



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**TESIS: *ESTUDIO MORFOGENÉTICO DE AGENTES CAUSANTES DE
EUMICETOMA***

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

BRIANDA STEPHANIE HERRERA RAMÍREZ



CIUDAD DE MÉXICO, 15 de Agosto del 2018

JURADO ASIGNADO:



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

PRESIDENTE: **Profesor: Adriana Guadalupe Mejía Chávez**

VOCAL: **Profesor: Misael González Ibarra**

SECRETARIO: **Profesor: Francisca Hernández Hernández**

1er. SUPLENTE: **Profesor: Ruth Edith Martín Fuentes**

2° SUPLENTE: **Profesor: Genaro Jiménez Reyes**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**UNIDAD DE MICOLOGÍA MÉDICA, DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y
PARASITOLOGÍA, FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.**

ASESOR DEL TEMA:

Dra Francisca Hernández Hernández

(nombre y firma)

SUPERVISOR TÉCNICO (Si lo hay):

Q.F.B. Érika Córdova Martínez

(nombre y firma)

SUSTENTANTE (S):

Brianda Stephanie Herrera Ramírez

(nombre (s) y firma (s))

INDICE

INTRODUCCIÓN	5
CAPÍTULO 1. MICETOMA	6
1.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS	6
1.2 EPIDEMIOLOGÍA	7
1.3 AGENTES CAUSALES	9
1.3.1 <i>Agentes de actinomicetoma</i>	10
1.3.2 <i>Agentes de eumicetoma</i>	10
1.4 MECANISMO DE INFECCIÓN	12
1.5 CUADRO CLÍNICO	12
1.6 DIAGNÓSTICO	13
1.6.1 <i>Examen directo</i>	13
1.6.2 <i>Cultivo</i>	14
1.6.3 <i>Histopatología y citología</i>	14
1.6.4 <i>Imagenología</i>	15
A) <i>Radiografía</i>	16
1.7 TRATAMIENTO	17
1.7.1 <i>Actinomicetoma</i>	18
1.7.2 <i>Eumicetoma</i>	18
1.8 MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES UTILIZADAS PARA DIFERENCIACIÓN DE HONGOS FILAMENTOSOS	21
1.8.1 <i>Nutrición</i>	21
1.8.2 <i>Reproducción</i>	21
1.8.3 <i>Medios de Cultivo</i>	24
1.9 INFLUENCIA DE LA LUZ Y OSCURIDAD EN LA INDUCCIÓN DE ESTRUCTURAS DE REPRODUCCIÓN.	24
1.9.1 IDENTIFICACIÓN DE AGENTES CAUSALES DE MICETOMA POR TÉCNICAS MOLECULARES.....	25
1.9.1.1 <i>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</i>	25
A) <i>Fases de la PCR</i>	26
1.9.2 <i>Genes utilizados para la PCR en hongos</i>	28
CAPÍTULO 2.- DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN	29
2.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	29
2.2 OBJETIVOS	29
2.3 HIPÓTESIS	29
2.4 MATERIALES Y MÉTODOS	30
2.4.1 <i>AISLADOS</i>	30
2.4.2 <i>REACTIVACIÓN Y PREPARACIÓN DEL INÓCULO</i>	30
2.4.3 <i>MEDIOS DE CULTIVO</i>	30
a) <i>Morfología macroscópica</i>	30
b) <i>Morfología microscópica</i>	31
2.5 EFECTO DE LOS CICLOS DE LUZ Y TEMPERATURA	31
2.6 EXTRACCIÓN DE DNA TOTAL	31

2.7 PCR	31
2.8 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR	32
CAPÍTULO 3. RESULTADOS.....	33
3.1 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR	33
3.1.1 <i>Extracción de DNA</i>	33
3.1.2 PCR	33
3.1.3 Secuenciación	35
3.2 MORFOLOGÍA MACRO Y MICROSCÓPICA.....	36
RESULTADOS DESPUÉS DE 30 DÍAS A 25°C EN INCUBACIÓN EN SEIS MEDIOS DE CULTIVO Y ASÍ COMO PERIODOS DE LUZ Y OSCURIDAD.	40
CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN.....	70
IDENTIFICACIÓN MOLECULAR.....	70
MORFOLOGÍA.....	71
CONCLUSIONES.....	75
SUGERENCIAS.....	76
REFERENCIAS	77
ANEXO A.....	81
ANEXO B.....	84
ANEXO C.....	86

INTRODUCCIÓN

La identificación de los hongos causantes de micetoma, representa un reto para el microbiólogo o para el micólogo responsable de esta tarea. En la mayoría de laboratorios de centros hospitalarios en donde atienden este tipo de infecciones, no se cuenta con procedimientos avanzados para lograr una identificación confiable. Por lo tanto, los procedimientos tradicionales basados en el cultivo son los más utilizados en base al aparente menor costo. El problema de la identificación aumenta si consideramos que muchos de los hongos involucrados comúnmente no desarrollan en cultivo estructuras características que ayuden a su identificación, sobre todo si solamente desarrollan el llamado micelio estéril.

En el presente trabajo se describe la micosis subcutánea conocida como micetoma (eumicetoma), así como sus principales agentes causales, datos epidemiológicos, procedimientos de laboratorio para el diagnóstico y brevemente los recursos terapéuticos con que los micólogos clínicos cuentan. Asimismo, considerando que el principal objetivo de este estudio fue probar algunos medios de cultivo que resultaran útiles para propiciar el desarrollo de las características morfológicas que favorezcan la identificación de los agentes de eumicetoma más frecuentes, se presentan con detalle los resultados obtenidos al probar seis medios de cultivo y diferentes condiciones. Para reforzar el estudio anterior, y dado que utilizamos aislados que habían sido identificados solamente por sus características morfológicas, aplicamos también la Reacción en Cadena de la Polimerasa seguida de Secuenciación. Finalmente planteamos algunas Conclusiones del trabajo realizado y Sugerencias para estudios futuros.

CAPÍTULO 1. MICETOMA

El micetoma es una infección subcutánea causada por dos tipos de agentes: hongos del phylum *Ascomycota* o bacterias del orden *Actinomycetales*. En el primer caso, la patología es conocida como eumicetoma y en el segundo caso la enfermedad se conoce como actinomicetoma.

1.1 Antecedentes históricos

Este padecimiento fue ya descrito en el libro hindú el *Atharva Veda*, desde hace siglos. Sin embargo, la primera observación científica corresponde a Engelbert Kaempfer, un médico y viajero alemán que en 1694 hizo la descripción de una enfermedad que observó en Malabar, India, como parte de su tesis doctoral en Holanda. Para 1842, John McGill, un cirujano inglés, observó estos padecimientos en Madrás, en la región de Madura en India. En 1846, J. Godfrey, un cirujano, también en Madrás, hizo la primera caracterización en la literatura médica y la publicó en *The Lancet* con el título: *Diseases of the foot not hitherto described* y la denominó “*morbus tuberculosis pedis*” (Arenas, 2014).

Así, el término de micetoma fue introducido por Vandyke Carter en el año de 1860 para la enfermedad identificada por Gill en 1842, mientras trabajaba en el Madura Dispensary, al Sureste de India. Dicha enfermedad afectaba el dorso o la planta del pie. Por otro lado, Colebrook en 1846 quien trabajó después que Gill en la India, denomina la enfermedad como “pie de Madura (Madura foot)”. Carter clasificó los casos de pie de Madura de acuerdo al color de los granos que presentaban las lesiones, posteriormente realizó cultivos con el Micólogo Berkeley indicando que era causado por un hongo *Clynonyphe carteri*.

Para el año de 1894 Boyce y Surveyor determinan que los granos tanto amarillos como marrones presentaban entidades diferentes de microorganismos, entre ellos los *actinomyces* en los granos amarillos. En 1911 Ricardo Cicero estudió por primera vez casos de micetoma en México y los comunicó un año más tarde.

Pinoy en 1913, en Francia, divide al micetoma en dos grupos; el primero actinomicosis, causado por actinomicetos y el segundo grupo micetoma causado por hongos verdaderos. Posteriormente, en 1916 Chalmers y Archibald revisaron la terminología de Pinoy y nombran al micetoma como “maduromicosis” (Winslow D., 1976).

Por su parte, Langeron en 1928 estudió casos producidos por *Actinomyces* y *Nocardia*. Para el año de 1945, González-Ochoa demuestra que *Actinomyces mexicanus* y *Nocardia brasiliensis* son la misma especie. En 1947 Latapí propone

el uso de sulfonas como tratamiento para el actinomicetoma, después de tratar a un paciente con lepra lepromatosa nodular y micetoma y observar una mejoría. Posteriormente, en 1963, obtiene datos epidemiológicos sobre la distribución mundial de 854 casos reportados, en donde el 60% fue por actinomicetoma y el 40 % por eumicetoma (Arenas, 2014).

Desde 1994 el Sheikh Mahgoub y Ahmed Hassan Fahal han contribuido a datos epidemiológicos, clínicos, anatómo-patológicos y terapéutica.

En 2006, el dermato-micólogo Arenas, coordinó una monografía editada en España. Un año después Bonifaz, Ibarra y colaboradores en el Hospital General de México reportan 15 casos de micetoma en niños menores de 15 años de una población de 334, estudiados durante 25 años. En 2008 Bonifaz, de Hoog y colaboradores describen *Chladophialophora bantiana* como agente causal de eumicetoma con granos negros, el mismo año Arenas publica terapias emergentes con Ahmeen.

En el año 2012 el grupo de Arenas mediante técnicas moleculares indica *Nocardia harenae* y *Nocardia takedensis* como nuevos agentes de micetoma. Al año siguiente López-Martínez y colaboradores publican un artículo de 3933 casos reportados en México con datos epidemiológicos.

1.2 Epidemiología

Micetoma es una infección de importancia principalmente en áreas tropicales y subtropicales. La mayoría de los casos se encuentran entre la latitud 15° sur y 30° norte comúnmente conocido como “Cinturón del micetoma” como se observa en la **Figura 1**. La mayoría de los casos reportados se encuentran ubicados principalmente en Sudán y México. Sudán es el área endémica a nivel mundial, en donde más de 7000 pacientes reciben tratamiento para ésta infección en el Instituto de Investigación del Micetoma de Khartoum, en donde se registra que el 70 % de los casos en el Estado de White Nile el agente causal es *Madurella mycetomatis*; una revisión del 2010 reporta una prevalencia de 14.5 por 1000 personas (Zijlstra E., *et. al.*, 2016).

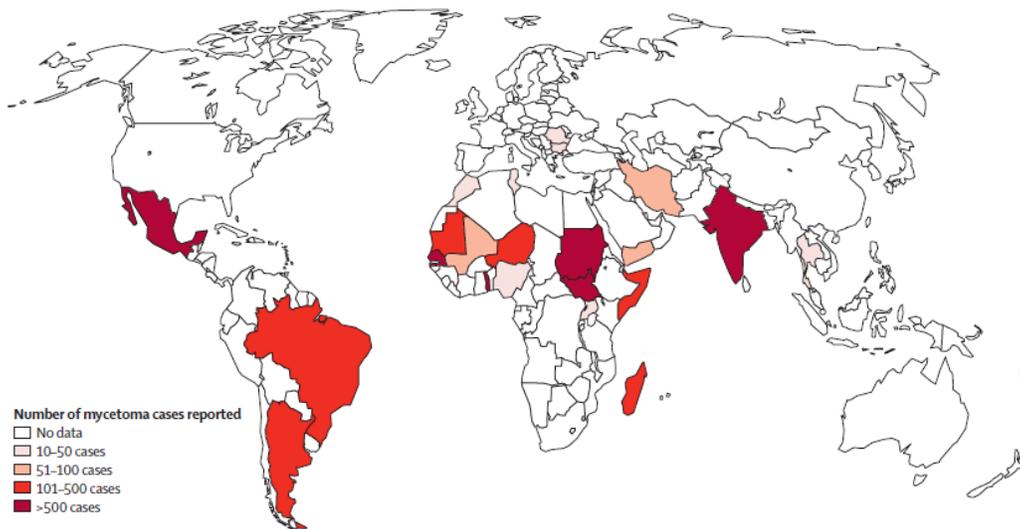
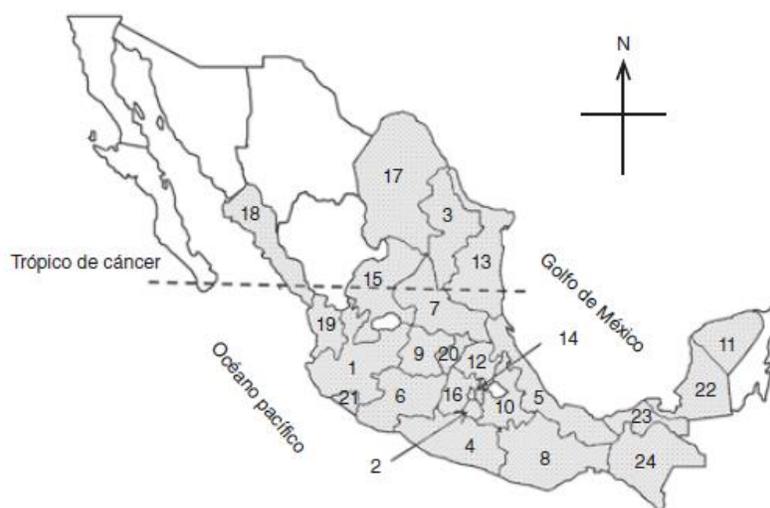


Figura 1. Distribución geográfica de los casos reportados de micetoma en 2013. Tomado de Zijlstra, *et. al.*, 2016.

En una publicación mexicana realizada en el 2013 por López-Martínez, *et. al.*, se informa que la frecuencia del micetoma está estrechamente relacionada con el nivel de desarrollo socioeconómico en los países donde se presenta. Tal es el caso de África, continente con elevados índices de pobreza y marginación; en Sudán o Somalia, la mayoría de los trabajadores agrícolas carecen de apoyo tecnológico y, en consecuencia, están expuestos a múltiples traumatismos cutáneos que potencialmente son la puerta de entrada para los agentes causales; además, en este continente se registra la mayor frecuencia de dicha micosis.

En la misma publicación se muestran los casos reportados de micetoma en México; que el Estado con mayor número de casos reportados fue Jalisco (676), seguido por Morelos (429), mientras que el Estado que presentó menor número de caso fue Chiapas (3) **Figura 2.**



Estado	Casos	Estado	Casos	Estado	Casos	Estado	Casos	Estado	Casos
(1) Jalisco	676	(6) Michoacán	243	(11) Yucatán	94	(16) Edo. de México	44	(21) Colima	13
(2) Morelos	429	(7) San Luis Potosí	229	(12) Hidalgo	67	(17) Coahuila	36	(22) Campeche	9
(3) Nuevo León	347	(8) Oaxaca	172	(13) Tamaulipas	66	(18) Sinaloa	34	(23) Tabasco	6
(4) Guerrero	302	(9) Guanajuato	163	(14) Distrito Federal	49	(19) Nayarit	24	(24) Chiapas	3
(5) Veracruz	264	(10) Puebla	138	(15) Zacatecas	49	(20) Querétaro	14	Sin reportar	462

Fig.2 Número de casos reportados en México de Micetoma (López-Martínez, *et. al.*, 2013).

1.3 Agentes causales

Actualmente las áreas de distribución se encuentran estrechamente relacionadas con las áreas del cinturón del micetoma. Mayormente, los casos reportados se encuentran en zonas áridas y climas calientes, los cuales tienen un período corto de lluvia y temperaturas cálidas.

Existen más de 56 especies causantes de micetoma (bacterias y hongos); algunos de estos microorganismos han sido aislados del suelo; se han aislado de los intestinos y otras partes de los gusanos comúnmente encontrados en suelos con arcilla, sugiriendo que el principal nicho ecológico de esos microorganismos es el suelo (Zijlstra, *et. al.*, 2016). Las áreas endémicas presentan cierto tipo de vegetación como el árbol de acacia con ramas espinosas, las cuales también son fuente de infección.

Madurella mycetomatis es la especie más comúnmente aislada de los casos de eumicetoma mientras que *Nocardia brasiliensis*, *Actinomadura pelletieri* y *S. somaliensis* son aislados de casos de actinomycetoma.

1.3.1 Agentes de actinomicetoma

El actinomicetoma es la infección muy frecuente en países con clima lluvioso (centro de Senegal, Nigeria, México, Brasil). En México el actinomicetoma se observa en 98% de los casos, donde el 86% es causado por *Nocardia*, siendo *Nocardia brasiliensis* la bacteria más frecuente; el porcentaje restante corresponde a *Actinomadura*. Los actinomicetos son bacterias Gram positivas y parcialmente ácido alcohol resistentes; microscópicamente se caracterizan por formar filamentos de 0.5 a 1 µm de diámetro, tabicados; cuando se fragmentan presentan formas cocoides y bacilares. Macroscópicamente forman colonias secas, de tamaño limitado, consistencia dura, acuminada y surcada con forma parecida a “palomita de maíz”; el color de la colonia varía dependiendo del género y especie: colonia naranja (*Nocardia*) y blanco-amarillento (*Actinomadura* y *Streptomyces*) (Bonifaz, 2010)

En la **Tabla 1** se muestran los casos reportados de micetoma en México, indicada en la revisión realizada por López-Martínez, *et. al.*, 2013 y los principales agentes de Micetoma en el país.

Tabla 1. Agentes causantes de actinomicetoma por orden de frecuencia con que se reportan en México (López-Martínez, *et. al.*, 2013).

Agente	N°	%
<i>Nocardia brasiliensis</i>	2389	65.58
<i>Actinomadura madurae</i>	301	7.93
<i>Streptomyces somaliensis</i>	39	1.02
<i>Nocardia asteroides</i>	27	0.71
<i>Actinomadura pellitieri</i>	11	0.21
<i>Nocardia otitidis-caviarum</i>	7	0.18
<i>Nocardia harenae</i>	2	0.05
<i>Nocardia transvalensis</i>	1	0.02
<i>Nocardia sp</i>	531	13.99
Actinomicetos	388	10.23
Total	3696	100.00

1.3.2 Agentes de eumicetoma

Los agentes de eumicetoma son muy numerosos. McGinnis, en 1996, recopiló 31 especies que habían sido documentadas como agentes etiológicos de eumicetoma; sin embargo, este número aumenta día con día. En el mundo, *Madurella mycetomatis* y *M. grisea* (hongos dematiáceos) son los agentes más frecuentes, pero otras especies como *Scedosporium apiospermum*, *Aspergillus sp.*

o *Fusarium sp.* (Hongos de filamento hialino), son reportados con muy importante frecuencia por diversos autores. La enfermedad afecta a todas las edades, aunque la discapacidad es mayor en adultos que trabajan en el campo. Comparado con otras enfermedades tales como la tuberculosis, malaria y VIH, el micetoma ha sido sobrevalorado, sin tomar en cuenta la importancia socioeconómica que significa (Ahmed, *et al.*, 2004).

Desde un punto de vista taxonómico, los agentes de eumicetoma se ubican en la subdivisión Ascomycotina (hongos que cuando se reproducen sexualmente forman esporas dentro de estructuras conocidas como ascas) y están distribuidos en tres clases: Ascomycetes, Hyphomycetes y Coelomycetes.

De los 3,993 casos revisados por López-Martínez, *et al.*, sólo 3.8 % correspondió a casos de eumicetoma, la mayoría causados por el hongo *Madurella mycetomatis*. Existen diferentes géneros y especies de hongos que pueden causar esta micosis en México, como se muestra en la **Tabla 2**, y en la **Tabla 3** se observa la frecuencia a nivel mundial.

Tabla 2. Hongos causantes de micetoma por orden de casos presentados en México (López-Martínez, *et al.*, 2013).

Agente	N°	%
<i>Madurella grisea</i>	39	28.47
<i>Madurella mycetomatis</i>	36	26
<i>Scedosporium apiospermum</i>	8	28
<i>Fusarium solani</i>	5	5.84
<i>Pyrenochaeta romeroi</i>	3	3.65
<i>Petriellidium boydii</i>	2	1.46
<i>Cladophialophora bantiana</i>	2	1.46
<i>Pyrenochaeta mackinnonii</i>	1	0.73
<i>Cladophialophora mycetomatis</i>	1	0.73
<i>Phaeoacremonium parasiticum</i>	1	0.73
<i>Fusarium subglutinans</i>	1	0.73
<i>Madurella sp</i>	6	4.38
<i>Acremonium sp</i>	4	2.92
<i>Fusarium sp</i>	2	1.46
Eumicético	26	18.98
Total	137	100.00

Tabla 3. Principales agentes de eumicetoma reportada a nivel mundial en orden decreciente (Tomada de Nenoff, *et al.*, 2015).

Agente
<i>Aspergillus spp</i>
<i>Acremonium spp</i>
<i>Cladosporium carrioni</i>
<i>Curvularia lunata</i>
<i>Cylindrocarpon spp</i>
<i>Diaporthe phaseolorum</i>
<i>Exophiala jeanselmei</i>
<i>Falciformispora spp</i>
<i>Fusarium spp</i>
<i>Madurella mycetomatis</i>
<i>Trematosphaeria grisea (ant. Madurella grisea)</i>
<i>Medicopsis romeroi (ant. Pyrenochaeta romeroi)</i>
<i>Neotestudina rosatti</i>
<i>Neocystalidum dimidatum</i>
<i>Paecilomyces lilacinus</i>
<i>Phialophora jeanselmei</i>
<i>Scedosporium boydii (ant. Pseudoallescheria boydii)</i>
<i>Scedosporium apiospermum</i>

1.4 Mecanismo de infección

El traumatismo normalmente es en piel y se da por la inoculación de material contaminado con los agentes causales.

1.5 Cuadro clínico

Clínicamente el micetoma se caracteriza por la presencia de masas tumeficientes, con material purulento y sangre, y granos. Estos granos son agregados de hifas (hongos) o filamentos bacterianos (Actinomycetales) como se observa en la **Figura 3.**

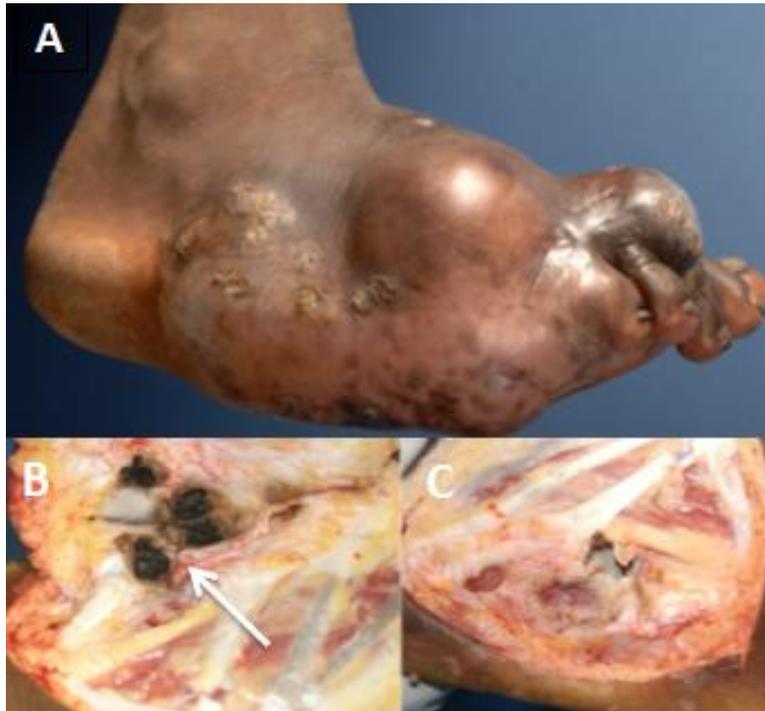


Figura 3. (A) Paciente con micetoma causado por *Madurella mycetomatis* en donde se observa aumento de volumen importante y deformación del pie. (B) presencia de granos pigmentados (flecha) en el tejido afectado. (C) tejido después de remover el cúmulo de granos (Tomado de Suleiman, *et. al.*, 2016).

1.6 Diagnóstico

1.6.1 Examen directo

Este es el procedimiento más sencillo pero muy importante para demostrar las estructuras parasitarias que caracterizan a un micetoma. El procedimiento consiste en recuperar el material drenado en las lesiones, que puede ser pus o material hematopurulento, el cual se observa directamente al microscopio para detectar las estructuras conocidas como granos. Las características de los granos dependen del agente causal, por lo que es esencial estudiarlas incluyendo, forma, tamaño, color y estructura. Los hongos pueden formar granos negros, blancos o blanco amarillentos, dependiendo del color de la colonia que forman. Los actinomicetos forman colonias que pueden no ser visibles a simple vista y que al microscopio también son pequeños o muy grandes, dependiendo del agente causal. Algunas bacterias forman granos con alguna característica especial: por ejemplo, *A. madurae* forma granos muy grandes (hasta de 5 mm), de bordes cartográficos; *A. pelletieri* forma granos de color rojo vino.

1.6.2 Cultivo

El cultivo se realiza a partir del material purulento que drena a través de las fístulas abiertas o por acción mecánica (por presión o con ayuda de un bisturí), el cual generalmente contiene los granos, los cuales representan el material de partida para este recurso diagnóstico.

Los granos de eumicetoma se siembran en ADS y ADS con antibióticos, y generalmente se incuban a un rango de temperatura de 25-28°C. La velocidad de crecimiento es variable y depende de cada agente. *Fusarium spp*, *Aspergillus spp*. O *Scedosporium apiospermum* se desarrollan en menos de una semana, mientras que *Madurella mycetomatis*, *Trematosphaeria grisea*, *Leptosphaeria sp*. Y *Medicopsis romeroi* (anteriormente *Pyrenochaeta romeroi*) son de crecimiento lento (más de tres semanas). La identificación se realiza con base en sus características morfológicas macroscópicas y microscópicas; se requiere de personal muy capacitado para distinguir las diferencias, muchas veces sutiles, entre los agentes. En la actualidad se busca el apoyo de técnicas moleculares para una taxonomía precisa de los agentes habituales y la descripción de nuevas especies que ocasionan este síndrome.

Aunque se han hecho algunos intentos de identificar a los principales agentes de eumicetoma utilizando la detección de enzimas mediante diversas pruebas bioquímicas o enzimáticas, actualmente la clasificación taxonómica se basa principalmente en las características macro y microscópica de los cultivos (facmed.unam.mx, [13-NOV-17]).

Debido a que la mayoría de los hongos causales de micetoma son principalmente hongos dematiáceos y únicamente forman micelio estéril, para los hongos como *Trematosphaeria grisea* y *Medicopsis romeroi*, ambos dematiáceos, la morfología es semejante, por lo que la identificación morfológica puede generar una confusión en los laboratorios, principalmente en personal sin experiencia con dichos patógenos.

Idealmente la incubación del organismo permite identificar a la especie para posteriormente realizar pruebas de susceptibilidad para una mejor terapia.

1.6.3 Histopatología y citología

Este procedimiento diagnóstico se realiza a partir de tejido de las lesiones obtenido por biopsia. En este tejido se observan, además de la respuesta inflamatoria, los granos, los cuales igual que en el examen directo, deben ser sometidos al estudio de sus características para determinar su posible etiología.

Para este estudio se recomienda que los cortes sean teñidos con Hematoxilina-Eosina, o ácido Peryódico de Shiff (PAS), tinciones suficientes para complementar el diagnóstico etiológico.

Durante la evaluación, los granos de actinomicetoma deben considerarse que están formados por filamentos de 0.5-1 μm de diámetro, mientras que las hifas en los hongos presentan un diámetro de 2-5 μm .

Muchos reportes y revisiones han descrito el uso del color del grano, así como tamaño y consistencia para diagnosticar la causa específica del micetoma, pero el resultado del cultivo representa una mejor herramienta para la identificación de los agentes causales. En la **Figura 4**. Se presentan cortes histológicos mostrando algunos granos tanto de eumicetoma como de actinomicetoma.

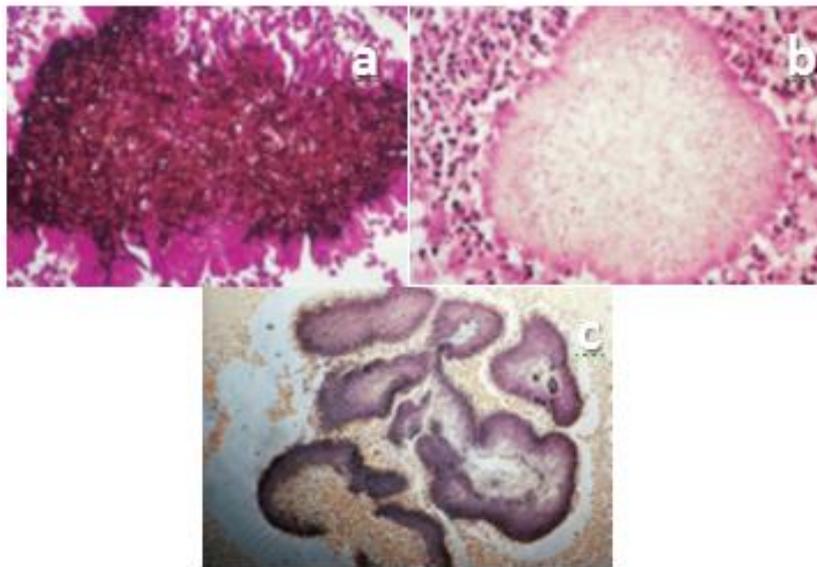


Figura 4. Corte histológico presentando forma y color de granos de micetoma. a) Grano marrón de *Acremonium falciforme*. b) Grano hialino de *Pyrenochaeta romeroi*. c) Grano por actinomycetes. Tomado de Hospenthal, 2010.

1.6.4 Imagenología

El uso de técnicas de imagen como radiografía, ultrasonido (ecografía), CT(Tomografía computarizada) y MRI (Resonancia Magnética) nos muestra un panorama amplio sobre la extensión del micetoma en tejido y hueso así como el alcance de destrucción de la zona afectada. La combinación de estas técnicas con las pruebas clínicas sirven para establecer un diagnóstico completo de la enfermedad (van de Sande, *et al.*, 2014).

A) Radiografía

La radiografía convencional (**Figura 5A**) indica si el hueso se encuentra comprometido, además de indicar los límites en todos los planos de la zona afectada. La importancia de esta prueba complementaria tiene un impacto importante en la terapéutica para determinar el tratamiento quirúrgico. Abd El Bagi sugiere una clasificación del micetoma de acuerdo al tamaño y extensión de las lesiones en hueso, así como la presencia de granulomas. Este autor indica que en la fase 0 el hueso no se encuentra comprometido y la infección se encuentra limitada, y en la fase VI, la más grave, el hueso se encuentra completamente destruido, además de existir diseminación a otras áreas del hueso (van de Sande, *et al.*, 2014).

B) Ultrasonido (Ecografía)

Otra prueba utilizada de manera más frecuente que la radiografía es la ecografía (**Figura 5B**), ya que a través de ella se observa la forma de los granos, la inflamación del granuloma y el tejido fibroso en la periferia. La presencia de imágenes hiper-ecóicas en lesiones de micetoma se clasifican como finas (22 %) o gruesas (35 %), numerosas (50 %) o pocas (17 %), aisladas (30 %) o agregadas (17 %) y difusas (10 %) o distribuidas en el centro de las cavidades (22 %). Sin embargo cuando hay senos activos la imagen puede distorsionarse y disminuir la visualización de las lesiones, por lo que provoca que esta prueba es utilizada para la diferenciación un micetoma y otra patología o entre actinomicetoma y eumicetoma (van de Sande, *et al.*, 2014).

C) MRI (Resonancia magnética)

El uso de la resonancia magnética (**Figura 5C**) permite visualizar la destrucción del hueso y el grado de compromiso de otros tejidos. Los granos se visualizan como lesiones conglomeradas, redondas, de 2-5 mm, mientras que el tejido involucrado se observa rodeado por bordes de baja intensidad. Sarris y cols correlacionaron los resultados de la MRI con los datos en la histopatología, y encontraron que las señales con mayor intensidad en la MRI representan inflamación granular, mientras que las señales con menor intensidad son causadas por la presencia de granos ("dot-in-circle"). En 2012 Shamid y cols sugirieron un nuevo método de clasificación para el micetoma basada en la MRI; propusieron un puntaje por el involucramiento de la piel, el tejido subcutáneo, el músculo y el hueso, las lesiones pequeñas (puntaje 1 - 3), moderadas (4 - 7) o severas (8 - 10). La resonancia magnética a diferencia de la ecografía no permite

diferenciar entre un actinomictoma de un eumictoma; sin embargo permite determinar el grado de involucramiento de más órganos y su destrucción (van de Sande, *et al.*, 2014).

