

29
201



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA

***“Diferenciación fisiológica, morfológica y térmica
de diversas cepas de Nocardia obtenidas en
pacientes de Micetoma”***

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :
LETICIA CARRILLO VALDEPEÑA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

1993



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

	Pag.
INTRODUCCION	
OBJETIVOS	3
GENERALIDADES:	
I. Micetoma actinomicético.	
1) Definición	4
2) Sinonimia	4
3) Aspectos epidemiológicos: distribución geográfica, fuente de infección y hábitat, vía de entrada, sexo y edad, ocupación, período de incubación y factores predisponentes	4
4) Frecuencia	8
5) Etiopatogenia	9
6) Aspectos clínicos: a) Topografía, b) Morfología y c) Sintomatología	10
7) Diagnóstico diferencial	13
8) Diagnóstico de laboratorio: a) Toma de muestra, b) Examen directo, c) cultivos d) Biopsias, e) Pruebas inmunológicas, f) Rayos X, g) Inoculación en animales	14

9) Pronóstico	18
10) Tratamiento	19
11) Profilaxis	21
II. Aspectos microbiológicos del género	
<u>Nocardia</u>	22
III. Características bioquímicas del género	
<u>Nocardia</u>	25
MATERIAL	26
METODOLOGIA	29
RESULTADOS	41
ANALISIS DE RESULTADOS	51
CONCLUSIONES	54
ANEXO	56
BIBLIOGRAFIA	62

INTRODUCCION

El micetoma es la micosis profunda más frecuente en México (60-65%), es considerada una entidad sindrómica por la diversa etiología que lo puede causar; en nuestro país son excepcionales los casos producidos por hongos verdaderos (5%), la mayoría se deben a diversos actinomicetos aerobios, con un marcado predominio de Nocardia brasiliensis (85%), sin embargo existen otros géneros como Actinomaduræ y Streptomyces.

A diferencia de otras enfermedades donde involucra una diversidad de especies como en la candidosis, para el micetoma es de suma importancia tipificar la especie productora, porque el esquema terapéutico a seleccionar depende de esto; por ejemplo se tiene información que un micetoma por N.asteroides es mucho más agresivo, y resistente a las terapias convencionales que se dan para los producidos por N.brasiliensis.

En el trabajo rutinario, el diagnóstico de un micetoma por lo regular se realiza de dos formas: mediante la observación de los granos al examen directo o bien por la histopatología, donde se observan los mismos y se clasifican por su forma y afinidad tintoreal; los cultivos vienen siendo una prueba confirmatoria del diagnóstico y más bien de identificación del agente etiológico.

Es sumamente importante el obtener cultivos puros, li
bres de contaminantes (bacterias y hongos), para que la
tipificación no salga alterada por los mismos.

Por todo lo anterior el objetivo del presente tra
bajo, es llevar a cabo una diferenciación de las cepas de
Nocardia, aisladas de pacientes con micetoma mediante una
serie de pruebas fisiológicas, bioquímicas, morfológicas,
etc., y realizar una correlación de las mismas para deter
minar cuales son las indispensables y cuales pueden omi
tirse para posteriores trabajos de tipificación y clasi
ficación.

OBJETIVOS

- Corroborar las características macro y micromorfológicas de las cepas de Nocardia spp. aisladas de pacientes con micetoma.
- Diferenciar mediante pruebas bioquímicas, fisiológicas y térmicas las especies del género Nocardia.
- Demostrar que las pruebas anteriores son métodos seguros de diferenciación y tipificación de las diversas especies del género Nocardia.
- Realizar la correlación entre agente etiológico y relacionarlo con los datos epidemiológicos más importantes.

" MICETOMA ACTINOMICETICO "

1.- DEFINICION: El micetoma actinomicético es un síndrome anatómico-clínico de tipo inflamatorio crónico constituido por aumento de volumen, deformación de la región que afecta y con lesiones de aspecto nodular, fistulizadas, de donde drena un exudado filante, que contiene las formas parasitarias denominadas "granos"; su etiología se debe a diversos actinomicetos aerobios.

(1,2,3,5,6)

2.- SINONIMIA: Tumor del pie, Pie de Madura y Maduromicosis.

(1,2,3,5,6)

3.- ASPECTOS EPIDEMIOLOGICOS

a) DISTRIBUCION GEOGRAFICA: El micetoma se presenta en regiones vecinas al Trópico de Cáncer. La mayoría de países que atraviesa éste, quedan comprendidos dentro de dos tipos de climas ; subtropical y

senegalés, son zonas con un promedio de precipitación pluvial abundante, que fluctúa entre 500-1000 mm y rangos de temperatura entre 10-20°C y 20-40°C. Los micetomas son más frecuentes en continentes como: Africa (Sudán, Somalia, Senegal, Niger, Chad y Nigeria); Asia (India); América (México, Venezuela, Argentina, Brasil y El Salvador). En Europa y Norteamérica se refieren casos esporádicamente.

