son tabicados, - se ramifican y segregan una substancia café - marrón. Al en - vejecer estos filamentos se organizan en esclerotes y su pared se impregna del pigmento, en este esclerote se cuentan en cantidades variables corpúsculos redondeados de 8 a 30 micras de diámetro (clamidosporas) (34). Por lo tanto, el *Streptothrix mycetomi* (Laveran) se vuelve *Madurella mycetomi* (34)

Cultivos sudamericanos que al no poder ser identificados con - otras especies conocidas, dieron lugar a que se creara una nueva especie que denominamos *Madurella grisea*; ésta especie se - distingue de la anterior por el aspecto macroscópica de los cultivos, por su morfología microscópica y por algunas propiedades biológicas (33).

En cambio, no existen diferencias notables entre las formas parasitarias de las dos especies, pues una y otra producen granos negros, algo verrucosos de 1 ó 2 mm de diámetro, duros y compuestos de filamentos micelianos hasta de 3 micras de espesor, con clamidosporas de 10 a 20 micras y de una substancia intersticial de color marrón (33).

Pinoy, en 1912 modificó la definición de Brumpt teniendo en cuenta también los caracteres microscópicos de la vida saprófita "Hongos estériles de filamentos tabicados que se reproducen por thalosporas, las cuales nacen por división binaria de los artículos de un filamento producen en el hombre micetomas de granos negros y se desarrollan a 37°C (2, 33).

El género *Madurella* carece de fructificación y de todo detalle o estructura morfológica que permita la ubicación cierta en la taxonomía (15).

SINONIMOS DE LOS AGENTES DEL GENERO MADURELLA. -

<u>Madurella mycetomi</u>	Brumpt	1905.
<i>Streptothrix mycetomi</i>	Laveran	1902.
<i>Glenspora khartoumensis</i>	Chalmers y Archibald	1916.
<i>Oospora tozeuri</i>	Pinoy - Nicolle	1908.
<i>Madurella tozeuri</i>	Nicolle y Pinoy	1908
<i>Madurella tabarkae</i>	Blanc y Brun	1919.
<i>Madurella americana</i>	Gammel	1927.
<i>Madurella ikedae</i>	Gammel	1927.
<i>Madurella lackawanna</i>	Hanan y Zurett	1938.
<i>Madurella viridobrunnea</i>	Radaelli y Ciferri	1942.
<i>Madurella ramiroi</i>	Pirajá de Silva	1919.
<i>Madurella oswaldoi</i>	Parreiras Horta	1919.
<i>Madurella rifanum</i>	Gostaminas	1929.
(13, 14, 16, 31, 39, 51)		
<u>Madurella grisea</u> (13, 14, 16, 39, 51).	Mackinnon, Ferrada Urzúa, Montemayor.	1949.

ASPECTO EN LA VIDA PARASITARIA (GRANOS)

Madurella mycetomi .-

Los granos son de tamaño variable entre 200 y 900 micras de diámetro. Hay dos tipos de granos: uno compuesto de hifas y el menos común de apariencia vesiculosa, son redondos u ova les y pueden ser bilobulados o trilobulados. Están compues - tos de dos partes, la médula y la corteza.

Las hifas se encuentran repartidas en varias direcciones, al - hacer un corte pueden ser longitudinales, transversales, obli - cuas, largas, segmentadas y contienen clamidosporas ovales ó redondas que se encuentran en posición intercalar o terminal.

El grano está dentro de una matriz dura café llamada "cemen - to", el cual es secretado por el hongo; las paredes de las hi - fas están bien definidas con un diámetro de 2 micras, son sep - tadas y ramificadas. Las clamidosporas miden de 7 a 15 mi - cras de diámetro.

La variedad menos común es la vesicular y presenta células - grandes de 7 micras de diámetro; el pigmento café es reteni - do más en la periferia que en el centro del grano.

(3, 10, 11, 14, 39, 57, 69).

CARACTERISTICAS CULTURALES.

Madurella mycetomi. -

Hongo de micelio blanco grisáceo, volviéndose amarillo al envejecer y ennegrece los medios de cultivo azucarados.

Presencia de oídias (artrosporas) de dimensiones variables desde 2 a 5 micras, esclerotes negros estériles de 0.5 a 1 mm - de diámetro, formados en el interior del medio de cultivo; puede invadir en el hombre la dermis, huesos, músculos y el tejido conjuntivo, dando un micetoma de granos negros; los granos son pequeños redondeados, más ó menos verrucosos, de morfología bastante semejante a la de los esclerotes formados en los cultivos. (1,2,34).

Los medios favorables para la formación de fialides son de preferencia: Agar Papa Zanahoria Agar Harina de Maíz, Agar Papa Peptona, Agar Peptona Lactosado, Agar Papa Zanahoria con hidrolizado de Caseína o Asparagina en los que se forman escasamente las fialides y fialosporas (38, 63, 70).

La temperatura óptima de crecimiento es de 37°C, la forma- -ción de esclerotes es favorecida en medios pobres; al examinar los se observa que están constituidos por un conjunto de células poligonales oscuras, revelan hifas segmentadas, ramificadas - irregulares de 1 a 2 micras de diámetro, redondas o poligonales con clamidosporas que miden de 5 a 15 micras, situadas en la periferia; su desarrollo a 28°C es muy pobre o nulo. (38, 39, 63, 70).

En medios pobres como Agar Extracto de Suelo, se producen pocas aleuriosporas o conidias (70) . Inoculación a los animales - poco satisfactoria o negativa. (34, 44).

CARACTERISTICAS MICROMORFOLOGICAS

Madurella mycetomi. -

En la vida saprofitica (cultivos), se desarrolla formando un micelio filamentoso estéril de 2 a 5 micras de diámetro que posee clamidosporas de 6 a 24 micras de diámetro, globulosas y de paredes gruesas cuya posición respecto al micelio vegetativo es lateral, intercalar o terminal y se presentan aisladas o en cadenas (2, 3, 18, 51, 54, 39, 67, 68, 70).

Las fialides se desarrollan en medios pobres, ya mencionados, - sobre ellas se forman aglutinados de fialosporas que son muy - lábiles, (cabezas, rosarios, aisladas o sobre los arbúsculos) - este tipo de esporulación se relaciona con el grado de formación de esclerotes. (63).

Madurella mycetomi es un hongo difícil de identificar debido a:

- 1.- Hay gran diversidad de morfología macroscópica entre las cepas.
- 2.- Hay polimorfismo en una misma cepa.
- 3.- Dada la pobreza de los caracteres de identificación.
- 4.- Por la ausencia de patogenicidad en los animales(63)

Las fialides miden de 8 a 10 micras de ancho por 2 a 4 de largo, se pueden encontrar aisladas; unidas directamente al filamento septado y perpendicularmente separadas por una membrana, - en ocasiones se observan dos o tres fialides sobre una articulación corta adherida al filamento.

En el extremo del filamentos hay esporas piriformes o arredondadas de 3 micras de diámetro, de paredes gruesas que están aisladas por una membrana. Estas esporas forman pequeños grupos redondos coronando la fialide. Las reuniones de esporas son muy lábiles y se separan con mucha facilidad durante el montaje, lo que dificulta su observación (63).

"Toda cepa que produce esclerotes forma igualmente fialides y éstas se encuentran de preferencia en el vello aéreo situado por encima de los esclerotes. La pérdida de la producción de ambos elementos morfológicos por una cepa, sería debido a mutaciones y variaciones frecuentes en estos hongos, en el cultivo y aún en el grano parasitario" (63).

ASPECTO EN LA VIDA PARASITARIA (GRANOS)

Madurella grisea.-

Los granos de M. grisea miden de 350 a 500 micras de diámetro, son de color café y tienen dos zonas definidas, una central sin ó con poco pigmento y la periferia más oscura.

El centro está formado por hifas hialinas y fuliginosas, la periferia contiene cemento café, son de consistencia dura.

(2,3,10,11,14,39,57,69).

Estudios hechos por absorción atómica y espectrofotometría de masas, demuestran que el tejido de los granos negros está formado por minerales tales como:

Zinc
Cobre
Manganeso
Magnesio
Calcio
Fierro
Aluminio
Cromo
Vanadio
Estaño (17)

CARACTERISTICAS CULTURALES

Madurella grisea. -

En agar glucosado de Sabouraud dá colonias duras formadas por una masa de micelio casi negra y plegada, cubierta por una - - vellosidad blanco - grisácea. Los cultivos viejos toman tintes marrones pero jamás amarillentos; la vellosidad oculta los pliegues de la masa micelial, pero algunas cepas producen escasa - y más corta vellosidad y en consecuencia las colonias son más oscuras y los pliegues más visibles.

En medio líquido de Czapek se desarrollan colonias esféricas, - sumergidas formadas por micelio hialino con un punto central - obscuro; tardíamente se puede observar la formación de un ve- lo grueso negruzco. Las hifas pueden ser moniliformes (3 a 4 micras) o cilíndricas (2 a 3 micras), fuliginosas, ramifica - das y tabicadas; éstas dan nacimiento a hifas jóvenes delgadas, casi hialinas, que forman la vellosidad o micelio aéreo.

El micelio cilíndrico predomina en la mayor parte de las ce - pas, las clamidosporas terminales e intercalares, de pared - - gruesa (4 a 7 x 3 a 4 micras) son vistas en número muy esca so y hay cepas que carecen de esta propiedad. (34, 35,).

CARACTERISTICAS MICROMORFOLOGICAS. -

Micelio más ó menos fuliginosos flexuoso o rectilíneo, poco ta bicado y ramificado, hialino o ligeramente amarillento de 2 a 3 micras de espesor, con membranas gruesas, algunos dispues- tos en manojos de funículos (micelio de unión), además presen- tan clamidosporas intercalares o terminales, esféricas u ovoides de 8 a 10 micras de diámetro (1, 54).

Los hongos sin esporulación como son: Madurella grisea y Pyre- nochaeta romeroi tienen una gran semejanza en sus granos y - características culturales; por lo que es necesario inducir la - formación de picnidias en medios de cultivo pobres tales como: Medio de Papa Zanahoria, Agar Harina de Maíz, Gelosa Glucosa da de Sabouraud; las picnidias, son características de Pyreno- chaeta romeroi las cuales se presentan más ó menos curvadas, de forma irregular o regular, ovals, piriformes o arredonda- das y miden entre 100 y 160 micras de ancho por 70 a 130 de - largo (62). Se ha llegado a la conclusión de que M. grisea - podría ser la forma no fértil de Pyrenochaeta romeroi (62).

Las diferencias entre ambas especies, pueden hacerse mediante serología, ya que por su morfología y fisiología son difícilmen- te distinguibles; algunos antisueros dan áreas de precipitación - en agar sólo frente al antígeno homólogo, por lo tanto, no hay evidencia de reacciones cruzadas. (46).

DISTRIBUCION GEOGRAFICA

Los eumicetomas han sido señalados en todo el mundo, pero con mayor frecuencia en las zonas de clima cálido y húmedo que favorece la vegetación y supervivencia del parásito en el medio ambiente. (50).

Madurella mycetomi. -

Ha sido encontrado en América del Norte (Texas), Africa del Norte, Costa de Marfil, Senegal (Africa Occidental), - India, Alto Volta, Togo, Sudán y en América del Sur.

En México son poco frecuentes los micetomas por hongos, - sólo un 1.4%. Se han encontrado casos en los estados de Coahuila, Guerrero, Morelos, Nayarit, Nuevo León, San - - Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Puebla y Yucatán (34, 38, - 41, 50, 61).

Madurella grisea

Se encuentra frecuentemente en América del Sur (zonas del Chaco y Norte Argentino, zona Central de Chile, Venezuela y Paraguay) en México es más frecuente que Madurella - - mycetomi y en Calcutta. (34, 62).

ASPECTOS CLINICOS DEL EUMICETOMA. -

Los hongos productores del eumicetoma se introducen en los tejidos accidentalmente mediante un traumatismo y más raramente a través de una solución de continuidad ya establecida (39, 51).

Debido a que los agentes etiológicos son hongos saprófitos que necesitan adaptarse a los animales, es decir, transformarse en patógenos y que por su parte el huésped ofrece una barrera, constituida por sus defensas naturales, las cuales deben ser vencidas. (51).