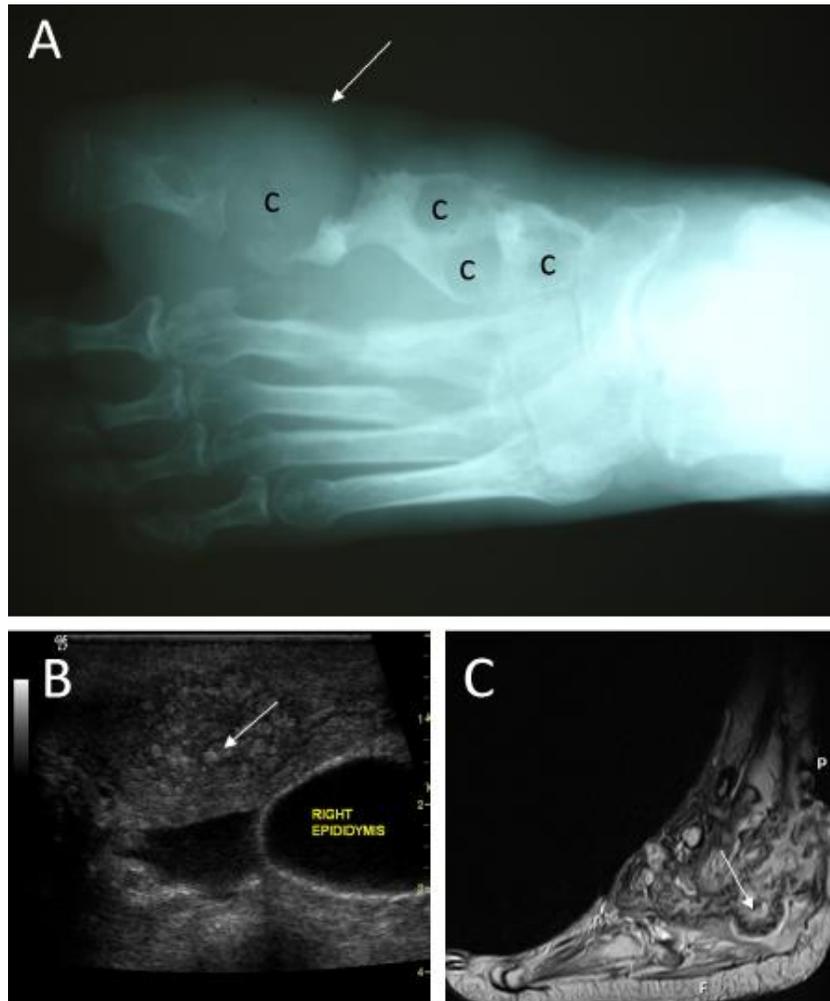


Figura 5. Diferentes técnicas utilizadas en el diagnóstico del micetoma. A) Radiografía del pie, en donde se observa tejido blando en forma de sombra (flecha) y múltiples cavidades en línea con eumictoma (c). B) Ecografía de un eumictoma en escroto, en donde se observan diversas cavidades con paredes delgadas y múltiples imágenes hipercóicas (flecha). C) MRI de pie, mostrando masiva destrucción de tejido blando y hueso (van de Sande, *et al.*, 2014).

1.7 Tratamiento

El uso de las técnicas mencionadas anteriormente nos proporciona un acercamiento de la extensión, gravedad de la lesión de manera rápida, no invasiva y que ayudan a un tratamiento mejor de las lesiones.

El tratamiento del micetoma ha probado ser difícil y comúnmente incluye el uso de antimicrobianos y cirugía. El uso de cirugía rara vez es exitoso en el tratamiento de esta infección, pero la remoción de pequeñas lesiones o la reducción de lesiones más amplias ha jugado un rol muy importante especialmente en el manejo de las enfermedades fúngicas debido a que la terapia de actinomicetoma y eumicetoma es diferente. El tiempo de tratamiento es muy variable; depende de la etiología (bacteriana o micótica) de la enfermedad, de la susceptibilidad del microorganismo a la droga o drogas indicadas y del apego del paciente al tratamiento.

1.7.1 Actinomicetoma

Para actinomicetoma se describe comúnmente el uso de estreptomicina con trimetopim-sulfametoxazol (TMP-SMX) o dapsona. Durante el primer mes el régimen para estreptomicina es de 14 mg/Kg/día (algunas veces 3 veces mes para régimen posterior al primer mes) para TMP-SMX 160 mg TMP y 800 mg SMX dos veces al día, para dapsona 1.5 mg/Kg/día dos veces al día.

En los casos de micetoma por *Nocardia* que no responden a sulfas, o que el tratamiento genere alteraciones en los pacientes, o bien que los agentes etiológicos sean sensibles, se pueden emplear otros esquemas terapéuticos; por ejemplo, la estreptomicina 1g/día; clofazimina 100 mg/día; rifampicina 600 mg/día e isoniacida de 300 mg-600 mg/día, con las indicaciones y controles inherentes a esto fármacos.

Diversos autores indican la elevada eficacia del uso de amikacina como terapia principalmente en cuadros de micetoma avanzado por *Nocardia* sp; sin embargo, se ha asociado a nefrotoxicidad por el uso continuo, además del alto precio de la amikacina, por lo que su uso depende de cada paciente. Es importante remarcar que en ocasiones la monoterapia no da resultados favorables, por lo que se recomiendan otras terapias combinadas, como amoxicilina + ácido clavulánico; en otros casos se utiliza el imipenem solo o combinado.

La cirugía utilizada para los pacientes con actinomicetoma se encuentra contraindicado, debido a una posible diseminación linfática y/o hematogénea (Bonifaz, 2010 y Zijjstra, *et al.*, 2016).

1.7.2 Eumicetoma

Generalmente en los países tropicales el micetoma es tratado con una combinación de antifúngicos y cirugía. Dentro de los medicamentos utilizados, el

itraconazol¹ es el tratamiento de elección (“gold estándar”). El periodo de tratamiento puede ser desde meses hasta años, el cual dependerá de la extensión de la lesión y patogenicidad del agente causal.

A) Antifúngicos

La dosis usual para el itraconazol es 400 mg por día (200 mg c/12 h). Esta terapia ha resultado efectiva específicamente para *Madurella mycetomatis* y *Trematosphaeria grisea* después de varios meses. Sin embargo para otros agentes causales la terbinafina (250-500 mg) presenta una buena alternativa para el tratamiento del eumicetoma (Nenoff, *et al.*, 2015).

Varios reportes han señalado falla en la terapia de eumicetoma con itraconazol solo o combinado. Es el caso de Bayles y cols quienes reportan una falla terapéutica con itraconazol combinado con 5-fluorocitosina², en 21 pacientes en Sudáfrica, 13 con actinomicetoma y 8 con eumicetoma por *Madurella mycetomatis*; ninguno presentó mejoría (Nenoff, *et al.*, 2015). Así mismo un paciente con terapia de 4 meses con 200 mg de itraconazol para eumicetoma no presentó mejoría; sin embargo la administración de 160 mg trimetropim-800 mg sulfametoxazol³ 2 veces p/día permitió una mejoría pero no curación en el paciente (Nenoff, *et al.*, 2015).

Debido a la resistencia y en consecuencia poca eficacia del itraconazol en la terapéutica, diversos estudios han reportado el uso de otros antifúngicos como terapias alternativas para eumicetoma, tales como el posaconazol⁴, la terbinafina⁵, el voriconazol⁶ y el isavuconazol⁷. En un estudio realizado en población de Sudamérica el posaconazol (200-800 mg por día) demostró ser una terapia alternativa y eficaz para el micetoma por *M. mycetomatis* y *T. grisea*, pero poca eficacia hacia *S. apiospermum* por lo que se utilizó voriconazol para este agente. En otro estudio la terbinafina en combinación con itraconazol mostró una alta eficacia para el eumicetoma; sin embargo para *S. apiospermum* y *S. boydii* se observó nula efectividad, por lo que se administró combinación de miconazol⁸ con caspofungina. En un estudio *in vitro* de susceptibilidad para *M. mycetomatis* se encontró que la concentración mínima inhibitoria (CMI) fue de ≤ 0.016 a 0.126

^{1,4, 6, 7, 8} Pertenecen al grupo de los triazoles los cuales inhiben principalmente la formación de ergosterol, la cual conforma la pared celular de los hongos (Gamaletsou, *et al.*, 2018).

² Análogo de una pirimidina fluorada. La fluorocitosina es metabolizada en las células fúngicas por la vía de las pirimidinas, actuando como un sustrato subversivo. El metabolismo produce nucleótidos tóxicos que interfieren con la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas (Vademecum, 2018).

³ Antibióticos utilizados de manera conjunta. Los dos componentes interfieren con la síntesis bacteriana de ácido tetrahidrofólico, intermediario esencial para la producción de ácidos nucleicos (Facultad de Medicina, 2018).

⁵ Es un derivado de la alilamina, la cual interfiere de modo específico en el primer paso de la biosíntesis del esteroide fúngico, genera la inhibición de la escualeno epoxidasa en la membrana celular del hongo (Vademecum, 2018).

µg/mL, mientras que en otro estudio realizado por Ahmed y cols el ravuconazol *in vitro* reportó una alta susceptibilidad para dicho hongo (Nenoff, *et al.*, 2015). El costo de la mayoría de los medicamentos previamente mencionados es muy alto, por lo que la terapia tiende a ser inaccesible para los pacientes y muchos de ellos abandonan el tratamiento, generando una evolución crónica en la infección (Bonifaz, 2010, Gamaletsou, *et al.*, 2018). En la **Figura 6** se muestran los principales antifúngicos para el tratamiento de eumicetoma.

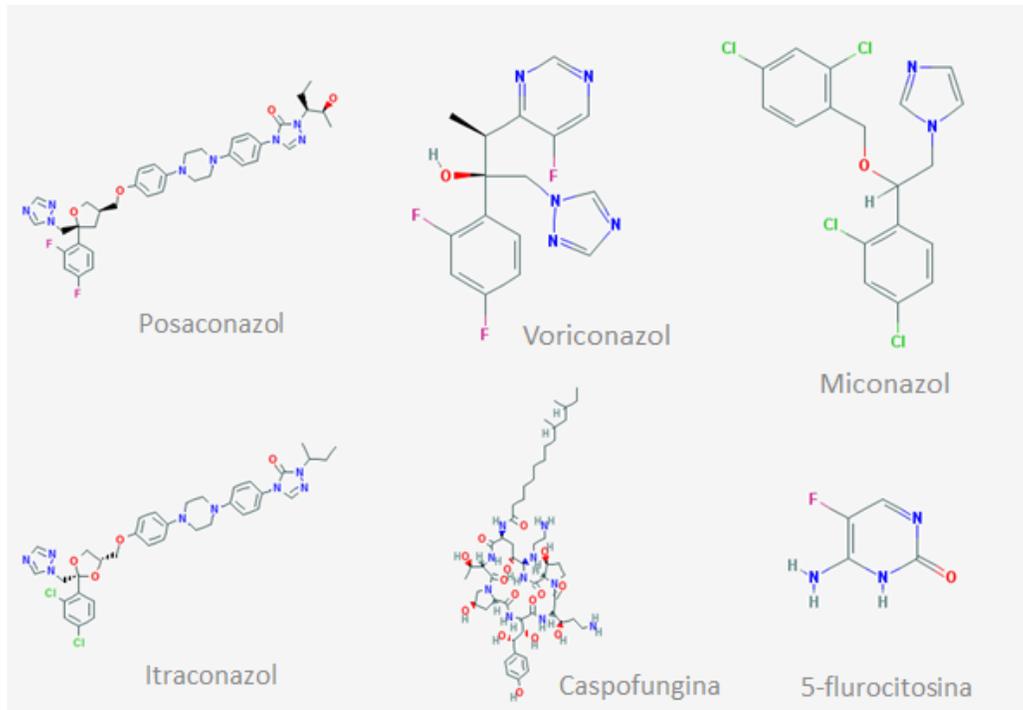


Figura 6. Estructura química de los antifúngicos utilizados con mayor frecuencia para el tratamiento de eumicetoma (Tomado de PubChem).

B) Cirugía

El uso de procedimientos quirúrgicos originalmente se utilizó como tratamiento estándar para el micetoma; sin embargo debido a las complicaciones médicas como las infecciones asociadas y la falta de antifúngicos, la recuperación del paciente no siempre ha sido exitosa.

Debido a varios factores como la resistencia a los antifúngicos, extensión de la lesión y el tiempo de la infección, los procedimientos quirúrgicos han sido solamente utilizados como terapia complementaria para el tratamiento en micetoma. La remoción del tejido, piel o músculo destruido de la lesión, inhibe la diseminación a otros órganos durante la terapia con antifúngicos (Nenoff, *et al.*, 2015).

En términos generales, una cirugía es recomendada para el tratamiento del eumicetoma, particularmente cuando es pequeño y bien localizado, y siempre acompañado de Tx. antifúngico antes y después de la cirugía.

1.8 Medios de cultivo y condiciones utilizadas para diferenciación de hongos filamentosos

La identificación de los agentes causantes de eumicetoma es difícil, debido a que los medios utilizados habitualmente no favorecen la formación de estructuras que permitan su caracterización morfológica. En la mayoría de los casos, es necesario utilizar procedimientos moleculares que en muchos laboratorios de diagnóstico microbiológico no son utilizados de manera rutinaria (Thiyajaran, *et. al.*, 2011).

Para identificar a la mayoría de hongos de importancia médica por medio de un cultivo es necesario considerar dos aspectos importantes: la nutrición y la reproducción de los hongos.

1.8.1 Nutrición

La nutrición en los hongos se lleva a cabo por absorción de sustancias orgánicas simples o elaboradas. Se realiza de dos maneras: como saprófitos o saprobios cuando toman sus nutrientes de materias orgánicas muertas o en descomposición, y la segunda como parásitos cuando se nutren de materia viva, incluso algunos llegan a ser parásitos obligatorios o facultativos, por lo que son heterótrofos. Para su crecimiento necesitan carbohidratos como fuente de carbono (glucosa, sacarosa y maltosa), nitrógeno (proteínas y sales de nitrógeno) y agua. Los hongos patógenos y oportunistas que afectan al ser humano; por lo general crecen entre 35 °C y 40 °C. El pH óptimo de crecimiento es de 5.6 a 6.8. La luz no es vital, sin embargo, para muchas especies ésta juega un papel importante en la esporulación, especialmente cuando existen intervalos de luz y oscuridad (Bonifaz, 2010).

1.8.2 Reproducción

Existen dos tipos de reproducción, la asexual y la sexual.

En la reproducción asexual se forman estructuras conocidas como esporas en hifas especializadas. Dependiendo del género y especie existen esporas internas (formadas en esporangios situados en una hifa especializada conocida como esporangióforo) y externas llamadas conidios y que surgen directamente de una hifa especializada llamada conidióforo.

En los hongos filamentosos las células hijas se forman en el extremo apical de los filamentos por elongación y tabicación, por lo que no se separan de la hija. Por ello para facilitar la dispersión a distancia de los hongos filamentosos se forman asexualmente esporas unicelulares de fácil dispersión.

La importancia práctica del conocimiento de las esporas asexuadas es grande, ya que la identificación de los hongos filamentosos se hace fundamentalmente en función de la morfología de estas estructuras. Cuando se produce crecimiento del micelio sin que se visualicen estructuras de reproducción se le conoce como "micelio estéril", lo cual complica su identificación.

Existe un tipo de conidio que constituyen formas de reproducción, pero también de resistencia que se denominan clamidoconidios y son capaces de soportar largos períodos de quiescencia en condiciones adversas. Se producen tanto en hongos levaduriformes como filamentosos, presentan una pared gruesa y generalmente son pigmentadas.

En la reproducción sexual consta en una síntesis principalmente de una primera fase de fusión citoplásmica (plasmogamia), seguida de la cariogamia, recombinación y posterior meiosis. El resultado es la producción de células que constituyen las esporas sexuales haploides en órganos de reproducción diferenciados. Según la estructura y morfología de las estructuras de reproducción sexual, se diferencian en tres formas: zigosporas, ascosporas (en el interior de un asca) y basidiosporas situadas externamente a un basidio.

Los hongos filamentosos se identifican a nivel de género y especie por la morfología del micelio, pero sobre todo por las características microscópicas de las estructuras de reproducción que forman. Por lo general, dichas estructuras son frágiles, por lo que se recomienda el uso de la técnica de microcultivo.

La mayoría de los agentes causantes de eumicetoma en el laboratorio forman estructuras de reproducción, ya sea sexual o asexual. En la **Tabla 4** se muestran algunos agentes causales y las estructuras de reproducción descritas en la literatura.

Sin embargo, algunos géneros y especies no generan estructuras de reproducción en los medios de cultivo habituales o de uso rutinario en los laboratorios de Micología; por lo que agentes como *Medicopsis romeroi* (ant. *Pyrenochaeta romeroi*) y *Trematosphaeria grisea* (ant. *Madurella grisea*) y *Madurella mycetomatis* frecuentemente son identificadas por su similitud morfológica con los respectivos géneros y por su frecuencia con que se presentan como agentes causales.

Tabla 4. Características morfológicas de los principales agentes causales de eumicetoma. Arenas, 2014 y Bonifaz, 2010.

Agente causal	Morfología	
	Macroscópica	microscópica
<i>Scedosporium boydii</i> (ant. <i>P. boydii</i>) <i>Scedosporium apiospermum</i>	Colonia blanco a beige, rugosa.	Hifas hialinas con conidios piriformes, forma coremios y cleistotecios.
<i>N. rosatti</i>	Colonia grisácea a café, vellosa y plegada.	Micelio hialino y forma peritecios con ascas redondeadas.
<i>Acremonium</i> sp (<i>Cephalosporium</i>)	Colonia blanco a rosácea, vellosa.	Micelio hialino, forma fiálides alargadas.
<i>Madurella mycetomatis</i>	Colonia marrón a ocre, difunde pigmento al medio, vellosa.	Micelio pigmentado, forma: fiálides piramidales con conidios esféricos, así como vesículas y esclerotes.
<i>Trematosphaeria grisea</i>	Colonia negra a grisácea, no difunde al medio, vellosa, compacta.	Micelio pigmentado, clamidoconidios.
<i>Medicopsis romeroi</i> (<i>P. romeroi</i>)	Colonia negra a grisácea, compacta.	Micelio pigmentado, forma picnidios piriformes, con conidios ovalados.
<i>Leptosphaeria senegalensis</i>	Colonia negra a grisácea.	Micelio hialino, forma peritecios con conidios ovalados.
<i>Exophiala jeanselmei</i>	Colonia grisácea a negro, difunde pigmento al medio, compacta con consistencia mucoide.	Micelio pigmentado, forma aneloconidios.

1.8.3 Medios de Cultivo

La composición básica de un medio de cultivo incluye nutrientes, un agente solidificante (en medios sólidos y semisólidos), sustancias que ayudan a dar un pH adecuado y componentes específicos. Los medios de cultivo pueden ser generales, enriquecidos, selectivos, diferenciales y especializados (Rezusta, *et al.*, 2004). La calidad de los medios de cultivo es indispensable para conseguir un buen aislamiento para su identificación.

Diversos autores han reportado diferentes medios de cultivo para favorecer la formación de estructuras que permitan la identificación de hongos. Algunos ejemplos son mostrados en la **Tabla 5**. Esos medios comparten la característica de presentar un bajo contenido de nutrientes, particularmente carbohidratos simples y mayor contenido de carbohidratos complejos, bajo contenido en nitratos.

Tabla 5. Medios de cultivo que inducen la formación de estructuras de reproducción (Nelson, *et al.*, 1983, Rajendra, *et al.*, 1991, Chávez, *et al.*, 1998, Flores, *et al.*, 2005, Rezusta, *et al.*, 2008 y Villatorio, *et al.*, 2008).

Medio de Cultivo	Géneros/ especies	Estructuras de Reproducción
AA-HC	<i>Cladosporium, Fusarium</i>	Estimula la conidiación de hongos miceliares, especialmente hongos dematiáceos
AHM	<i>Madurella mycetomatis</i>	Formación de fiálides
AET	<i>Madurella mycetomatis</i>	Formación de fiálides.
APZ	<i>Alternaria alternata</i>	Estimula la conidiación de hongos miceliares, especialmente hongos dematiáceos
AHA	<i>Acreonium, Cladosporium, Fusarium, Paecilomyces, Phialophora, Scopulariopsis</i>	Obtención de las formas teleomórficas asociadas.

El cultivo negativo se descarta por lo general a las cuatro semanas de incubación cuando se observa en el inóculo una ausencia de crecimiento.

1.9 Influencia de la luz y oscuridad en la inducción de estructuras de reproducción.

El efecto de la luz juega un papel crítico en la naturaleza, desde su intervención en procesos fisiológicos como la fotosíntesis en el caso de las plantas hasta la inducción de metabolitos secundarios.

En el caso de los hongos, estos reaccionan a la luz de diferentes maneras, principalmente como fuente de información, como la habilidad para reconocer si es

favorable a su crecimiento (pérdida de agua o nutrientes en el suelo), así como para transmitir la señalización para iniciar el proceso de crecimiento o la conidiación, la cual ocurre en presencia de la luz.

Los hongos presentan mecanismos de percepción a la luz roja, azul, UV cercana y verde; sin embargo, no existe suficiente información referente a los mecanismos de percepción de la luz, por lo que la mayoría de la bibliografía describe generalmente los efectos de la luz blanca y la luz diurna.

Se ha observado que los efectos de la luz para la inhibición o inducción de estructuras de reproducción están condicionados principalmente por ciclos circadianos de luz y oscuridad. Sin embargo, fenómenos como la hiperpolarización de la membrana celular, las alteraciones en los niveles de ATP intracelular y cAMP, el incremento del uso de oxígeno y la ruptura de glucógeno también han sido factores importantes en la formación de estructuras de reproducción (Doris y Schmoll, 2010).

La conidiación en los hongos es el proceso más regulado por ciclos circadianos de luz, y en algunos casos como *Neurospora*, ésta empieza al anochecer. Se ha observado que suministrar luz durante intervalos en la noche repercute de manera negativa, alterando la señalización para el inicio de la conidiación.

1.10 Identificación de agentes causales de micetoma por técnicas moleculares

Los procedimientos basados en el estudio del material genético han sido de gran utilidad en los últimos años para la identificación rápida y confiable de diversos microorganismos incluyendo los hongos. En el caso de los agentes de eumicetoma se han utilizado diferentes técnicas como: hibridación de fluorescencia in situ (FISH), Hibridación de arreglo de DNA, Multiplex tandem PCR, PCR en tiempo real, PCR, espectrometría de masas por MALDI-TOF [Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (desorción/ionización láser asistida por matriz)], RCA con capilar de Padlock [Rolling Circle Amplification (Amplificación de círculo rodante)] y LAMP [Loop mediated isothermal amplification (técnica de amplificación isotérmica mediada por bucle)] (Mouhanad, *et. al.*, 2015 y Tsui, *et. al.*, 2011). Dentro de los procedimientos más utilizados se encuentran la PCR seguida de secuenciación.

1.10.1.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR es un método desarrollado por Mullis en los años 1980, la cual tiene como fundamento la amplificación in vitro de

millones de veces una secuencia específica de DNA durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente. Para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima DNA polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el DNA en las células (NCBI, 2017; Tamay de Dios, *et al.*, 2013).

Los elementos importantes en la reacción son el templado o molde (cadenas de DNA que se separan y funcionan como molde para que la enzima sintetice las nuevas cadenas que lleven la secuencia blanco), la enzima (Taq polimerasa), los oligonucleótidos o primers, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (DNTP's: adenina, timina, citosina y guanina), el ion Mg^{+} , solución amortiguadora o buffer y agua, los cuales interactúan en las diversas fases de la PCR.

A) Fases de la PCR

La PCR cuenta con tres fases: la primera es la desnaturalización, seguida de la alineación, y posteriormente la elongación, las cuales se llevan a cabo en un equipo llamado termociclador, aparato que están diseñados para generar condiciones homogéneas durante las fases de la amplificación.

a) Desnaturalización

Al DNA templado o molde que normalmente se encuentra en doble cadena y que contiene la secuencia a amplificar se aplican inicialmente temperaturas altas (94 °C) durante 20-30s (este tiempo varía dependiendo de la secuencia blanco) para separar las hebras.

b) Alineación

En esta fase los primers (también llamados oligonucleótidos o cebadores) se alinean por el extremo 3' del DNA molde separado e hibridan con su secuencia complementaria. Para que se forme el complejo templado-primers, es importante que la temperatura de hibridación (T_m , temperature of melting) sea la óptima; ésta generalmente oscila entre 50-60 °C.

c) Enlongación

La Taq polimerasa juega un papel importante, actúa sobre el complejo templado-primers y empieza su función catalítica a una velocidad muy rápida; agrega DNTP's complementarios para crear las cadenas completas de DNA. La extensión de las cadenas es en dirección de la síntesis del DNA, es decir, de 5' a 3'. La temperatura óptima para la reacción es de 72 °C, ya que a esa temperatura la enzima es funcional.

Al finalizar la PCR se realiza una electroforesis en un gel de agarosa para visualizar los fragmentos amplificados y de esta forma confirmar que se obtuvo la amplificación de la región blanco (Tamay de Dios, *et al.*, 2013). **Figura 7.**

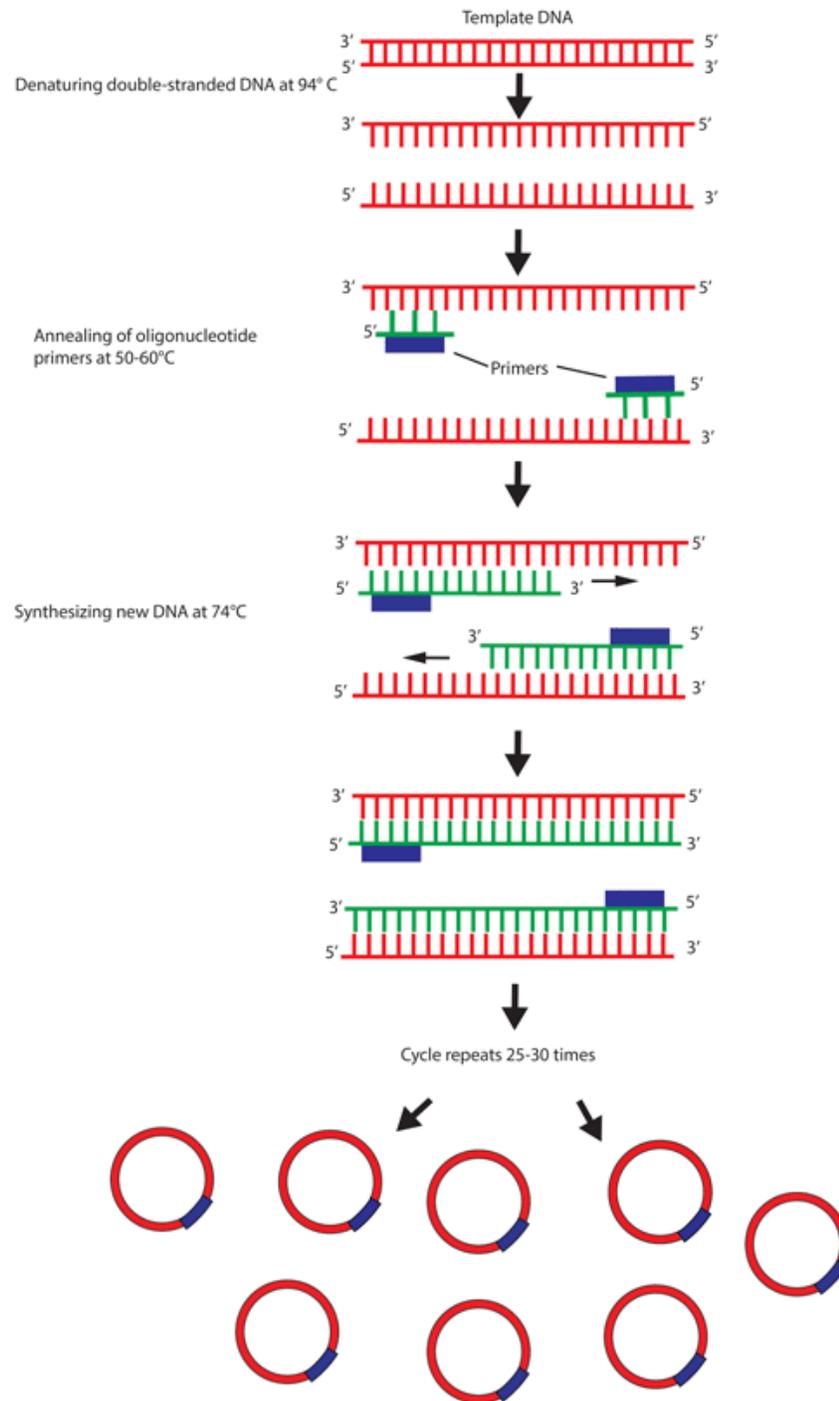


Figura 7. Esquema general del mecanismo de amplificación de fragmentos de DNA por PCR. Tomado de addgene.com.

1.10.2 Genes utilizados para la PCR en hongos

Los genes del RNA ribosomal (rRNA) son los genes más utilizados para la amplificación por PCR debido a que presentan un alto número de copias en el genoma. Esto aumenta la posibilidad de su detección en un gel de agarosa. La unidad transcripcional del gen rRNA se encuentra compuesta por los genes 18S, 5.8S y 28S. Entre la subunidad 18S y 5.8S y entre la 5.8S y la 28S DNA ribosomal se encuentran las regiones intergénicas espaciadoras transcripcionales (ITS1 and ITS2) **Figura 8**. Estos genes contienen secuencias conservadas comunes a todos los hongos, dominios variables y regiones espaciadoras internas altamente variables. Las zonas variables son utilizadas para clasificar las especies, ya que permiten diseñar oligonucléotidos que hibridan y detectan tanto secuencias muy conservadas e inespecíficas como variables y muy específicas (Rodríguez; *et. al.*, 2008 y Ferrer, *et. al.*, 2011).

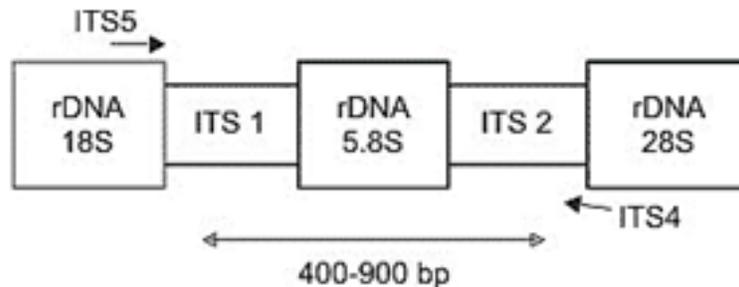


Figura 8. Estructura del rRNA y posición de las regiones intergénicas (ITS). La posición de los ITS y su dirección de síntesis se marcan con una flecha. Los fragmentos obtenidos varían entre los 400 y 900 pb. Obtenido de Valente-Brasileiro, *et. al.*, 2004.

CAPÍTULO 2.- DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN

2.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Con excepción de pocos géneros, los agentes causantes de eumicetoma frecuentemente carecen de características fenotípicas que faciliten su identificación. El método tradicional de identificación de estos hongos es el cultivo en medios como agar dextrosa Sabouraud y ocasionalmente agar papa dextrosa.

A diferencia de algunos hongos como *Scedosporium apiospermum* y *Fusarium* que crecen en pocos días, la mayoría de agentes de eumicetoma tienen un tiempo de crecimiento prolongado. Además, los agentes fúngicos más frecuentes causantes de eumicetoma como *Madurella sp* y *Medicopsis romeroi* no forman estructuras características que nos ayuden a identificarlos en los medios mencionados previamente.

Por otra parte, los procedimientos moleculares realizados en la clínica, además de permitir la caracterización de aislados difíciles de identificación y de estar dirigidos a estudios epidemiológicos, su costo resulta demasiado alto para ser utilizados en estudios rutinarios que permitan una identificación oportuna del agente causal de micetoma.

Derivado de lo anterior, resulta necesario buscar medios de cultivo que arrojen resultados oportunos y confiables a menor costo en comparación con los procedimientos moleculares, que nos ayuden a inducir estructuras que favorezcan la identificación de los hongos causantes de micetoma.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 Confirmar por procedimientos moleculares la identidad de los hongos causantes de eumicetoma incluidos en este estudio.

2.2.2 Encontrar uno o más medios de cultivo útiles para inducir la formación de estructuras de reproducción sexual o asexual de hongos causantes de micetoma para su identificación morfológica, modificando condiciones de luz, oscuridad y temperatura.

2.3 HIPÓTESIS

De los medios de cultivo propuestos en el presente estudio, por lo menos uno de ellos será útil para la inducción de estructuras de reproducción sexual o asexual en los hongos causantes de eumicetoma, con las cuales se facilitará su identificación morfológica.

2.4 MATERIALES Y MÉTODOS

2.4.1 Aislados

Se incluyeron 9 aislados, previamente conservados en solución salina al 0.85% que forman parte de la colección de hongos del área de Micología Médica (Unidad de Micología) del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina. Estos aislados han sido obtenidos de pacientes con micetoma y conservados en agar y/o agua durante varios años, estos aislados fueron identificados por morfología macro y microscópica como; *Leptosphaeria senegalensis* (040), *Madurella mycetomatis* (918 y 243), *Madurella grisea* (242 y 650), *Scedosporium apiospermum* (058 y 636) y *Pyrenochaeta romeroi* (054 y 635).

Los años de registro de los aislados en la colección para el aislado 058 del año 1986; los aislados 040, 054 son del año 1989;; los aislados 242 y 243 del año 1991; los aislados 635, 636 y 650 del año 2000 y el aislado 918 del año 2012.