Los micetomas en Africa y la India, son generalmente de tipo eumicético debido a que su clima es tropical (senegalés), con un rango de temperatura mayor (20-45°C), condiciones óptimas para el desarrollo de hongos.

Respecto a México, las regiones geográficas que se consideran zonas endémicas debido a que se observan la mayor parte de casos son: Guerrero-Morelos; Sur de Veracruz; Sur de Nuevo León y Sur de Sinaloa. En México y Venezuela, son más frecuentes los micetomas de tipo actinomicético, debido a que ambos países quedan comprendidos dentro de un clima subtropical, con un rango de temperatura menor (10-25°C). (1,5,6,13)

b) FUENTE DE INFECCION Y HABITAT: Tanto los hongos verdaderos como los actinomicetos productores de micetoma, han sido aislados del suelo y de los vegetales, se han relacionado con las acacias (espinas). No se ha reportado transmisión de hombre a hombre. (1,2,5,13)

c) VIA DE ENTRADA: Los traumatismos dan la puerta de entrada a los agentes etiológicos, los cuales penetran por una solución de continuidad, por ejemplo por espinas, astillas de madera, clavos, piedras etc. Los traumatismos repetidos y de pequeña magnitud, a nivel de las porciones que más adelante se van a ver afectadas, como son las extremidades y el dorso, vienen a ser la vía de ingreso del agente causal y el inicio del padecimiento, dependiendo del inóculo y la susceptibilidad del hospedero. (1,2,5,13)

d) SEXO Y EDAD: Los micetomas predominan en el sexo masculino en proporción de 5:1; hay algunas observaciones que indican que la alta incidencia en el

sexo masculino, más bien se debe a una influencia hormonal, ésto se piensa por la exacerbación del micetoma en las mujeres embarazadas. Para algunos autores esta alta incidencia, es un reflejo de la ocupación, pero en México como en la India y los países africanos, la mujer al igual que el hombre desarrolla labores en el campo, por lo tanto está sujeta a la misma probabilidad de inoculación. (1)

Para la mayoría de las cepas hay un predominio hacia el sexo masculino, con excepción de Actinomadurae madurae que se presenta más en el sexo femenino.

SEXO: Los micetomas se presentan más frecuentemente entre la 3a. y 5a. décadas de la vida, probablemente por ser la edad más productiva.

Los casos de micetoma en niños son raros, probablemente por la misma explicación hormonal.

(1,2,3,10,13,17)

- e) OCUPACION: Las personas más afectadas son las que se dedican a las labores del campo, además de indios que trabajan en condiciones rudimentarias, sin protección alguna, como pueden ser amas de

casa, obreros, carpinteros y leñadores. La ocupación influye en la topografía clínica por ejemplo; los leñadores y cañeros adquieren la infección en la espalda, debido que al cargar la leña lo hacen sin protección. (1,2,3,5,6,13)

f) PERIODO DE INCUBACION: Dicho período no se ha podido determinar, a partir del primocontacto, la enfermedad puede manifestarse desde algunos meses hasta años. Esto dependerá de varias condiciones como son: el tamaño del inóculo, virulencia de la cepa y el estado inmunitario del huésped. (1,5)

g) FACTORES PREDISPONENTES: Sólo los relacionados con la ocupación. (1)

4.- FRECUENCIA: El micetoma es la "micosis" subcutánea más frecuente en México (65%). Es importante debido a que puede generar invali

dez del miembro que afecta, y cuando se presenta en cráneo o tórax causa complicaciones severas e incluso la muerte.

(1,2,5,6)

5.- ETIOPATOGENIA: En la siguiente tabla se indican los agentes causales más frecuentes del micetoma actinomicético:

		<u>asteroides</u>	
	- <u>Nocardia</u>	<u>brasiliensis</u> (85%)	
		<u>otitidis-cavarum</u> (caviae)	
ACTINOMICETOS	- <u>Actinomadurae</u>	<u>madurae</u> (10%)	
		<u>pelletieri</u>	
		<u>somaliensis</u>	
	- <u>Streptomyces</u>	<u>paraquayensis</u> (excepcional)	
			(1,4)

Los agentes etiológicos del micetoma viven sa profíticamente en el medio ambiente (suelo, vegeta les), y penetran en el huésped por traumatismos, de modo que las esporas o filamentos de éstos crecen lentamente, por lo tanto el período de incubación puede ser de meses hasta años. (1,5)

Los agentes causales se desarrollan en el huésped formando "granos", que son masas compactas de micelio. La lesión crece por contigüidad avan zando hacia el tejido subcutáneo, atacando tejido muscular, conjuntivo y óseo; se forma una reacción inflamatoria compuesta por polimorfonucleares y fi brosis. (1,5,13)

Cuando el proceso está bien establecido, se forman fístulas que se interconectan entre sí, por las que son expulsados los granos junto con un ma terial filante.