Por lo anterior, el eumicetoma tiene una lenta evolución hasta de 10 a 40 años (3), la facilidad y formas en que el hombre se inocula, hace que el padecimiento sea frecuente (66) . Si la enfermedad se instala, tendrá diferentes fases de desarrollo, estas son:

- a) Fase de Latencia o Adaptación
- b) Fase de Proliferación
- c) Fase Invasiva

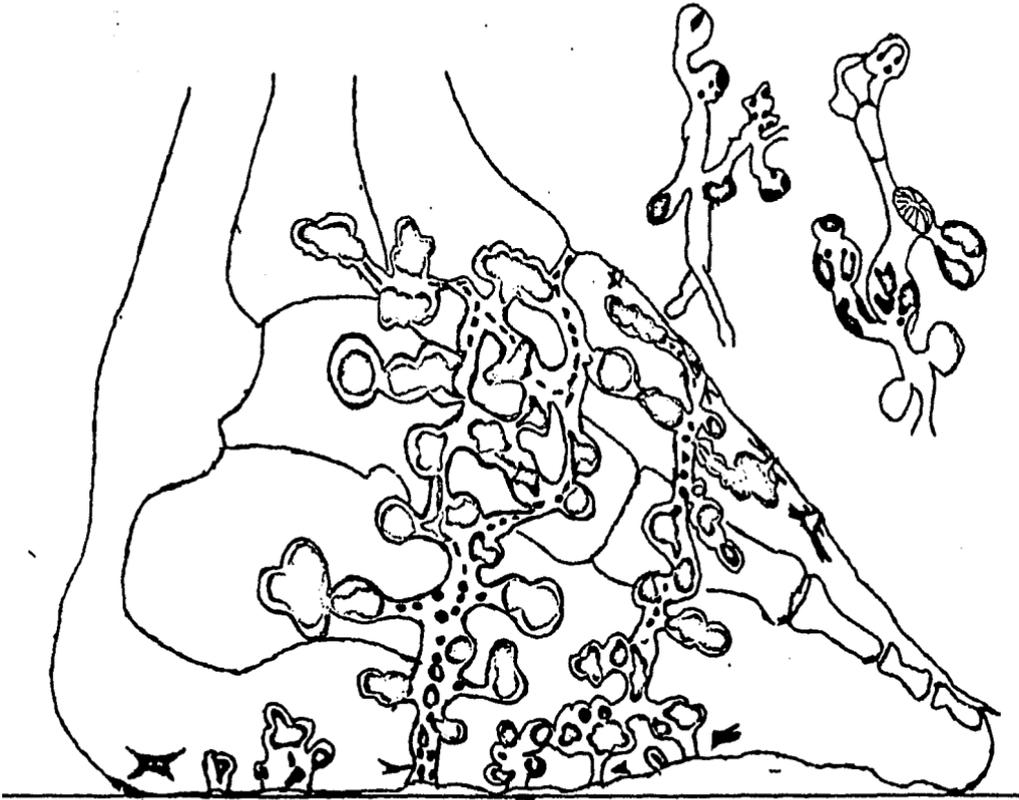
En la primera fase, el agente patógeno se introduce generalmente por la planta del pie y empieza a formar una respuesta tisular, a la sexta u octava semana, se produce inflamación que no permite la deambulaci3n, posteriormente aparecen fístulas, al tercer o cuarto mes se forman n3dulos sensibles y el pie se inflama, después aparecen los granos característicos que son evacuados por las fístulas y se forman nuevos n3dulos. (39, 66).

En la fase de proliferaci3n, el hongo forma zonas de fibro - esclerosis, libra las barreras anatómicas del pie y llega a nivel plantar, hay preferencia por el músculo, los espacios interfasciculares con una degeneraci3n miosítica extensiva irreversible; hay proliferaci3n formándose filamentos largos que se van uniendo, el tamaño del grano aumenta dando "geodos" en el canal medular de la epífisis, lo que da imágenes claras, arredondadas de contornos definidos.

Después del ataque cortical hay invasión hacia la médula del hueso (39.).

FIGURA # 1

Muestra un corte sagital de un pie con "Maduromicosis" - causada por Madurella mycetomi, hay granos colectados y se observan las interconexiones por medio de canales y - - tractos sinuosos a la superficie.



En la fase de invasión proliferan las colonias (granos) que se difunden en todas direcciones (músculos, huesos y articulaciones) Se establece la infección secundaria por microorganismos piógenos como algunos anaerobios, *Proteus virulentus* y *Vibriones*, además de otros microorganismos (66,67).

Las reacciones linfáticas son constantes:

- Inflamación de los linfáticos
- Macropoliadenopatía inguinal satélite de aparición más o menos precoz
- Los ganglios se inflaman (66, 67).

Los granos se encuentran en los espacios celulares, vasculares y el periostio. La marcha del enfermo se hace difícil, - pueden haber neoplasias, por lo que se consideran malignos - " in situ " y continúan las recidivas hasta dar metástasis - - ganglionares a distancia, es por ésto que se aconseja la cirugía.

Las formas evolutivas son:

- 1.- Forma de aparición.
- 2.- Forma intermedia
- 3.- Forma extrema

Forma de aparición. -

- Verruga atípica con caracteres macroscópicos y geodos pequeños.
- Ulceración en la parte dañada
- Nódulos más o menos móviles.
- Tumores cutáneos en los bordes.

Esta forma evolutiva puede durar en los casos del género Ma durella incluso dos años o más (66, 67).

Forma intermedia. -

Llega a sitios más profundos, el pie aumenta de volumen, se hace globoso, la marcha es penosa, los dolores nocturnos se incrementan. Puede haber invasión del tarso o metatarso y presentar lesiones geólicas, esto sucede entre los dos y cinco años después de la aparición (61, 66, 67).

Forma extrema. -

El pie está monstruosos, polifistulizado de tamaño muy aumentado, el esqueleto sufre alteraciones muy grandes, hay adenopatía inguino - crural, el estado general del enfermo se encuentra alterado, se presenta infección agregada e impotencia funcional. (61, 66, 67).

Las formas clínicas dependen:

- 1.- Del agente etiológico
- 2.- Del tiempo al que se inicia un tratamiento después de la invasión o implantación.
- 3.- De las veces en que se ha estado en contacto con el agente etiológico pues se sabe que la implantación puede ser debida a un contacto repetido y prolongado con el parásito lo que provoca una sensibilización. (51,61,66,67).

EPIDEMIOLOGIA DEL EUMICETOMA.

La maduromicosis tiene una distribución mundial, es más común en las zonas biogeográficas, donde se favorece la supervivencia del hongo causante. Estos hongos viven saprofiticamente en el suelo sobre vegetales, astillas de madera, etc. (5,14,31,32,39).

La profesión, edad y sexo tienen importancia en la epidemiología de la enfermedad. La mayoría de los casos corresponden a trabajadores rurales de sexo masculino, de 20 a 50 años de edad es decir, la época de máxima actividad física que aumenta, por consiguiente la posibilidad de infección (2,11,51,61,)

Por su casuística se tienen relaciones de 5:1 ó mayores del sexo masculino con respecto al femenino.

Las personas más afectadas por el eumicetoma son agricultores, vaqueros y gente dedicada a las labores del campo que están en contacto con los agentes etiológicos en las zonas endémicas (32, 39, 51).

El período de incubación para el eumicetoma es largo desde un año hasta 10 o más, esto depende de las condiciones del huésped y de la agresividad del agente etiológico (39).

La mayoría de los micetomas se localizan en el pie, sobre todo en el dorso, algunos casos extrapédicos se observan en otras partes del cuerpo. (Que están en contacto con el suelo). (39, - 51, 66, 67 .)

	México	Sudán	Africa
Pie	35%	68.8%	68.0%
Pierna	28%	3.2%	10.0%
Rodilla	-	4.4%	4.0%
Muslo	-	2.0%	3.0%
Nalgas, Periné	1.0%	2.0%	3.0%
Mano	2.0%	10.7%	5.0%
Brazo	8.0%	3.8%	3.0%
Abdomen	3.0%	1.0%	1.0%
Caja Torácica	20.0%	1.0%	1.0%
Cabeza y cuello	3.0%	3.1%	2.0%

Madurella mycetomi:

Agente causal común del eumicetoma, predomina en áreas tropicales de Africa, India, con una precipitación pluvial de 250 a 500-mm/año, común en zonas húmedas del Senegal, Alto Volta, Togo Sudán, Africa del Norte, Costa de Marfil, en México tiene una frecuencia menor que Madurella grisea (10, 11, 14, 16, 39, 61).

Madurella grisea:

Se localiza en América del Sur (Chaco, Norte Argentino, zona central de Chile, Venezuela, Paraguay y Brasil) en Calcutta.

En México es el más frecuente agente de eumicetoma de granos negros (10, 11, 14, 16, 39, 61).

Pyrenochaeta romeroi:

Agente etiológico común en Sudamérica, Senegal, Somalia y algunas otras regiones africanas (10, 14, 39).

Leptosphaeria senegalensis:

Se encuentra en Senegal y el Chad. (39).

Phialophora jeanselmei:

Se presenta preferentemente en países de Africa, hay algunos casos en Martinica (Antillas) Estados Unidos, en México se han aislado algunos casos (10, 14, 39, 61).

ALGUNOS ASPECTOS HISTOPATOLOGICOS

Debido a que la forma parasitaria de los agentes etiológicos - del eumicetoma de granos negros son muy semejantes al examen en fresco y a que en los cultivos tardan dos semanas ó más en crecer las colonias, para la identificación de los hongos causantes se han empleado diferentes tinciones para hacer la diferenciación de los agentes etiológicos, entre éstas se emplean las que son más específicas para tinción de hongos como:

- Tinción de Hematoxilina- Eosina (H&E), la del Acido Peryodico de Schiff (PAS), Metenammina de Plata o Tinción de Gomori, el Método de Gridley, la Hematoxilina-Eosina-Safranina, la Tinción de Reticulina, la Tinción de Mann y la de Grocott.

(39, 65, 66, 67).

Las características histológicas de los granos difiere no sólo - en su forma y tamaño sino en sus propiedades tintoriales según el género, por lo que el estudio histopatológico es uno de los más útiles. (65, 66, 67).

Por lo que respecta a la reacción tisular, la epidermis muestra hiperqueratosis y acantosis con elongación de los procesos interpapilares y zonas de ulceración. La dermis presenta infiltrado de linfocitos, histiocitos y formación de abscesos de polimorfonucleares y algunos eosinófilos, es decir, no se forma un verdadero granuloma. En el interior de estos micro abscesos se encuentran los granos (61) .

En el eumicetoma se presenta en general la siguiente imagen - histopatológica.

Reacción inflamatoria elemental.- El grano está centrado en el absceso entre la aureola de polimorfonucleares.

La corona de neutrófilos polimorfonucleares es más marcada en granos vesiculosos que en los filamentosos de M. mycetomi (Reacción Tisular Periférica).

Zona granulomatosa en corona.- Es rica en plasmocitos - más que en histiocitos, eosinófilos y linfocitos.

Zona de reacción macrofágica plasmodial.- Se observa sobre todo en granos con cemento como los de M. mycetomi, - Madurella grisea y Madurella sp. Los plasmocitos son atacados y se libera el cemento por lo que se observa una zona purulenta, como granuloma; a distancia hay inflamación perivascular y de los espacios celulares, es una reacción de reabsorción de cuerpo extraño. La formación del cemento altera el paso de eosinófilos (39, 66, 67).

M. mycetomi da imágenes pseudo - foliculares con corona de histiocitos y células gigantes. En la periferia hay granuloma fibroblástico con enorme cantidad de colágena responsable de la esclerosis extensiva.

Respuesta del Huésped:

A nivel de tegumentos hay esclerosis hipertrófica monstruosa eliminándose granos. Los trayectos por donde se evacúa el parásito varían en proliferación y extensión dependiendo de las zonas de resistencia como son: espacios celulares, ejes conjuntivo-vasculares, músculos, tendones, superficies aponeuróticas, espacios sub-periósticos, nervios y vasos - - sanguíneos. (14, 39, 67)

El fenómeno inflamatorio es frecuente de encontrar en el endotelio con calcificación fragmentaria limitando la elasticidad

Se nota trombosis y recanalización. La disposición de la hiperplasia es perinodular, serpenteante en las esclerosis reaccionales, más finalmente se unen a los nódulos. La hipervascularización tortuosa se manifiesta en los pies macroscópicamente a la superficie del esqueleto.

Los linfáticos son susceptibles de hiperplasia con una zona inflamatoria.

Micetomas por Madurella.-

Los granos filamentosos, se encuentran en las cavernas. Las fosas se perforan en túneles profundos en la diáfisis y el tejido esponjoso. Los metatarsianos sufren deformación por la presión de los granos sobre ellos.

Hay descalcificación de los contornos de las cavidades óseas - restando parte de la imagen radiológica. La osteolisis es moderada. (57).

HISTOLOGIA CAUSADA POR Madurella mycetomi

Los cortes histológicos estudiados muestran espesamiento de la epidermis por hiperplasia simple. En dermis y tejido celular subcutáneo hay alteración de los límites y configuración, observándose condensación de células de infiltración y formaciones granulomatosas semejantes a reacción de cuerpo extraño. La condensación citógena constituye tres tipos de formaciones residuales reactivas:

- a) Granuloma de cuerpo extraño en torno a las condensaciones miceliana " granos "
- b) Almacenamiento de granulación pigmentaria.
- c) Infiltración difusa.

Los granulomas peri-micelianos son muy característicos:

El grano por condensación de hifas, de color muy oscuro, castaño - rojizo con porciones negras, se halla rodeado por un sin cicio reticular de histiocitos, absolutamente desprovisto de infil tración leucocitaria, en el seno del cual por confluencia y plasmodesmosis se forman células gigantes multinucleadas. (8, 39, - 44, 66, 67).

Por fuera del anillo de histiocitos, bien limitado con respecto al tejido ambiente, se encuentra tejido conjuntivo joven con tendencia fibrótica y sumamente infiltrado por leucocitos. La infiltración se compone exclusivamente de linfocitos y monocitos, hallándose muy escaso número de leucocitos polimorfonucleares.