2.4.2 Reactivación y preparación del inóculo

Cada uno de los aislados fue reactivado en 50 mL de caldo Dextrosa Sabouraud (cDS) e incubado en agitación (100 rpm) a 28 °C por 7 días. Pasado este tiempo los aislados fueron inoculados en agar papa dextrosa (APD) e incubados a 28 °C por 7 días. Posteriormente un fragmento de la colonia fue suavemente disgregado en un mortero estéril para preparar una suspensión en agua destilada estéril de la cual se tomaron 5 µL para observar al microscopio y verificar que este material no tuviera exceso de fragmentos fúngicos y/o conidios. En caso necesario se hicieron diluciones para tener de cada aislado 100 unidades formadoras de colonia por mL. De esta suspensión se inocularon 35 µL en agar dextrosa Sabouraud para obtener un cultivo monospórico. De una colonia de este cultivo, se hicieron tres subcultivos: uno para conservar en solución salina, otro para estudiar la morfología macro y microscópica en seis medios de cultivo diferentes y un tercero para cultivar en cDS para la extracción de DNA e identificación molecular.

2.4.3 Medios de Cultivo

Se elaboraron siete medios: agar harina de maíz (AHM), agar papa zanahoria (APZ), agar harina de avena (AHA), agar extracto de trigo (AET), agar agua con hojas de clavel (AA-HC), agar V8 (A-V8), agar dextrosa Sabouraud modificado (ADSm), de acuerdo a fórmulas reportadas en la literatura (Anexo A).

a) Morfología macroscópica

Cada uno de los medios fue inoculado, por duplicado con 30 μL de una suspensión elaborada a partir de una colonia crecida en APD de cada aislado; posteriormente se incubaron a 25 °C. A los 15 días se hizo un registro fotográfico de la colonia. A los 30 días, se hizo un examen directo con azul de algodón para su observación microscópica y registro fotográfico.

b) Morfología microscópica

Para el estudio microscópico se prepararon, por duplicado, microcultivos con cada uno de los medios de cultivo. En resumen, cada placa de agar se cortaron 4 fragmentos de aproximadamente 1 centímetro cuadrado, y se sobrepusieron en la superficie del agar restante de la placa; sobre la superficie de cada cuadrado de agar, se depositaron 20 μL de la suspensión de cada aislado y se les colocó un cubreobjetos estéril. Se incubaron a 25 °C. Cada semana se retiró un cubreobjetos para contrastarlo con azul de algodón y observarlo al microscopio. Se hizo registro fotográfico.

2.5 Efecto de los ciclos de luz y temperatura

En una siguiente fase y solamente para los aislados que no presentaron estructuras de reproducción que permitieran su identificación, en la fase previa. Se prepararon seis medios de cultivos, AET, AHM, APZ, ADSm, AA-HC y agar V8 (A-V8). Se procedió a inocular los aislados correspondientes y de la misma forma descrita para morfología macroscópica y microscópica, para esta fase se utilizó una incubadora automatizada (Percival scientific, programada para proporcionar intervalos de 12 horas de luz y 12 de horas de oscuridad a una temperatura de 35 °C, durante dos meses. El registro de la morfología macroscópica se realizó de la misma manera que en la fase anterior. La morfología microscópica se estudió dos veces por semana realizando exámenes directos contrastados con azul de algodón.

2.6 Extracción de DNA total

A partir de un cultivo en agar dextrosa Sabouraud se preparó una suspensión para inocular en cDS e incubar en agitación (120 ml) por 7 días a 30 °C. Pasado este tiempo, la masa fúngica fue recuperada por filtración en papel estéril. Después de secar perfectamente este material, se procedió a extraer el DNA utilizando el kit Gene All Plant SV® (descripción detallada en el Anexo B). Una vez realizada la extracción de DNA, se preparó un gel de agarosa al 0.8 % para evaluar la calidad y pureza del DNA. El gel fue teñido con SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen) a una concentración final 3 %.

2.7 PCR

El DNA total fue cuantificado (Epoch Microplate spectrophotometer, Bioteck®). De este material, 100 ng fueron utilizados para amplificar un fragmento de 600 pb de

la región ITS, de acuerdo al protocolo propuesto por Harun, *et al.*, (2011). Cada reacción contenía las siguientes concentraciones finales en un volumen de 50 µL: amortiguador de Reacción 1X (BioTecMol), MgCl₂ 1.5 mM, dNTP's (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 0.2 mM, Oligonucleótidos (ITS1 e ITS4) 0.4µM y Taq DNA polymerase (recombinant) Thermo Scientific 1.5 U. Se programaron 35 ciclos, cada uno con las siguientes temperaturas: desnaturalización 94 ° C, 1 min; hibridación 63.3 ° C 1 min; y alineamiento 50 ° C 1 min; extensión final 72 °C, 5 min.

Se preparó un gel de agarosa a 1.5 % teñido con SYBR Safe (3 %), para observar el o los fragmentos amplificados de cada uno de los aislados, con ayuda de un transiluminador (Macro-vue, UV-20, Hoefer).

Una vez visualizados los fragmentos, los productos de PCR fueron purificados con el kit DNA Clean & Concentrator (Zymo Research). Estos productos fueron nuevamente corridos en un gel de agarosa para corroborar su calidad.

2.8 Identificación molecular

Los productos de PCR purificados fueron enviados a secuenciar al Laboratorio de Biología Molecular de la Unidad de Biotecnología y Prototipos de la Facultad de Estudios Superiores campus Iztacala, UNAM. Posteriormente las secuencias obtenidas fueron procesadas con el programa CHROMAS®, se seleccionó una región de nucleótidos en donde la lectura fuera óptima, la cual fue comparada con la base de datos del GeneBank.

CAPÍTULO 3. RESULTADOS

3.1 Identificación molecular

3.1.1 Extracción de DNA

La extracción de DNA de los aislados dio como resultado un producto de buena calidad y cantidad. Este material es mostrado en la **Figura 9**. El DNA fue posteriormente cuantificado por espectrofotometría (**Anexo B**).



Figura 9. DNA de algunos aislados de agentes de eumicetoma corridos en un gel de agarosa al 0.8%.; Carril MP: Marcador de peso molecular λ DNA Hind III Fragments, Carril 2: *M. mycetomatis* (243), Carril 3: *M. mycetomatis* (918), Carril 4: *T. grisea* (242), Carril 5: *M. romeroi* (054), Carril 6: *T. grisea* (650), Carril 7: *L. senegalensis* (054), Carril 8: *M. romeroi* (635), Carril 9: *Sc. apiospermum* (058).

El aislado 636 mostró poco crecimiento, por lo que se dejó una semana más en incubación, antes de llevar a cabo la extracción de DNA.

3.1.2 PCR

Después de la amplificación de la región ITS por PCR, y de la electroforesis, se observaron los productos mostrados en la **Figura 10**. *Trematosphaeria grisea* y un aislado de *Scedosporium apiospermum* en este proceso no amplificó, por lo que se volvió a realizar la PCR para estos aislados.

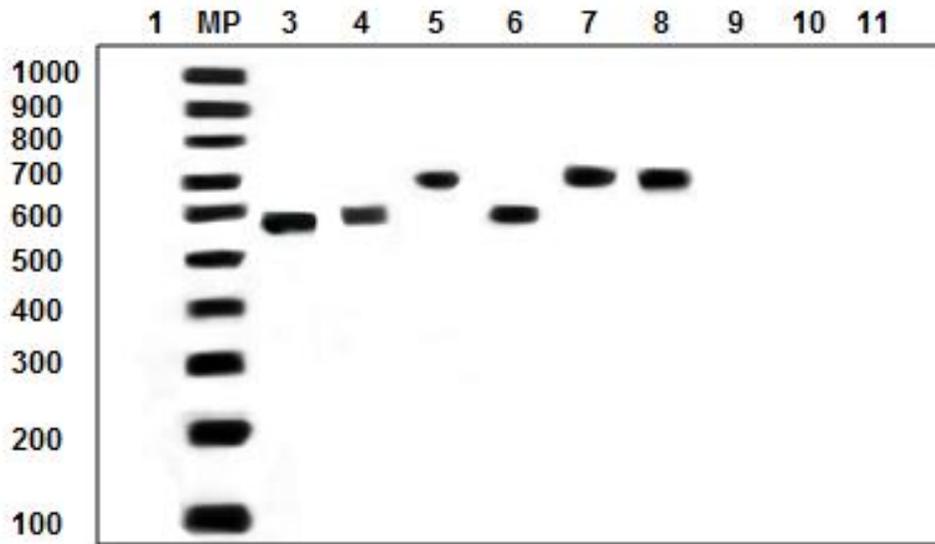


Figura 10. Productos de PCR de seis aislados corridos en un gel de agarosa al 1.5 %. Carril 1: Control negativo, Carril 2: Marcador de peso molecular de 100 pb; Carril 3: *M. romeroi* (040), Carril 4: *L. senegalensis* (054), Carril 5: *M. mycetomatis* (243), Carril 6: *M. romeroi* (635), Carril 7: *S. apiospermum* (058), Carril 8: *M. mycetomatis* (918), Carril 9: *T. grisea* (242), Carril 10: *T. grisea* (650), Carril 11: *S. apiospermum* (636).

En el gel de la **Figura 11** se observa que el aislado 636 correspondiente a *S. apiospermum* no mostró amplificación, por lo que se realizaron otras reacciones de PCR tomando como regiones blanco a D1/D2, β -tubulina y β -actina así como primers diseñados para el complejo de *Scedosporium sp.* De acuerdo a Harun *et. al.*, 2011, y utilizando como control positivo el aislado 058, el cual si amplificó para la región ITS para los 4 casos.

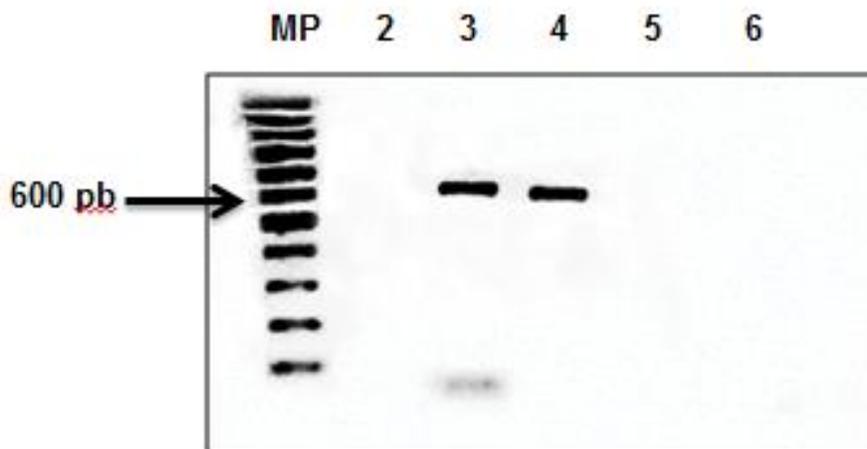


Figura 11. Productos de PCR corridos en un gel de agarosa al 1.5 %. Carril 1: Marcador de peso molecular de 100 pb; Carril 2: Control negativo Carril; 3: *T. grisea* (242), Carril 4: *T. grisea* (650), Carril 5: *S. apiospermum* (636).

El aislado 636 no amplificó para ninguna de las regiones (**Figura 12**) y solo se observó el amplificado de 700 pb del aislado 058 (*S. apiospermum*).

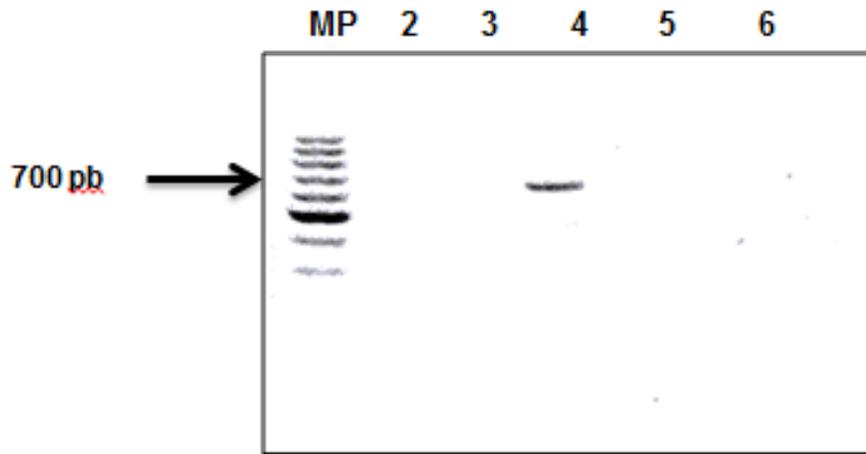


Figura 12. Productos de PCR corridos en un gel de agarosa al 1.5 %. Carril 1: Marcador de peso molecular de 100 pb; Carril 2: Control negativo Carril; 3: *T. grisea* (242), Carril 4: *T. grisea* (650), Carril 5: *S. apiospermum* (636).

3.1.3 Secuenciación

Al comparar la secuencia de los fragmentos obtenidos de los aislados estudiados con la base de datos del GeneBank, se determinó que el aislado 040 identificado en la Colección de la Unidad de Micología como *L. senegalensis*, corresponde a *Medicopsis romeroi* con 100% de identidad y un margen de error de 0.0. En este mismo análisis se determinó que los aislados 054, 058, 242, 243, 635 y 918 corresponden al género y especie previamente determinados por morfología.

Respecto al aislado 650, que en la colección estaba clasificado como *Madurella grisea*, al analizar la secuencia se encontró una identidad que oscilaba entre el 40 y el 70 % con hongos del orden Pleosporales, indicando especies como *Paraconiothyrium cyclothyrioides*, entre otros con márgenes de error muy altos.

Se decidió realizar una amplificación para las regiones de β -tubulina, D1/D2 y β -actina. La región D1/D2 no amplificó. Respecto a las dos regiones restantes, se obtuvo un amplificado de 800 pb para β -actina y uno de 300 para β -tubulina (**Figura 13**). Ambos fragmentos fueron purificados y enviados a secuenciar. El resultado del análisis de la secuencia en el GeneBank el mismo obtenido en el análisis de la región ITS. No se realizaron otros experimentos moleculares para este aislado; por lo que su estudio fue solamente morfológico, con identificación molecular hasta el orden de Pleosporales.

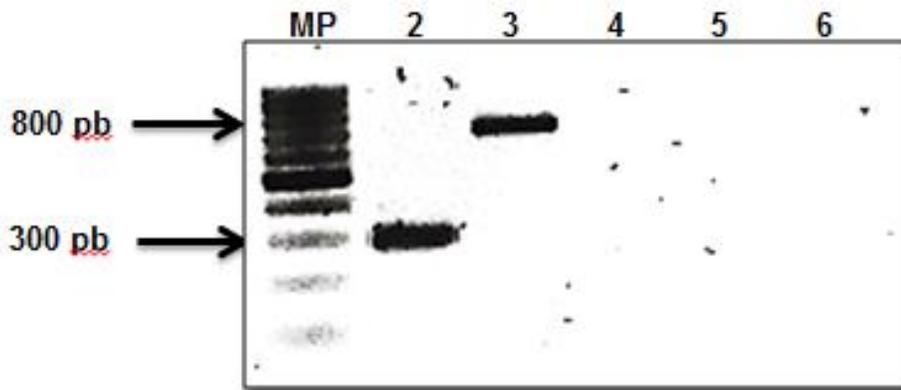


Figura 13. Productos de PCR del aislado 650 (*T. grisea*), corridos en un gel de agarosa al 1.5 %. Carril 1: Marcador de peso molecular de 100 pb; Carril 2: fragmento correspondiente al gen de β -actina (300 pb); Carril 3: fragmento correspondiente al gen de β -tubulina (650), Carril 4: Control negativo.

3.2 Morfología macro y microscópica

3.2.1 *Medicopsis romeroi*

En los aislados identificados como *M. romeroi* (040, 054 y 635), su morfología macroscópica después de 15 días de incubación, se observaron colonias algodonosas, con micelio aéreo de color marrón claro a oscuro, con crecimiento radial y con borde grisáceo. No se observó pigmento difusible al medio. En la periferia de las colonias crecidas en AET se observaron pequeños cuerpos esféricos dematiáceos; a los 30 días, estos cuerpos esféricos se observaron en toda la colonia.

La formación de picnidios se observó en los seis medios de cultivo; en AET, la formación de picnidios inició en la semana dos en forma de aglomerados de hifas, algunas de la periferia hinchadas, recubiertas por una capa amorfa oscura, como se observa en las **Figuras 14, 15 y 16**. Con relación al aislado 054 la formación de picnidios se observó desde la semana dos. En los medios de cultivos restantes la formación de picnidios, así como su madurez se observó hasta las semanas tres y cuatro de incubación.

Los picnidios formados en los diferentes medios mostraron distintas formas y tamaños: circulares, ovalados, piriformes, con dimensiones desde 30 X 40 μm hasta 70 X 90 μm de diámetro; al romper la estructura se observaron conidios hialinos con formas elipsoidales y cilíndricas con un tamaño de 2.0 – 2.8 X 1 - 1.5 μm (**Figuras 14, 15 y 16**).

En todos los medios de cultivo se observó un aumento en el número de picnidios en relación directa con el tiempo de incubación.

3.2.2 *Scedosporium apiospermum*

Los aislados identificados como *S. apiospermum* (058 y 636), la morfología macroscópica mostró colonias algodonosas, blanco a grisáceas, con crecimiento aéreo radial y sin pigmento difusible al medio. No se observó diferencia notable en la morfología de las colonias entre el inicio y el término del periodo de incubación.

Microscópicamente, solo el medio AA-HC indujo la formación de cleistotecios, en la semana tres y cuatro de incubación, aunque estos fueron muy escasos. En los demás medios sólo se observaron estructuras de reproducción asexual, es decir, conidios hialinos ovalados y coremios, como se muestra en las **Figuras 17 y 18**.

El tamaño de los cleistotecios formados osciló entre 80-100 µm de diámetro; no se observaron ascas, únicamente se observaron las ascosporas pigmentadas, ovoides, de 4-5 µm de largo.

Al finalizar el periodo de incubación se observó una degradación de las hifas y conidios en todos los medios de cultivo.

A) Influencia de la luz y oscuridad

A los 15 días de su incubación en condiciones de luz alternada con oscuridad, se observaron colonias de crecimiento rápido, de marrón a beige, sin pigmento difusible al medio. En los medios AET, APZ y A-V8, ambos aislados (058 y 636) se observó un crecimiento anular **Figuras 19 y 20**.

Microscópicamente ambos aislados desarrollaron cleistotecios marrón, redondos en el medio AA-HC, de 80-100 µm de diámetro; no se observaron ascas, pero sí ascosporas pigmentadas, ovoides, de 4-5 µm de largo. La morfología de los cleistotecios fue similar al observado en las condiciones previamente descritas, es decir, la luz y oscuridad no influyeron en estas estructuras. En el aislado 636 se observó una estructura piriforme, 50 x 20 µm, marrón, a las dos semanas de incubación en agar AV8; a las tres semanas de incubación no se observaron estructuras similares. En todos los medios de cultivo se desarrollaron coremios, pero fueron más abundantes en APZ y AHM.

Debido a que en la mayoría de los medios se observó degradación fúngica a partir de la tercera semana, en la **Figuras 19 y 20** solamente se muestran imágenes hasta dicha semana, en particular en AA-HC, en donde se observó la formación de cleistotecios.

3.2.3 *Trematosphaeria grisea*

Los aislados de esta especie (242 y 650), formaron colonias algodonosas, con micelio aéreo de color marrón en el centro y blanco-grisáceo en la periferia, con poco pigmento marrón difusible al medio, como se muestra en las **Figuras 21 y 22**. No se observó ninguna diferencia en el transcurso de los 30 días de incubación.

En la morfología microscópica y en todos los medios, sólo se observaron hifas pigmentadas, sin estructuras de reproducción. En la cuarta semana se observó el micelio degradado en todos los medios.

A) Influencia de luz y obscuridad

A los 15 días de su incubación se observaron colonias de crecimiento rápido, de marrón claro a oscuro, con pigmento difusible al medio. En los medios AET, APZ y A-V8, tanto en los aislados 242 como 650, se observó crecimiento en forma anular (**Figuras 23 y 24**).

Microscópicamente solo se observó micelio estéril en todos los medios. A partir de la tercera semana se observó degradación del cultivo por lo que en las figuras solo se reportan imágenes hasta este tiempo; se muestra una imagen de la semana ocho de incubación en que se observa el micelio completamente degradado.

El aislado 242 en el medio A-V8, ADSm, mostró una aglomeración de hifas en la primera y segunda semana; sin embargo, no desarrolló ninguna estructura de reproducción. Se observa presencia de clamidoconidios en cultivos después de dos semanas en los medios AA-HC, AET, ADSm, APZ y A-V8.

3.2.4 *Madurella mycetomatis*

En *Madurella mycetomatis* (243 y 918), la morfología macroscópica presentó mayor variabilidad en los diferentes medios de cultivo, desde la formación de micelio hasta la presencia de pigmento difusible al medio. Los medios AA-HC, APZ, AET y AHM indujeron colonias de beige a blanco, con poco micelio aéreo, muy adherido a la superficie del agar, sin pigmento difusible al medio. En los medios AHA y AA-HC, se desarrollaron colonias marrones en el centro y borde grisáceo, con pigmento marrón difusible al medio.

Al finalizar el periodo de incubación los medios de cultivo, AHM, AA-HC, APZ, indujeron estructuras esféricas dematiáceas en el interior del medio, conocidas como esclerotes. En ADSm se observó crecimiento filamentoso hacia el interior del agar.

En el aislado 918, al final de la segunda semana de incubación en AHM y APZ, se formaron escasas fiálides piramidales, con conidios esféricos, como se muestra en la **Figura 26**. Al mismo tiempo y en todos los medios, se observaron hifas en proceso de degradación.

Referente al aislado 243 en medio AHM y AHA (**Figura 25**) se observaron escasas fiálides; en la segunda semana también se observó un proceso de degradación. La formación de esclerotes se observó durante las semanas tres y cuatro (**Figura 25 y 26**)

A) Influencia de luz y obscuridad

Las colonias presentaron variabilidad en su forma, aspecto y pigmentación. En los medios AA-HC y APZ, se desarrollaron colonias de micelio blanco, abundante

pero estrechamente adherido a la superficie del medio, sin pigmento difusible, así como estructuras esféricas marrón dentro inmersas en el medio (conocidas como esclerotes). En los medios AHM, AET, ADSm y AV8 se observaron colonias marrones con borde claro, con pigmento difusible al medio; en estos medios se observó crecimiento en forma de anillos (**Figuras 27 y 28**).

Microscópicamente, solo los medios AHM y AV8 indujeron la formación de fiálides en los dos aislados (243 y 918). El aislado 918 mostró la presencia de fiálides en menor tiempo (una semana) y en mayor número que el aislado 243. Respecto al medio, se observó que el AV8 indujo la formación de fiálides más grandes que el AHM. En AHM se observaron polifiálides, a diferencia del AV8 en que se observaron solamente monofiálides.

Resultados después de 30 días a 25°C en incubación en seis medios de cultivo y así como periodos de luz y oscuridad.

Figura 14. Aislado 040, *Medicopsis romeroi*

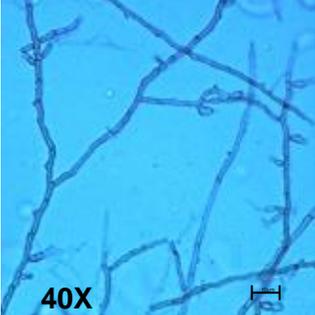
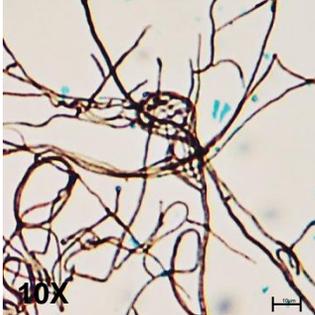
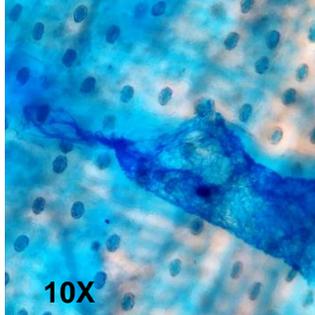
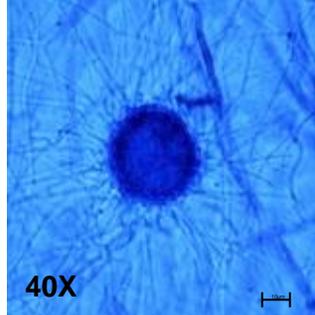
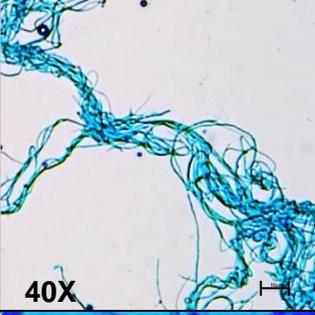
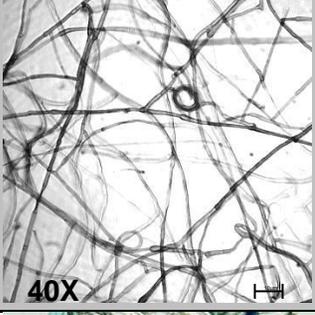
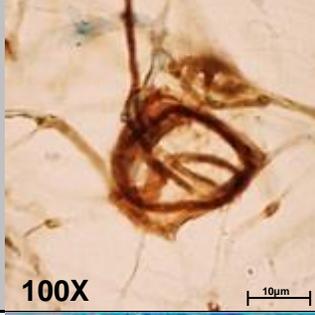
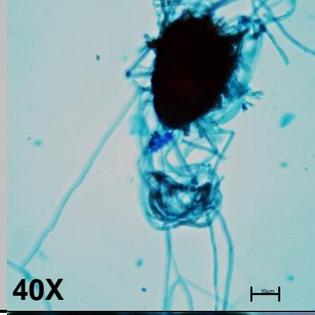
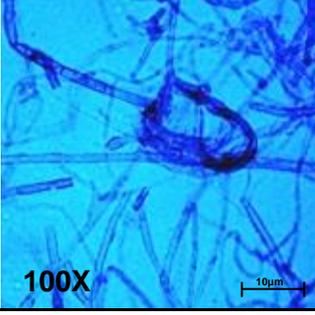
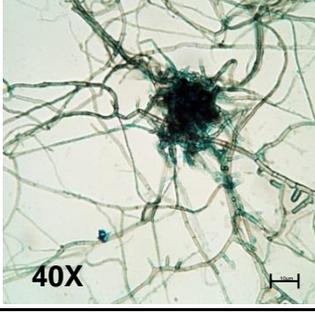
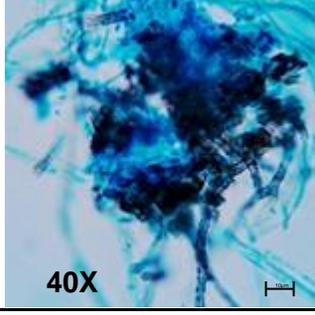
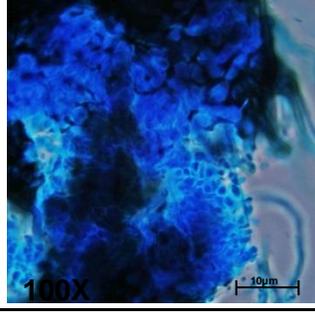
Medio	Macroscópica	Microscópica			
	15 días	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
AA-HC					
ADSm					
AET					

Figura 14. 040 *Medicopsis romeroi* (cont).

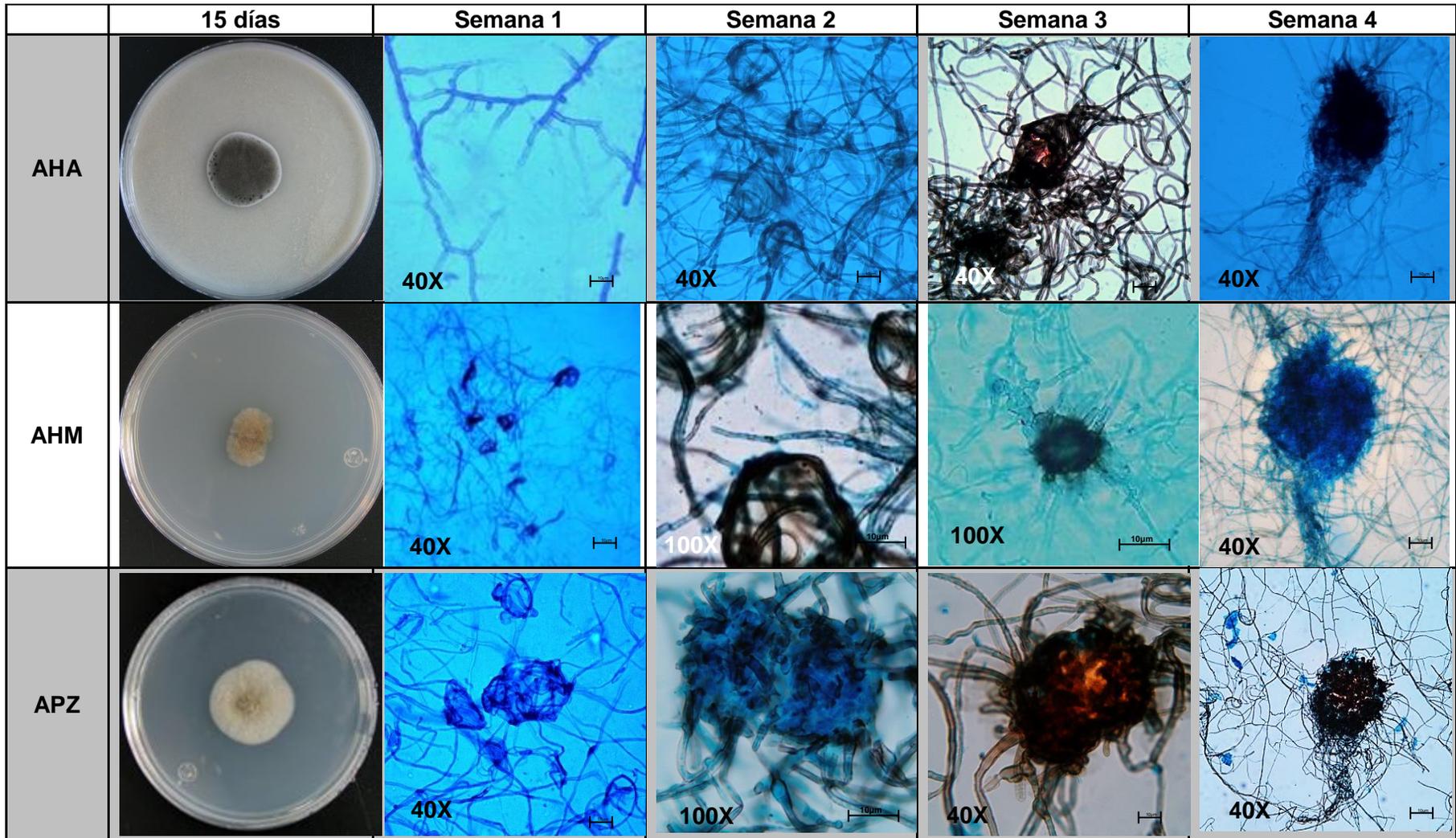


Figura 15. Aislado 054 *Medicopsis romeroi*.