La diseminación de los micetomas por vía lin fática y hemática es rara. (1,3,5,9,10)

6.- ASPECTOS CLINICOS

- a) TOPOGRAFIA: La topografía clínica más frecuente es en miembros inferiores (70%), en pies (50%) de

bido a que están más expuestos a sufrir traumatismos. Se dá principalmente a nivel de la articulación tibiotalariana y en menos proporción en plantas y dedos; el resto se dá en piernas, rodillas, huecos poplíteos, muslos, cadera y nalgas.

La segunda localización es en espalda y nuca (15%).

Otras partes del cuerpo que se van a ver afectadas son los miembros superiores (manos, brazos y codos) en el 10% de los casos. Se han reportado casos en abdomen, cara anterior de tórax, cara y cráneo.

Rara vez se presentan micetomas múltiples que son causados por varias inoculaciones o probable metástasis o diseminación linfática (ejemplo en pie e ingle, pie y axilas. (1,2,3,9,12,14)

- b) MORFOLOGÍA: Gran parte de los micetomas cursan con aumento de volumen y deformación de la región que afecta, con lesiones de aspecto nodular, fistulizadas, de éstas drena un exudado filante y sero-purulento que contiene "granos".

Debido a la evolución crónica del padeci

miento puede afectarse músculo, periostio y hueso, además de comprometer otras estructuras como visceras y pulmones. Los daños a nivel de hueso dependen del agente causal, el cual invade y destruye huesos pequeños como falanges, metatarsianos, huesos del carpo, rótulas, vértebras, etc. El fémur, tibia y esternón debido a que son huesos grandes resisten más al daño osteolítico.

Los agentes etiológicos más osteofílicos son: Nocardia brasiliensis y Actinomaduræ maduræ. El ataque al hueso depende de tres circunstancias: de la cronicidad, del estado inmune del paciente y del agente etiológico. Las alteraciones que más se presentan son: periostitis, osteitis, osteofibrosis y osteolisis. Aunque por cronicidad todos pueden ser osteolíticos.

Clínicamente los micetomas producidos por N. brasiliensis y Actinomaduræ pelletieri son más filamentosos, polifistulizados y osteolíticos: mientras que los causados por A. maduræ y Streptomyces somaliensis son más leñosos, fibrosos y con menos fístulas e igualmente osteolíticos.

Pocas veces el micetoma se presenta de manera atípica (por ejemplo los minimicetomas). Otros casos atípicos son cuando no forman fístulas o cuando se presentan de manera intraósea. (1,2,3,5,6)

- c) **SINTOMATOLOGIA:** El dolor puede presentarse en casos crónicos, principalmente cuando hay francas lesiones osteolíticas o cuando presentan alguna infección bacteriana agregada, mientras que en los casos iniciales puede haber dolor o ausencia de éste, los pacientes sólo refieren prurito especialmente cuando las fistulas están prontas a abrirse.

(1,5,9,11)

7.- DIAGNOSTICO DIFERENCIAL

Tuberculosis colicuativa, actinomicosis, coccidiodomicosis, osteomielitis, furunculosis y cicatrices queloides.

(1,2,5,13)

8.- DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

- a) TOMA DE MUESTRA: Se inicia seleccionando una de las fístulas que estén más activas, si se encuentra cerrada se abre con la ayuda de una aguja de disección. El exudado que drena se toma con el asa micológica y se divide para su observación y cultivo.

Cuando se tienen fístulas con poca actividad, la muestra puede ser a partir de la biopsia.

Otros tipos de muestra pueden ser expectorción y lavado bronquial principalmente cuando el padecimiento compromete pulmones. (1)

- b) EXAMEN DIRECTO: El material recolectado se coloca entre porta y cubreobjetos, con una gota de lugol, solución salina o hidróxido de potasio al 10%.

Con la observación de los granos es suficiente para establecer el diagnóstico, además de orientarnos en la etiología en base al tamaño, color, forma y propiedades especiales de cada grano.