La infiltración peri-granulomatosa se continúa con amplias bandas de infiltración más densa, en cuyo seno existe intensa acumulación de pigmento café amorfo, granular o grumoso, en ma-

crofágos y en células multinucleadas. Las acumulaciones de pigmentos son considerables y muy densas, el pigmento es castaño oscuro, translúcido, presentándose en forma de masas esferoides o amorfas cuyo tamaño varía de 1 a 12 micras.

Continuando las bandas de almacenamiento pigmentario, se encuentran zonas de infiltración pura difusa, parvicelular, con abundantes plasmocitos (18, 57, 66, 67).

Los granulomas peri-micósicos no siempre presentan la estructura descrita. En algunos de ellos, especialmente cuando los granos son muy grandes, la corona de histiocitos proliferativos ha desaparecido; las células histiocitarias aisladas y fibroblastos jóvenes invaden el grano miceliano que está adherido y parece continuarse con el tejido que lo rodea. En éstos granos de gran tamaño (1 a 3 mm) hay células de infiltración, especialmente linfocitos con acentuada degeneración (39.)

Por fuera de estos mismos granos se observa muy escasa infiltración pues el tejido conjuntivo joven, que rodea a los granos pequeños, ha sufrido evidente esclerosis colágena (39, 44, 52).

En el corte hay fragmentos cafés a rosas (H&E) de forma variable y de tamaño hasta de un centímetro de diámetro. El grano es pequeño circular u oval, con vesículas redondas u ovals cubierto de substancia café homogénea. Con la impregnación argéntica de Hotkinss-Mac Manus se hace más visibles los filamentos y espacios, así como las vesículas del hongo.

Estos elementos con tintes rosas o negros, se distinguen fácilmente del cemento, hay filamentos bifurcados, en forma de artículos cortos, moniliformes de diámetro variable de 2 a 5 - micras. Las vesículas tienen un tamaño de 20 micras.

El cemento del grano es de color rojo con Mann, azul en Azul de Toluidina de Dominici. Los granos vesiculosos en el centro no tienen tintes y tienen pequeñas masas que se colorean de rojo con la eosina. El grano está rodeado de células reaccionales largas y prolongadas de contornos bifurcados sin borde. El cemento del grano, en gran parte es formado por el huésped, la periferia del grano es rosa, que pasa a café en el centro, probablemente por la difusión de un pigmento de los filamentos fúngicos (66, 67).

HISTOLOGIA CAUSADA POR Madurella grisea. -

Granos café claros circinados, situados en abscesos, los granos miden entre 0.4 y 2 mm de diámetro. Los elementos de la periferia del grano son más cromogénicos, con presencia de cemento café.

El cemento es granular y desaparece en la periferia quedando sólo en el centro, en la porción periférica puede haber clamidosporas, en la zona central hay hifas hialinas septadas; en ésta área se puede observar mejor el micelio con PAS y la proteína fibrosa que se extiende hasta la superficie del grano. Hay leucocitos polimorfonucleares y células plasmáticas que tienen citoplasma PAS (+) se encuentran en la superficie.

Esta zona con la de H & E es acidófila y posiblemente representa una reacción de antígeno-anticuerpo. La histiolísis aparece como una función de los elementos inflamatorios degenerativos, hay presencia de células mononucleares gigantes.

Hay colágeno, células plasmáticas y células mononucleares, está libre de tejido granular infiltrado, hay proliferación de fibroblastos. Los capilares proliferan en el endotelio.

La epidermis exhibe acantosis y espongiosis numerosos melanóforos además de otros elementos celulares. Hay hiperplasia pseudoepiteliomatosa, tejido edematosos - eritematosos, el colágeno está lisado.

La tinción de Metenamina de Plata (PAS) es positiva (6, 15, 62, 66, 67.)

El centro del grano es rosa o café con H&E, la zona periférica es café, las células reaccionales dan una banda roja irregular.

La zona periférica es roja con Mann y Azul de Dominici. El grano es menos regular (63, 62, 67, 66)

Las secciones de tejido de los granos pueden ser clasificadas - en tres grupos (5 0).

- 1.- Hongos pigmentados
- 2.- Hongos no pigmentados
- 3.- Actinomicetos (bacterias)

AGENTES CAUSANTES DE MICETOMA DE GRANOS NEGROS

--- CRITERIOS HISTOLOGICOS PARA EL DIAGNOSTICO (25) ---

	<u>Madurella grisea</u>	<u>Madurella mycetomi</u>	<u>P. romeroi</u>
A.- ZONA CORTICAL			
1) Color	C a f é	C a f é	Café oscuro dentro. Café claro fuera
2) Forma	Curvilínea	Multilobulados	Curvilínea
3) Filamentos	Café, regulares	Café regulares	Café regulares.
4) Vesículas	Cafés, pequeñas (5 a 8 micras)	Sólo en granos vesiculosos	Cafés pequeñas (5 a 8 micras)
5) Cemento intersticial	Café totalmente distribuídos	C a f é distribuído	Ausente
B.- ZONA CENTRAL			
1) Color	No coloreados o poco coloreados	No coloreados ó poco coloreados	Poco ó Ningún color.
2) Filamentos	Hialinos ó debilmente coloreados.	C a f é s	Claros, pigmento periferia.
3) Vesículas	Usualmente ausentes.	Ausentes	Ausentes
4) Cemento intersticial	Ausente	Presente	Ausente
C.- ZONA PERIFERICA DEL GRANO			
	Ausente	Banda eosinófila	Banda eosinófila

CARACTERES DE LOS GRANOS DE EUMICETOMA (50)

ORGANISMO	MACROSCOPICAMENTE		MICROSCOPICAMENTE		
	COLOR	DIAMETRO mm	COLOR INTRIN- SECO.	DIAMETRO DE FILA - MENTOS. (micras).	AFINIDAD TINTOREAL
<u>M. mycetomi</u>	negro	mayor 1 mm	café	mayor 2 mi- cras.	ninguna en particular.
<u>M. grisea</u>	negro	mayor 1 mm	café	mayor de 2 micras.	ninguna en particular.
<u>P. romeroi</u>	negro	mayor 1 mm	café	mayor de 2 micras.	ninguna en particular.
<u>L. senegalensis</u>	negro	mayor 1 mm	café	mayor de 2 micras	ninguna en particular.
<u>P. boydii</u>	blanco amarillentos	mayor 1 mm	ninguno	mayor de 2 micras.	PAS positi- vo.
<u>Especies de Cepha- losporium sp.</u>	blanco amarillentos	mayor 1 mm	ninguno	mayor de 2 micras.	PAS positi- vo.

CAPITULO IV

PARTE PRACTICA

PARTE EXPERIMENTAL - MATERIAL Y METODOS

1. - MATERIAL

- Agujas de disección
- Algodón absorbente
- Aplicadores de madera
- Barniz de uñas
- Bebederos
- Bisturí
- Cajas Cople
- Cajas petri desechables de 100 x 10 mm
- Cajas petri de vidrio de 100 x 10 mm
- Cinta adhesiva
- Cobre objetos
- Espátula de aluminio
- Frascos viales de vidrio de 5 ml con tapón de hule
- G a s a
- Gradillas de aluminio para 20 tubos
- Gradillas de aluminio para 40 tubos
- Gradillas de madera para 60 tubos
- Jeringas desechables para insulina (con agujas)
- Lápiz graso.
- Matraces Erlenmeyer de 250 ml
- Matraces Erlenmeyer de 300 ml
- Matraces Erlenmeyer de 500 ml
- Matraces aforados de 100 ml
- Matraces aforados de 500 ml
- Matraces Erlenmeyer de 125 ml.
- Mecheros Bunsen
- Morteros.

- Papel adhesivo (masking tape)
- Papel de estrasa grueso para esterilizar
- Pinzas de dientes de ratón
- Pinzas Millipore
- Pinzas para depilar
- Pipetas graduadas de 1 ml
- Pipetas graduadas de 2 ml
- Pipetas graduadas de 5 ml
- Pipetas graduadas de 10 ml
- Pistilos
- Porta objetos
- Portasas con asa micológica
- Probetas de 50 ml
- Telas de asbesto
- Tijeras de disección
- Tripie
- Tubos de ensayo de 13 x 100 mm
- Tubos de ensayo de 16 x 150 mm
- Tubos de ensayo de 22 x 175 mm
- Varillas de vidrio
- Vasos de precipitado de 250 ml
- Vasos de precipitado de 500 ml
- Vidrios de reloj

2.- EQUIPO

- Autoclave
- Balanza Analítica
- Balanza granataria
- Estufa
- Horno
- Incubadora a 28°C
- Incubadora a 37°C
- = Refrigerador
- Microscopio óptico

3. - REACTIVOS

- Acetona
- Agua destilada
- Asparagina
- Azul de algodón
- Agar Agar
- Bactopeptona
- Bálsamo de Canadá
- C e r a
- Cloruro de Potasio
- Cloruro de Sodio
- Eritrocina al 1%
- Etanol
- Formol al 10%
- Fosfato monobásico de Potasio
- Galactosa
- Gelatina nutritiva
- Glicerina
- Glucosa
- Hidróxido de Potasio al 20%
- Lactosa
- L u g o l
- Maltosa
- Metanol
- Nitrato de Potasio
- Nitrato de Sodio.
- Peptona
- Peptona de Caseína

- R e s i n a
- Rojo de Fenol
- Sacarosa
- Sulfato de Amonio
- Sulfato Ferroso
- Sulfato de Magnesio
- U r e a
- Xilol

4. - MEDIOS DE CULTIVO

- Agar dextrosa al 2% o medio de Sabouraud sólido
- Agar caseína al 5%
- Agar caseína - peptona al 1%
- Agar harina de maíz (Corn Meal Agar)
- Agar infusión cerebro-corazón (BHI Agar)
- Agar papa-peptona
- Agar papa-zanahoria
- Agar Micosel
- Base caldo Rojo de Fenol
- Infusión Cerebro - Corazón (BHI broth)
- Medio de Sabouraud líquido
- Medio de leche tornasolada
- Medio de gelatina nutritiva.

5. - FARMACOS

- Anfotericina B
- Cloranfenicol
- Diamino difenil sulfona (DDS)
- Fosfomicina
- Griseofulvina P/G micronizada
- Ketoconazol
- Rifampicina
- Sulfametoxazol - Trimetoprim

6. - PRODUCTOS BIOLÓGICOS

- Mucina Gástrica de Cerdo (Enzima)
- Adyuvante completo de Freud.

7. - ANIMALES DE EXPERIMENTACION

- Ratones blancos (Cepa Taconic)

II PARTE. - METODOS

1.- TOMA DE MUESTRA.-

Se tienen dos pacientes con Micetoma de granos negros que llegan a la consulta de micología en diferentes épocas del año para datos ver resultados. (Tabla # 1)

Se recolectan los granos de preferencia de las fístulas que no se han abierto para evitar contaminaciones posteriores en las siembras, para obtenerlos se abre la fístula, la piel es previamente limpiada con alcohol (se hace en las fístulas que están más blandas y en las que el paciente refiere que le dan comezón), después de la asepsia del área fistulizada se procede a retirar la costra o hacer una pequeña incisión (con la aguja de disección) para dejar que drene todo el material (seropurulento ó serosanguinolento) contenido en las fístulas en el que serán arrastrados los granos, que son retirados con el asa micológica, para su posterior observación y siembra (14,40).

2.- ESTUDIO MICOLOGICO.-

Procesamiento de los productos patológicos.-

2.1.- Examen directo de los granos:

Los granos obtenidos son lavados con solución salina isotónica estéril para quitar la sangre ó pus que tengan se ponen sobre un portaobjetos con una gota de Lugol ó de Potasa al 20% con un cubreobjetos encima, se dejan reposar para que sean aclarados poco a poco (14,39).

Primero se procede a observar las características macroscópicas del grano (forma, color, tamaño y consis-

tencia) y posteriormente se hace la descripción microscópica de éste.

La observación microscópica se realiza con lupa y con los objetivos de 10X y 40X, para la identificación del tipo de filamentos que los constituyen y otras características especiales.

2.2.- Limpieza de los granos:

Una parte de los granos extraídos de los pacientes son lavados con solución salina fisiológica que contiene 0.5 mg/ml de cloranfenicol, agitándolos con fuerza para lavarlos o de preferencia disgregarlos para lavarlos mejor (40,43,70)(Ver resultados tabla # II)

2.3.- Cultivo de los granos:

Los granos previamente lavados son cultivados por duplicado en; Medio Micosel, Agar Sabouraud y Agar - Infusión Cerebro Corazón al que se le adiciona cloranfenicol en solución alcohólica (0.005 mg/100 ml), son incubados a temperatura ambiente (23 a 26°C) y a 37°C durante 15 días para observar su crecimiento. (Ver resultados Tabla III).

2.4.- Características Macroscópicas:

Se observan después de un período de 15 a 30 días de crecimiento de los primocultivos. Las características esenciales que se observan son:

- Aspecto de la colonia (forma, tamaño y características especiales).

- Presencia y tipo de filamentos aéreos.
- Coloración por el anverso y reverso de la colonia
- Presencia de pigmento difusible al medio de cultivo.