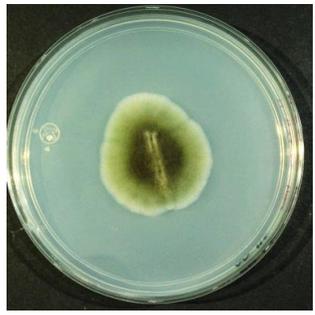
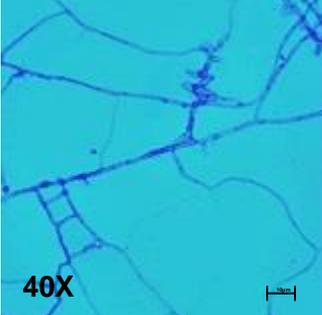
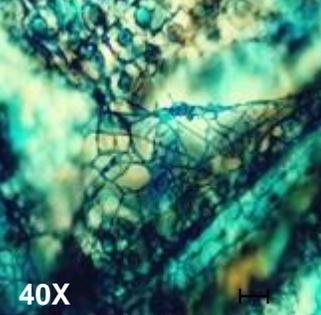
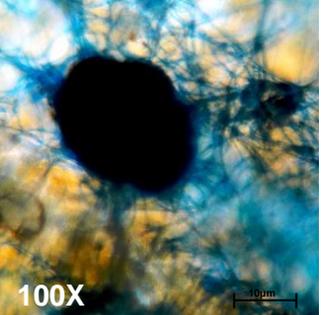
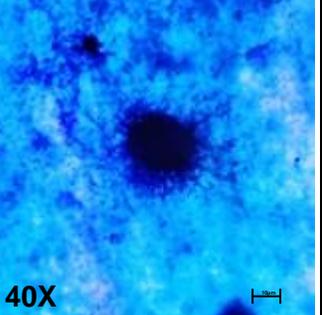
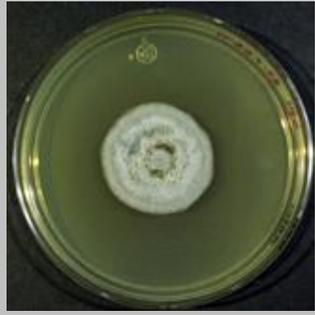
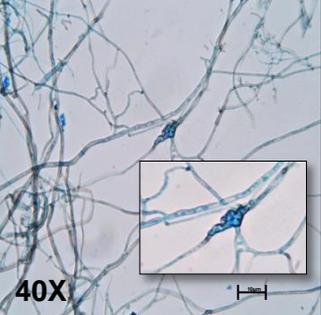
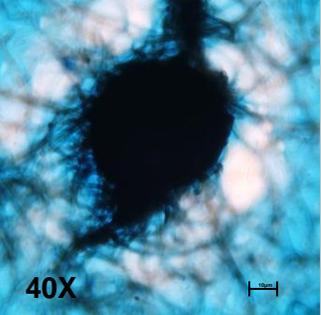
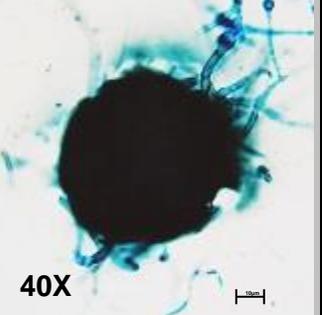
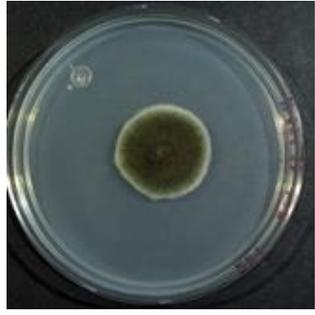
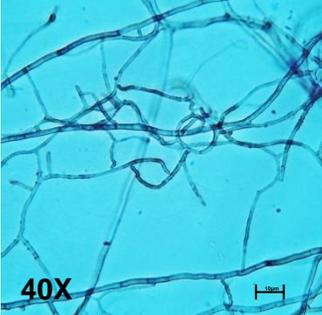
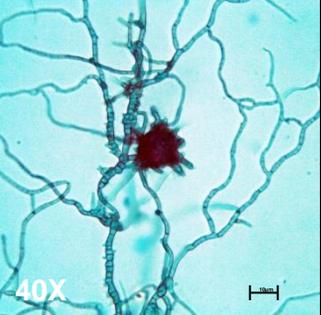
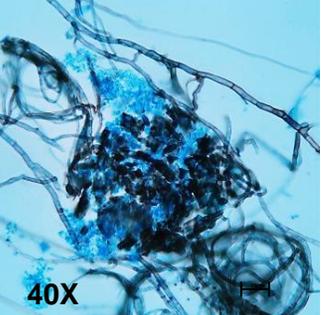
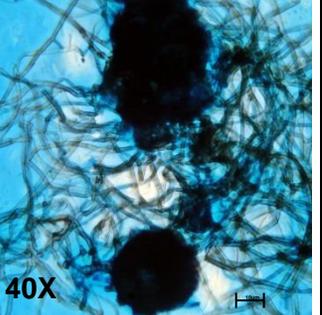
Medio	Macroscópica	Microscópica			
	15 días	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
AA-HC					
ADSm					
AET					

Figura 15. 054 *Medicopsis romeroi* (cont).

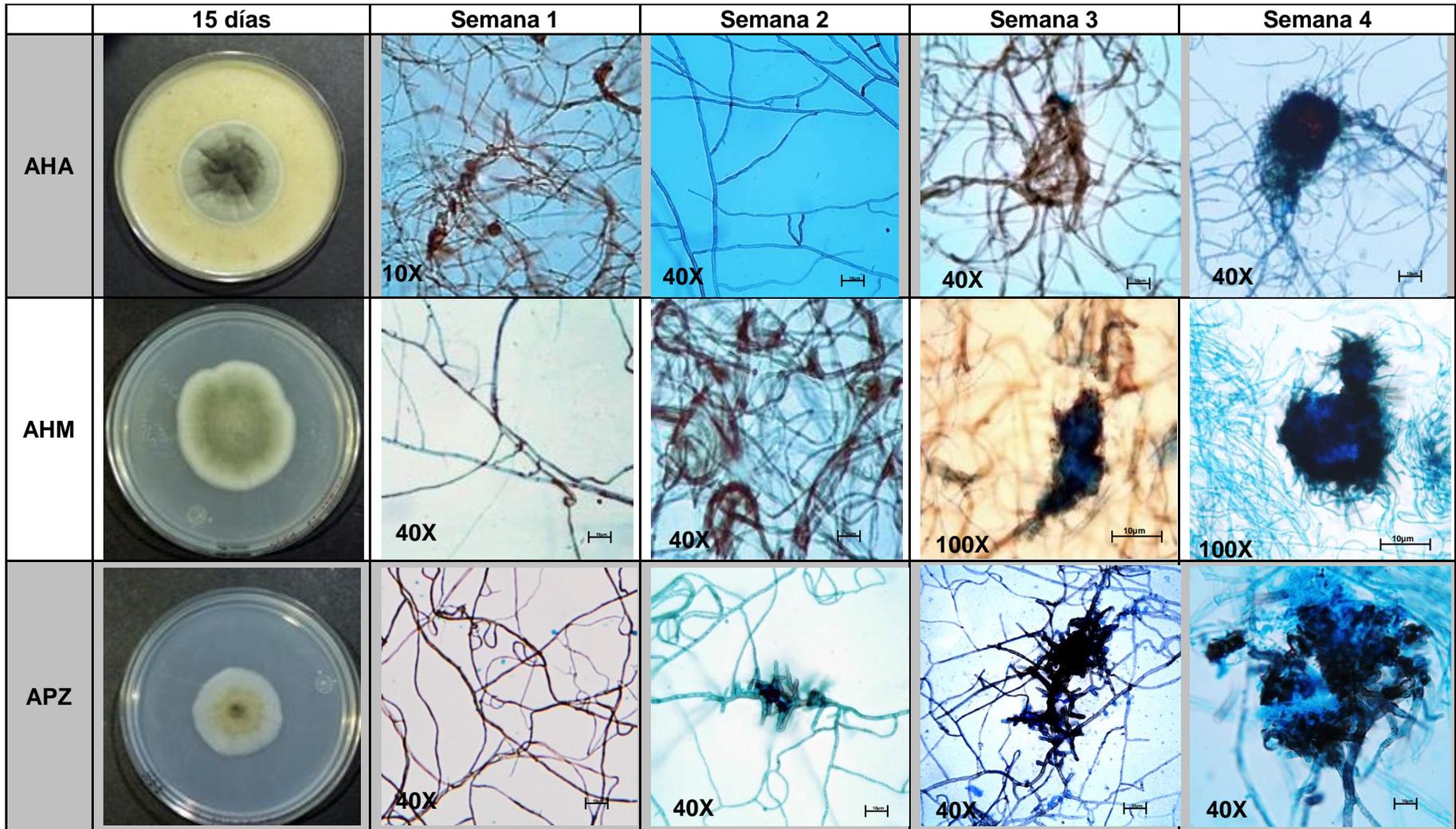


Figura 16. Aislado 635 *Medicopsis romeroi*

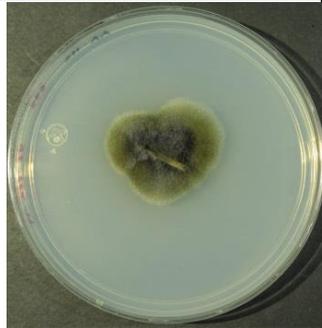
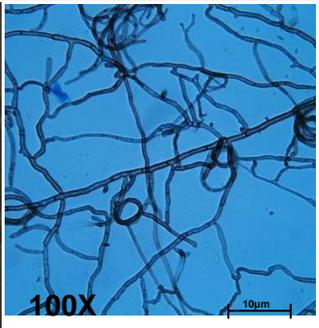
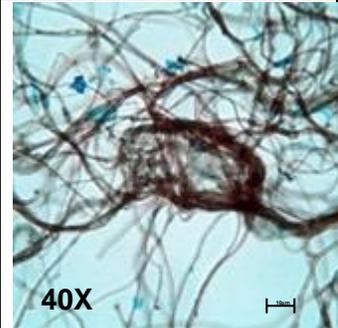
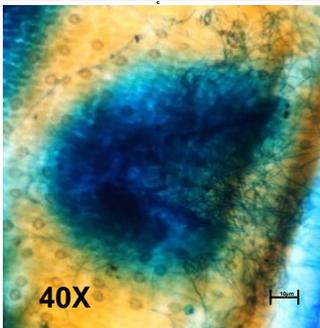
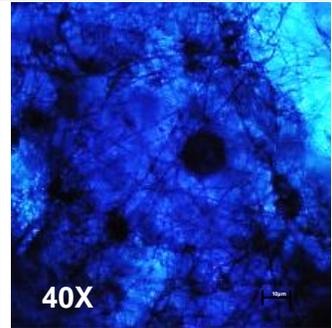
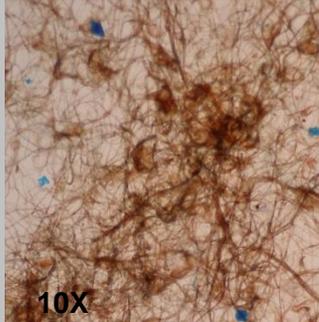
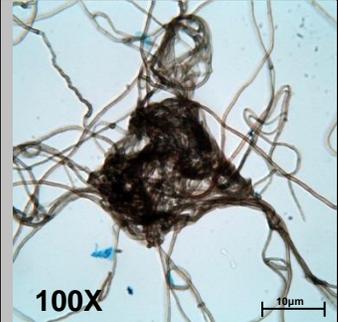
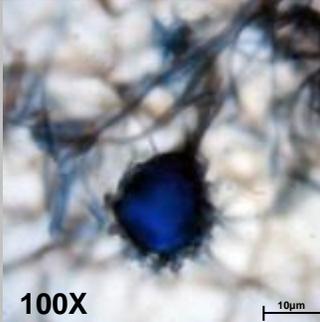
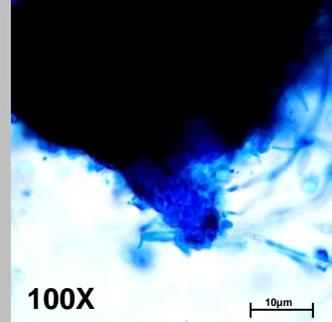
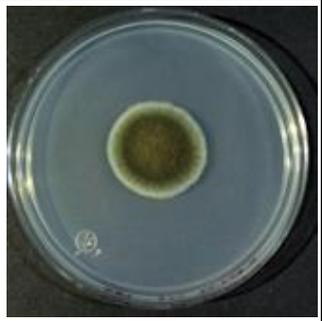
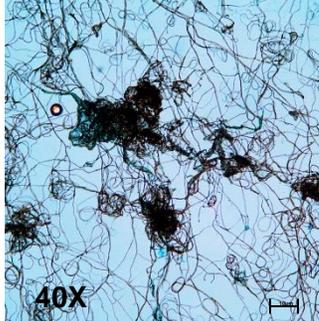
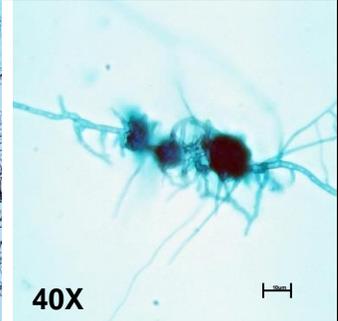
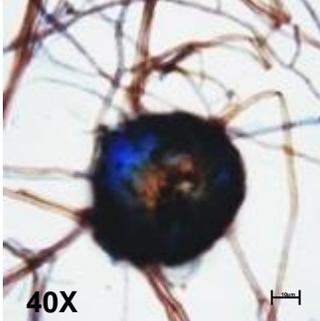
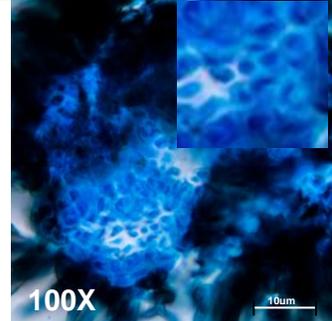
Medio	Macroscópica	Microscópica			
	15 días	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
AA-HC					
ADSm					
AET					

Figura 16. 635 *Medicopsis romeroi* (cont).

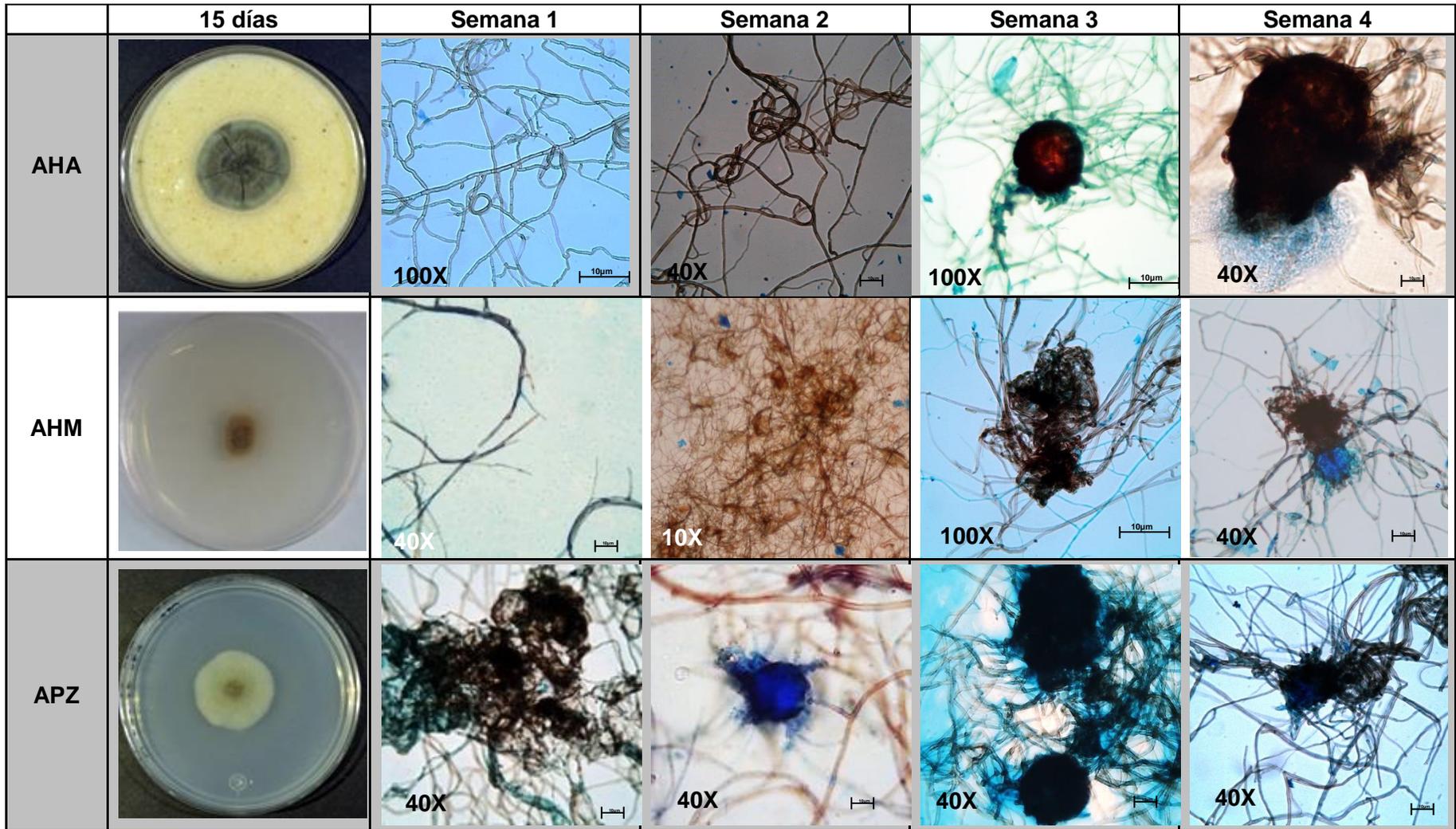


Figura 17. Aislado 058 *Scedosporium apiospermum*

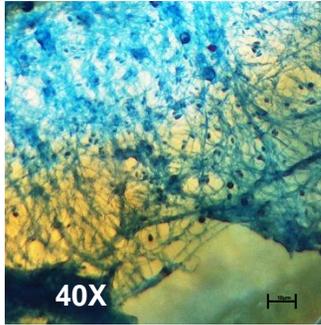
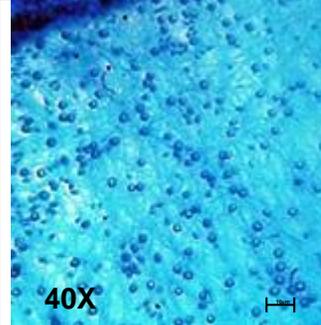
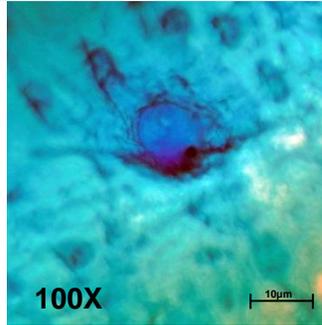
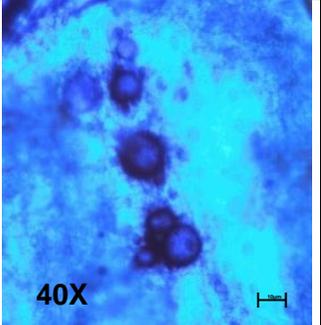
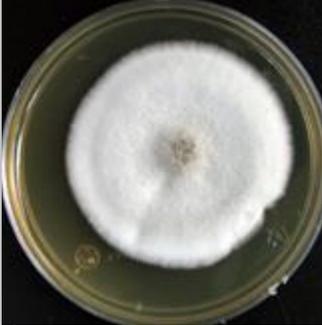
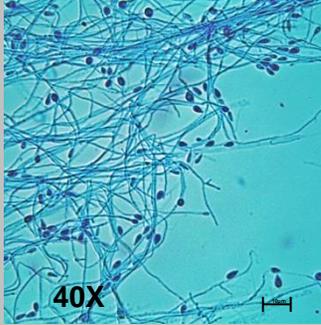
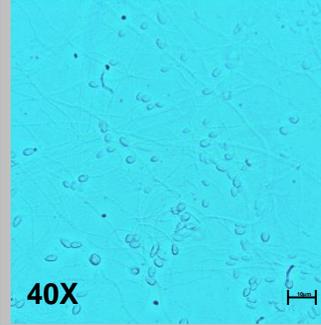
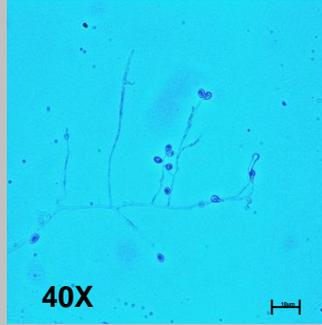
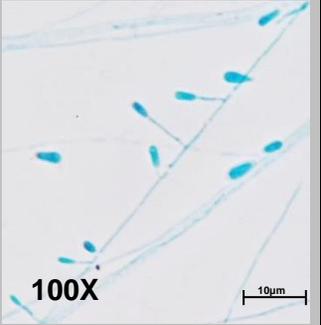
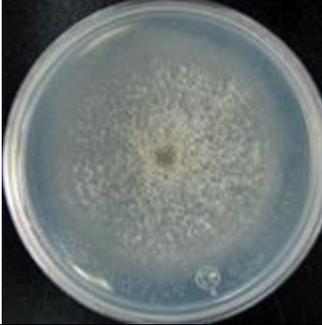
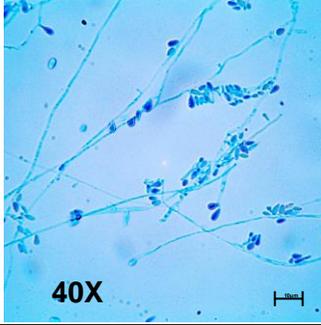
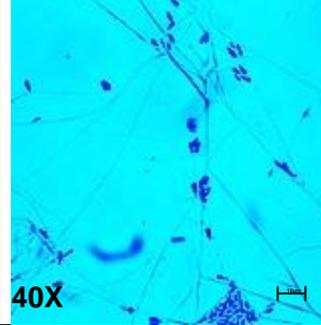
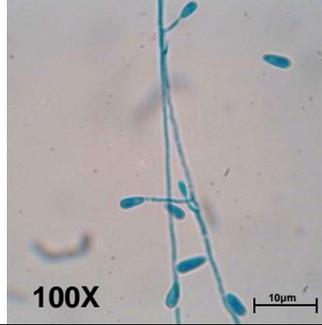
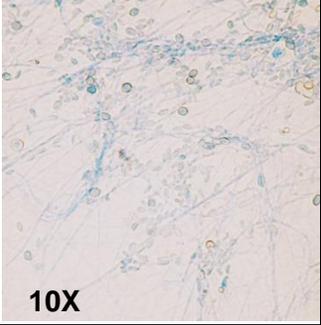
Medio	Macroscópica	Microscópica			
	15 días	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
AA-HC					
ADSm					
AET					

Figura 17. 058 *Scedosporium apiospermum* (cont).

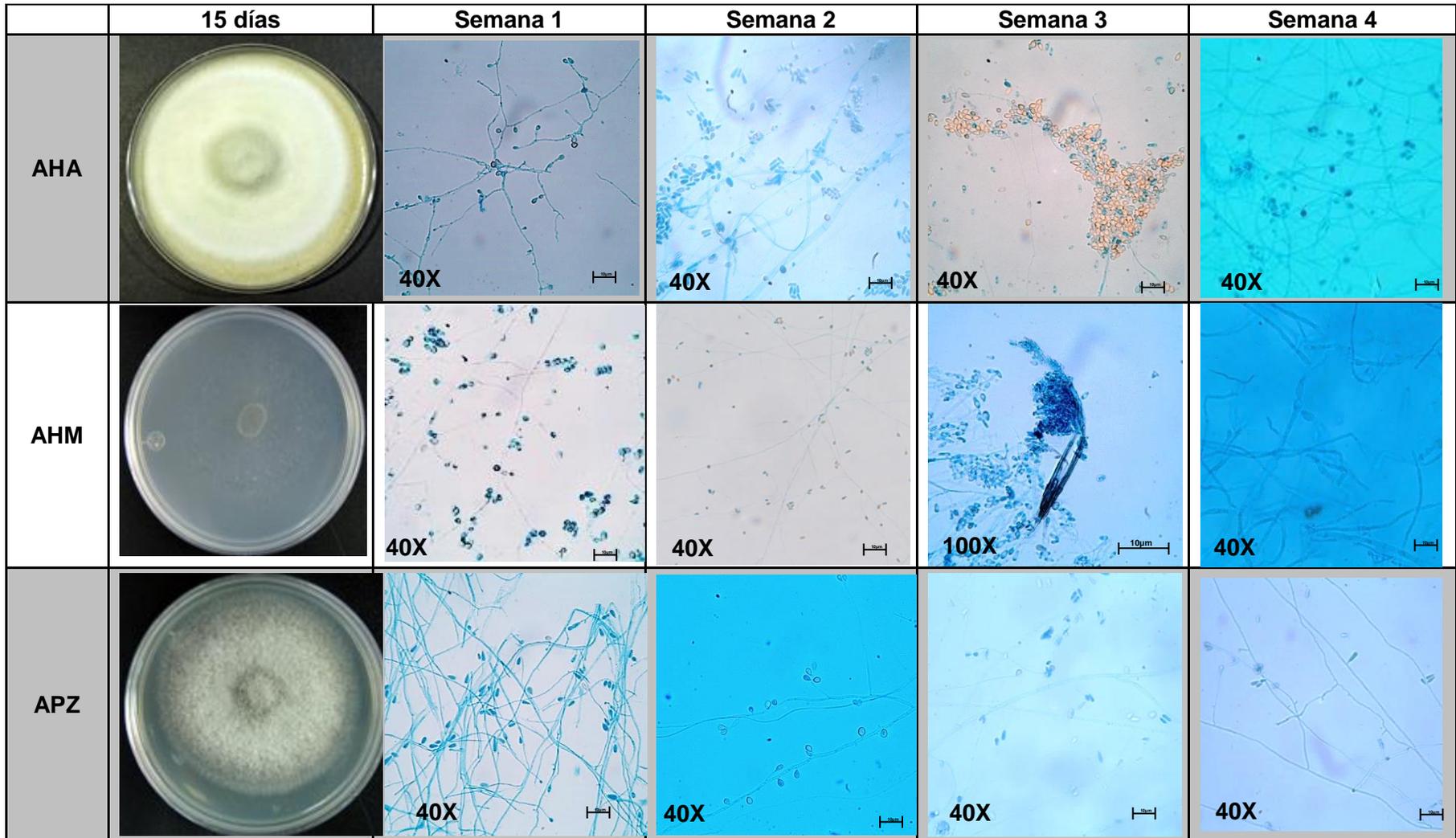


Figura 18. Aislado 636 *Scedosporium apiospermum*

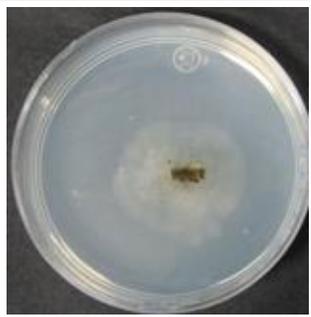
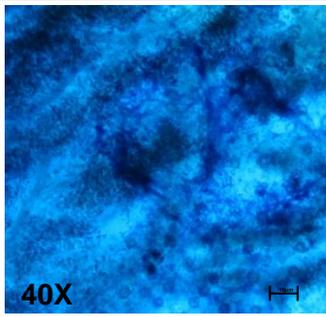
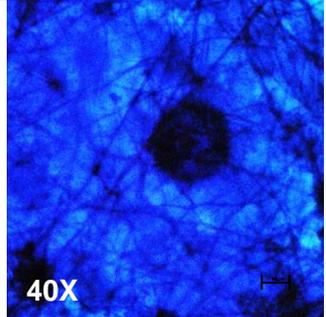
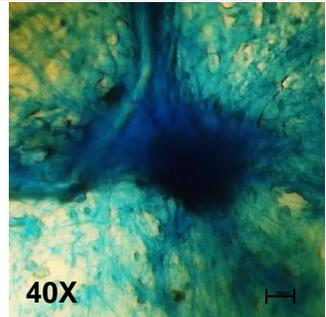
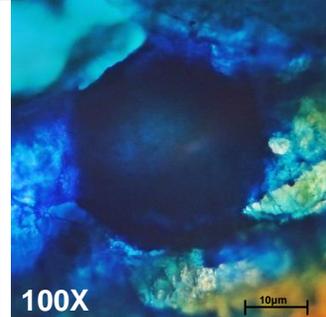
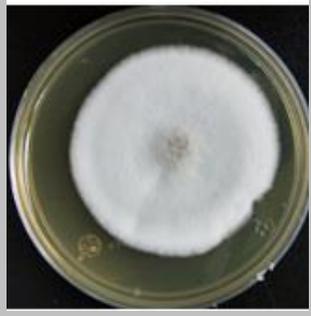
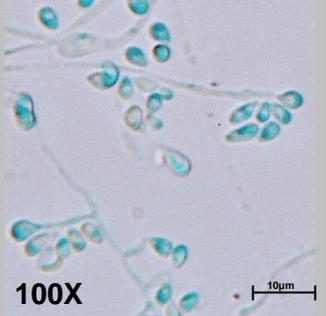
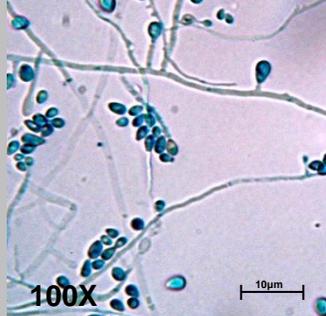
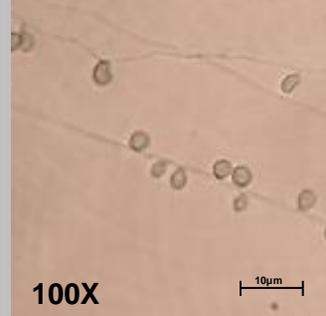
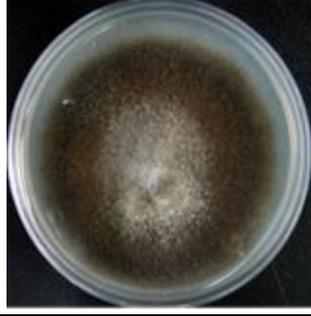
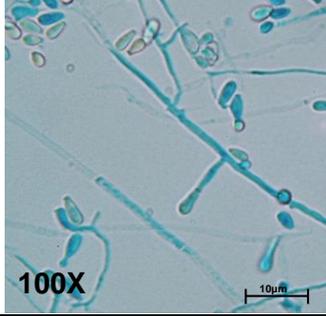
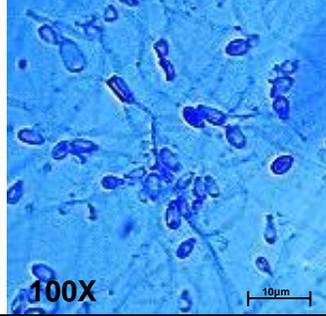
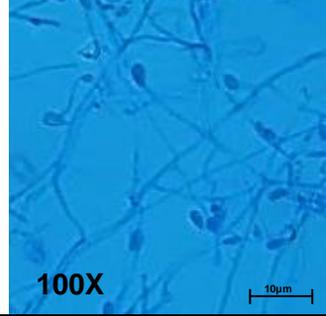
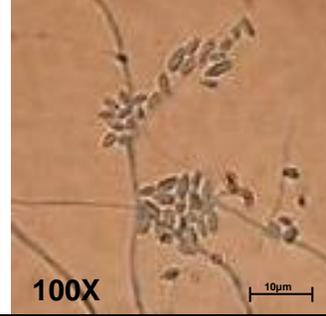
Medio	Macroscópica	Microscópica			
	15 días	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
AA-HC		 40X	 40X	 40X	 100X
ADSm		 100X	 100X	 100X	 100X
AET		 100X	 100X	 100X	 100X

Figura 18. 636 *Scedosporium apiospermum* (cont).