2.5. - Examen microscópico de las cepas:

Para lograr alguna seguridad sobre el género del hongo causante del micetoma se recurre a la observación de las formas de reproducción, esto se logra por exámenes directos de las colonias con Azul de Algodón - los que son expuestos al microscopio. Cuando las características al examen directo de la cepa son tan escasas como en estos casos, se procede a realizar microcultivos en medios pobres como: Papa - Peptona Agar Harina de Maíz, Agar Sabouraud, Medio de Agar Papa Zanahoria y en Agar Micosel. (Resultado tablas IV y V).

Método de microcultivo:

Se esterilizan durante 45 minutos a 180°C en una caja petri dos portaobjetos, un triángulo de vidrio (en el fondo de la caja se coloca un papel filtro para lograr la cámara húmeda), aparte se prepara el medio que será utilizado y se vacía en una caja petri estéril, el medio se fragmenta en cuadros y se depositan dos de ellos en los portaobjetos separados, todo en área estéril; el hongo se siembra en los cuatro lados del cuadro de medio y se coloca encima el portaobjetos, se le agrega agua glicerizada estéril (10%) para evi -

tar la desecación del medio, todo lo anterior se hace para respetar las estructuras del hongo y posteriormente teñirlo, de la siguiente manera:

- 1.- Retirar el exceso de medio (en área estéril).
- 2.- Fijar con alcohol metílico ambos portabbbjetos.
- 3.- Teñir con eritrocina al 1% con emisión de vapores durante 10 a 15 minutos.
- 4.- Quitar el exceso de colorante con alcohol etílico.
- 5.- Poner los portaobjetos en cajas de Cople que contienen acetona durante 10 minutos.
- 6.- Poner los portaobjetos en una mezcla de acetona-Xilol (50% v/v) durante 10 minutos.
- 7.- Después se ponen en Xilol durante 10 minutos más (en éste paso se puede interrumpir el proceso para después hacer el montaje).
- 8.- Montar con bálsamo de Canadá o Resina (dejar secar) (14,43).
- 9.- Observar al microscopio.

2.6.- Biopsias de los pacientes:

Para observar la presencia de granos en cortes histológicos, se manda hacer biopsias de los pacientes y su posterior tinción de ellas con H & E, Grocott y Gomori (PAS). (Tabla VIII).

3.- ESTUDIO DE LAS CEPAS.-

3.1.- Examen directo:

Se efectúa el examen con Azul de Algodón y cinta adhesiva de ambas cepas en medios como: Papa Peptona, - Agar Harina de Maíz, Agar Sabouraud, medio de Agar Papa Zanahoria, Agar Micosel, Agar Caseña al 5% y - Agar Caseña Peptona.

3.2.- Microcultivo:

Se realiza por el método descrito en la sección 2.5 en diferentes medios como: Papa - Zanahoria, medio de - Agar Sabouraud, medio de Agar Papa - Peptona, que - fueron teñidos con eritrocina.

3.3.- Medios especiales:

Debido a la dificultad de lograr desde el aislamiento y posterior crecimiento e identificación de las formas reproductivas se hacen siembras en medios pobres (medio papa - peptona, medio peptonado, medio harina de maíz medio de papa=zanahoria.) para obligar al hongo a formar mayor cantidad de formas de reproducción, además de sembrarlos en medios ricos para observar la formación de características especiales, tales medios son: (agar caseña al 5%, agar caseña peptona al 1% y agar infusión cerebro-corazón) (Resultados tablas IVyV).

3.4.- Pruebas bioquímicas:

Estas pruebas comprenden las que nos darán la mayor parte de la información acerca del género y nos podrán ayudar a determinar la especie, en éstas pruebas -

se comprenden:

1.- Prueba de temperatura óptima de crecimiento.-

Se hace mediante cultivos en medios habitualmente usados en micología (papa-peptona, agar harina de maíz, medio de Sabouraud sólido, medio micosel - sólido, papa zanahoria agar y medio de infusión - cerebro corazón) los que son sembrados e incubados a 28°C y a 37°C (todo ésto por duplicado) el crecimiento será observado a los 7, 15 y 30 días.

2.- Prueba de asimilación de fuentes de carbono.-

Es en la que se utiliza el medio sugerido por Mackinnon (ver sección 5), adicionado de los carbohidratos (glucosa, maltosa, lactosa, sacarosa) en los que se siembran ambas cepas y se observa el crecimiento y asimilación del azúcar.

3.- Asimilación de fuentes de nitrógeno se emplea también el medio sugerido por Mackinnon (33, 34) pero adicionado de fuentes de nitrógeno orgánicas e inórgánicas como son: (nitrato de sodio, nitrato de potasio, sulfato de amonio, asparagina y urea), se observan a los 7, 15 y 30 días su crecimiento y utilización de la fuente de nitrógeno.

4.- Licuefacción de gelatina usando el medio especial para este fin y usando temperatura ambiente en ambas cepas, observando el crecimiento a los 7, 15, 30 días para observar si ha habido licuefacción de la gelatina.

5.- Prueba de utilización de la caseína.-

Se hace en el medio especial para ello, con incubación a temperatura óptima de cada una de las cepas y observándose el crecimiento a los 7, 15 y - 30 días.

En todos los medios anteriores se observa la forma, color, tamaño, características especiales y pigmentos disolubles al medio de ambas cepas, así como el tamaño del crecimiento colonial y el vire del indicador para - medir la utilización de las diferentes sustancias. (re- sultados ver tabla VI).

3.5.- Estudio de sensibilidad a Fármacos "in vitro"

El método empleado es el de diluciones en tubo (23,64) efectuado en infusión cerebro corazón para M. mycetomi y en caldo Sabouraud para M. grisea se han utilizado - estos medios porque permiten un buen desarrollo de las cepas además de ser de fácil preparación y manejo.

Los fármacos probados son: Anfotericina B, Diaminodi- fenil sulfona, Fosfomicina, Griseofulvina P/G microni - zada, Ketoconazol, Rifampicina y Sulfametoxazol.- Trime toprim. (4,12,37).

Los intervalos de concentración empleados son los que - han sido probados para ambas cepas como mínimos y - máximos inhibitorios tomándose en cuenta sus niveles - en plasma, ampliándose más para observar sus efectos.

El método de las diluciones consiste a grandes rasgos:

- En hacer una dilución del fármaco de concentración

conocida en el disolvente adecuado.

- A partir de esta dilución hacer la demás: si es en medio sólido, se agregarán al medio que se utilicen, si se efectúa como en éste caso, en medio líquido - se tomará en cuenta el volumen de medio para saber cuanto de la dilución debe añadirse para obtener la concentración final deseada.
- Teniendo ya todas las concentraciones en que se van a probar los diferentes fármacos, se adiciona un crecimiento homogéneo de las cepas en cantidad constante (cultivo homogéneo en medio líquido 0.5 ml). La cantidad de medio utilizado también es constante 5 - ml, lo que varía es la cantidad de dilución que se adiciona para obtener la concentración deseada. (37, 64) (Ver resultados tabla VII).

4.- ESTUDIO DE PATOGENICIDAD DE LAS CEPAS "IN VIVO"

Se efectúa en ratones blancos cepa Taconic, para observar la capacidad de causar alguna lesión de tipo micetoma.

- 4.1.- Para la inoculación de los ratones se usó el método de - la mucina (Mucina al 5% más triturado de colonias) con - la modificación del empleo de adyuvante Completo de - Freud para potencializar su acción . (22,21,26).

El inóculo será de 20 mg/ml. de cepa, inoculándose 0.1 ml en el cojinete plantar de 4 ratones por cada cepa, te niendo además ratones testigos que son inoculados única mente con solución de Mucina al 5% preparada en solu - ción salina isotónica estéril. Se efectúan 3 inoculacio - nes: una en la forma mencionada y las dos siguientes -

empleando el Adyuvante de Freud 0.05 ml y 0.05 ml del triturado de la colonia más Mucina (5%) también por inoculación en el cojinete plantar, todas las inoculaciones - anteriores se hacen en condiciones estériles para evitar infecciones y contaminaciones con otros microorganismos, que pudieran dar falsas positivas.

A los cuatro meses son sacrificados los animales, efectuándose examen directo, cultivo y biopsias de las patas y otros órganos en los que hay posibilidad de presencia de granos (21).

Las biopsias se procesan y se tifican con H & E para observar alguna reacción inflamatoria o formación de granos.

4.2.- Muerte de los ratones.-

El método empleado es el de descerebración que es el - más adecuado por no causar cambios en los tejidos, después son abiertos y se les extrae hígado, pulmones y corazón, se les corta la pata por ser los órganos más susceptibles a la proliferación del eumicetoma.

4.3.- Procesamiento de las muestras:

Se cortan pequeños pedazos de los diferentes órganos extraídos y se siembran enmedios de Sabouraud, Infusión - Cerebro - Corazón Agar a sus temperaturas óptimas respectivas, para observar si hay algún crecimiento, se observa a los 7, 15 y 30 días.

Se hacen exámenes directos de pequeños pedacitos de los órganos para observarlos al microscopio. El resto de - los órganos se envía al laboratorio de Histopatología para su procesamiento y tinción (Resultados tabla IX).

4.4.- Lecturas. -

Las lecturas de los cultivos se realizan a los 7, 15, 30 y 60 días para poder observar si hay algún desarrollo de las cepas.

5.- MEDIOS USADOS - (Fórmula y Preparación).

a) Medio Sabouraud:

Fórmula: Dextrosa ----- 40 grs.
 Peptona ----- 10 grs.
 Agar ----- 20 grs.
 Agua destilada ----- 1000 ml.

Se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos a 15 lbs de presión. Si se usa Caldo no se le agrega Agar.

Se distribuye en tubos en volumen de 8 a 10 ml y se inclina antes de que solidifique el medio (14, 43, 51, 66).

b) Medio Micosel:

Su fórmula es igual que la del medio Sabouraud, la diferencia es que se le adicionan antibióticos en la siguiente proporción:

Actidione(Ciclohexamida) ---- 400 mg/lt
Cloranfenicol ----- 50 mg/lt

El primero se disuelve en 5 ml de acetona y el segundo en 5 ml de alcohol etílico, se adicionan una vez que el medio ha hervido, se integra, se esteriliza de igual manera que el anterior (43. 51).

c) Medio Papa - Zanahoria:

Fórmula:	Pulpa de Zanahoria - - - - -	20 grs.
	Pulpa de Papa - - - - -	20 grs.
	A g a r - - - - -	18 a 20 grs
	Agua destilada - - - - -	1000 ml.

Las pulpas se pesan y se fragmentan en pequeñas porciones, se hierven a fuego lento durante 1 hora, se cuelean, se les adiciona el agar y más agua si hace falta por la que se haya evaporado a completar el litro se calienta para disolver el agar, se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 min. a 15 lbs. de presión. (51,66).

d) Medio Agar Papa-Peptona:

Fórmula:	Pulpa de papa - - - - -	20 grs.
	Peptona - - - - -	10 grs.
	A g a r - - - - -	18 a 20 grs
	Agua destilada - - - - -	1000 ml.

Se hierva la pulpa de papa durante 1 hora con el agua, se cuele y después se le adiciona la peptona y el agar se calienta para disolver el agar y se esteriliza a 121°C, durante 15 minutos a 15 lbs. de presión.

Los medios son distribuidos en los tubos en cantidad de 8 a 10 ml y después de esterilizados se inclinan (si son sólidos)

e) Medio Agar Infusión Cerebro Corazón:

Se pone el medio de Infusión Cerebro Corazón en la cantidad que se requiere para el volumen de medio y se le adiciona el agua destilada y el agar, se calienta hasta que se deshace el agar y se esteriliza igual que los anteriores.

f) Medio de Agar Harina de Maíz:

Harina de Maíz (Corn Meal) en la cantidad sugerida según la casa que la fabrica.

Fórmula: A g a r ----- 20 grs.
 Agua destilada----- 1000ml

Se distribuye y esteriliza de la misma manera que - las anteriores.

g) Medio de Agar Caseína al 5%:

Fórmula: A g a r ----- 20 grs.
 Peptona de caseína ----- 5 grs.
 Agua destilada----- 100 ml.

Se distribuye en los tubos y se esteriliza a 121°C - durante 15 minutos a 15 lbs. de presión.

h) Medio de Agar Caseína Peptona

Fórmula: A g a r ----- 20 grs.
 Peptona ----- 1 grs.
 Peptona de Caseína ----- 1 grs.
 Agua destilada ----- 100 ml.

i) Medio para la utilización de Carbohidratos:

Sugerido por Mackinnon (33, 34).

Fórmula: Fosfato Monobásico de Potasio - 1.0 grs;
 Sulfato de Magnesio -----0.5 grs.
 Cloruro de Potasio ----- 0.5 grs.
 Sulfato ferroso ----- 0.01 grs
 Asparagina ----- 1.5 grs.

Peptona ----- 10 grs.
 A g a r ----- 20 grs.
 Púrpura de Bromocresol - - 15 ml
 (sol. acuosa al 0.04%).
 Agua destilada ----- 1000 ml

Al medio anterior se le hicieron algunas modificaciones, se usó el Caldo Rojo de Fenol Base, medio líquido para la determinación de reacciones de fermentación de azúcares. Ya que su constituyente principal es la Peptona de Caseña carente de hidratos de Carbono.

Fórmula: Trypticase ----- 10 grs/lt.
 Cloruro de Sodio ----- 5 grs/lt.
 Rojo de Fenol----- 0.018 gr/lt

pH 7.4 ±. Se le adicionan los ingredientes restantes y se esteriliza a 121°C durante 15 minutos (15 lbs - de presión) se enfría a 45°C, para adicionarle la solución del azúcar, previamente esterilizada.

Los azúcares se preparan en soluciones al 20% que son esterilizadas a 115°C durante 10 minutos, estas soluciones son adicionadas al medio anterior en proporción de 20 gotas en cada 8 ml de medio.

Estas pruebas se hicieron por duplicado tanto en tubos - como en cajas, con un inóculo uniforme y como previamente se ha determinado la temperatura óptima de crecimiento de ambas cepas se incuban a éstas y las lecturas de resultados se hacen a los 7, 15 y 30 días. -

Teniendo controles a los que no se les adiciona el azúcar, sólo 20 gotas de agua destilada estéril.

J) Medio para la utilización de fuentes de nitrógeno:

Mackinnon (31, 33).

Fórmula:

Fosfato monobásico de Potasio --	1.0 grs.
Sulfato de Magnesio -----	0.5 grs.
Cloruro de Potasio -----	1.0 grs.
Sulfato ferroso -----	0.01 grs
Dextrosa -----	30 grs.
Glicerina -----	50 grs.
A g a r --	20 grs.
Agua destilada -----	1000ml.

Rojo de fenol (fenolsulfonaftaleína) 0.02% (disuelto en etanol), que tiene un intervalo de pH de 6.8 a 8.4 (Vire de Amarillo a Rojo), en ambos medios se hace el ajuste del pH entre - 7.2 y 7.4

Se ponen en tubos 8 ml. Se esterilizan y se adicionan 20 - gotas del compuesto nitrógenado (urea al 2%, asparagina al 2%, nitrato de potasio al 1%, bactopectona 10%) previamente esterilizados a 115°C durante 10 minutos. Se hacen las lec turas a los 7, 15, 30 días. Se tienen controles sin fuente - de Nitrógeno a los que se les adicionan 20 gotas de agua - destilada estéril.

También se efectúa en cajas, el inóculo es uniforme para - todas estas pruebas.

K) Medio para licuefacción de Gelatina:

Fórmula: Gelatina ----- 120 grs.
 Infusión Cerebro Corazón --- 25 grs.
 Agua destilada-----1000 ml.
 pH 7.2 a 7.4

Se puede usar la Gelatina nutritiva que se utiliza para -
bacterias, este es el siguiente:

 Polipeptona ----- 5.0 grs
 Extracto de carne de res --- 3.0 grs
 Gelatina ----- 120 grs.
 pH final 6.8 ±

Se esteriliza a 121°C a 15 lbs. de presión durante 15 min

1) Leche tornasolada:

Se compone de leche descremada deshidratada y torna-
sol para producir el color lavanda.

Se esteriliza a 113 ó 115°C durante 20 minutos (15 lbs
de presión), se deberá evitar el calor excesivo porque
carameliza la leche.

R E S U L T A D O S

TABLA # 1

DATOS DE LOS PACIENTES DE MICETOMA DE GRANOS NEGROS.

Iniciales	H.M.J	P. C. J. M.
Sexo	Masculino	Masculino
Edad	23 años	13 años
Ocupación	Vaquero	Escolar
Procedencia	Estación Tamuín San Luis Potosí	Ejido San Rafael Guasave. Sin.
Localización	Pie izquierdo	Dorso y borde - lateral del pie - izquierdo.
Evolución	1 año, 3 meses	4 años, 6 meses
No. Micológico	254-82	50-83
No. expediente	3094-82	566-83

Ambos pacientes llegaron a la consulta externa del Servicio de - Dermatología del Hospital General de México (S.S.A.) en diferen - tes fechas y después mandados al Laboratorio de Micología del - mismo servicio para el estudio e identificación de los agentes - - etiológicos. En el servicio de Histopatología del mismo hospital - se hizo el estudio de sus biopsias.

TABLA # II

DESCRIPCION DE LOS GRANOS OBTENIDOS DE AMBOS PACIENTES

Características macroscópicas:

	"254-82 (H.M.J.)	"50-83" (P.C.J.M.)
Forma:	Redondos u ovales - irregulares.	Redondos irregulares.
Color	café obscuro	Negro carbón.
Tamaño	0.5-4 mm (agregados)	1.0 a 4 mm(agregados)
Consistencia	Blandos	Duros, ceden a la <u>pre</u> sión.
	254-82 (H.M.J.)	50-83 (P.C.J.M.)

Características microscópicas:

Granos filamentosos formados por hifas gruesas hialinas y - fuliginosas. Pigmentadas de color café claro.	Granos filamentosos con hifas gruesas de aproximadamente 2 - μ o más, presentan clamidosporas, pig- mentados color café ocre.
--	---

TABLA # III

DESCRIPCION DE LOS PRIMOCULTIVOS

Los granos obtenidos de los pacientes, previamente lavados con solución que contiene cloranfenicol son sembrados en los medios usuales para el estudio micológico.

Los diferentes medios de cultivo son incubados a temperatura ambiente (23 a 26°C) y a 37°C, debido a que la cepa 50-83 sólo creció en Medio de Agar Infusión Cerebro Corazón, se hará únicamente esa descripción.

	254-82	50-83
<u>MEDIO SABOURAUD</u>	(sólido)	sin crecimiento
<u>Anverso</u>		
Forma	colonia extendida, vellosa.	sin crecimiento
Color	Gris	
Tamaño	Se extiende rápidamente en el medio a temp. amb.	
Características especiales	Micelio aéreo, corto, gris-blanquecino.	
<u>Reverso</u>		
Pigmento:	No hay pigmento difusible al medio, en el reverso presenta tonos oscuros (negros)	
Características Microscópicas:	Hifas gruesas, hialinas o fuliginosas septadas muy numerosas.	

TABLA # 111

Continuación....

254-82

50-83

MEDIO MICOSEL

Sin crecimiento

Características
Macroscópicas:

Anverso:

Forma:

Colonia vellosa, -
acuminada muy ex
tendida.

Color:

G r i s

Tamaño:

CreCIMIENTO muy -
rápido a tempera -
tura ambiente

Características
especiales

Micelio aéreo cor -
to, color gris - -
blanquecino.

Reverso:

Pigmento:

Sin pigmento difusi
ble al medio, colo
nia oscura.

Características
Microscópicas:

Hifas hialinas y -
otras de tonos ca -
fés, septadas.

TABLA # III

Continuación:...

MEDIO DE AGAR INFUSION CEREBRO CORAZON (BHI).

	254-82	50-83
Características Macroscópicas:		
<u>Anverso:</u>		
Forma:	Colonia vellosa - acuminada.	Medio adicionado de cloranfenicol 0.005% colonia - poco vellosa.
Color ;	Gris	Beige
Tamaño	Crece mejor a - temperatura ambiente.	Mejor crecimiento a 37°C.
Características especiales:	Micelio aéreo - gris blanquecino, abundante, corto.	Micelio aéreo pequeño, color beige, presencia de estriaciones.
<u>Reverso:</u>		
Pigmento:	Sin pigmento difusible al medio, - colonia oscura.	Café - Ocre difusible al medio.
Características Microscópicas:	Hifas hialinas y - otras fuliginosas, septadas gruesas.	Hifas gruesas, - con presencia de clamidosporas - aisladas o en grupo de color café oscuro.

Ambas cepas tienen una temperatura en que su crecimiento es más abundante, para la cepa 254-82 es temperatura ambiente y para la 50-83 crece mejor a 37°C.

TABLA # IV

DESCRIPCION DE LAS COLONIAS EN MEDIOS ESPECIALES

De las colonias obtenidas de primocultivo en los medios ya mencionados en la Tabla III, se hacen subcultivos en medios pobres que nos dan más características microscópicas (formas reproductivas), estos medios son usados asimismo para realizar los microcultivos que nos darán formas especiales de reproducción para hacer la identificación de la especie, pues con el estudio histopatológico se identificó el género.

	254-82	50-83
<u>AGAR PAPA</u> <u>PEPTONA</u>		
Características Macroscópicas:		
<u>Anverso:</u>		
Forma	Colonia vellosa, - delimitada y acu- minada.	Colonia vellosa blanca, cerebri- forme.
Color	G r i s	Blanca-beige - (blanca sucia).
Tamaño	Poco crecimiento a 37°C, bueno a - temperatura am- biente. (5 cms.)	Crecimiento - abundante a 37°C (2 cm). poco a temp. - ambiente.
Características especiales	Micelio aéreo cor- to, de color gris- blanquecino.	<u>Presencia de -</u> <u>Esclerotes.</u>

TABLA IV

Continuación.....

	254-82	50-83
<u>Reverso:</u>		
Pigmento:	Sin pigmento difusible, color - oscuro an <u>colonia</u>	Pigmento difusible ocre-tonos- <u>cepias</u> .
Características Microscópicas:	Hifas gruesa, <u>hialinas</u> o fuliginosas septadas, escasas clamidosporas.	Hifas gruesas, - presencia de <u>clamidosporas aisladas</u> o en grupos- color café.
<u>AGAR HARINA DE MAIZ</u>		
Características Macroscópicas:		
<u>Anverso:</u>		
Forma:	Colonia vellosa, - acuminada micelio aéreo blanco.	Colonia vellosa, - blanca-sucia.
Color:	G r i s	Blanca-beige.
Tamaño:	2.5 cm a temp. - ambiente.	2.5 cm a 37°C
Características especiales:	Abundante forma - ción de micelio - aéreo grisáceo.	<u>Presencia Escle- rotes</u>
<u>Reverso:</u>		
Pigmento:	Obscuro, no difun de al medio.	Poco pigmento - ocre difusible.
Características Microscópicas	Hifas gruesas fuligi nosas o hialinas sep tadas, algunas clami dosporas	Hifas gruesas con clamidosporas a- bundantes color - obscuro(fuliginosas)

TABLA # IV

Continuación.....

	254-82	50-83
<u>AGAR SABOURAUD</u>		
Características Macroscópicas:		
<u>Anverso:</u>		
Forma:	Colonia vellosa, acuminada.	a 37°C colonia vellosa, peque ña. Temperatu ra ambiente - sin crecimien to a 25°C.
Color:	Gris, tonos ro - jizos.	Café- Beige.
Tamaño:	Temp. ambiente (8 cm), mejor - desarrollo que a 37°C.	a 37°C alcanza 0.7 cms.
Características especiales:	Abundante forma ción de micelio aéreo.	Colonias peque ñas delimitadas, micelio aéreo - corto
<u>Reverso:</u>	Sin pigmento di - fusible.	Color ocre difu sible.
Características Microscópicas:		

NOTA: En todos los medios especiales se presentan las mismas para la cepa 254-82 (micelio abundante grueso, fuliginoso y hialino - septado en ocasiones algunas clamidosporas, ésto fue observado tam
bién en los microcultivos).

TABLA # IV

Cóntinuación.....

La cepa 50-83 presenta mayor cantidad de características reproductivas tanto en el microcultivo, en el que se observan fialides en una sola ocasión a pesar de ser repetido, se observan abundantes clamidosporas en grupo o aisladas e hifas gruesas fuliginosas. Por lo anterior, no se harán las descripciones microscópicas en los medios especiales.

AGAR PAPA ZANAHORIA	254-82	50-83
Características Macroscópicas:		
<u>Anverso:</u>		
Forma:	Colonia vellosa, acuminada.	Colonia vellosa, cerebriforme.
Color:	Grisácea - blanquecina.	Beige - blanco.
Tamaño:	6 cm al mes de crecimiento a temperatura ambiente.	2.5 cm después de un mes de incubación a 37° C
Características especiales:	Presencia de pequeños <u>Esclerotes</u> negros, sólo en este medio.	<u>Presencia de - Esclerotes</u> abundantes
<u>Reverso:</u>		
Pigmento:	Tonos oscuros <u>de</u> trás de la colonia, sin pigmento <u>difusi</u> ble.	Pigmento <u>difusi</u> ble ocre.

TABLA # IV

Continuación.....

	254-82	50-83
<u>AGAR INFUSION</u> <u>CEREBRO - CO-</u> <u>RAZON.</u>		
Características Macroscópicas:		
<u>Anverso:</u>		
Forma:	Colonia acuminada, vellosa.	Colonia cerebriforme.
Color:	Grisáceo.	Beige
Tamaño:	Buen crecimiento.	Mejor crecimiento a 37°C (3cm) al mes de incubación.
Características especiales:	Micelio aéreo abundante	Abundante formación de <u>Esclerotas</u> .
<u>AGAR BHI</u>		
Pigmento:	Sin pigmento difusible	Abundante pigmento ocre que difunde al medio.

TABLA # IV

Continuación.....