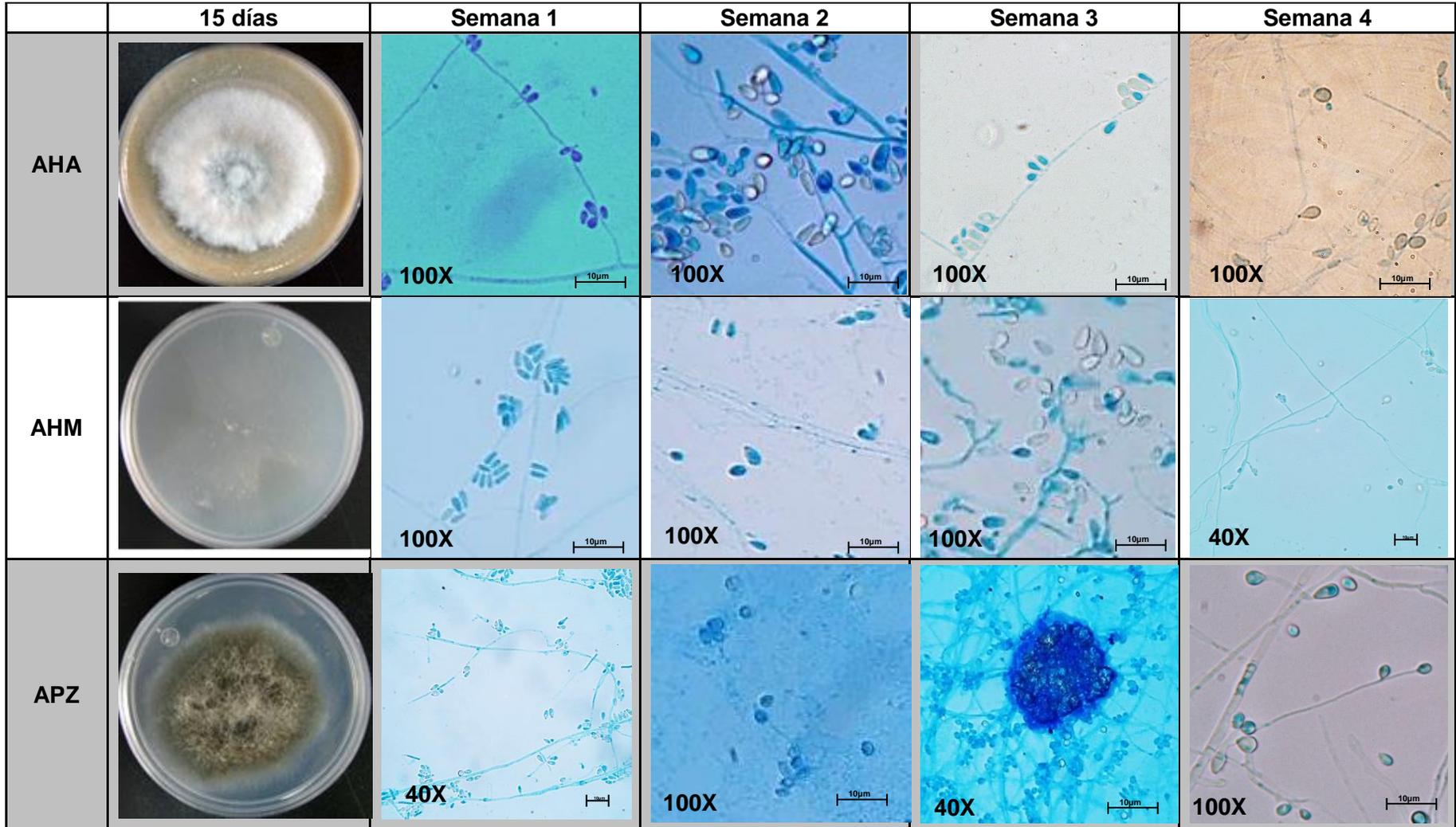


Figura 19. Aislado 058 *Scedosporium apiospermum* en condiciones de luz y obscuridad a temperatura de 35 °C

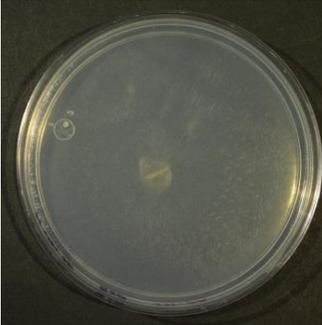
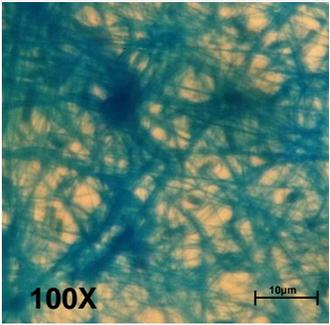
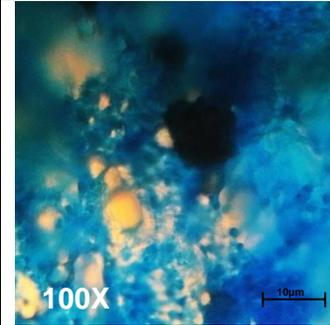
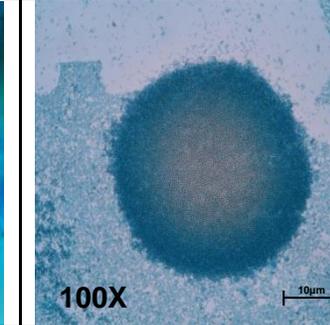
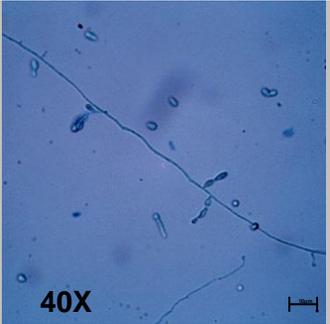
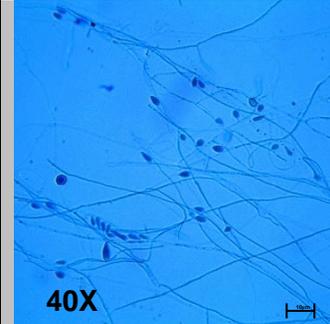
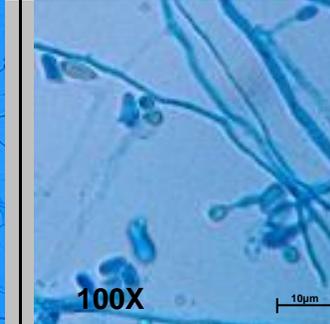
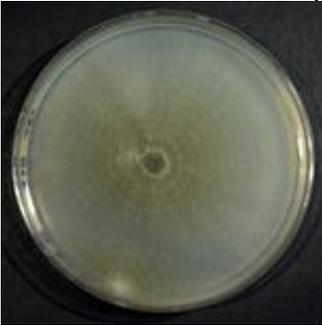
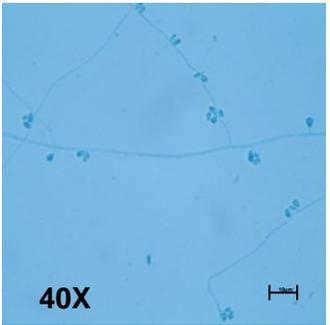
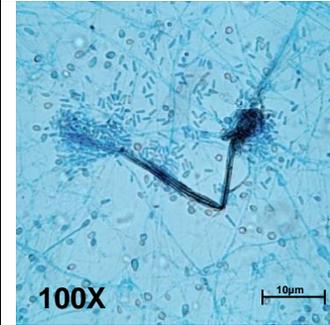
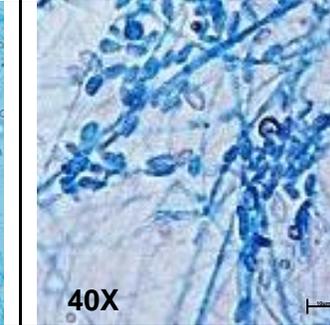
Medio	Macroscópica	Microscópica		
	15 días	Semana 1	Semana 2	Semana 3
AA-HC		 100X	 100X	 100X
ADSm		 40X	 40X	 100X
AET		 40X	 100X	 40X

Figura 19. 058 *Scedosporium apiospermum* (cont).

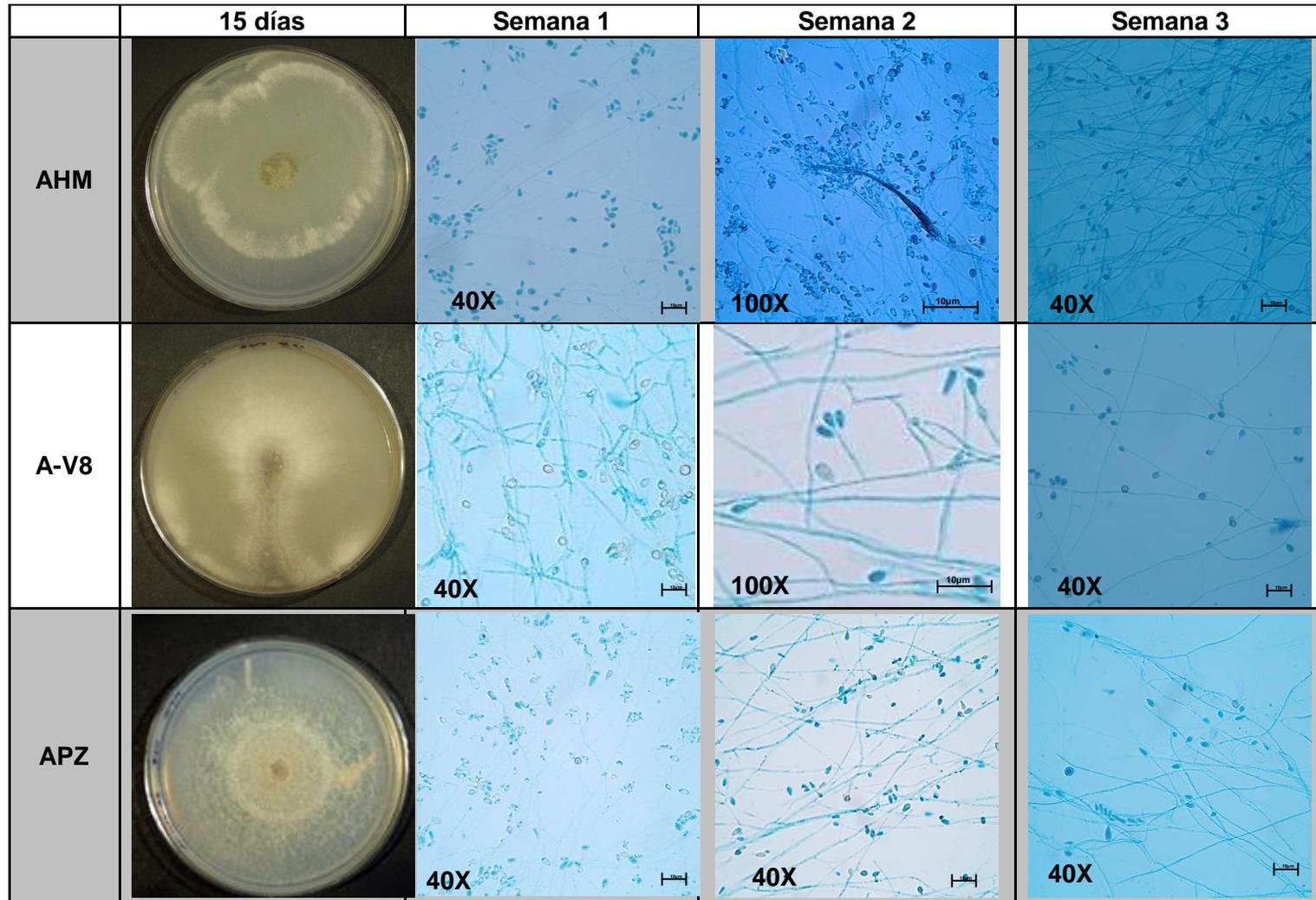


Figura 20. Aislado 636 *Scedosporium apiospermum* en condiciones de luz y obscuridad a 35 °C.

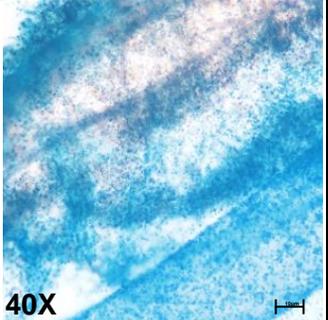
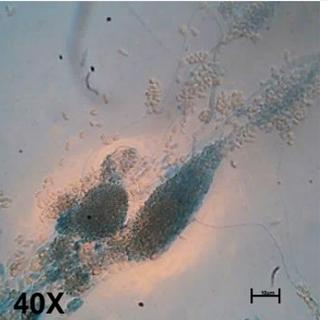
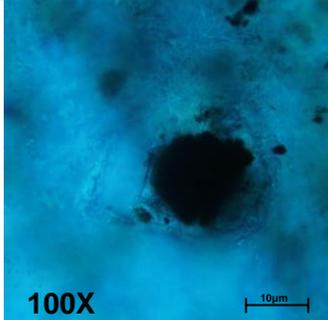
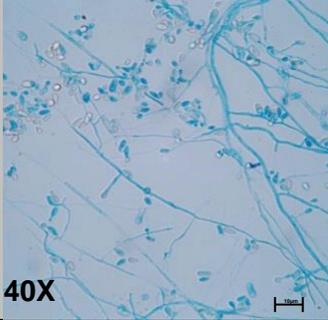
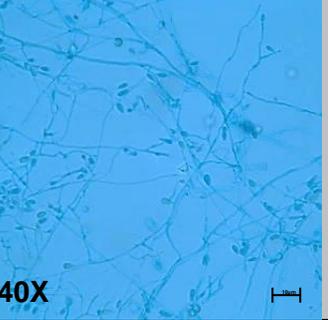
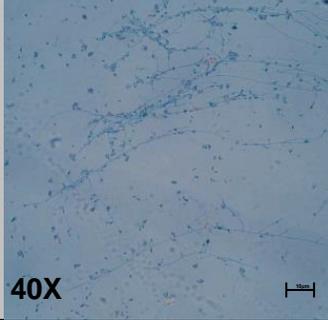
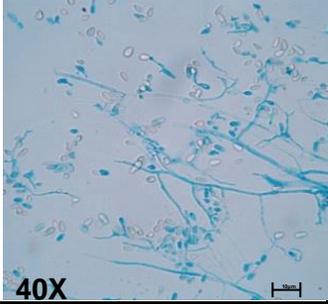
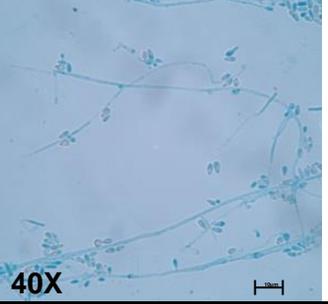
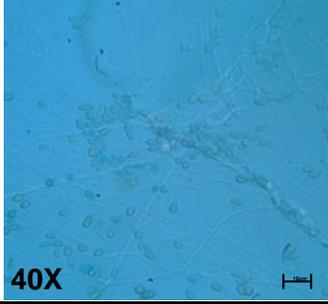
Medio	Macroscópica	Microscópica		
	15 días	Semana 1	Semana 2	Semana 3
AA-HC		 40X	 40X	 100X 10µm
ADSm		 40X	 40X	 40X
AET		 40X	 40X	 40X

Figura 20. 636 *Scedosporium apiospermum* (cont).

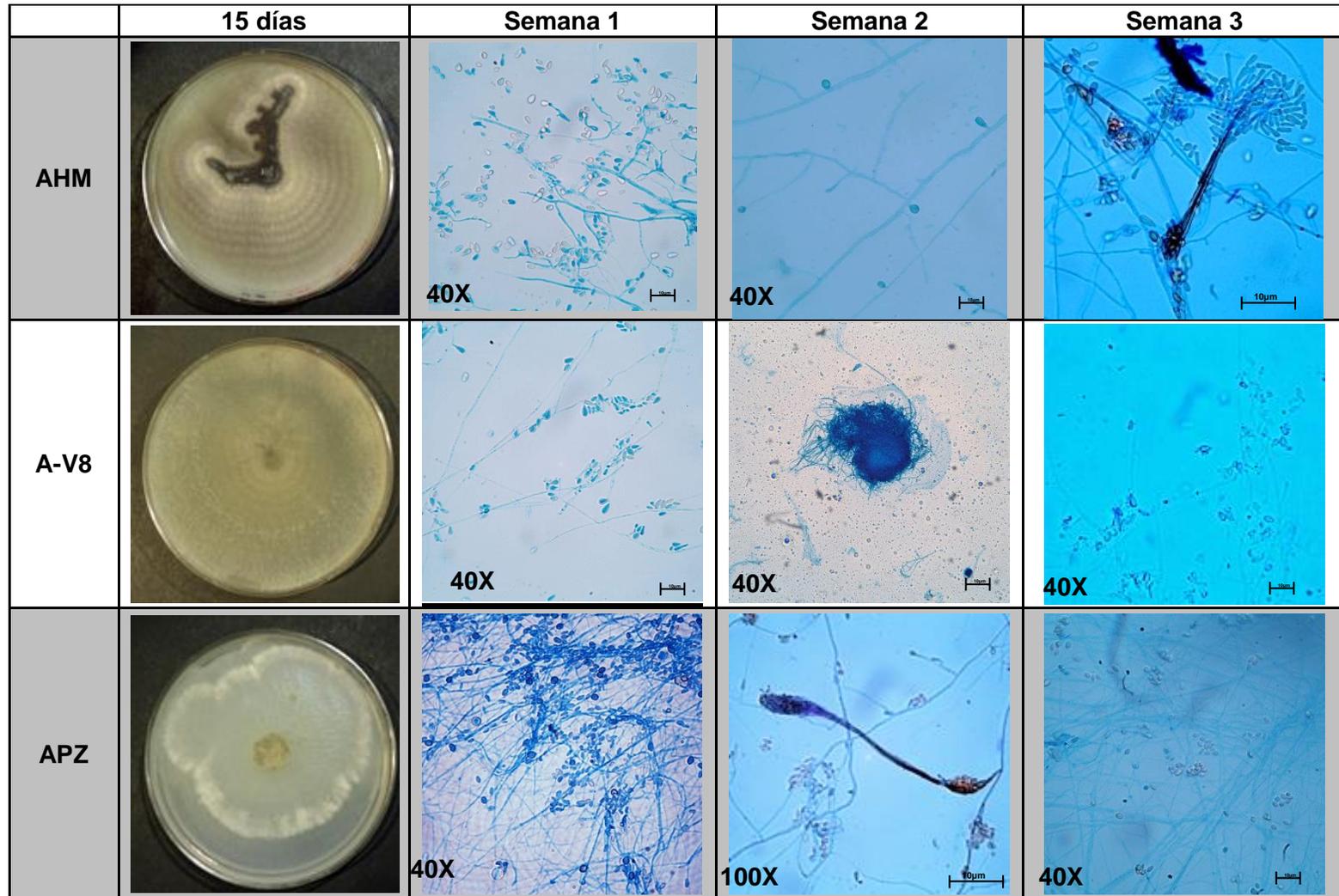


Figura 21. Aislado 242 *Trematosphaeria grisea*

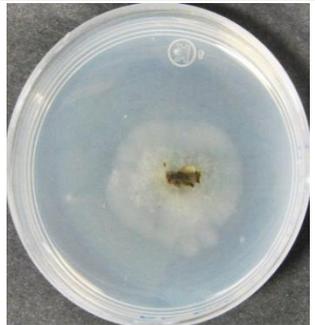
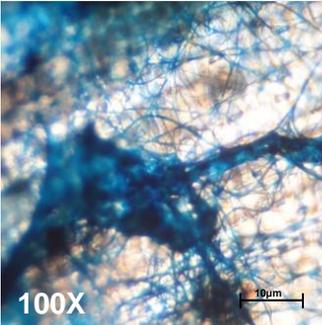
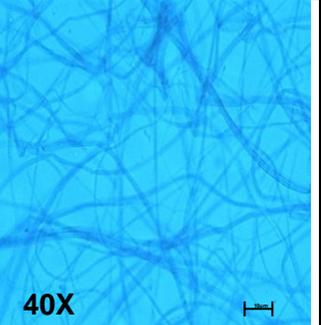
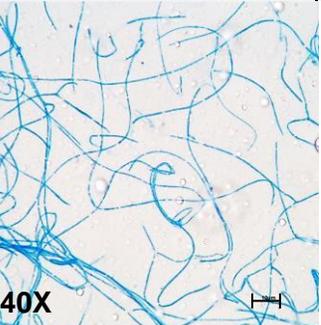
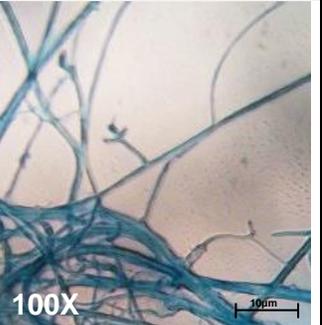
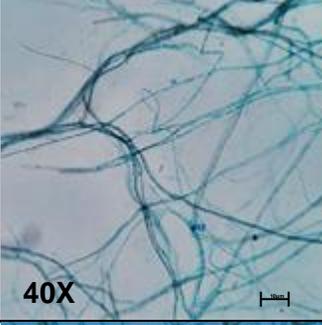
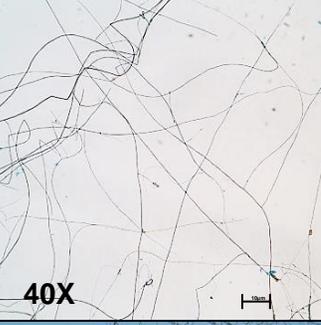
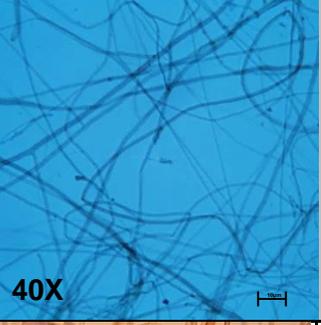
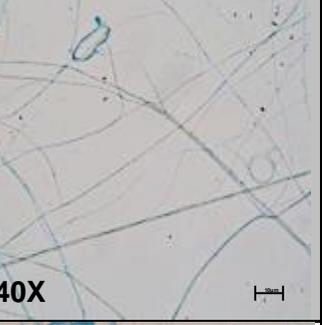
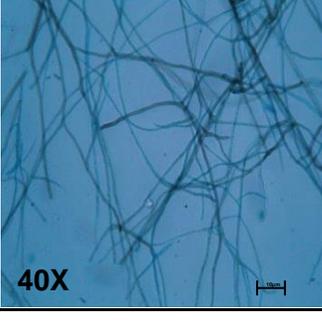
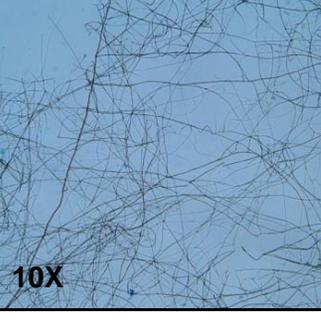
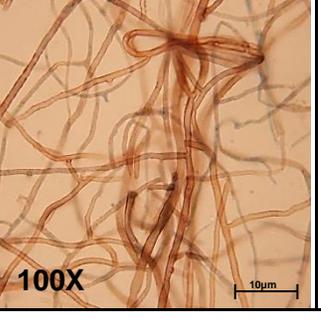
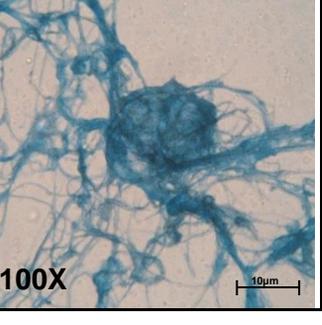
Medio	Macroscópica	Microscópica			
	15 días	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
AA-HC					
ADSm					
AET					

Figura 21. 242 *Trematosphaeria grisea* (cont).

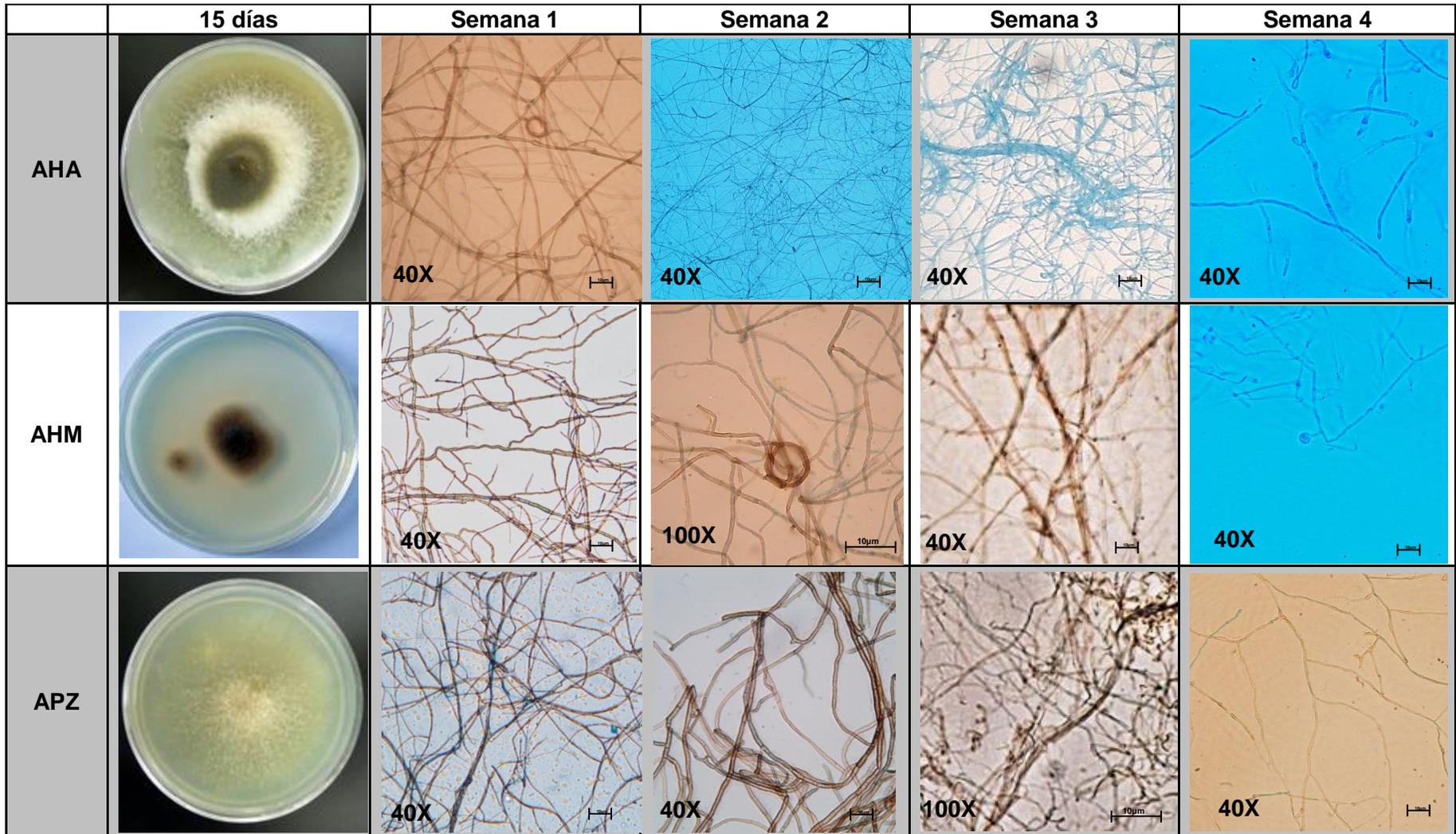


Figura 22. Aislado 650 *Trematosphaeria grisea*

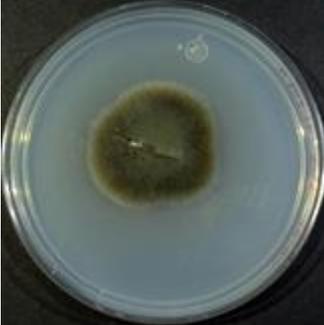
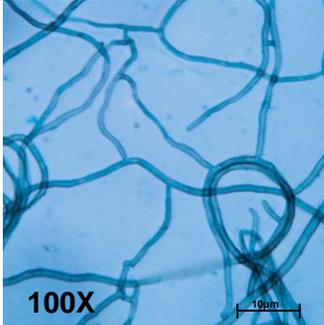
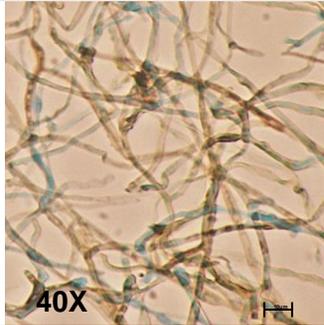
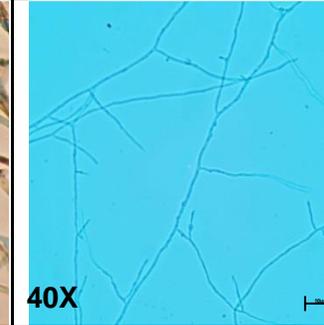
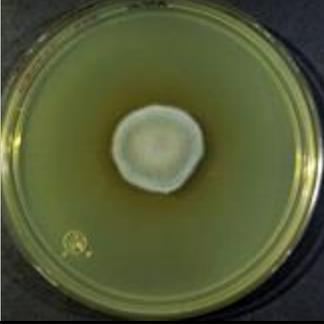
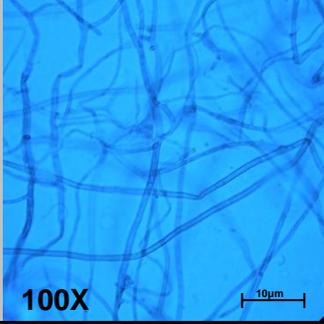
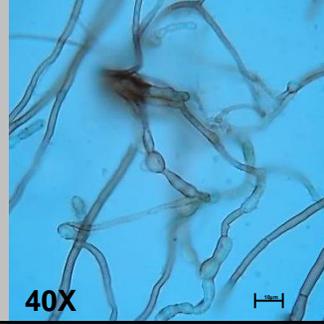
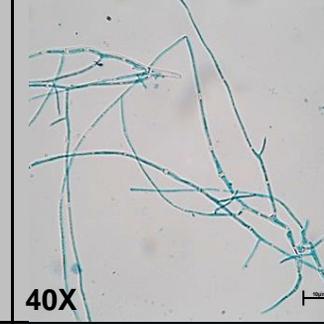
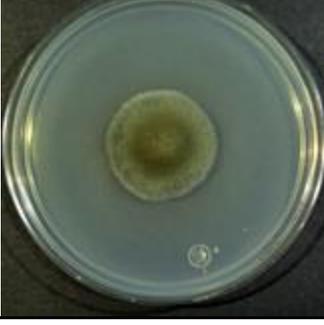
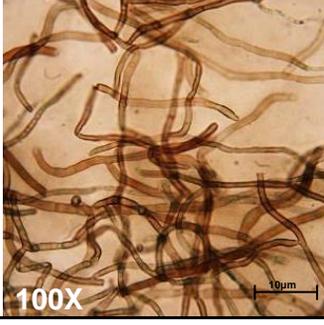
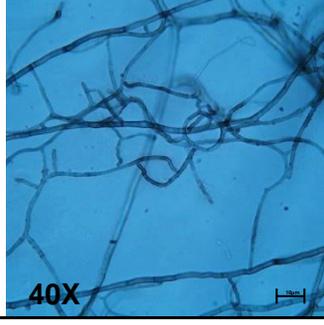
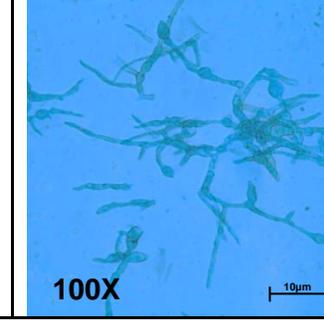
Medio	Macroscópica	Microscópica		
	15 días	Semana 1	Semana 2	Semana 3
AA-HC				
ADSm				
AET				

Figura 22. 650 *Trematosphaeria grisea* (cont).

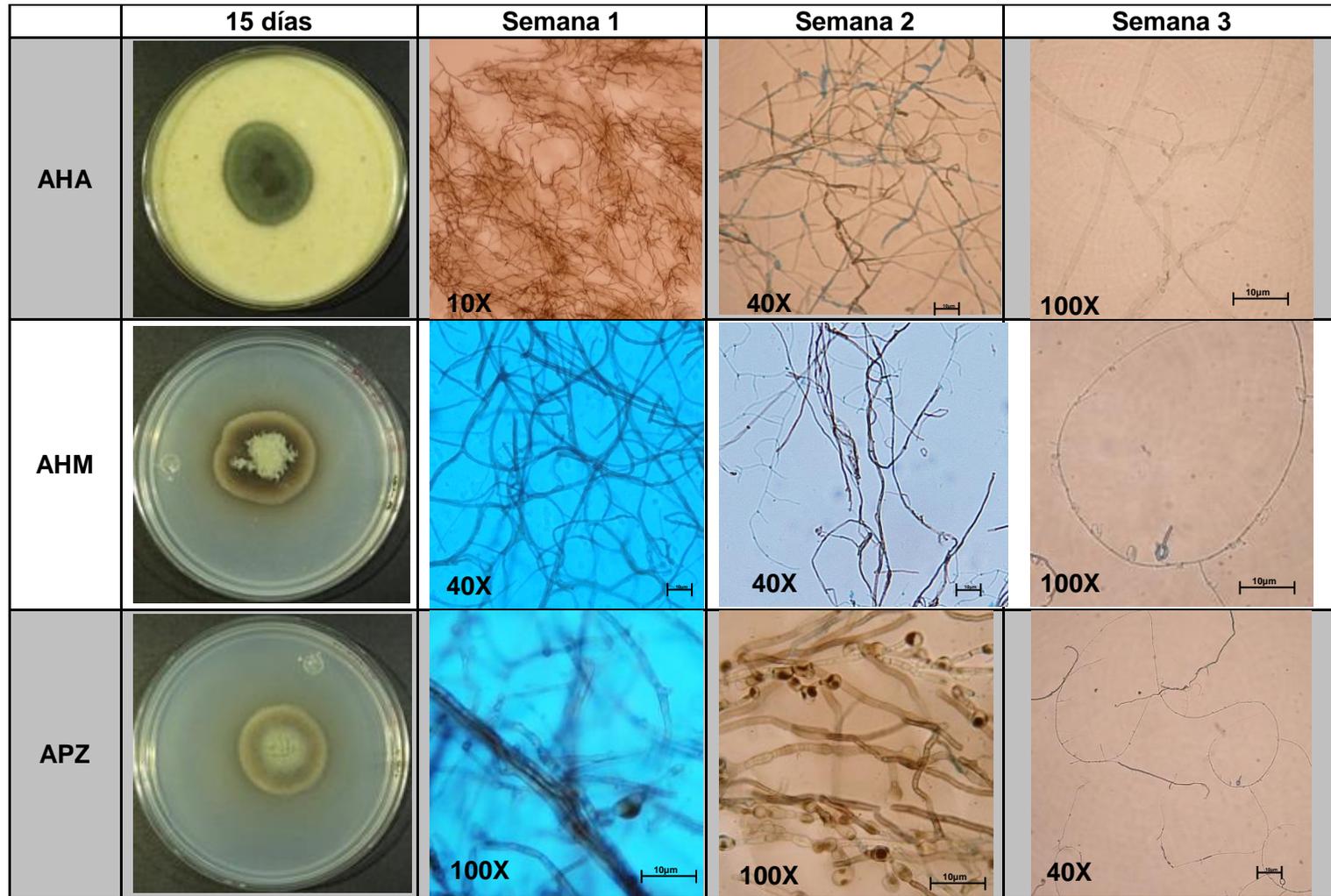


Figura 23. Aislado 242 *Trematosphaeria grisea* en condiciones de luz y obscuridad a 35 °C

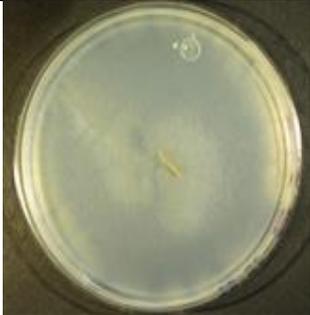
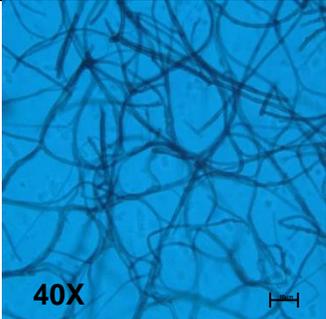
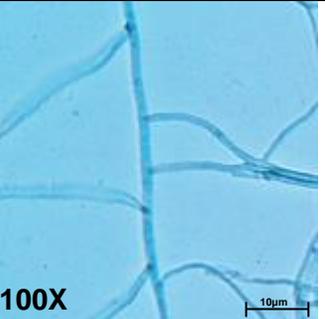
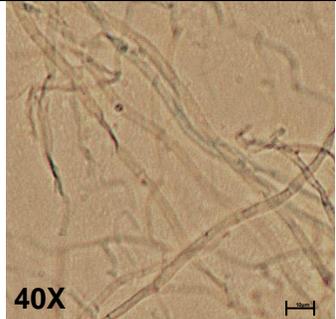
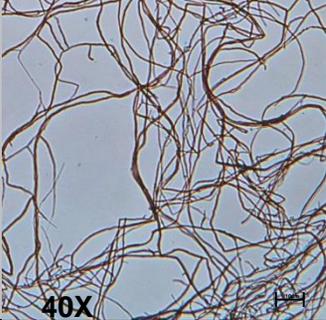
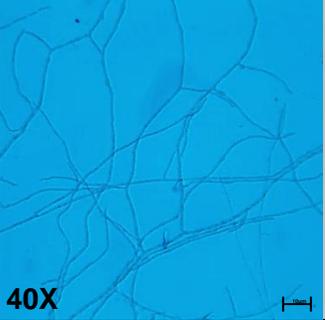
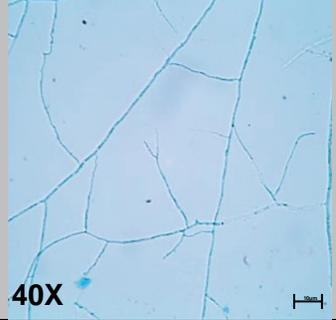
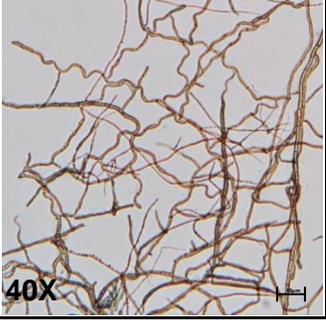
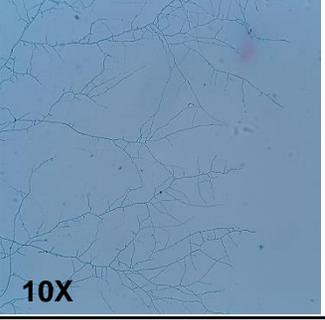
Medio	Macroscópica	Microscópica		
	15 días	Semana 1	Semana 2	Semana 8
AA-HC		 40X	 100X 10µm	 40X
ADSm		 40X	 40X	 40X
AET		 40X	 10X	 40X

Figura 23. 242 *Trematosphaeria grisea* (cont).