	254-82	50-83
<u>AGAR MICOSEL</u>		
Características Macroscópicas		
<u>Anverso:</u>		
Forma:	Colonia vellosa, acuminada y de limitada	Colonia con vello corto, cerebriforme.
Color:	Tonos rojizos	Beige
Tamaño:	6 cm al mes de incubación a temperatura ambiente.	Al mes de incubación a 37°C (2.8 cm).
Características especiales:	Bastante desarrollo de micelio aéreo.	Micelio aéreo corto.
<u>Reverso:</u>		
Pigmento:	Negro, no difusible.	Pigmento marrón ocre que difunde al medio.
<u>AGAR CASEINA</u> <u>AL 5%</u>		
Forma:	Colonia vellosa, - obscura, acuminada con halo veloso blanco.	Colonia poco vello-cerebriforme
Color:	Gris oscuro (negro)	Blanco-beige tonos oscuros
Tamaño:	Buen crecimiento - 2-3 cms.	Muy buen crecimiento a 3 a 4 cms.
Caract. esp.	Micelio aéreo gris	Micelio aéreo corto
Pigmento:	Sin pigmento difusible.	Pigmento difusible - ocre.

TABLA # IV

Continuación.....

	254-82	50-83
<u>AGAR CASEINA</u> <u>PEPTONA</u>		
Forma:	Colonia vellosa, poco acuminada.	Colonia poco vellosa, cerebri-forme.
Color:	Gris	Beige
Tamaño:	3 cm al mes de incubación a temperatura amb.	3.5 cm al mes de incubación a 37°C.
<u>Reverso:</u>		
Pigmento:	Sin pigmento difusible al medio.	Poco pigmento ocre difusible al medio.

Los esclerotes son estructuras que aparecen en los medios de cultivo, se piensa que son formas de resistencia que tienen mucha semejanza con los granos de los agentes etiológicos.

NOTA:

Las características dadas son leídas cada semana por intervalos de un mes, todos los medios se emplearon en duplicado tanto para su incubación a temperatura ambiente como a 37°C las lecturas reportadas, después de un mes de incubación.

TABLA # V

RESUMEN DE LAS CARACTERISTICAS DE M. mycetomi EN LOS MEDIOS ESPECIALES.

CEPA 50-83 TEMPERATURA OPTIMA 37°C

<u>M E D I O S</u>	<u>CARACTERISTICAS MACROSCOPICAS</u>	<u>CARACTERISTICAS MICROSCOPICAS</u>	<u>CARACTERISTICAS ESPECIALES</u>
AGAR PAPA PEPTONA	Colonia vellosa blanca-beige, cerebriforme. Pigmento ocre difusible.	Presencia de hifas gruesas, clamidosporas abundantes.	<u>Esclerotes.</u>
AGAR HARINA DE MAIZ	Colonia de vello corto, blanco sucia, poco pigmento ocre, difusible.	Clamidosporas, hifas gruesas.	<u>Esclerotes.</u>
AGAR SABOURAUD.	Colonia beige, cerebriforme, poco vellosa con pigmento ocre difusible.	Abundantes clamidosporas.	
AGAR PAPA-ZANAHORIA.	Colonia beige-blanco sucio, cerebriforme, con vello corto, pigmento ocre difusible.	Clamidosporas, hifas fuliginosas y <u>FLALIDES</u>	<u>Esclerotes.</u>
AGAR BHI	Colonia beige, cerebriforme, poco micelio aéreo, abundante pigmento ocre difusible.	Clamidosporas, hifas fuliginosas	Abundante formación de <u>ESCLEROTES.</u>
AGAR MICOSEL.	Colonia beige, cerebriforme con micelio aéreo corto, pigmento difusible ocre	Clamidosporas, hifas fuliginosas	

TABLA # V

Continuación

<u>M E D I O S</u>	<u>CARACTERISTICAS MACROSCOPICAS</u>	<u>CARACTERISTICAS MICROSCOPICAS</u>	<u>CARACTERISTICAS ESPECIALES</u>
AGAR CASEI- NA AL 5%	Colonia beige, - crece más que - en otros medios, micelio aéreo - corto, pigmento ocre.	Clamidosporas, hi fas fuliginosas. - gruesas	
AGAR CASEI- NA PEPTONA	Colonia beige, - cerebriforme, - con poco pigmen to difusible.	Clamidosporas hi fas fuliginosas - - gruesas.	

TABLA # V

RESUMEN DE LAS CARACTERISTICAS DE M. grisea EN LOS MEDIOS ESPECIALES.

CEPA 254-82 TEMPERATURA OPTIMA 30°C

<u>M E D I O S</u>	<u>CARACTERISTICAS MACROSCOPICAS</u>	<u>CARACTERISTICAS MICROSCOPICAS</u>	<u>CARACTERISTICAS ESPECIALES</u>
AGAR PAPA-PEPTONA.	Colonia con micelio aéreo abundante gris, sin pigmento, difusible, acuminada.	Hifas gruesas, - septadas, escasas clamidosporas.	Abundante micelio aéreo, grisáceo.
AGAR HARI-NA DE MAIZ	Colonia acuminada, gris vellosa, sin pigmento difusible.	Hifas gruesas, - septadas, hialina y fuliginosas, escasas clamidosporas.	
AGAR SABOU-RAUD	Colonia acuminada gris, tonos rojizos abundante micelio aéreo.	Hifas gruesas, - septadas, hialina y fuliginosas, escasas clamidosporas.	
AGAR PAPA-ZANAHORIA.	Colonia gris, con abundante micelio aéreo gris-blanco sin pigmento difusible.	Hifas hialinas y fuliginosas, gruesas escasas clamidosporas.	Presencia de <u>Esclerotes.</u>
AGAR BHI	Colonia acuminada vellosa, gris, sin pigmento difusible.	Hifas hialinas y fuliginosas, presencia de clamidosporas.	

TABLA # 5

Continuación.....

<u>M E D I O S</u>	<u>CARACTERISTICAS MACROSCOPICAS</u>	<u>CARACTERISTICAS MICROSCOPICAS</u>	<u>CARACTERISTICAS ESPECIALES</u>
AGAR MICO- SEL	Colonia vellos, acu- minada, delimitada, con abundante micedio aéreo, sin pig- mento difusible.	Hifas hialinas y - fuliginosas, septa- das gruesas, con presencia de clami- dosporas.	
AGAR CASEI NA AL 5%	Colonia vellosa, obs- cura, acuminada, - con halo vellosoblan- co.	Hifas hialinas y - fuliginosas, septa- das gruesas, con presencia de algu- nas clamidosporas	
AGAR CASEI NA PEPTONA	Colonia vellosa, po- co acuminada, gris, sin pigmento difusi- ble.	Hifas hialinas y - fuliginosas, clami- dosporas.	

TABLA # VI

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS BIOQUIMICAS

Características	254-82	50-83
Temperatura óptima:	30°C	37°C
Pigmento difusible:	Ninguno	Café - ocre
Asimilación de:		
Glucosa	+	+
Maltosa	+	+
Lactosa	-	+ (Esclerotes)
Sacarosa	+	- (Esclerotes)
Nitrato de Potasio	+	+ (Esclerotes)
Sulfato de Amonio	+	+
Asparagina	+	+
U r e a	+	+ (Esclerotes)
Peptona	+	+
Licuefacción de Gelatina	++	+++
Proteolisis de la Leche	<u>±</u>	<u>±</u>
Color del grano	Negro	Negro

(Esclerotes): En esos medios hubo formación de esclerotes.

De acuerdo con las características de histopatología y examen directo de los granos, los resultados de utilización de las fuentes de carbono, nitrógeno, licuefacción de la gelatina y proteolisis de la leche, así como la temperatura óptima de crecimiento y la macroscopía y micromorfología colonial se pudo identificar ambas cepas como sigue: (32, 38, 65).

Cepa 254-82

Madurella grisea

Cepa 50-83

Madurella mycetomi

TABLA # VI

Continuación

SIMBOLOGIA

- + Vire del medio de rojo a amarillo, con abundante crecimiento de la cepa.
- Sin vire del medio y con escaso crecimiento.
- ++ Utilización de la substancia probada, con buen crecimiento.
- +++ Utilización del substrato probado, con excelente crecimiento.
- ± Poca utilización del producto probado y muy escaso crecimiento.

TABLA # VII

PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A FARMACOS "in vitro"

Los intervalos empleados en éstas pruebas se eligen de acuerdo con los niveles encontrados en plasma con las dosis terapéuticas empleadas con los diferentes fármacos y han sido monitoreados en pacientes tratados con ellos (4, 12, 8, 37, 48, 64) para observar los efectos de los medicamentos, se han ampliado los intervalos.

<u>FARMACO</u>	<u>DOSIS TERAPEUTICA</u>	<u>NIVELES EN PLASMA.</u>
Anfotericina B	0.5 a 1.0 grs.	0.5 a 2 μ g/ml
Diaminodifenil sulfona	50 a 100 mg.	20 a 100 μ g/ml
Fosfomicina	0.5 a 1 gr.	4 y 5.5 respectivamente (μ g/ml).
Griseofulvina P/G (micronizada)	0.5 a 1 gr.	0.25 a 3.75 - - μ g/ml.
Rifampicina	600 mg	7 a 12 μ g/ml.
Sulfametoxazol - Trimetoprim	2 a 4 gr.	1.10 a 2.5 μ g/ml
Ketoconazol	200 mg.	0.78 a 1.56 μ g/ml

NOTA:

Las pruebas de sensibilidad se realizan a las temperaturas óptimas - y las lecturas se realizan a la semana, 15 días y al mes, los resultados reportados son los finales.

...

TABLA # VII

Continuación

<u>DILUCION DEL FARMACO</u>	<u>M. Mycetomi</u>	<u>M. grisea</u>
(Mg/ml)	(50-83)	(254-82)
KETOCONAZOL		
Control	+++	+++
0.2 μ g/ml	++	++
0.4 μ g/ml	+	++
1.0 μ g/ml	Inhibido	++
2.0 μ g/ml	Inhibido	Inhibido
4.0 μ g/ml	Inhibido	Inhibido
6.6 μ g/ml	Inhibido	Inhibido
GRISEOFULVINA - P/G MICRONIZADA		
0.2 μ g/ml	+++	+++
0.6 μ g/ml	+++	+++
1.0 μ g/ml	+++	+++
2.0 μ g/ml	++	++
6.0 μ g/ml	++	++
8.0 μ g/ml	+	++
10.0 μ g/ml	+	++
20.0 μ g/ml	+	++
Control	+++	+++
ANFOTERICINA B		
Control	+++	+++
0.2 μ g/ml	+++	+++
0.6 μ g/ml	++	++
1.0 μ g/ml	+	++
2.0 μ g/ml	Inhibido	+
4.0 μ g/ml	Inhibido	+
8.0 μ g/ml	Inhibido	+
16.0 μ g/ml	Inhibido	+
32.0 μ g/ml	Inhibido	Inhibido

TABLA # VII

Continuación

DILUCION DEL FARMACO	<u>M. mycetomi</u>	<u>M. grisea</u>
DIAMINO DIFENIL SULFONA: (DDS).		
14.0 μ g/ml	++	++
28.0 μ g/ml	+	+
50.0 μ g/ml	Inhibido	Inhibido
100.0 μ g/ml	Inhibido	Inhibido
160.0 μ g/ml	Inhibido	Inhibido
Control	+++	+++
SULFAMETOXAZOL/ TRIMETOPRIM.		
Control	+++	+++
0.4 μ g/ml	+++	++
0.8 μ g/ml	++	+
1.4 μ g/ml	++	+
2.0 μ g/ml	+	+
4.0 μ g/ml	+	Inhibido
6.0 μ g/ml	+	Inhibido
12.0 μ g/ml	+	Inhibido
RIFAMPICINA		
1.0 μ g/ml	+++	+++
6.0 μ g/ml	+++	+++
10.0 μ g/ml	++	++
14.0 μ g/ml	++	+
18.0 μ g/ml	++	+
20.0 μ g/ml	++	+
Control	+++	+++

TABLA # VII

Continuación

DILUCION DEL FARMACO	<u>M. mycetomi</u>	<u>M. grisea</u>
FOSFOMICINA		
Control	+++	+++
2.0 $\mu\text{g/ml}$	++	++
3.0 $\mu\text{g/ml}$	++	++
4.0 $\mu\text{g/ml}$	++	+
5.0 $\mu\text{g/ml}$	+	+
6.0 $\mu\text{g/ml}$	+	+
SIMBOLOGIA:		

+++ Excelente crecimiento (comparable con el que se obtiene en los controles).

++ Buen crecimiento, poca inhibición del crecimiento con respecto al de los controles

+ Escaso crecimiento; inhibición bastante marcada con respecto al crecimiento en los tubos de control.

± Muy escaso crecimiento; poco desarrollo con respecto al control

Inhibición

Sin crecimiento a partir del inóculo, con respecto a los controles, no se observa ningún desarrollo.

TABLA # VII

Continuación

De los resultados obtenidos en las pruebas de sensibilidad se puede decir que:

- a) Hay un intervalo de inhibición para ambas cepas.
- b) Algunos fármacos no tienen acción inhibitoria en una ó ambas cepas.
- c) La concentración mínima inhibitoria es diferente para M. mycetomi y M. grisea.
- d) Con los resultados obtenidos se puede normar un criterio acerca de los medicamentos que serán eficaces en el tratamiento.

<u>C E P A</u>	<u>FARMACO</u>	<u>INTERVALO INHIBITORIO.</u>
<u>M. mycetomi</u>	Ketoconazol	1.0 a 6.6 µg/ml.
<u>M. grisea</u>	Ketoconazol	2.0 a 6.6 µg/ml
<u>M. mycetomi</u>	Griseofulvina	No lo inhibe
<u>M. grisea</u>	Griseofulvina	No hay inhibición
<u>M. mycetomi</u>	Diaminidifenilsulfona	50 a 160 µg/ml.
<u>M. grisea</u>	Diamino difenilsulfona	50 a 160 µg/ml.
<u>M. mycetomi</u>	Anfotericina B	2.0 a 32 µg/ml.
<u>M. grisea</u>	Anfotericina B	Mayor o igual de 32 µg/ml.
<u>M. mycetomi</u>	Sulfametoxazol - Trimetoprim	No hay inhibición
<u>M. grisea</u>	Sulfametoxazol - Trimetoprim	4.0 a 12 µg/ml.
<u>M. mycetomi</u>	Rifampicina	No hay inhibición
<u>M. grisea</u>	Rifampicina	No hay inhibición
<u>M. mycetomi</u>	Fosfomicina	No hay inhibición
<u>M. grisea</u>	Fosfomicina	No hay inhibición

TABLA # VII

Continuación

De los resultados anteriores se puede observar que de los fármacos usualmente empleados en el tratamiento del Eumicetoma tienen acción inhibitoria " in vitro " como se muestra.

<u>C E P A</u>	<u>FARMACO</u>	<u>C O N C.</u> <u>MINIMA.</u>	<u>C O N C.</u> <u>MAXIMA.</u>
<u>M. mycetomi</u>	Ketoconazol	1.0 $\mu\text{g/ml}$	6.6 ó mayor
<u>M. grisea</u>	Ketoconazol	2.0 $\mu\text{g/ml}$	6.6 ó mayor
<u>M. mycetomi</u>	Anfotericina B	2.0 $\mu\text{g/ml}$	32 $\mu\text{g/ml}$ más
<u>M. grisea</u>	Anfotericina B	2.0 $\mu\text{g/ml}$	32 $\mu\text{g/ml}$ o más
<u>M. mycetomi</u>	Diaminodifenil	50 $\mu\text{g/ml}$	160 $\mu\text{g/ml}$ ó más
<u>M. grisea</u>	Sulfona (DDS)	50 $\mu\text{g/ml}$	160 $\mu\text{g/ml}$ ó más
<u>M. grisea</u>	Sulfametoxazol Trimetoprim	4.0 $\mu\text{g/ml}$	12 ó más $\mu\text{g/ml}$

La giseofulvina, Rifampicina y Fosfomicina no inhiben a ninguna de las dos cepas.

Se intentó el uso de penicilindros para las pruebas farmacológicas " in vitro " no resulta por el poco volumen empleado, el período prolongado para el crecimiento de las cepas y la temperatura de incubación.

RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS HISTOPATOLOGICOS.

Debido a que la histopatología juega un papel muy importante en el diagnóstico del eumicetoma, se realizaron biopsias de los pacientes. Los resultados son:

Paciente P.C.J.M. (50-83)
Tinción: H & E
Epidermis: Espesamiento por hiperplasia simple.
Dermis: Alteración de sus límites normales y configuración, observándose condensación de células de infiltración y formación de granulomas semejantes a reacción de cuerpo extraño. El grano se encuentra centrado en el absceso de leucocitos polimorfonucleares imagen típica de Granuloma Tuberculoide.

El grano encontrado fue de tipo Filamentoso, rodeado de una corona de neutrófilos polimorfonucleares. El grano tiene forma irregular, filamentoso, con cemento abundante de color café, en el centro y tejido de color rosa en la periferia. Micetoma causado por M. mycetomi.

Paciente: H.M.J. (254-82).
Tinción: Con Hematoxilina y Eosina (H&E)
Epidermis: Espesamiento por hiperplasia simple.
Dermis: Alteración de sus límites y configuración normales, imagen de Granuloma Tuberculoide Inespecífico con grano de Madurella grisea que tiene forma ovalada o lobulada, no hay cemento con poca pigmentación en el centro, en la periferia hay pequeñas vesículas.

TABLA # VIII

DESCRIPCION DE LOS GRANOS

A) ZONA CORTICAL	<u>Madurella mycetomi</u>	<u>Madurella grisea</u>
1. Color	Café (ocre)	Café
2. Forma	Multilobulados	Curvilíneos.
3. Filamentos	Cafés regulares	Cafés regulares
4. Vesículas	No hay	Cafés pequeñas
5. Cemento	Café (ocre)	Café
B) ZONA CENTRAL		
1. Color	Café (ocre)	Rosa claro
2. Filamentos	Cafés	Hialinos ó debilmente coloreados.
3. Vesículas	Ausentes	Ausentes
4. Cemento Inters-ticial.	Presente	Ausente.

TABLA # IX

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE PATOGENICIDAD "in vivo"

La patogenicidad de los agentes etiológicos fué probada en animales de laboratorio (ratones blanco cepa Taconic), las inoculaciones son hechas posteriores a un período de adaptación y observación de los ratones, se dividieron en tres grupos con 4 ratones en cada uno que son Grupo Control, M. mycetomi y M. grisea, se realizaron 3 inoculaciones espaciándolas a un mes para observar las reacciones en la pata posterior izquierda de los animales, después de 4 meses se sacrifican, los resultados obtenidos son negativos al examen directo, cultivos y biopsias.

El esquema de inmunización seguido es el siguiente:

<u>RATONES</u>	<u>TIEMPO</u>	<u>OBSERVACIONES</u>	<u>INOCULACION.</u>
Grupo I	0 días	Ratones sanos	Primera inoculación (0.1 ml. de Mucina al 5%) estéril.
Control	5 días	Ninguna	Segunda inoculación 0.1 ml. M. 5%
	15 días	Ninguna	
	30 días	Ninguna	
Grupo I	31 días	Sin ningún cambio en la pata.	Tercera inoculación 0.1 ml. de Mucina 5%
Control	60 días	Ninguna	
	90 días	Ningún cambio en la pata inferior izquierda.	

TABLA IX

Continuación

<u>RATONES</u>	<u>TIEMPO</u>	<u>OBSERVACIONES</u>	<u>INOCULACION</u>
Grupo II			
<u>M. mycetomi</u>	0 días	Ninguna	Primera inoculación.
	5 días	Ninguna	0.1 ml de - triturado de - cepa (20mg/ml) en Mucina al - 5%.
	15 días	Pequeña inflamación local (pata posterior izquierda).	
	30 días	Inflamación cede poco a poco.	Segunda inoculación 0.1 ml. (0.05 ml de - triturado de la cepa en la Mu cina al 5% + - 0.05 ml. de - Adyuvante de - Freud.
	31 días	Inflamación muy pronunciada en la pata.	
	60 días	Disminuye poco a poco la inflamación.	Tercera inoculación 0.1 ml (0.05 ml de - triturado de - cepa en Muci na al 5% +0.05 Adyuvante).
	61 días	Inflamación local persistente.	
	90 días	Persiste inflamación pero cada día menor.	Sacrificio de los animales

TABLA # IX

Continuación.....

<u>RATONES</u>	<u>TIEMPO</u>	<u>OBSERVACIONES</u>	<u>INOCULACION</u>
Grupo III	0 días	Ratones sanos	Primera inoculación 0.1 ml. de triturado de cepa en Mucina al 5% (20 mg/ml.
<u>M. grisea</u>	5 días	Pequeña inflamación localizada en pata inferior izq.	
	15 días	Inflamación va cediendo.	
	30 días	Sin inflamación	Segunda inoculación 0.1 ml (0.05 ml de triturado de cepa en Mucina al 5% + 0.05 ml de Adyuvante)
	31 días	Inflamación muy pronunciada, localizada en la pata inferior izquierda.	
	60 días	Continúa la inflamación muy pronunciada en la pata.	Tercera inoculación 0.1 ml de triturado de cepa en Mucina al 5%.
	61 días	Se varía la vía de inoculación a <u>Intra</u> peritoneal	
	90 días	Inflamación persistente.	Sacrificio.

TABLA # IX

Continuación

N O T A

Los animales son sacrificados y abiertos para observar sus órganos internos (hígado, pulmones y corazón y la cavidad peritonea) los cuales son observados a simple vista y al examen directo (en trocitos delgados) al igual que las patas que también son cortadas y después de examinarlas se cultivan y se mandan trozos para su estudio histopatológico.

Los resultados de los exámenes directos, biopsias y cultivos son NEGATIVOS, no hay presencia de granos o hifas de los agentes etiológicos, sólo inflamación local en la pata en que se llevaron a cabo las inoculaciones.

CONCLUSIONES

- Con el examen directo y la histopatología de los granos se identificó el género de ambos agentes etiológicos, éste es:

Madurella sp.

- Los estudios de utilización de fuentes de nitrógeno, - carbono (Pruebas Bioquímicas), temperatura óptima - de crecimiento y la macro y micromorfología de ambas cepas, nos completan el estudio dándonos género y especie:

<u>C e p a</u>	<u>Género</u>	<u>Especie</u>
50-83	<u>Madurella</u>	<u>mycetomi</u>
254-82	<u>Madurella</u>	<u>grisea</u>

- La sensibilidad a fármacos " in vitro " nos muestra que las cepas son sensibles respectivamente a:

Madurella mycetomi. - Ketoconazol, Diaminodifenil - Sulfona y Anfotericina B.

Madurella grisea. - Ketoconazol, Anfotericina B, - Diaminodifenil sulfona, Sulfame metoxazol - Trimetoprim.

Mientras que la Griseofulvina, Rifampicina y Fosfomicina nos las inhiben.

- La patogenicidad " in vivo " para ambas cepas en las condiciones ya mencionadas son "Nulas"

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Alexopoulos Constantine J.
Introducción a la Micología
Tercera Edición
EUDEBA Manuales (1977)
- 2.- Arenas R., Woo G.
Hongos Negros Panorama Actual
Rev. Méx. Derm. Vol. XXV (3)
Páginas. 243 - 254 (1981)
- 3.- B o r e l l i D.
Madurella mycetomi y Madurella grisea
Comentarios a un trabajo de F. Niño.
Archivos Venezolanos de Medicina -
Tropical y Parasitología Médica.
Vol. IV (2) pags. 195-211 (1962).
- 4.- B o r g e r s M.
Mechanism of action of Antifungal Drugs,
with especial reference to the Imidazole
Derivatives.
Reviews of Infectious Diseases
Vol. II (4) Pags. 520-534 (Jul-Aug.1980).
- 5.- B r y g o o E.
Recherches Mycologiques a Madagascar
Mycol. Mycopath. Appli. Vol. XVI (4)
Paginas 365-372 (10 de mayo de 1962).
- 6.- Butz W.C.M.D.; Ajello Libero Ph D.
Black grain mycetoma a case due to -
Madurella grisea.
Reprinted from the Archives of Dermatology
Vol. 104 pags. 197-201 (Aug. 1971).

- 7.- C. de Peluffo I; Civila E.; Calegari L.;
Conti - Díaz I.A.; Pereyra P.; Rotkier I.
Micetoma por *Scedosporium apiospermum*
(*Petrillidium boydii*), Asociado a *Nocardia*
sis Pulmonar, Candidosis y Dermatofito -
sis a un paciente Inmunodeprimido.
Dermatol. Iberolat. Vol. 19 (1) .
Pags. 41 - 47 (1977).
- 8.- Cabré J.; Olmos I.; González de Canales F
Maduromycoze par *Madurella mycetomi*
Ann. Dermatol. Venerol. (Paris)
Vol. 108 Pags. 381 - 386 (1981).
- 9.- Cockshott W.P.; Edin M.D.; Rankin A.M.
Medical treatment of mycetoma
Lancet Vol. 2 pags. 1112-1114 .
November 19, 1960.
- 10.- Conant F.N.; Smith T.D.; Baker R.;
Calaway J. L.
Micología - 3a. Edición
Editorial Interamericana, S. A. (1972)
Páginas 356 - 373.
- 11.- Contreras Pérez C. U.
Estudio determinativo de 14 cepas de *Madu*
rella, una contribución para su clasificación
T E S I S (1981) I. P. N.
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.
- 12.- Cucé L.C.; Wroclawski E.L. y Sampio -
Sebastião A. P.
Treatment of Paracoccidiomycosis, Candi
dosis, Chromomycosis, Lobomycosis y My-
cetoma with Ketoconazole: A brief Sumary.
Inter. Journal Dermatology Vol. 19 (7) .
Páginas 405 - 408 (1980).