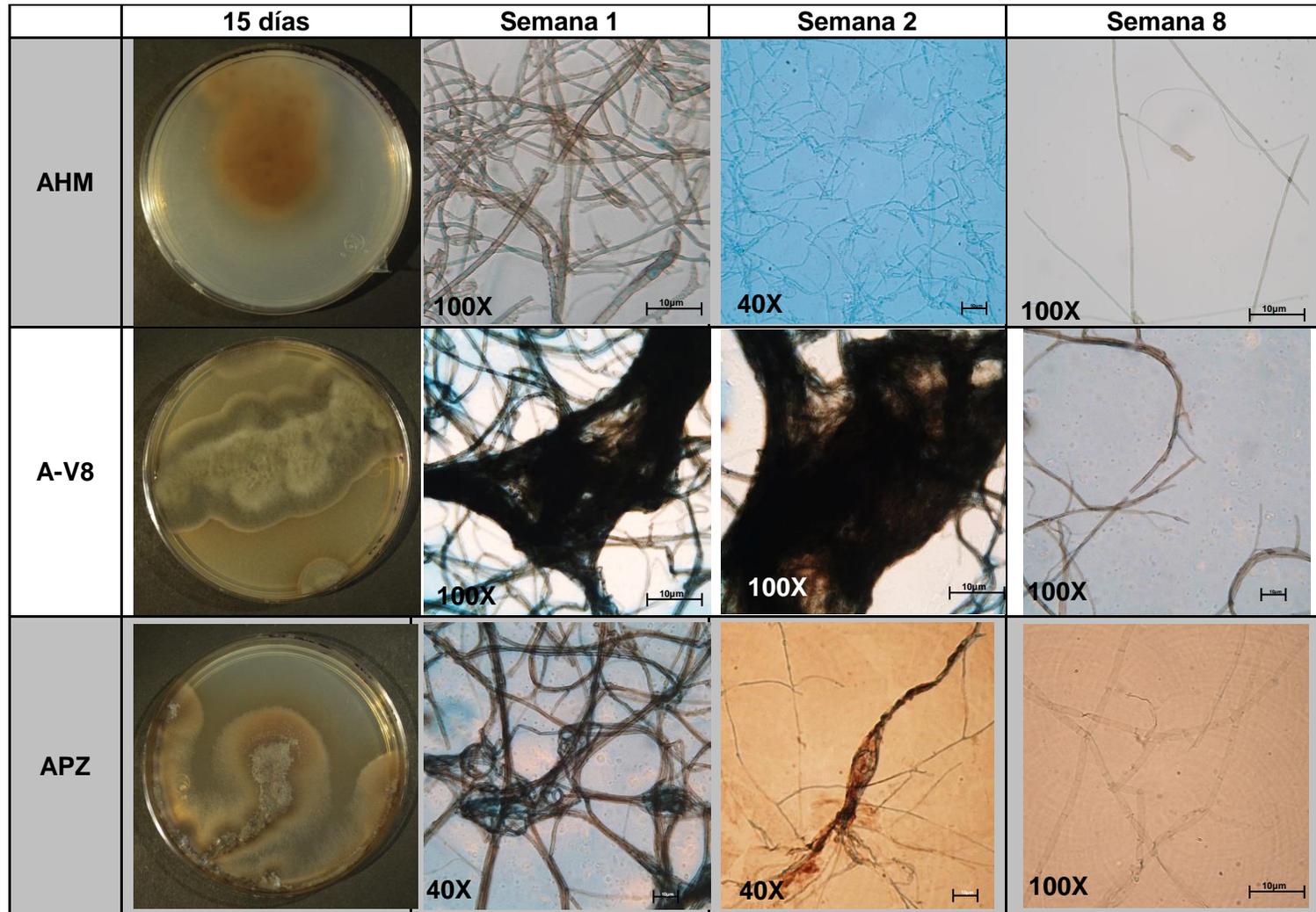


Figura 24. Aislado 650 *Trematosphaeria grisea* en condiciones de luz y obscuridad en condiciones de luz y obscuridad a 35 °C

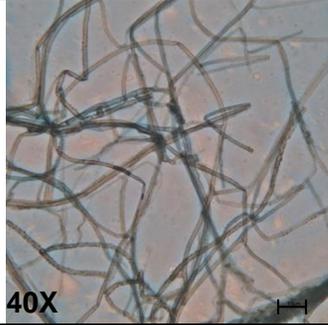
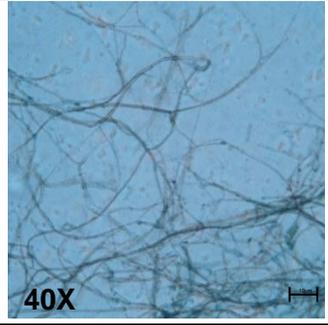
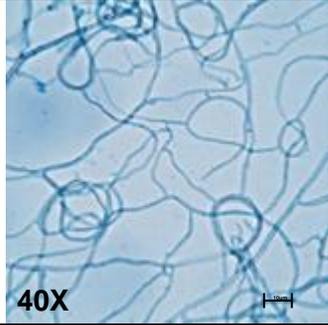
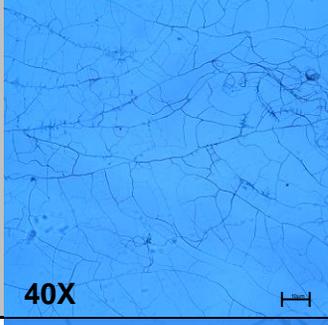
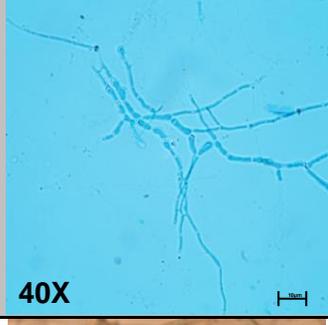
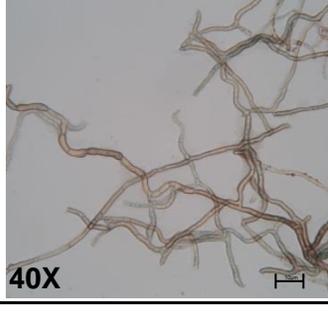
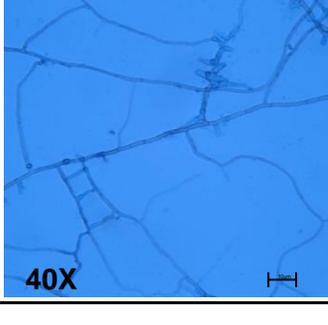
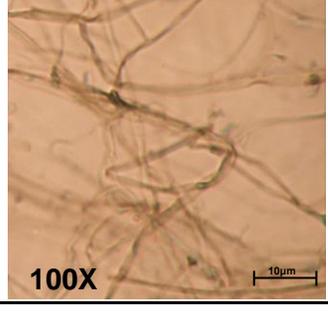
Medio	Macroscópica	Microscópica		
	15 días	Semana 1	Semana 2	Semana 8
AA-HC		 40X	 40X	 40X
ADSm		 40X	 40X	 40X
AET		 40X	 40X	 100X

Figura 24. 650 *Trematosphaeria grisea* (cont).

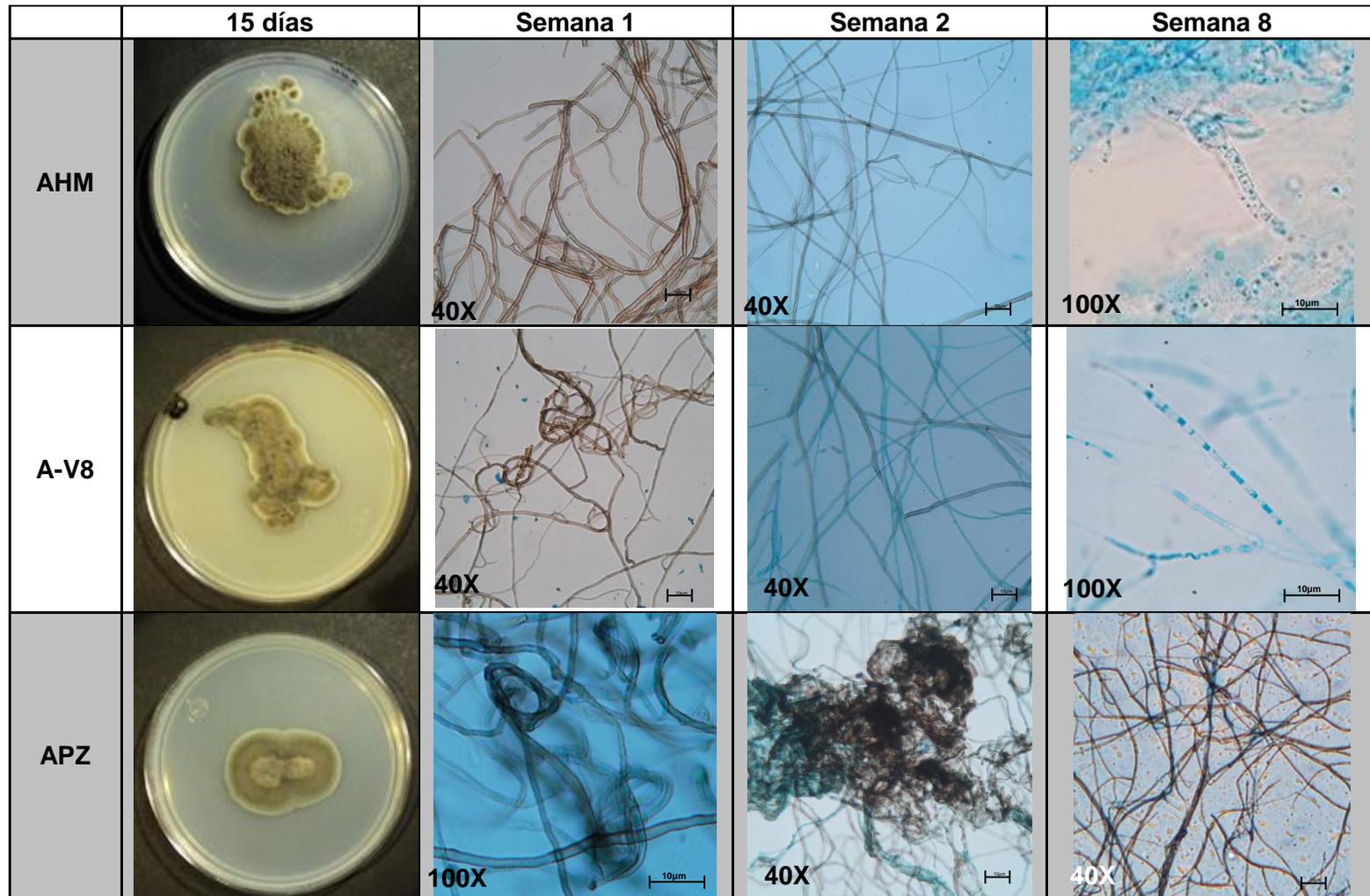


Figura 25. Aislado 243 *Madurella mycetomatis*

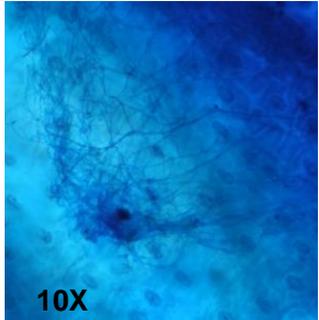
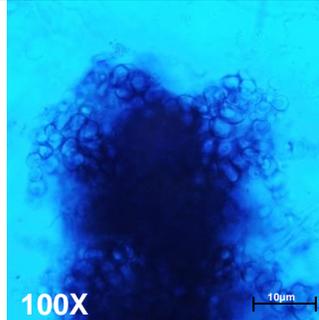
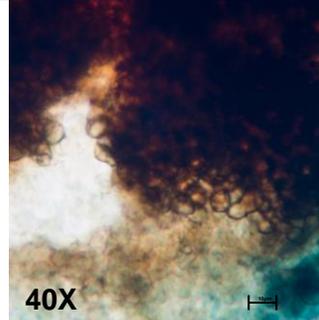
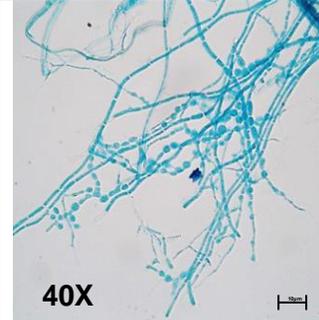
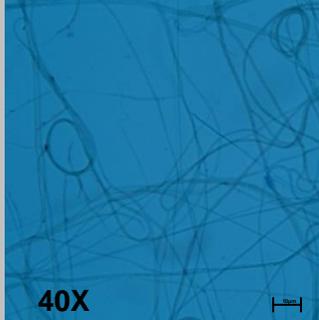
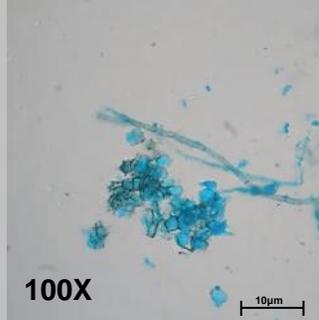
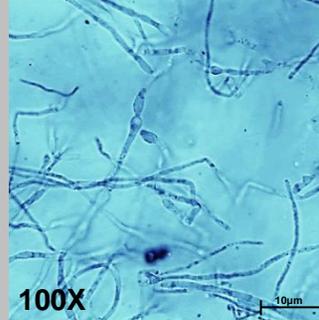
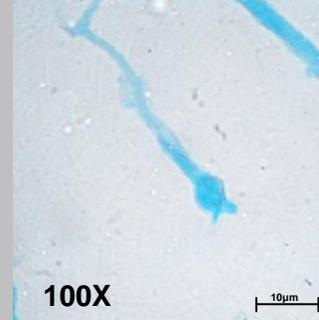
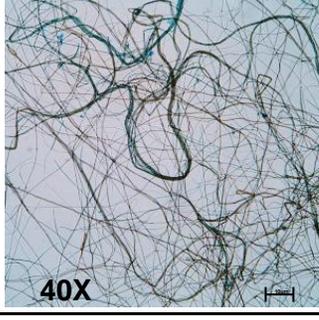
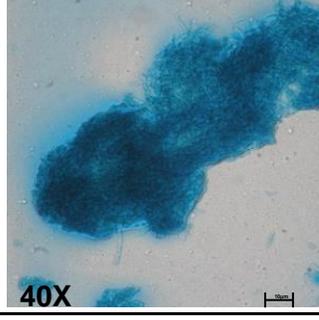
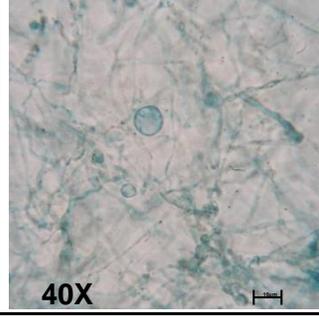
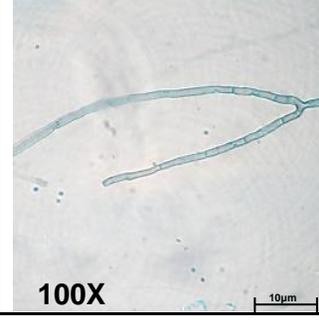
Medio	Macroscópica	Microscópica			
	15 días	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
AA-HC		 10X	 100X	 40X	 40X
ADSm		 40X	 100X	 100X	 100X
AET		 40X	 40X	 40X	 100X

Figura 25. 243 *Madurella mycetomatis* (cont).

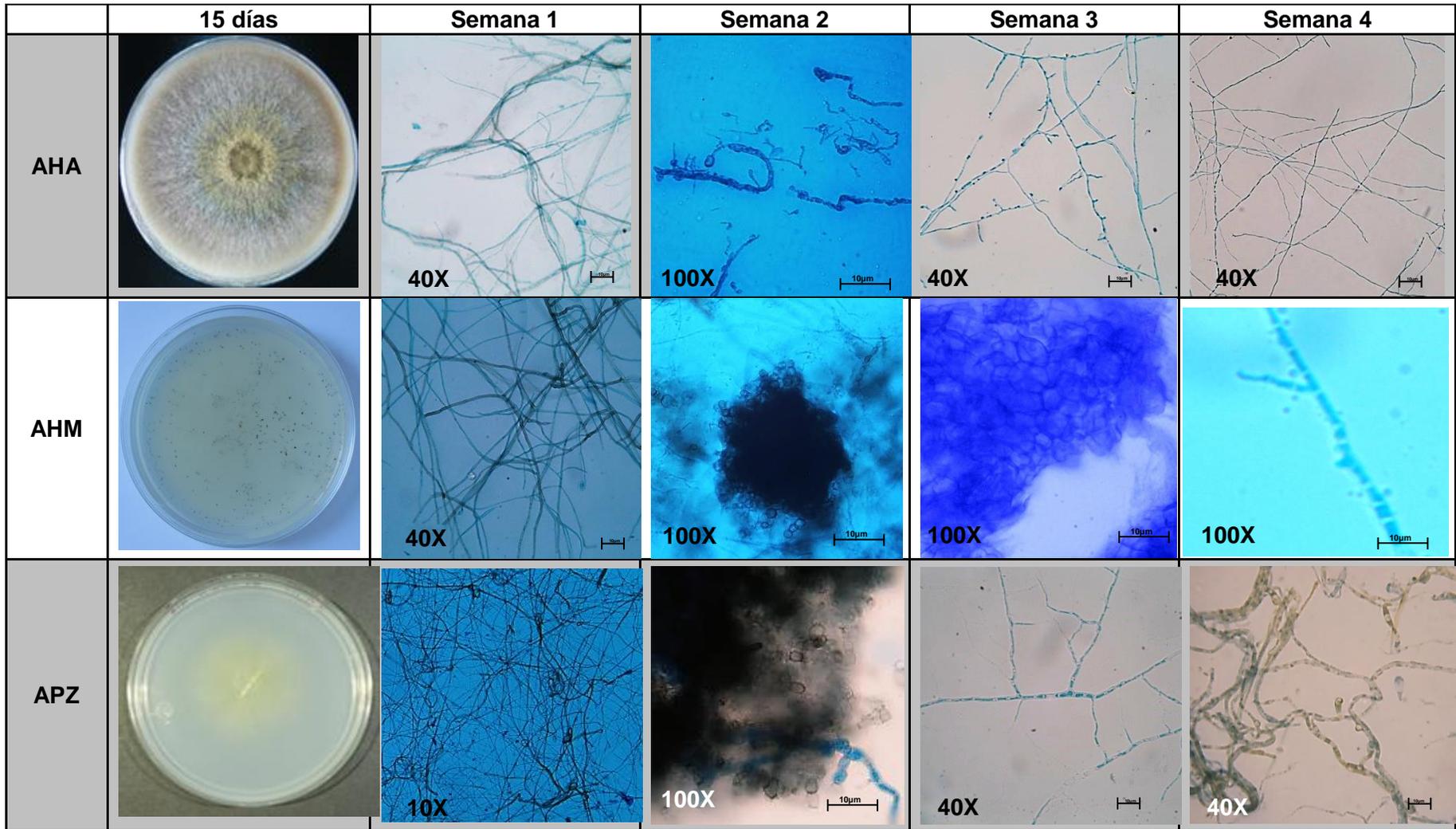


Figura 26. Aislado 918 *Madurella mycetomatis*

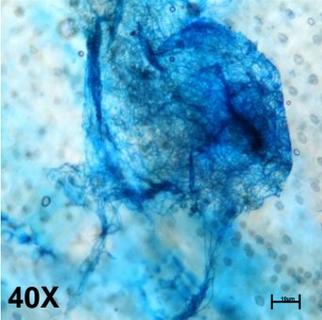
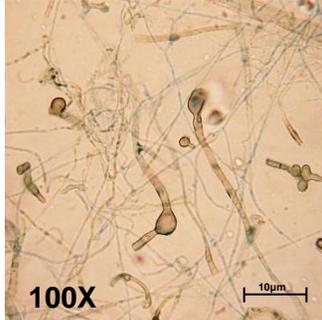
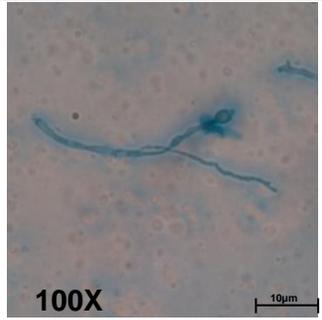
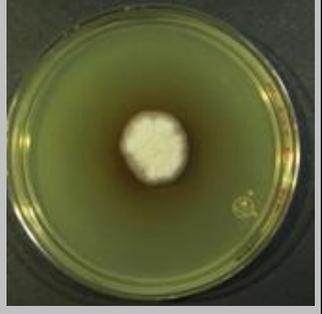
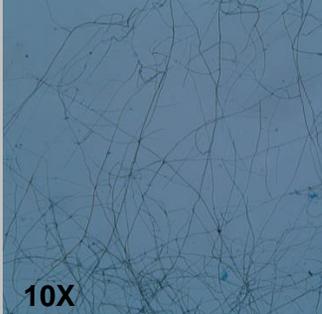
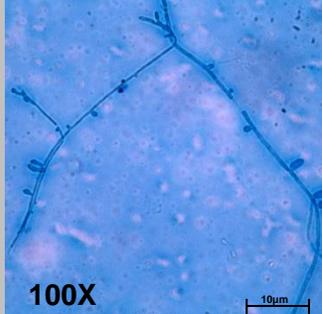
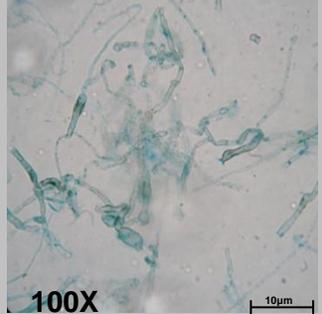
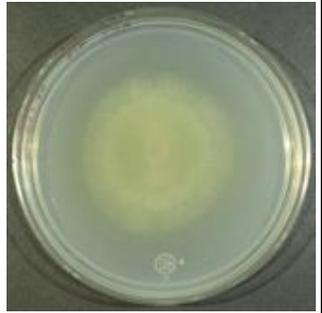
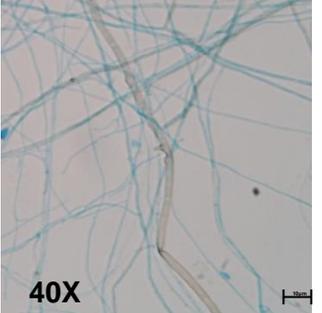
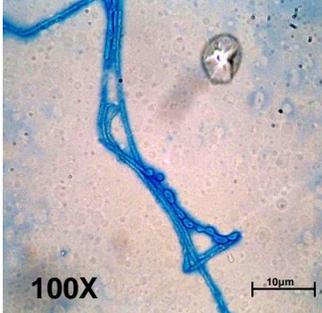
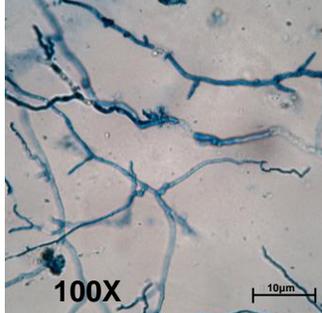
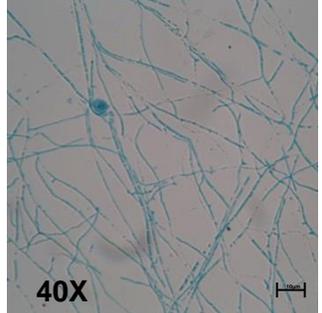
Medio	Macroscópica	Microscópica			
	15 días	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
AA-HC		 40X	 100X	 100X	 100X
ADSm		 40X	 10X	 100X	 100X
AET		 40X	 100X	 100X	 40X

Figura 26. 918 *Madurella mycetomatis* (cont).

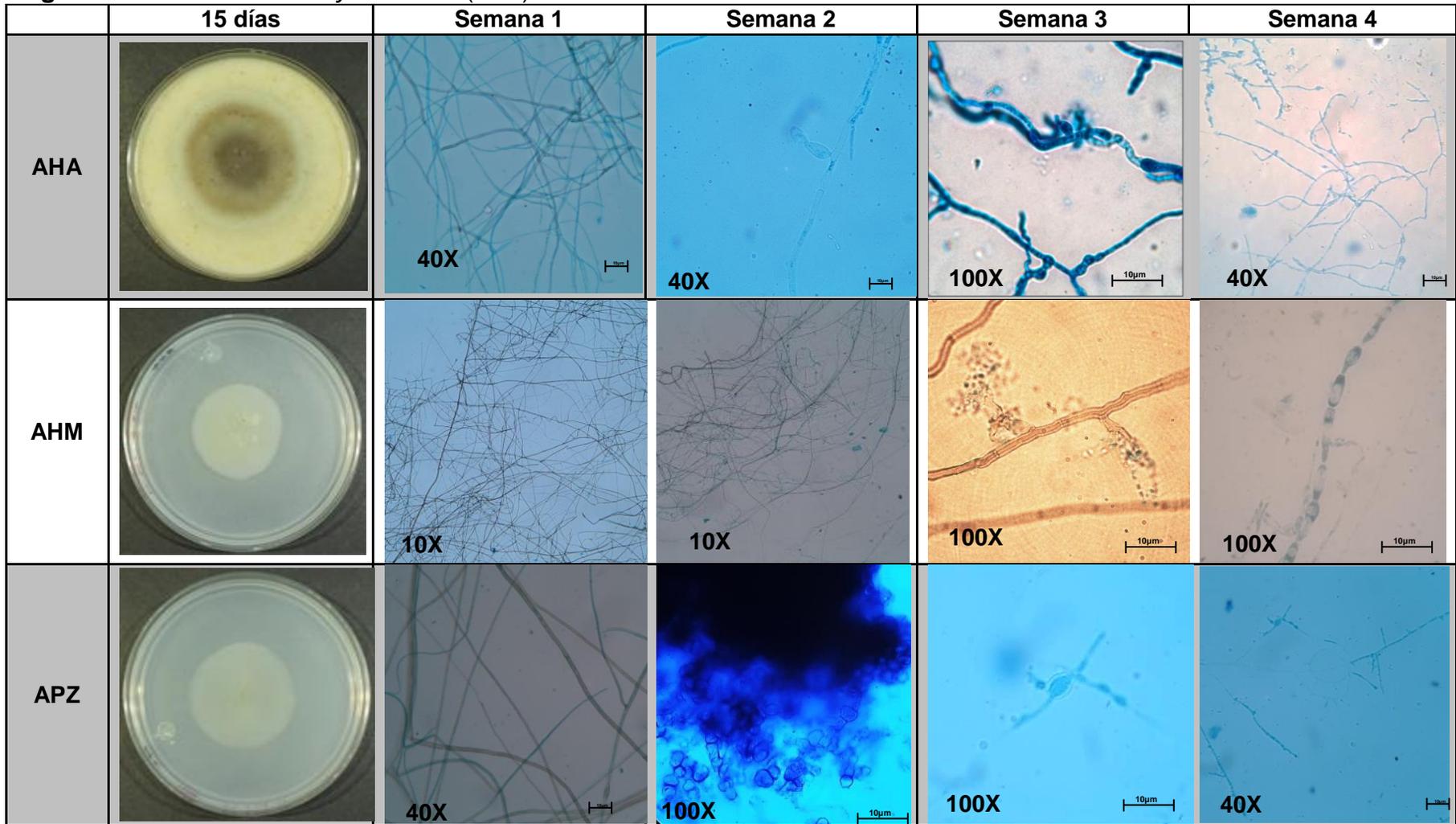


Figura 27. Aislado 243 *Madurella mycetomatis* en condiciones de luz y oscuridad a 35 °C

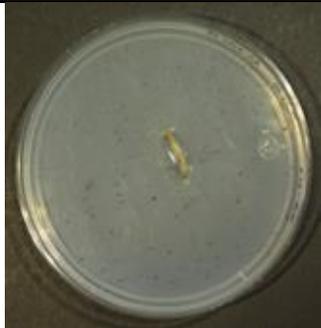
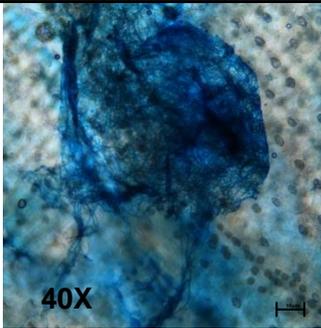
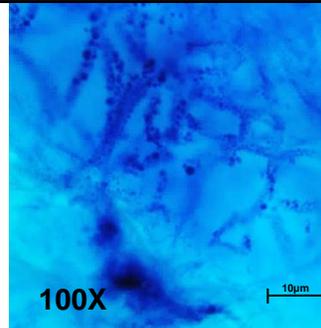
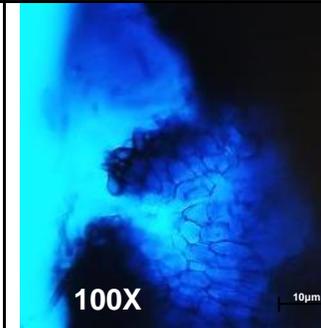
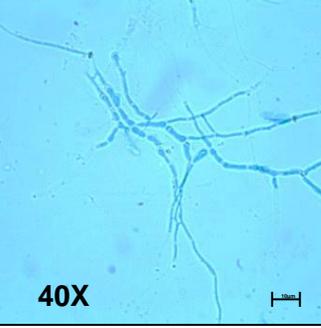
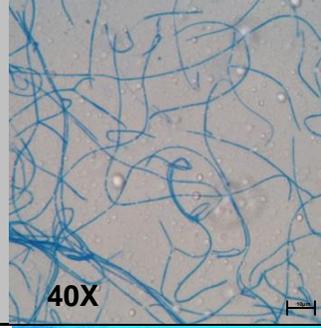
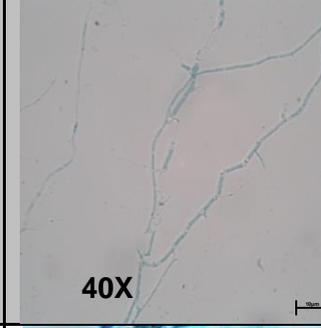
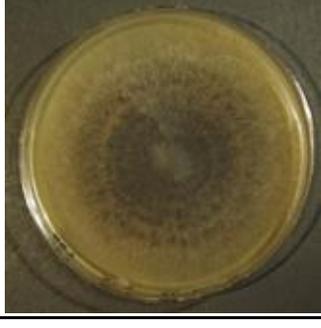
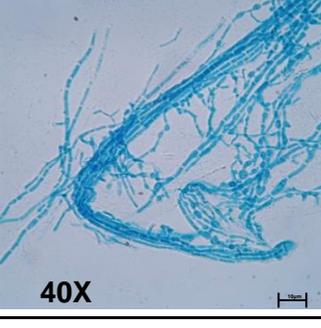
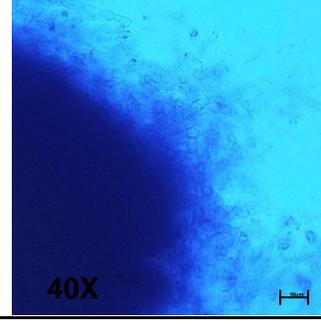
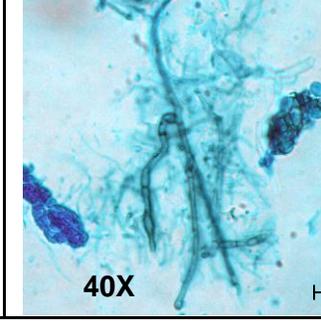
Medio	Macroscópica	Microscópica		
	15 días	Semana 1	Semana 2	Semana 3
AA-HC		 40X	 100X 10µm	 100X 10µm
ADSm		 40X	 40X	 40X
AET		 40X	 40X	 40X

Figura 27. 243 *Madurella mycetomatis* (cont).

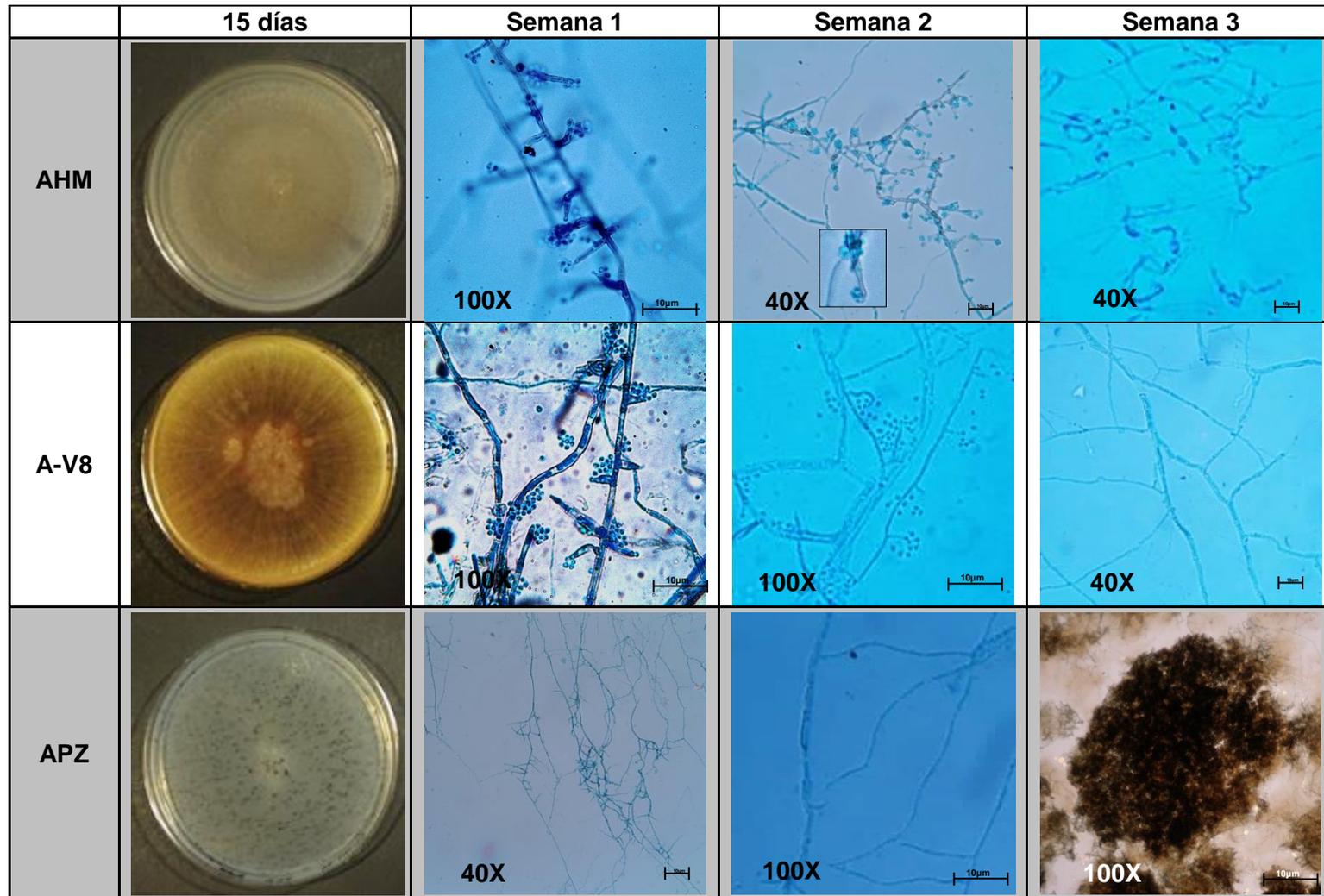


Figura 28. Aislado 918 *Madurella mycetomatis* en condiciones de luz y oscuridad a 35 °C

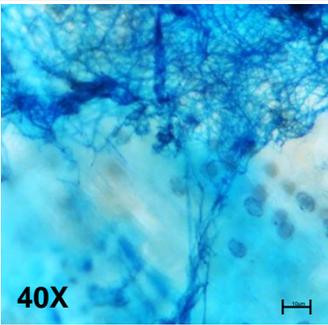
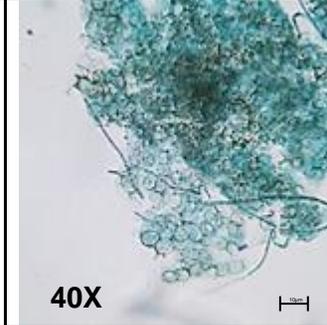
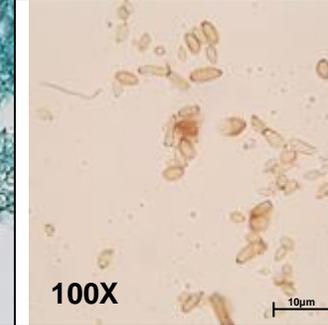
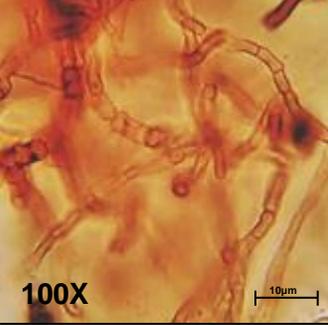
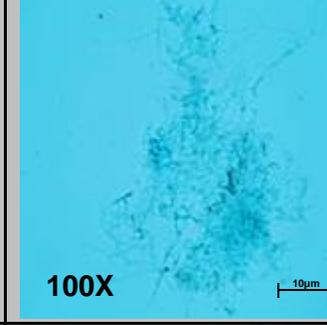
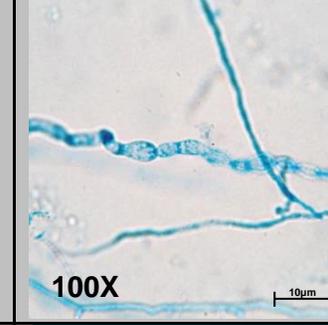
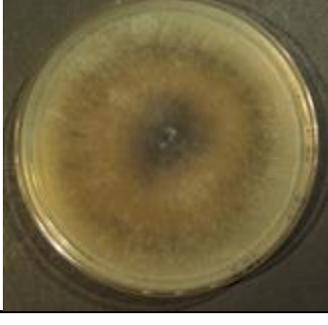
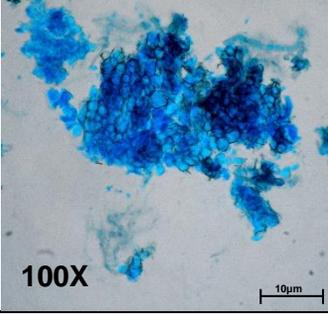
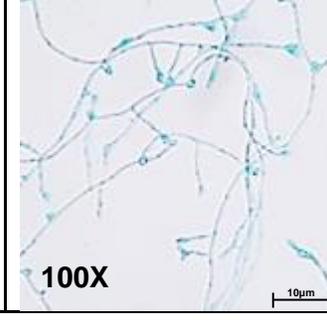
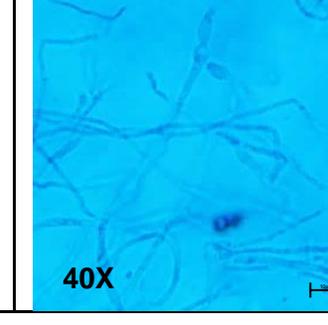
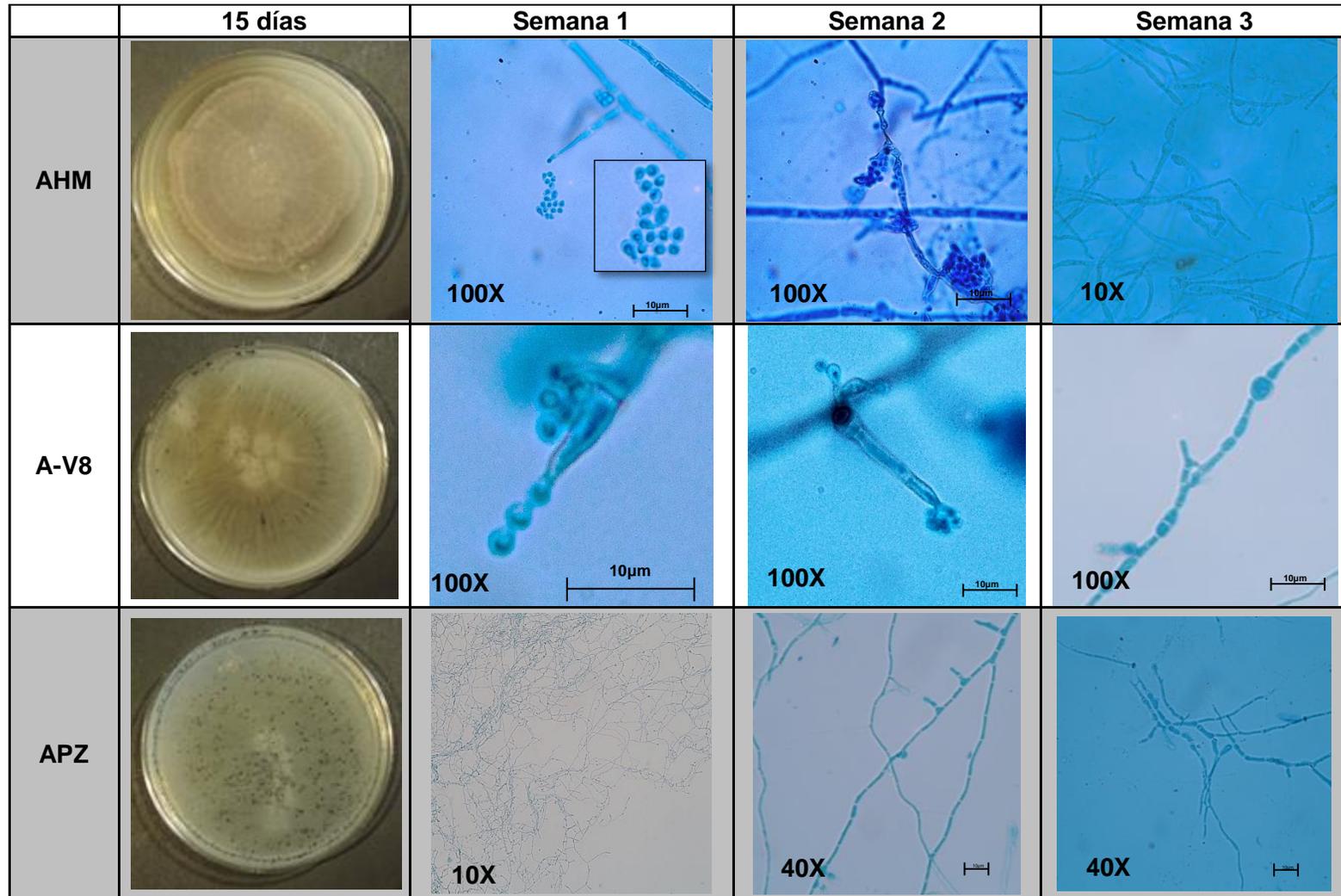
Medio	Macroscópica	Microscópica		
	15 días	Semana 1	Semana 2	Semana 3
AA-HC		 40X	 40X	 100X
ADSm		 100X	 100X	 100X
AET		 100X	 100X	 40X

Figura 28. 918 *Madurella mycetomatis* (cont).



CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN

Identificación molecular

El uso de las técnicas moleculares, como la PCR-secuenciación ha sido una herramienta que ha permitido la identificación precisa de diversas especies de organismos, incluyendo los hongos.

En el genoma de los hongos existen diferentes regiones que han sido utilizadas como referencia para identificar especies. Entre ellas, la región ITS se encuentra altamente conservada en los hongos y favorece la diferenciación entre especies, sea por el tamaño del amplicón o por su secuenciación.

Para la identificación molecular de agentes de eumicetoma amplificando la región ITS, en *Madurella mycetomatis* se ha descrito la obtención de un fragmento de 600 pb. (Ahmed, *et al.*, 2002, Desnos-Ollivier, *et al.*, 2016). En *Medicopsis romeroi* el fragmento es de 658-660 pb (Ahmed, *et al.*, 2002, Borman, *et al.*, 2016, Desnos-Ollivier, *et al.*, 2016). Para *Scedosporium apiospermum* el amplicón es de 700 pb (Harun *et al.*, 2011, Desnos-Ollivier, *et al.*, 2016). En *Trematosphaeria grisea* de 500 pb (Borman, *et al.*, 2016, Desnos-Ollivier, *et al.*, 2016) y *Leptosphaeria senegalensis* 580-600 pb (Desnos-Ollivier, *et al.*, 2016).

En este trabajo incluimos 9 aislados de los cuales 7 fueron identificados a nivel de especie. A través de la electroforesis corroboramos que el tamaño de los amplicones es similar a los descritos en la literatura para la mayoría de aislados.

Sin embargo, el aislado 636 de *S. apiospermum* no mostró ningún producto de amplificación con ninguna de las PCRs realizadas, utilizando diferentes regiones blanco (ITS, dominio D1/D2, β -tubulina, β -actina y primers diseñados por otros autores para diferenciar especies del complejo *Scedosporium sp*). En estos casos solo amplificó el aislado 058 correspondiente a *Sc. boydi*. Es importante resaltar que estos aislados fueron obtenidos de pacientes con micetoma e ingresados a la colección de la Unidad de Micología en diferentes años. Morfológicamente los dos aislados fueron similares macro y microscópicamente en los diferentes medios de cultivo.

Harun *et al.* (2011), describen la variedad morfológica entre las especies del complejo de *Scedosporium sp* considerándola como un inconveniente para la identificación o diferenciación de las especies. Estos autores no lograron diferenciar todos los aislados analizados (aunque fueron minoría) por medio de PCR con los primers diseñados por ellos, por lo que también recurrieron a la morfología. Es probable que sea necesario buscar otras regiones blanco, como lo indican Giraud, *et al.*, 2014, quienes proponen el uso del gen de calmodulina.

Después de la amplificación por PCR, se llevó a cabo la secuenciación de los productos y el análisis de las secuencias. Este procedimiento fue muy útil ya que permitió la reclasificación del aislado que originalmente estaba considerado como *L. senegalensis*, el cual presentó una identidad de 100 % con *M. romeroi*. Diversos autores como Zijlstra, *et al.*, 2016 y Desnos-Ollivier, *et al.*, 2016, consideran que la identificación de estos agentes, especialmente los hongos dematiáceos, suele ser difícil debido a que frecuentemente solo desarrollan micelio estéril y la morfología

macroscópica tiende a ser similar; además describen que los medios de cultivo utilizados de rutina en los laboratorios, como APD y ADS, dificultan la formación de estructuras de reproducción.

Borman, *et al.*, 2016, Desnos-Ollivier, *et al.*, 2016, indican que la identificación molecular de todos los aislados y cepas de referencia de *M. mycetomatis* mostró que el tamaño de los fragmentos amplificados es muy similar entre ellos, por lo que la identificación molecular utilizando la región ITS fue muy confiable. En este trabajo, los dos aislados estudiados (243 y 918) de esta especie amplificaron un fragmento de 600 pb y las secuencias analizadas presentaron una identidad de 100 % con las cepas reportadas en el Genbank. Así mismo, los autores describen que cepas y aislados de *M. romeroi*, presentaron mayor variabilidad tanto en el tamaño del amplificado como en las secuencias. En nuestro estudio, los dos aislados identificados como *M. romeroi* (054 y 635) y el aislado previamente identificado como *L. senegalensis* y reclasificado como *M. romeroi* (040), presentaron poca variabilidad en el tamaño de sus fragmentos amplificados y en sus secuencias.

El aislado correspondiente a *T. grisea* (650), sólo se logró identificar molecularmente hasta el nivel de orden Pleosporales. En estudios recientes (Borman, *et al.*, 2016, Zijlstra, *et al.*, 2016) *T. grisea* ha sido reclasificada en el orden Pleosporales; anteriormente este hongo estaba clasificado en el orden Sordariales. Al igual que *S. apiospermum* y *M. romeroi*, diversos autores han indicado que *T. grisea* es una especie que presenta variabilidad principalmente en la región ITS, y en consecuencia en el tamaño de sus fragmentos amplificados. Borman y colaboradores indican que la subunidad RPB2 y el factor de elongación de traslación 1 α son regiones muy útiles para la identificación de los aislados de *T. grisea* analizados en su estudio.

Morfología

Para el micólogo clínico, la identificación de los hongos causantes en micetoma frecuentemente es un reto, ya que la formación de micelio estéril es común. En la búsqueda de medios que facilitaran la identificación de estos hongos se encontró que la utilidad de los medios de cultivo fue viable dependiendo del género y especie.

Los medios que favorecieron la inducción en la formación de estructuras de reproducción para los aislados en la primera fase del estudio fueron el agar extracto de trigo, agar papa zanahoria, agar agua hojas de clavel y agar harina de avena.

Los 6 medios utilizados durante la fase uno del estudio indujeron la formación de picnidios ovoides pigmentados para los tres aislados identificados como *Medicopsis romeroi*, como mencionan Borman y col en 2016, Villatorio, 2015 y Retuzta 2009 y Arenas 2014, la formación de picnidios ocurre en un período de 30-45 días aproximadamente, a 30°C en medios como APZ, ADS con cloranfenicol y AHA. Sin embargo, la formación de los picnidios fue diferente

dependiendo del medio de cultivo: el AET y el APZ favorecieron la formación y maduración de las estructuras en un período de 22 días, mientras que en los 4 medios restantes es proceso se alcanzó hasta los 30 días.

Con la nueva organización taxonómica que ubica a *Trematosphaeria grisea* dentro del Orden Pleosporales, Borman y cols. en el 2016 y Villatorio 2015, indican para esta especie la formación de picnidios es similar a *Medicopsis romeroi* en medios como el agar Czapek, el ADS con cloranfenicol y APD, así como la presencia de clamidioconidios en medios con bajo contenido de nutrientes. Sin embargo, ninguno de los aislados de *T. grisea* presentó picnidios en los medios con alto contenido en carbohidratos complejos como AET, APZ o AA-HC o la presencia de clamidioconidios en medios con bajos nutrientes como ADSm, AHM o AHA.

Borman y col. en 2016 describieron diferentes especies de *Trematosphaeria* (*Emarellia* sp., **EuMycetoma And RElated Localised Lesions Indian Agent.**): *E. grisea* (NCPF7066T), *E. grisea* (NCPF7761), *E. grisea* (NCPF7384), *E. grisea* (NCPF7666), *E. paragrisea* (NCPF7611T), *T. grisea* (cbs332.50 (AUT)), *T. grisea* (CBS246.66), *T. pertusa* (CBS122371) y *T. pertusa* (CBS122368). Estos autores indican que al realizar PCR dirigida a los genes de ITS, β -tubulina, actina al complejo de *Trematosphaeria* spp., morfológicamente pueden diferenciarse por la formación o no de clamidioconidios o de picnidios en medios con un tiempo de incubación mayor a 3 meses. En el presente estudio al correlacionar los datos morfológicos con los obtenidos en la identificación molecular del aislado 650 con diferentes marcadores moleculares (ITS, D1/D2, β -tubulina y β -actina), se identificó solamente como un hongo perteneciente al orden Pleosporales. Este hallazgo puede ser un indicativo de que dicho aislado no sea *T. grisea*, sino un hongo diferente. El aislado 242 fue confirmado molecularmente como *T. grisea*. Las principales diferencias entre dichos aislados fue la variabilidad en el tamaño y color de las colonias en los medios utilizados y la formación de aglomerados amorfos de hifas en el medio A-V8 durante la fase de luz y oscuridad para el aislado 650 y la formación de clamidioconidios en el aislado 242; ninguno formó picnidios en los dos meses estudiados; sin embargo la formación de estas estructuras durante ciclos de luz y oscuridad ejemplifica la importancia de estos ciclos para inducir los procesos metabólicos para la formación de estructuras de reproducción como lo indican Doris y Schmoll (2010).

Sobre la inducción en la formación de cleistotecios en *S. apiospermum*, Elizondo-Zertuche en 2014, Guarro 2012 y Cortéz 2008, reportan que los medios AHA, AHM o APD inducen su formación en un tiempo de incubación de 2 semanas a 35 °C, así como la formación de conidios después de 4 días de incubación; por otra parte Rainer y cols 2007 indican que el crecimiento de *S. apiospermum*, la formación de cleistotecios depende de la presencia de nitrógeno, aminoácidos,

carbohidratos simples y sales como el cloruro de sodio y cloruro de magnesio, además de un rango óptimo de pH de 6.5 a 7.0 en el medio de cultivo. En nuestro estudio la formación de cleistotecios sólo fue inducida en el medio de cultivo AA-HC; esto seguidamente se debió a la concentración de nitrógeno, sales y carbohidratos presentes en la hoja y al pH del medio de cultivo (pH 6.5). La presencia de conidios fue en todos los medios la formación de coremios sólo se observó en el AHA y el APZ, los cuales tienen un alto contenido de aminoácidos y carbohidratos complejos (Abantes, 2012 y Elizondo-Zertuche, 2014).

Los aislados de *S. apiospermum* (058 y 636) expuestos a ciclos de luz y oscuridad, no presentaron diferencia significativa en la formación de cleistotecios sólo disminuyó el tiempo de crecimiento y maduración de las estructuras en AA-HC, indicando una conexión directa entre el contenido del medio de cultivo. En contraste, los aislados de *T. grisea* formaron clamidioconidios y aglomerados de hifas durante los de ciclos de luz y de oscuridad (Metz, *et al.*, 2014).

La identificación morfológica de *M. mycetomatis* generalmente se basa en la formación de colonias marrón, vellosas, con pigmento difusible al medio. Diversos autores han señalado que los medios como APD, ADS, ACD (Agar Czapek dox), AHM, BHI, AA-HC y AMZ (agar manzana zanahoria) inducen la formación de fiálides en *Madurella mycetomatis*, en un periodo de 10 a 20 días en un rango de temperatura de 30 °C - 37 °C en aislados obtenidos recientemente (Jie, *et al.*, 2010; Mhmoud, *et al.*, 2012; Thilakavathy, *et al.*, 2015, Rezusta, *et al.*, 2004). En el presente estudio la formación de fiálides solo se observó en AHM para el aislado 918 y sólo una fiálide en el aislado 243 después de 3 semanas. Nelson, *et al.*, 1983; Rezusta, *et al.*, 2004, Nenoff, *et al.*, 1983 y Villatorio, *et al.*, 2004, asocian la pérdida de la formación de estas estructuras con la antigüedad de los aislados, así como la pérdida de la virulencia. Al revisar la antigüedad de los aislados, el aislado 243 data del año 1991 mientras que el aislado 918 data del año 2012; por lo que en este estudio la temporalidad de los aislados fue un factor importante en la inducción en la formación de fiálides.

Rezusta, *et al.*, 2004, Mentz, *et al.*, 2014, proponen el uso de medios de cultivo con alto contenido de carbohidratos complejos, nitrógeno y sales, además de periodos de luz y oscuridad, para inducir la conidiación de *M. mycetomatis*, simulando así las condiciones que indujeron la formación de fiálides en ambos aislados, en los medios AHM y A-V8, en dos semanas de incubación. El aislado 918, formó las estructuras más rápidamente y en mayor cantidad que las observadas en el aislado 243, estos datos concuerdan con los observados en el periodo de incubación sin ciclos de luz y oscuridad. Así mismo Mhmou y cols (2012) indica una variabilidad en la forma de las fiálides dependiendo del medio de cultivo en el que se incubó al aislado, desde polifiálides y monofiálides hasta el tamaño y forma de las fiálides y los conidios. En este estudio el AHM indujo

principalmente monofiálides alargadas y conidios esféricos. El A-V8 favoreció la formación de polifiálides cortas, de base ancha y conidios pequeños y ovoides.

CONCLUSIONES

1. En este estudio, 4 medios de cultivo mostraron ser de utilidad para inducir la formación de estructuras de reproducción sexual o asexual.
 - A) El agar extracto de trigo y el agar papa-zanahoria indujeron la formación de picnidios en *Medicopsis romeroi* en un periodo de 3 semanas.
 - B) El agar agua-hojas de clavel y el agar extracto de trigo indujeron la formación de cleistotecios en *Scedosporium apiospermum* en un periodo de un mes.
 - C) El agar harina de avena indujeron la formación de fiálides en *Madurella mycetomatis* en un periodo de un mes.
 - D) Ningún medio utilizado favoreció la inducción de estructuras de reproducción en *Trematosphaeria grisea* en un mes.
2. Las condiciones de luz y obscuridad en conjunto con el aumento de la temperatura de incubación favorecieron la formación de estructuras de reproducción en algunos hongos.
 - A) El agar harina de avena y V8 para *Madurella mycetomatis* indujeron la formación de fiálides en una semana.
 - B) El agar agua-hojas de clavel y extracto de trigo para *Scedosporium apiospermum* indujeron la formación de cleistotecios en tres semanas.
3. Los medios de cultivo que favorecieron la formación de estructuras de reproducción fueron aquellos que contienen carbohidratos complejos (AET, APZ y A-V8).
4. Los medios con bajo contenido de nutrientes (AA-HC y APZ) favorecieron la formación de estructuras de resistencia como esclerotes y clamidioconidios.
5. En *Trematosphaeria grisea*, ninguno de los medios y condiciones utilizados indujo estructuras de reproducción.
6. La secuenciación de un fragmento de la región ITS fue útil para la identificación molecular de 7 de los aislados estudiados.
7. La PCR realizada con el DNA del aislado 636 (*Scedosporium apiospermum*) no resultó ser útil para la confirmación de identidad de este hongo, ya que no se obtuvo producto de amplificación de cinco regiones blanco.
8. El producto de amplificación del aislado 650 (*Trematosphaeria grisea*), comparado con la base de datos de GeneBank no permitió determinar con exactitud la identidad del hongo estudiado (orden Pleosporales).

SUGERENCIAS

Durante la realización de este estudio, la información obtenida en la literatura sobre los componentes de los medios de cultivo que los hongos utilizan como sustratos, fueron un factor crucial para intentar inducir las estructuras de reproducción sexual o asexual.

Considerando que el nitrógeno y los carbohidratos complejos son los principales componentes presentes en los medios de cultivo que dieron mejor resultado, se recomienda que en los laboratorios interesados en identificar los agentes causales de eumicetoma, utilicen medios como el Agar Extracto de Trigo, Agar Harina de Maíz, Agar V8 y Agar Papa Zanahoria para obtener resultados más rápidos y confiables.

Debido a que este es un estudio aún general para seleccionar medios de cultivo para agentes de eumicetoma, se sugiere realizar una estandarización más fina de cada uno de los medios de cultivo (como otras temperaturas y pH's, luz y oscuridad, humedad, etc.) que favorecieron la formación de las estructuras de reproducción para cada uno de los diferentes agentes de eumicetoma, tomando como base los datos e información aquí proporcionados.

Finalmente se recomienda hacer un estudio de las secuencias de hongos pertenecientes al orden Pleosporales o al complejo de *Trematosphaeria grisea* encaminado al diseño de oligonucleótidos (primers) que favorezcan la identificación molecular más específica para hongos taxonómicamente relacionados.

REFERENCIAS

- Abrantes Ruben (2017). Diversidad de especies de *Scedosporium* provenientes de muestras clínicas de Argentina y su sensibilidad *in vitro* frente antifúngicos (Tesis de doctorado). Universidad Nacional del Nordeste, Argentina.
- Ahmed A, Adelman D, *et al.*, "Environmental Occurrence of *Madurella mycetomatis*, the major agent of human eumycetoma in Sudan", *J. Clin Microbiol*, 2002; 40(3):1031-1032.
- Ahmed A, van Leeuwen W, *et al.*, "Mycetoma caused by *Madurella mycetomatis*: a neglected infectious burden", *Lancet infect Dis*, 2004; 4:566-74.
- Arenas R., Micetoma en Micología. México DF. McGraw-Hill Interamericana, 2004, 5ta edición.
- Bonifaz A, "Micología Médica Básica", Editorial McGrawHill, 2010, 3ra edición.
- Bonifaz A, Tirado-Sánchez A, *et al.*, "Mycetoma: Experience of 482 Cases in a Single Center in Mexico". *PLoS Negl Trop*, 2014; 8(8): 3102.
- Borman A, Desnos-Olivier M, *et al.*, "Novel taxa Associated with human fungal black-grain Mycetomas: *Emarellia grisea* gen. nov., sp. Nov, and *Emarellia paragrisea* sp. Nov.", *J Clin Microbiol*, 2016; 54(7): 1738-1743.
- Borman A, Linton C, *et al.*, "Molecular identification of pathogenic fungi", *J. Antimicrobiol Chem*, 2008; 61(1): i7-i12.
- Chávez G, Arenas, *et. al*, "Micetomas eumicéticos por *Madurella mycetomatis*. Informe de seis casos", *Rev Iberoam Micol*, 1998; 15: 90-93.
- De Hoog S, van Diepeningen A, *et al.*, "Causative agents of black grain micetoma", *J. Clin Microbiol*, 2012; 50(3):988-994.
- Desnos-Ollivier M, Bretagne S, *et al.*, "Molecular identification of Black grain micetoma Agents", *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44(10):3517-3523.
- Develoux M & Enach-Angoulvant A, "Le diagnostic biologique des mycétome", *Revue Francophone des Laboratoires*, 2011; 430:61-67.
- Elizondo Zertuche M (2012). *Caracterización molecular y fenotípica de aislamientos clínicos y ambientales del complejo Pseudallescheria boydii* (Tesis de maestría). Universidad Autónoma de Nuevo León, Nuevo León, México.

- Facultad de Medicina, <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/micetoma.html>, [Consulta 12-FEB-17].
- Ferrer C, Colom F, *et al.*, "Detection and Identification of fungal pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8S ribosomal DNA typing in ocular infections", *J. Clin Microbiol*, 2001; 39(8):2873-2879.
- Flores C., San Martín S., *et al.*, "Especies de *Fusarium* de la Quebrada de Lozano, Jujuy, Argentina", *Rev. argent. microbiol.*, 2005; 37(2):109-112.
- Gamaletsou M, Walsh T & Sipsas N, "Invasive fungal infections in patients with Hematological malignancies: Emergence of resistant pathogens and new antifungal therapies", *Turk J Haematol*, 2018; 35(1): 1-15.
- Giraud S & Bouchara JP, "*Scedosporium apiospermum* complex: Diagnosis and species identification", *Curr Fungal Infect Rep*, 2014; 8:211-219.
- Jie Y, Jun D, *et al.*, "Phenotypic and molecular characterization of *Madurella pseudomycetomatis* sp. Nov., a novel opportunistic fungus possibly causing black grain micetoma", *J Clin Microbiol.*, 2010; 48(1); 251-257.
- López-Martínez R, Méndez-Tovar L, *et al.*, "Actualización de la epidemiología del micetoma en México. Revisión de 3,933 casos", *Gaceta Médica de México*, 2013; 149:586-92.
- MedlinePlus, Metz A, Haddad A, *et al.*, "Induction of the sexual stage of *Pestalotiopsis microspora*, a taxol-producing fungus", *Microbiol.*, 2000; 146:2079-2089.
- Metz A, Haddad A, *et al.*, "Induction of the sexual stage of *Pestalotiopsis microspora*, a taxol-producing fungus", *SGC*, 2000; 146: 2079-2089.
- Mhmoud N, Ahmed S, *et al.*, "*Pleurostomophora ochracea*, a novel agent of human eumicetoma with yellow grains", *JCM*, 2012; 50(9); 2987-2994.
- Mouhanad A, Jiale X & Coudray AJ, "Comparison of molecular methods in the diagnosis of pathogenic fungi", *Int. J Sci. technol Res*, 2015; 4(9):234-236.
- Nelson PE, Tousson TA, *et al.*, "*Fusarium* species, an Illustrated Manual for Identification". *The Pennsylvania State University Press, University ark*, 1983, 39-48.
- Nenoff P, van de Sande W, *et al.*, "Eumycetoma and actinomycetoma-an update on causative agents, epidemiology, pathogenesis, diagnostic and therapy", *JEADV*, 2015, 29; 1973-1993.