- 13.- Da Silva Lacaz C.; Fava Netto C.
Agentes Etiológicos da Maduromicose
Folia Clinica et Biologica
Vol. 22 (5/6) pags. 303-337
(Nov. Dez. 1954).
- 14.- Emmons C.H.W.; Binford C.H.; -
Utz J.P.; Kwon Chung F. J.
Medical Mycology - 3a. Edición.
Editorial Lea & Fabiger (1977).
Páginas 437 - 464.
- 15.- Escudero Gil M.R.: Llopez M. A.;
Martínez Palacio P. y Canales de G.
Un caso de maduromicosis por Madu-
rella grisea - Estudio de la cepa.
Actas Dermo - Sif. (España).
Vol. 72 (5-6) Pags. 265-270
(May - Jun 1981.).
- 16.- Fava Netto C.; Da Silva Lacaz C.
ContribuçãO para o estudo dos agentes
etiológicos da Maduromicose.
Folia Clinica et Biologica
Vol. 21 (5) págs. 331-352 (Maio 1954)
- 17.- Findlay G.H.; Vismar H.F.
Black grain mycetoma. Atomic Absor-
tion and spark source mass spectropho-
tometry of the tissue grain in Madure-
lla mycetomi infection.
British Journal of Dermatology
Vol. 97 (5).pags. 497-499 (Nov. 1977)
- 18.- Findlay G.H.; Vismar H.F.; Liebbeberg
N. v. d. W. - Black grain mycetoma:
The Ultrastructure of Madurella mycetomi
Mycopathology Vol. 67(1) págs.51-54(mar.79)

- 19.- Fitz Patrick A.; Arndt Kenneth et al.
Dermatology in General Medicine.
 Publicación 1971 Pags. 1823-1825
 Mc. Graw Hill Book Company a Blakistán.
- 20.- Gay Prieto R.
Dermatología - 8a. Edición.
 Ed. Médicos Científicos (1976).
- 21.- González Ochoa A.
 Producción experimental del Micetoma por
 Nocardia brasiliensis en el ratón.
 Gac. Méd. de Méx. Vol. 99 (8).
 Páginas 773-781 (1969).
- 22.- González Ochoa A.; Kumico Hojyo T.
 International Congress of Chemotherapy
 Production of Mycetoma by Nocardia bra-
 siliensis in mice. June - Julio 1 (1977)
 Páginas 323 - 330.
- 23.- Grigoriu D.; Grigoriu A.
 Contribution a la technique de l'antibiogra-
 mme anti - fungique. Mycol.Mycopath.Appli
 Vol. 41 (3 - 4) págs. 373-377 (1970).
- 24.- Gumma S. A.; Mahgoub E. S.
 Counterimmuno-electrophoresis in the diag-
 nosis of Mycetoma and its sensitivity as -
 compared to inmunodiffusion.
 Sabouraudia Vol. 13 págs.309-315 (1975)
- 25.- Klokke A.H.; Swamidasan G.; Anguli R. y
 Verghese A.
 The causal agents of Mycetoma in South -
 India. Trans, of the Royal Soc. of Trop.
 Med. and Hyg. Vol. 62 (4)
 págs. 509- 512 (1968).

- 26.- Kurup P.V.; Randhawa H.S.; Sandhu R.S.;
Abraham S - Pathogenicity of *Nocardia* -
caviae, *N. asteroides* and *N. brasiliensis*.
Mycol. Mycopath. Appli.
Vol. 40 (3-4) págs. 115-130 (1970).
- 27.- Latapí F.; Mariat F.; Lavalle P.; Ortiz Y.
Micetoma por *Streptomyces somaliensis* lo-
calizado a un dedo de la mano.
Comprobación en México del primer caso
extra - africano. *Rev. Méx. Derm.*
Vol. 5 págs. 257-270 (1961).
- 28.- Latapí F.; Ortiz Y.
Micetomas por *Streptomyces somaliensis* -
en México. - Estudio de 8 casos.
Rev. Méx. Derm. Vol. 15
Págs. 47 - 65 (1971).
- 29.- Lavalle P.
Nuevos datos sobre la etiología del miceto-
ma en México y sobre su patogenía.
Gac. Méd. Méx. Tomo XCVI (6)
Págs. 545 - 568 (Junio 1966).
- 30.- Lavalle P.
Micetomas por *Streptomyces* en América.
Dermatología Ibero - Latino - Americana
Separata # 3 Año XIV págs. 379-389 (1972)
- 31.- Lazo S. R. F.
Micetomas en el Ecuador
Rev. Ecuat. Hig. Med. Trop.
Vol. 31 (1) págs. 39-44 (1978).
- 32.- Mackinnon J. E.
Agentes Maduromicóticos en la regios neo-
tropical. - Apartado de los "Anales de la -
Facultad de Medicina "Montevideo"
Tomo 48 # 3-4- págs. 453-458 (1963).

- 33.- Mackinnon J. E.
 Características de 4 cultivos de *Madurella mycetomi* (Laverán) Brumpt aislados en el Sudán y en Somalia Británica.
 Apartado de los "Anales de la Facultad de Medicina "Montevideo Tomo 36 # 4
 Págs. 197 - 210 (1951).
- 34.- Mackinnon J. E.; Ferrada L.V. y Montemayor L.
 Investigaciones sobre las *Maduromicosis* y sus agentes.- Apartado de los "Anales de la Facultad de Medicina" Montevideo Tomo 34 # 1,2,3 págs. 231-300 (1949).
- 35.- Mackinnon J. E.; Ferrada - Urzúa L.V. y Montemayor L.
Madurella grisea n.sp. A new species of fungus producing the black variety of *Maduromicosis* in South America.
 Mycopathology Vol. IV. Fasc. 4 pag.384-392 (j u l 1949).
- 36.- Macotela E.
 Los Micetomas - Simposio Syntex.
 Desarrollo y estado actual de la micología - médica en México - Marzo de 1980.
 Págs. 41 - 54.
- 37.- Mahgoub E. S.
 Laboratory and clinical experience with Clotrimazole (Bay B 5097).
 Sabouraudia Vol. 10 Págs. 210-217 (1972)
- 38.- Mahgoub E. S.
 Experimental infection of athymic nude New Zealand mice Nu Nu strain with mycetoma agents. Sabouraudia Vol. 16 Págs. 211-216 (1978).

- 39.- Mahgoub E. S.
Mycetoma - Primera publicación.
 Ed. William Heinemann Medical Book Ltd.
 (1973).
- 40.- Mahgoub, E. S.
 The value of gel diffusions in the diagnosis
 of mycetoma. Trans. of the Royal Soc.
 of Trop. Med. and Hyg. Vol. 58 (6)
 (November 1964).pags. 560-563 (Nov.1964)
- 41.- Mahgoub E.S.; Gumma S.A.; Hassean A.M.
 Immunological status of mycetoma patients.
 Bulletin de la Societé de Pathologie Exotique
 Vol. 70 (1) págs. 48-54 (Abril 1977).
- 42.- Mancillas J.
 Micetoma de granos negros por Madurella -
 mycetomi. Comunicación preliminar de un
 caso del estado de Coahuila, Méx.
 Rev. Méx. Derm. Vol. 22 Págs. 226-231
 (1978).
- 43.- Mariat F.; Segretain G.; Drouhet E.
Diagnóstico de Laboratorio en Micología Mé
dica - Primera Edición.
 Ed. La Prensa Médica Mexicana (1977).
- 44.- Mazza S.; Cornejo A.; Pereyra R.
 Micetomas por Madurella.
 Actas y Trabajos del VI Congreso Nacional
 de Medicina, Córdoba. Tomo III.
 Págs. 1 a 6 (1939).
- 45.- Moira L. Mc. Laren; Mahgoub E.S.; - - -
 Georgakopoulos E.
 Preliminary investigation on the use of the
 enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)
 in the serodiagnosis of mycetoma.
 Sabouraudia Vol. 16 págs. 225-228 (1978).

- 46.- Murray I. G.; Buckley H. R.
Serological differences between *Pyrenochaeta romeroi* and *Madurella grisea*.
Sabouraudia Vol. 7 págs. 62-63 (1969).
- 47.- Murray I. G.
Skin sensitivity to *Madurella mycetomi*
in guinea pigs. *Trans. of the Royal Soc.
of Trop. Med. and Hyg.* - Vol. 55 (3)
Págs. 209-215 (1961)
- 48.- Murray I. G.; Colichon H.
Chemotherapy of *Maduromycosis* - Preliminary experiments with *Diaminodiphenilamine Dihydrochloride* and *Amphotericin B* in vivo and in vitro. *Trans of the Royal Soc. of Trop. Med. and Hyg.* Vol. 56 (2) págs. 156 - 165 (1962).
- 49.- Murray I.G.; Moghraby E. I.
The value of skin tests in distinguishing between *Maduromycetoma* and *actinomycetoma*. *Trans. Royal Soc. Of. Trop. Med. and Hyg.* Vol. 58 (6) págs. 557-559 (1964)
- 50.- Murray I. G.
Some aspects of medical mycology in the tropics. *Trans. of the Royal Soc. of. Trop. Med. and Hyg.* Vol. 60 (4) Págs. 554-561 (1966).
- 51.- Negroni P.; Fernández LL. y Daglio CAN
A propósito de un caso de pie de Madura con granos negros. Revisión de los Mice tomas producidos por "*Madurella*"
Revista Argentina de Dermatofilología
Tomo 31 (2) págs. 192-205 (1947).

- 52 - Negroni P. y Vucetich M.
Micotoma maduromicósico por *Madurella mycetomi*. Revista del Instituto Malbrán Tomo XV Págs. 106-112 (1950 - 1953).
- 53.- Neuhauser I. M. D.
Black grain maduromycosis caused by - *Madurella grisea*. Report of the first - North American case and its response to therapy with Diaminodiphenilsulfone
A.M.A. Archives of Dermatology
Vol. 72 Págs. 550-555 (1955).
- 54.- Niño Flavio L.
Coexistencia de "*Madurella mycetomi*" y de "*Madurella grisea*" en una misma observación de maduromicosis podal negra.
Mycol. et Mycopath. Appli.
Vol. XVI Fasc. 4 Págs. 323-332 (1962).
- 55.- Novales J.
Micotomas. Aspectos Histopatológicos.
IV Congreso Mexicano de Dermatología
Tampico, Méx. 19 al 22 de abril, 1967
Págs. 337- 344.
- 56.- Novales J.; Lavalle P.
Micotoma por *Streptomyces somaliensis* en el Estado de Morelos.
Rev. Méx. Derm. Vol. 20
Págs. 25-33 (1977)
- 57.- O'Hara Ebell H.
Un caso de pie de Madura.
Micotoma causado por *Madurella sp.*
Trabajo hecho bajo la dirección del Prof. Pedro Weiss. Lima, Perú (1948) P:1-8

- 58.- Padhye A.A.; Sukapure R.S. y -
Trirumalachar M. J.
Cephalosporium madurae n.s.p. cause
of madura foot in India.
Mycol. et. Mycopath. Appli.
Vol. XVI Fasc. 4 Págs. 315-322 (1962)
- 59.- Palestine R.F.; Rogers R.S.
Diagnosis and treatment of mycetoma
J. Am. Acad. Dermatol. Vol. 6
Págs. 107-111 (1982).
- 60.- Rippon J. W.
Medical Mycology. - The pathogenic fungi
and the pathogenic actinomycetic.
Primera Edición - Ed. W.B. Saunders -
Modernas S. A. (1971) págs. 48-69.
- 61.- Saul Cano A.
Lecciones de Dermatología - 10a. Edición
Ed. Fco. Méndez Cervantes (1983)
Pags. 128 - 139.
- 62.- Segretain G. et Destombes P.
Recherche sur les mycetomes a Madurella
grisea et Pyrenochaeta romeroi.
Reimpreso: Sabouraudia "Journal of the -
International Society for Human and Animal
Mycology" - Vol. 7 Part. 1 Págs. 51-61
(1969).
- 63.- Segretain M.G.; Tréfouël J. M.
Physiologie végétale - Sur les Phialides et
phialosporas produites per Madurella myce
tomi. Cr.Seanc. Acad. Sci. Vol. 247.
Págs. 130-132 (1958).
- 64.- Speller D. C. E.
Antifungal Chemotherapy
Primera Impresión.
Ed. John Willey & Sons. (1980)

- 65.- Talwar P. y Sehgal S. C.
Mycetomas in North India
Sabouraudia Vol. 17 pags. 287=291
(1979).
- 66.- Vanbreuseghem R. y Destombes P.
Les Mycetomes - Extrait du: Bulle
tín de la Société de Pathologie Exo-
tique Tomo 51 (5) págs. 793-832
(1958).
- 67.- Vanbreuseghem R.; Destombe P.; -
André M; Segretain G et Mariat F.;
Carnain R. et Nazimoff.
Les Mycetomes (Congo Belge, Tchad,
Senégal. Somalia, Francaice).
Mycologie Médicale et de Pathologie -
Exotique (19 Nov. 1958).
Extrait du: Bull. Soc. de Pathol Exot.
Tomo 51 (5) Págs. 833-875.
- 68.- Velasco Castrejón O. y Tay Zavala J.
Nociones de Micología - 2a. Edición.
Ed. Fco. Méndez Cervantes (1978).
págs. 97 - 113.
- 69.- Zapater R. C.
La maduromicosis en la Argentina.
Revista de la Asociación Médica Argen
tina. Vol. 72 (7) págs. 1-8 (Jul.1958)
- 70.- Zapater R. C.
Micología Médica (Introducción a la:)
Segunda Edición. Ed. Ateneo S.A.
Págs. 60-65 (1970) págs. 66-73.