- PubChem, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/55283#section=2D-Structure>, [Consulta: 28-SEP-18].
- PubChem, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4189>, [Consulta: 28-SEP-18].
- PubChem, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Posaconazole#section=2D-Structure>, [Consulta: 28-SEP-18].
- PubChem, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Voriconazole>, [Consulta: 28-SEP-18].
- PubChem, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2826718#section=Top>, [Consulta: 28-SEP-18].
- Rezusta López, Sánchez Sousa, *et al.*, “Fundamentos básicos para el diagnóstico micológico”; *Rev. Iberoam. Micol.*; 2007, 3:1-17.
- Rodríguez-Tudela JL, *et al.*, “Pruebas moleculares en el diagnóstico micológico”; *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2008; 26 Supl 13:47-53.
- Santano-Rivero Desiree (2013). Estudio de la distribución ambiental de los hongos del género *Scedosporium* en el País Vasco. Identificación de especies por técnicas moleculares (tesis de maestría). Universidad del País Vasco, País del Vasco.
 - Quinsa, <http://quinsa.com.mx/precios/BD%20MICROBIOLOGY/BD%20BIOLOGY.pdf>, [Consulta 12-FEB-17].
- Sivayogana R, Madhu R, *et al.*, “A prospective clinico mycological study of Deep mycoses in a tertiary centre in Tamil Nadu”, *IJRD*, 2018; 4(2): 126-135.
- Suleiman H, Wadaella E & Fahal A, “The surgical treatment of micetoma”, *PloS Negl Trop Dis*, 2016; 10(6):1-9.
- Tamay de Dios, Ibarra C & Velasquillo C, “Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa PCR y de la PCR en tiempo real”, *Mediagraphic*, 2013; 2(2):70-78.

- Thilakavathy P, Vijaykumar G, *et al.*, “A case report of eumicetoma: emphasizing the need for early diagnosis and appropriate management”, *Sch J Med Case Rep*, 2015; 3(3): 225-227.
- Tisch D & Schmoll M, “Light regulation of metabolic pathways in fungi”, *Appl microbiol Biotechnol.*, 2010; 85: 1259-1277.
- Tsui C, Woodhall, *et al.*, “Molecular techniques for pathogen identification and fungus detection in the environment”, *IMA fungus*, 2011; 2(2):177-189.
- Vademecum, <https://www.vademecum.es/principios-activos-terbinafina-d01ba02>, Consulta [28-SEP-18].
-
- Valente Brasileiro B, Moura Coimbra M, *et al.*, “Genetic variability within *Fusarium solani* specie as revealed by PCR-fingerprinting based on PCR markers”, *Braz. J. Microbiol*, 2004; 35:205-210.
- Van de Sande W, Fahal A, *et al.*, “Merits and pitfalls of currently used diagnostic tools in Mycetoma”, *PloS Negl Trop Dis*, 2014; 8(7):1-11.
- Villatorio Hernández RJ; Tesis: Actividad contra hongos causales de micosis subcutáneas de seis especies Herbáceas. Universidad de San Carlos de Guatemala; Facultad de Ciencias y Química; Julio 2008.
- Zijlstra E, Van de Sande W, *et al.*, “Mycetoma: a unique neglected tropical disease”, *Lancet Infect Dis*, 2016; 16:100-12.

ANEXO A

Medios de cultivo utilizados para inducir la formación estructuras de reproducción

Agar Agua con Hojas de clavel (Leslie et al, 2006)

Preparación de las hojas

Éstas deben estar libres de residuos fungicidas o insecticidas. Inmediatamente después de la recolección; cortar fragmentos de 5 a 8 mm² y se secan en una estufa durante 3-4 horas. Almacenar los fragmentos en aluminio y esterilizarlos por una hora. Estos pueden ser almacenados por 12 meses antes de utilizarse.

En este trabajo se hizo una modificación: después de la recolección de hojas, se realizó un lavado suave con solución de hipoclorito de sodio (0.5 %) para eliminar la capa sérica de las hojas.

Agar Agua 2 %

Pesar 20 g de agar bacteriológico y colocarlo en 1 L de agua destilada; calentar hasta ebullición y posteriormente esterilizar. Distribuir el agar en cajas Petri y permitir que llegue a un estado semisólido, para colocar en la superficie algunos fragmentos de hojas de clavel.

Preparar placas de agar al 2 % en agua y colocar los fragmentos de hojas de clavel estériles en su superficie.

Agar Dextrosa Sabouraud modificado (reducción de dextrosa al 50 %) (Rezusta, et al., 2008)

Composición:

Peptona	10 g
Dextrosa	20 g
Agar	15 g
Agua Estéril	1 L

Pesar los ingredientes y colocarlos en un matraz Erlenmeyer; adicionar el agua y calentar a ebullición. Esterilizar por 15 min a 105°C y distribuir en cajas Petri.

Agar Extracto de Trigo

Composición:

Semillas de trigo	400g
Agar	15 g
Dextrosa	10 g
Agua	1 L

Hervir el trigo en un 1 L de agua destilada hasta reducir el líquido a 500 mL; filtrar y colocar el filtrado en un matraz Erlenmeyer; adicionar el agar y la dextrosa; completar el volumen a 1 L con agua destilada. Hervir hasta ebullición y esterilizar por 15 min. Distribuir en cajas Petri.

Agar harina de Avena (Rezusta, *et al.*, 2008)

Composición:

Harina de avena	30 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 L

Hervir lentamente la harina de avena en el agua durante 1 hora. Filtrar y ajustar el volumen a 1 L. Esterilizar durante 15 min y transferir a cajas Petri.

En relación a la referencia original, para este trabajo se eliminaron las sales ($\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$) y se adicionó la dextrosa, con el fin de disminuir el pH del medio y de los nutrientes.

Agar harina de maíz (Quinsa, 2017)

Se utilizó el medio de cultivo comercial.

Pesar 17 g del medio y colocarlo en un matraz Erlenmeyer; adicionar un litro de agua destilada. Llevarlo a ebullición; esterilizar por 15 min a 105°C. Transferir a cajas Petri.

Agar papa zanahoria

Composición:

Papa rallada o en cuadros	20 g
Zanahoria rallada o en cuadros	20 g
Agar	18 g
Agua	1 L

Lavar, pelar, rallar o cortar en trozos los vegetales; hervirlos lentamente en 1L de agua durante 1 h. Filtrar y colocar en un frasco Erlenmeyer; añadir el agar al filtrado. Esterilizar durante 15 min y transferir a cajas Petri.

Agar V8

Composición:

Jugo V8	200 mL
CaCO ₃	3 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 L
Ajustar pH a 7.2.	

ANEXO B

Método de Purificación de DNA genómico con el Kit GeneAll® Exgene™ Plant SV MINI

Los hongos fueron previamente cultivados en caldo infusión cerebro corazón (BHI) durante cinco días a 120 rpm a 26.5°C. La masa fúngica fue cosechada por filtración, lavada con agua destilada estéril y secada con papel filtro. Se partió de un peso aproximado de 1 g de masa fúngica húmeda para extraer el DNA siguiendo las instrucciones del proveedor.

El Buffer PL puede precipitar cuando se conserva en un lugar frío, en caso que suceda, se calienta en baño maría a 65°C para disolver el precipitado.

Procedimiento de acuerdo al proveedor (modificado para hongos)

1. Macerar la masa fúngica de manera rápida y fina (polvo), usando un mortero y pistilo previamente enfriados con nitrógeno líquido. Colocar hasta 100 mg (masa húmeda) o 25 mg (masa seca) del polvo en un tubo de 1.5 o 2 mL.
2. Adicionar 400 uL de Buffer PL y 4uL de RNAasa (100 mg/mL), y mezclar en el vortex vigorosamente.
3. Incubar por 10-15 minutos a 65 °C. Mezclar 2-3 veces durante la incubación por inversión o vortex.
4. Adicionar 140 uL de Buffer PD al lisado. Mezclar con vortex, e incubar 5 min. en hielo.
5. Centrifugar por 5 minutos a máxima velocidad (10 000 xg o 10 000- 14 000 rpm).
6. Vaciar el lisado a un filtro EzSep™ (azul) y centrifugar por 2 minutos a máxima velocidad.
7. Transferir el decantado/filtrado a un nuevo tubo por pipeteo o decantación, cuidando de no destruir el pellet de residuos celulares.
8. Adicionar 1.5 volumen de Buffer BD al lisado y mezclar inmediatamente por pipeteo o inversión.
9. Vaciar 700 uL de la mezcla del paso 7 a la columna GeneAll SV (verde) junto al tubo colector. Centrifugar por 30 segundos y descartar el filtrado.

10. Reutilizar el tubo colector. Cualquier precipitado que se haya formado en la mezcla debe ser incluido en la transferencia.
11. Repetir el paso 8 con el resto de la muestra.
12. Adicionar 700 uL de Buffer CW a la columna. Centrifugar por 30 segundos y descartar el filtrado. Reinsertar la columna al tubo colector.
13. Adicionar 300 uL de Buffer CW a la columna SV. Centrifugar por 2 min. Transferir cuidadosamente la columna SV a un tubo nuevo de 1.5 mL.
14. Adicionar Buffer AE⁹ directamente en el centro de la membrana de la columna. Incubar por 5 min. a temperatura ambiente y centrifugar por 1 min.
15. Para mayores rendimientos se repitió el paso 12.

Cuantificación del DNA

El DNA fue cuantificado por espectrofotometría, por triplicado, a una dilución 1/500, a 280 nm y 260 nm de longitud de onda; el factor de corrección fue de 320 nm.

⁹ Para eluir el DNA se utilizaron 50 uL de H₂O miliQ (Figura 1), debido a que al momento de realizar la electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, el Buffer generó interferencia, observándose muy poco DNA.

ANEXO C

Análisis de las secuencias utilizando la base de datos GeneBank

A continuación se muestran las secuencias analizadas en la base de datos del GeneBank, tanto para ITS1 como ITS4.

Aislado 040 ITS1

Range 1: 67 to 533		GenBank	Graphics	▼ Next Match	▲ Previous Match
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
863 bits(467)	0.0	467/467(100%)	0/467(0%)	Plus/Plus	
Query 1	CCTCTGCTTTTTTGGAGTACCTCTTGTTCCTCGGCGGGCTTGCCCGCCAACGGGGACCTC	60			
Sbjct 67	CCTCTGCTTTTTTGGAGTACCTCTTGTTCCTCGGCGGGCTTGCCCGCCAACGGGGACCTC	126			
Query 61	AATTC AACCCCTTTGCAATAGTATGAAAACGCTCTGATAACAATCTAAATCGTTACAACCTTT	120			
Sbjct 127	AATTC AACCCCTTTGCAATAGTATGAAAACGCTCTGATAACAATCTAAATCGTTACAACCTTT	186			
Query 121	CAACAATGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGT	180			
Sbjct 187	CAACAATGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGT	246			
Query 181	GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTAT	240			
Sbjct 247	GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTAT	306			
Query 241	TCCATGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGAACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGT	300			
Sbjct 307	TCCATGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGAACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGT	366			
Query 301	GTTTGTCCCGCCAGAGTGCCTGGACTCGCCCTAAAGTCATTGGCAGCCGGCCGCCTCAGC	360			
Sbjct 367	GTTTGTCCCGCCAGAGTGCCTGGACTCGCCCTAAAGTCATTGGCAGCCGGCCGCCTCAGC	426			
Query 361	TCGGAGCGCAGCAGATTCAGCGCATCGAAGTCGGGAGCGGTGGCATCCAGAAGCTCTTAT	420			
Sbjct 427	TCGGAGCGCAGCAGATTCAGCGCATCGAAGTCGGGAGCGGTGGCATCCAGAAGCTCTTAT	486			
Query 421	TTTCTACGTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAA	467			
Sbjct 487	TTTCTACGTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAA	533			

El análisis arrojó 100 % de identidad y un valor de error de 0.0 para ITS1 con:

Medicopsis romeroi strain IHEM 23337 isolate ISHAM-ITS_ID MITS2144 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence.

Sequence ID: KP132406.1

Aislado 040, ITS4

Range 1: 42 to 492		GenBank	Graphics	▼ Next Match	▲ Previous Match
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
833 bits(451)	0.0	451/451(100%)	0/451(0%)	Plus/Plus	
Query 1	GGAAGGATCATTACTGTGGGCTGTTCTTCGGAAAGCCCGCGAGATAGCACCCCTCTGCTTT	60			
Sbjct 42	GGAAGGATCATTACTGTGGGCTGTTCTTCGGAAAGCCCGCGAGATAGCACCCCTCTGCTTT	101			
Query 61	TTTGAGTACCTCTTGTTCCTCGGCGGGCTTGCCCGCCAACGGGGACCTCAATTCAACCC	120			
Sbjct 102	TTTGAGTACCTCTTGTTCCTCGGCGGGCTTGCCCGCCAACGGGGACCTCAATTCAACCC	161			
Query 121	TTTGCAATAGTATGAAAACGCTCTGATAACAATCTAAATCGTTACAACCTTCAACAATGGA	180			
Sbjct 162	TTTGCAATAGTATGAAAACGCTCTGATAACAATCTAAATCGTTACAACCTTCAACAATGGA	221			
Query 181	TCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCGAGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCA	240			
Sbjct 222	TCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCGAGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCA	281			
Query 241	GAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATCCATGGGGC	300			
Sbjct 282	GAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATCCATGGGGC	341			
Query 301	ATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGAACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGTGTTTGTC	360			
Sbjct 342	ATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGAACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGTGTTTGTC	401			
Query 361	CCAGAGTGCCTGGACTCGCCTTAAAGTCATTGGCAGCCGGCCGCTCAGCTCGGAGCGCA	420			
Sbjct 402	CCAGAGTGCCTGGACTCGCCTTAAAGTCATTGGCAGCCGGCCGCTCAGCTCGGAGCGCA	461			
Query 421	GCAGATTCAGCGCATCGAAGTCGGGAGCGGT	451			
Sbjct 462	GCAGATTCAGCGCATCGAAGTCGGGAGCGGT	492			

El análisis arrojó 100 % de identidad y un valor de error de 0.0 para ITS4 con:

Medicopsis romeroi strain IP 862.63 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
Sequence ID: DQ836801.1

Aislado 054 ITS1

Range 1: 123 to 336		GenBank	Graphics	▼ Next Match	▲ Previous Match
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
396 bits(214)	2e-106	214/214(100%)	0/214(0%)	Plus/Plus	
Query 1	TCGGCGGGCTTGCCCGCCAACGGGGACCTCAATTCAACCTTTTGCAGTAGTATGAAAACG	60			
Sbjct 123	TCGGCGGGCTTGCCCGCCAACGGGGACCTCAATTCAACCTTTTGCAGTAGTATGAAAACG	182			
Query 61	TCTGATAACAATCTAAATCGTTACAACCTTCAACAATGGATCTCTTGGTCTGGCATCGA	120			
Sbjct 183	TCTGATAACAATCTAAATCGTTACAACCTTCAACAATGGATCTCTTGGTCTGGCATCGA	242			
Query 121	TGAAGAACGCGAGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAA	180			
Sbjct 243	TGAAGAACGCGAGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAA	302			
Query 181	TCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCA	214			
Sbjct 303	TCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCA	336			

Se obtuvo el siguiente resultado con un 100 % de identidad con un valor de error de $2e^{-107}$ para ITS1:

Medicopsis romeroi isolate VPCI 1050/P/15 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence. Sequence ID: [KU361135.1](#) Length: 530 Number of Matches: 1

Aislado 054 ITS1

Range 1: 100 to 459		GenBank	Graphics		
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
665 bits(360)	0.0	360/360(100%)	0/360(0%)	Plus/Plus	
Query	1	TTTTTTGAGTACCTCTTGTTCCTCGGCGGGCTTGCCCGCCAACGGGGACCTCAATTCAA			60
Sbjct	100	TTTTTTGAGTACCTCTTGTTCCTCGGCGGGCTTGCCCGCCAACGGGGACCTCAATTCAA			159
Query	61	CCTTTTGCAGTAGTATGAAAACGTCGTGATAACAATCTAAATCGTTACAACCTTTCAACAAT			120
Sbjct	160	CCTTTTGCAGTAGTATGAAAACGTCGTGATAACAATCTAAATCGTTACAACCTTTCAACAAT			219
Query	121	GGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATT			180
Sbjct	220	GGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATT			279
Query	181	GCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCATGG			240
Sbjct	280	GCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCATGG			339
Query	241	GGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTGAACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGTGTTTGTC			300
Sbjct	340	GGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTGAACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGTGTTTGTC			399
Query	301	CCGCCAGAGTGCCTGGACTCGCCITAAAGTCATTGGCAGCCGGCCGCTCAGCTCGGAGC			360
Sbjct	400	CCGCCAGAGTGCCTGGACTCGCCITAAAGTCATTGGCAGCCGGCCGCTCAGCTCGGAGC			459

Se obtuvo el siguiente resultado con un 100 % de identidad con un valor de error de 0.0 para ITS4:

Medicopsis romeroi isolate VPCI 1050/P/15 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
Sequence ID: [KU361135.1](#) Length: 530 Number of Matches: 1

Aislado 058 ITS1

Range 1: 62 to 606 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1007 bits(545)	0.0	545/545(100%)	0/545(0%)	Plus/Plus
Query 1	TTACCTAIGTTCTGTTGCTTCGGCGCGCTCGGTCAGCGCCCTCTGAAAAGAGGACGATG			60
Sbjct 62	TTACCTAIGTTCTGTTGCTTCGGCGCGCTCGGTCAGCGCCCTCTGAAAAGAGGACGATG			121
Query 61	CCCCTCCCGCCGGCAGCACCAAACTCTTGAATTTTACAGCGGATCACAGTTCTGATTGA			120
Sbjct 122	CCCCTCCCGCCGGCAGCACCAAACTCTTGAATTTTACAGCGGATCACAGTTCTGATTGA			181
Query 121	AAACaaaaaaaaCAAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAG			180
Sbjct 182	AAACAAAAAAAAACAAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAG			241
Query 181	AACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTT			240
Sbjct 242	AACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTT			301
Query 241	GAACGCACATTGCGCCCGGCAGTAATCTGCGGGGCATGCCCTGTCCGAGCGTCATTTCAAC			300
Sbjct 302	GAACGCACATTGCGCCCGGCAGTAATCTGCGGGGCATGCCCTGTCCGAGCGTCATTTCAAC			361
Query 301	CCTCGAACCTCCGTTTCCCTCAGGGAAGCCAGGGTCGGTGTGGGGCCCTACGGCGAGTC			360
Sbjct 362	CCTCGAACCTCCGTTTCCCTCAGGGAAGCCAGGGTCGGTGTGGGGCCCTACGGCGAGTC			421
Query 361	TTCGCGACCCCGTAGGCCCTGAAATACAGTGGCGGTCCCGCCGCGGTTGCCCTCTGCGT			420
Sbjct 422	TTCGCGACCCCGTAGGCCCTGAAATACAGTGGCGGTCCCGCCGCGGTTGCCCTCTGCGT			481
Query 421	AGTAAGTCTCTTTTGCAGCTCGCATTGGGTCGGCGGAGGCGCTGCCGTCAAACCCACT			480
Sbjct 482	AGTAAGTCTCTTTTGCAGCTCGCATTGGGTCGGCGGAGGCGCTGCCGTCAAACCCACT			541
Query 481	AACAACCTCCAGATGGTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGTACCCGCTGAACTTAAGCATAT			540
Sbjct 542	AACAACCTCCAGATGGTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGTACCCGCTGAACTTAAGCATAT			601
Query 541	CAATA 545			
Sbjct 602	CAATA 606			

Se obtuvo el siguiente resultado con un 100 % de identidad con un valor de error de 0.0 para ITS1:

Scedosporium apiospermum strain PWQ2352 isolate ISHAM-ITS_ID MITS2232 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence. Sequence ID: KP132636.1Length: 614Number of Matches: 1

Aislado 058 ITS4

Range 1: 10 to 556		GenBank	Graphics	▼ Next Match	▲ Previous Match
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
1011 bits(547)	0.0	547/547(100%)	0/547(0%)	Plus/Plus	
Query	1	GAACCTGCGGAGGGATCATTACAGAGTTACTACTCCAAACCCATTGTGAACCTTACCTAT	60		
Sbjct	10	GAACCTGCGGAGGGATCATTACAGAGTTACTACTCCAAACCCATTGTGAACCTTACCTAT	69		
Query	61	GTTCGTGCTCGGCGGCGTCCGGTCAGCGCCCTCTGAAAAGAGGACGATGCCCTCCC	120		
Sbjct	70	GTTCGTGCTCGGCGGCGTCCGGTCAGCGCCCTCTGAAAAGAGGACGATGCCCTCCC	129		
Query	121	GCCGGCAGCACCAAACTCTTGAATTTTACAGCGGATCACAGTTCTGATTTGAAAACaaa	180		
Sbjct	130	GCCGGCAGCACCAAACTCTTGAATTTTACAGCGGATCACAGTTCTGATTTGAAAACAAA	189		
Query	181	aaaCAAGTTAAAACTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCGGCATCGATGAAGAACGCAGC	240		
Sbjct	190	AAACAAGTTAAAACTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCGGCATCGATGAAGAACGCAGC	249		
Query	241	GAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAC	300		
Sbjct	250	GAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAC	309		
Query	301	ATTGCGCCCGGCAGTAATCTGCCGGCATGCCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCCTCGAAC	360		
Sbjct	310	ATTGCGCCCGGCAGTAATCTGCCGGCATGCCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCCTCGAAC	369		
Query	361	CTCCGTTTCTCAGGGAAGCCAGGGTCGGTGTGGGGCGCTACGGCAGTCTTCGCGAC	420		
Sbjct	370	CTCCGTTTCTCAGGGAAGCCAGGGTCGGTGTGGGGCGCTACGGCAGTCTTCGCGAC	429		
Query	421	CCCCGTAGGCCCTGAAATACAGTGGCGGTCCCGCCGGGTTGCCTTCTGCGTAGTAAGTC	480		
Sbjct	430	CCCCGTAGGCCCTGAAATACAGTGGCGGTCCCGCCGGGTTGCCTTCTGCGTAGTAAGTC	489		
Query	481	TCTTTTGCAAGCTCGCAITGGGTCCCGGCGGAGGCCTGCCGTCAAACCCCTAACAACTC	540		
Sbjct	490	TCTTTTGCAAGCTCGCAITGGGTCCCGGCGGAGGCCTGCCGTCAAACCCCTAACAACTC	549		
Query	541	CAGATGG 547			
Sbjct	550	CAGATGG 556			

Se obtuvo el siguiente resultado con un 100 % de identidad con un valor de error de 0.0 para ITS4:

Scedosporium apiospermum strain PWQ2352 isolate ISHAM-ITS_ID MITS2232 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence Sequence ID: [KP132636.1](#)

Aislado 242 ITS1

Range 1: 105 to 459		GenBank	Graphics	▼ Next Match	▲ Previous Match
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
656 bits(355)	0.0	355/355(100%)	0/355(0%)	Plus/Plus	
Query 1	GCAGTATGCTAGTATCTTCTGATTCTGTGGGCATGAATTTTTTACAACCTTCAACAATGG	60			
Sbjct 105	GCAGTATGCTAGTATCTTCTGATTCTGTGGGCATGAATTTTTTACAACCTTCAACAATGG	164			
Query 61	ATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACCGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGC	120			
Sbjct 165	ATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACCGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGC	224			
Query 121	AGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCATGGGG	180			
Sbjct 225	AGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCATGGGG	284			
Query 181	CATGCCTGTTTCGAGCGTCATTGACACCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGCGTCTGTCCC	240			
Sbjct 285	CATGCCTGTTTCGAGCGTCATTGACACCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGCGTCTGTCCC	344			
Query 241	TGCGGGGACTCGCCCCAAAGTCATTGGCAGCCTCTGCCCGCTTCCCGCGCAGCACTGTCC	300			
Sbjct 345	TGCGGGGACTCGCCCCAAAGTCATTGGCAGCCTCTGCCCGCTTCCCGCGCAGCACTGTCC	404			
Query 301	CGCTTTTGGGAGGACCTACGGGTGGACTGGCGTCCAGCAAGCTCTTTTTATTCA	355			
Sbjct 405	CGCTTTTGGGAGGACCTACGGGTGGACTGGCGTCCAGCAAGCTCTTTTTATTCA	459			

Se obtuvo el siguiente resultado con un 100 % de identidad con un valor de error de 0.0 para ITS1:

Trematosphaeria grisea internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence
Sequence ID: [KX757030.1](#) Length: 539 Number of Matches: 1

Aislado 242 ITS4

Range 1: 342 to 453		GenBank	Graphics	▼ Next Match	▲ Previous Match
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
207 bits(112)	3e-50	112/112(100%)	0/112(0%)	Plus/Plus	
Query 1	CCCTGCGGGGACTCGCCCCAAAGTCATTGGCAGCCTCTGCCCGCTTCCCGCGCAGCACTG	60			
Sbjct 342	CCCTGCGGGGACTCGCCCCAAAGTCATTGGCAGCCTCTGCCCGCTTCCCGCGCAGCACTG	401			
Query 61	TCGCGCTTTTGGGAGGACCTACGGGTGGACTGGCGTCCAGCAAGCTCTTTTT	112			
Sbjct 402	TCGCGCTTTTGGGAGGACCTACGGGTGGACTGGCGTCCAGCAAGCTCTTTTT	453			

Se obtuvo el siguiente resultado con un 100 % de identidad con un valor de error de $3E^{-50}$ para ITS4:

Trematosphaeria grisea internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence
Sequence ID: [KX757030.1](#) Length: 539 Number of Matches: 1

Aislado 243 ITS1

Range 1: 150 to 420 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
501 bits(271)	4e-138	271/271(100%)	0/271(0%)	Plus/Plus
Query 1	CCGCCGGAGGATTATACAACACCCTATTTGCTCTGTACGGCCCTCTCTGAGTCTTCTGTAC			60
Sbjct 150	CCGCCGGAGGATTATACAACACCCTATTTGCTCTGTACGGCCCTCTCTGAGTCTTCTGTAC			209
Query 61	TGAATAAGTCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAG			120
Sbjct 210	TGAATAAGTCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAG			269
Query 121	CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCA			180
Sbjct 270	CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCA			329
Query 181	CATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTCCGAGCGTCATTTCAACCATCAAG			240
Sbjct 330	CATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTCCGAGCGTCATTTCAACCATCAAG			389
Query 241	CCCCGGGCTTGTGTTGGGGACCTGCGGCTG		271	
Sbjct 390	CCCCGGGCTTGTGTTGGGGACCTGCGGCTG		420	

Se obtuvo el siguiente resultado con un 100 % de identidad con un valor de error de $4e^{-108}$ para ITS1:

Madurella mycetomatis genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete sequence, strain: IFM 46458. Sequence ID: LC317630.1 Length: 582 Number of Matches: 1

Aislado 635 ITS4

Range 1: 236 to 438 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
375 bits(203)	2e-100	203/203(100%)	0/203(0%)	Plus/Plus
Query 1	GCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAT			60
Sbjct 236	GCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAT			295
Query 61	CATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTTCGAG			120
Sbjct 296	CATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTTCGAG			355
Query 121	CGTCATTTGAACCCCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGTGTTTGTCCCGCCAGAGTCCGTGG			180
Sbjct 356	CGTCATTTGAACCCCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGTGTTTGTCCCGCCAGAGTCCGTGG			415
Query 181	ACTCGCCTTAAAGTCATTGGCAG		203	
Sbjct 416	ACTCGCCTTAAAGTCATTGGCAG		438	

Se obtuvo el siguiente resultado con un 100 % de identidad con un valor de error de $2e^{-100}$ para ITS4:

Medicopsis romeroi isolate VPCI 1050/P/15 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
 Sequence ID: [KU361135.1](#)

Aislado 650 ITS1

Range 1: 40 to 441		GenBank	Graphics	▼ Next Match ▲ Previous Match	
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
737 bits(399)	0.0	401/402(99%)	0/402(0%)	Plus/Plus	
Query	1	CCTTGCCCTTTGAGTACCTTCTCGTTTCCTCGGTGGGCTCGCCCGCCGGTGGACAACCATA			60
Sbjct	40	CCTTGCCCTTTGAGTACCTTCTCGTTTCCTCGGTGGGCTCGCCCGCCGGTGGACAACCATA			99
Query	61	AACTCTTTGTAATAGCAGTATCTTCTGAGAAAAACAATAGTCAAACTTTCAACAACGG			120
Sbjct	100	AACTCTTTGTAATAGCAGTATCTTCTGAGAAAAACAATAGTCAAACTTTCAACAACGG			159
Query	121	ATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGC			180
Sbjct	160	ATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGC			219
Query	181	AGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTCGGTATTCCGTTGGG			240
Sbjct	220	AGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTCGGTATTCCGTTGGG			279
Query	241	CATGCCCTGTTTCGAGCGTCATTTAAACATTCAAGCTCGGCTTGGTGTGGGTGCTTGTCTCT			300
Sbjct	280	CATGCCCTGTTTCGAGCGTCATTTAAACATTCAAGCTCGGCTTGGTGTGGGTGCTTGTCTCT			339
Query	301	CCCCCGCGGTGGACTCACCTCAAATGCATTGGCGGCCGGTATGTTGGCTTCGAGCGCAGT			360
Sbjct	340	CCCCCGCGGTGGACTCACCTCAAATGCATTGGCGGCCGGTATGTTGGCTTCGAGCGCAGT			399
Query	361	AGAAACGCGCCAGACGTCCTGACATGCTGGTCCCCCACAAGA		402	
Sbjct	400	AGAAACGCGCCAGACGTCCTGACATGCTGGTCCCCCATAAGA		441	

Se obtuvo el siguiente resultado con un 100 % de identidad con un valor de error de 0.0 para ITS1:

Pleosporales sp. CSV4 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence. Sequence ID: [KU571702.1](#).

Aislado 918 ITS1

Range 1: 68 to 580 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
948 bits(513)	0.0	513/513(100%)	0/513(0%)	Plus/Plus
Query 1	ACCCCCAAAACCGTTGCTTCGGCGGGCGGCACCCCCGGGCCTCCCGGTAGTGTAGTGTCC	60		
Sbjct 68	ACCCCCAAAACCGTTGCTTCGGCGGGCGGCACCCCCGGGCCTCCCGGTAGTGTAGTGTCC	127		
Query 61	CTCGGCCCCCTCCGCGGGCGTCCGCGGAGGATTATACAACACCCTATTTGCTCTGTAC	120		
Sbjct 128	CTCGGCCCCCTCCGCGGGCGTCCGCGGAGGATTATACAACACCCTATTTGCTCTGTAC	187		
Query 121	GGCCTCTCTGAGTCTTCTGTACTGAATAAGTCAAACTTTCACAACGGATCTCTTGGTT	180		
Sbjct 188	GGCCTCTCTGAGTCTTCTGTACTGAATAAGTCAAACTTTCACAACGGATCTCTTGGTT	247		
Query 181	CTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTG	240		
Sbjct 248	CTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTG	307		
Query 241	AATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGCGGGCATGCCTGTTT	300		
Sbjct 308	AATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGCGGGCATGCCTGTTT	367		
Query 301	GAGCGTCATTTCAACCATCAAGCCCCGGGCTTGTGTTGGGGACCTGCGGCTGTCCGCAG	360		
Sbjct 368	GAGCGTCATTTCAACCATCAAGCCCCGGGCTTGTGTTGGGGACCTGCGGCTGTCCGCAG	427		
Query 361	GCCCTGAAAACCCAGTGGCGGGCTCGCTGGTCACCCCGAGCGTAGTAGTTATATCCAACTC	420		
Sbjct 428	GCCCTGAAAACCCAGTGGCGGGCTCGCTGGTCACCCCGAGCGTAGTAGTTATATCCAACTC	487		
Query 421	GCCCAGGGCGTGTGCGGGCTCCGGCCGTTAAAGCCCAACTCATTITTTACCCCAAGGTTG	480		
Sbjct 488	GCCCAGGGCGTGTGCGGGCTCCGGCCGTTAAAGCCCAACTCATTITTTACCCCAAGGTTG	547		
Query 481	ACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTT	513		
Sbjct 548	ACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTT	580		

Se obtuvo el siguiente resultado con un 100 % de identidad con un valor de error de 0.0 para ITS1:

Madurella mycetomatis isolate VPCI 1096/P/16 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [KY310662.1](#)

Aislado 918 ITS4

Range 1: 304 to 526 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
412 bits(223)	2e-111	223/223(100%)	0/223(0%)	Plus/Plus
Query 1	AGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCT			60
Sbjct 304	AGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCT			363
Query 61	GTTCGAGCGTCATTTCAACCATCAAGCCCCCGGGCTTGTGTGGGGACCTGCGGCTGTCC			120
Sbjct 364	GTTCGAGCGTCATTTCAACCATCAAGCCCCCGGGCTTGTGTGGGGACCTGCGGCTGTCC			423
Query 121	GCAGGCCCTGAAAACCAAGTGGCGGGCTCGCTGGTCACCCCGAGCGTAGTAGTTATAATCCA			180
Sbjct 424	GCAGGCCCTGAAAACCAAGTGGCGGGCTCGCTGGTCACCCCGAGCGTAGTAGTTATAATCCA			483
Query 181	ACTCGCCCAAGGGCGTGTGCGGGCTCCGGCCGTTAAAGCCCAA			223
Sbjct 484	ACTCGCCCAAGGGCGTGTGCGGGCTCCGGCCGTTAAAGCCCAA			526

Se obtuvo el siguiente resultado con un 100 % de identidad con un valor de error de $8e^{-109}$ para ITS4:

Madurella mycetomatis isolate VPCI 1096/P/16 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [KY310662.1](#)