(1,5,6,13)

- Granos de tipo Nocardia: Son iguales no impor

tando la especie, son granos con filamentos microsifonados de 50-150 μ de tamaño, de color blanco o blanco amarillento, multilobulados dando una forma "arriñonada" o como "fetos", pueden presentar o no numerosas clavos en la periferia. (1,5)

- Grano de A. madurae: Es un grano formado de filamentos microsifonados visible a simple vista, mide de 1-5 mm de tamaño, de color blanco amarillento, de forma redonda irregular y de consistencia blanda.

Al microscopio se observa lobulado y en alguna parte de su periferia presenta flecos (1,5)

- Grano de A. pelletieri: Es un grano con filamentos microsifonados, mide 200-300 μ de tamaño, de color rojo o rojo coral, de forma redonda y agrupada.

(1,5)

- Grano de S. somaliensis: Es un grano constituido de filamentos microsifonados, mide de 0.5-1 mm de tamaño, de color blanco grisáceo, de forma redonda y de consistencia dura.

(1,5)

c) CULTIVOS: Pueden realizarse en medios de Sabou

raud solo o con actidione, o en extracto de levadura agar.

Algunas especies se deben sembrar en primocultivo en medios especiales como: Lowenstein Jensen para A. madurae y S. somaliensis.

Para casi todos los actinomicetos, el tiempo promedio de crecimiento de las colonias fluctúa entre 8-15 días a temperatura ambiente, con excepción de A. madurae que puede llegar a desarrollar hasta en dos meses. (1,6,13)

- d) **BIOPSIAS:** Son importantes sobre todo cuando no se encuentran granos al examen directo.

La imagen histológica es igual no importando los agentes causales, formada básicamente por un granuloma inflamatorio inespecífico y raras veces tuberculoide.

La importancia de la biopsia está en determinar las características tintoriales y forma de los granos. (1,13)

- Granos de Nocardia: Los granos son multilobulados, se tiñen ligeramente en la periferia con hematoxilina (lila) y en el centro toma la eosina (rosa). (1,5)

- Grano de A. madurae: Es grande, tiene poca afinidad por la hematoxilina, quedando de color lila o violeta intenso, aunque no de manera uniforme. (1,5)
- Grano de A. pelletieri: Es grande, tiene poca afinidad por la hematoxilina, en el centro queda ligeramente pálido y su disposición es característica, debido a que deja espacios o hendiduras simulando un "plato roto". (1,5)
- Grano de S. somaliensis: Es grande, con poca afinidad por la hematoxilina, de consistencia dura, de modo que al corte con el microtomo deja una imagen similar a una "rebanada de papa". (1,5)

e) PRUEBAS INMUNOLOGICAS: Las pruebas inmunológicas (intradermo-reacción) carecen de importancia diagnóstica, debido a que se requieren de un sin número de antígenos, además de que presentan cruces inmunológicos, en particular con M. tuberculosis. (1,5)

f) RAYOS X: Son indispensables para indicar el grado de afección ósea. (1,2,3)

g) INOCULACION EN ANIMALES: Se realiza con el fin de investigar la virulencia de los microorganismos.

Se inyecta una suspensión de la cepa a estudiar en el cojinete plantar del ratón; una vez que se presenta la inflamación, se sacrifica al animal para observar los granos que provienen de la pata y del peritoneo. Los granos regularmente se observan más pequeños y sin clavos ni flecos.

Es importante recuperar la cepa a través de los cultivos. (1,5)

9.- PRONOSTICO

El pronóstico del micetoma depende de tres circunstancias: del agente causal, de la topografía clínica y del grado de avance o profundidad.

De modo que los padecimientos con mejor pronóstico son los causados por N.brasiliensis que se presentan en el pie sin presentar lesiones a nivel

de periostio y hueso.

Los de mal pronóstico son los causados por especies como: A. madurae y S. somaliensis, que estén localizados en el dorso o cráneo y que provoquen osteólisis o que comprometan otras estructuras como: pulmones, vísceras y cerebro. (1,2,5,6)

10.- TRATAMIENTO

El tratamiento del micetoma depende de condiciones como: agente causal, grado de avance del padecimiento y las condiciones del paciente.

El esquema más empleado para micetomas por Nocardia spp, es a base de diamino difenil sulfona (DDS), a la dosis de 100-200 mg / día asociada a sulfametoxazol-trimetoprim, a la dosis de 400-800 a 800-160 mg / día. El tratamiento se prolonga por años y dependiendo de la respuesta que tenga el paciente se disminuye la dosis.

Es importante que se realice un control clínico y de laboratorio debido a que éste tipo de fármacos generan problemas hematológicos.

Otro tratamiento puede ser a base de sulfame

toxipiridazina a la dosis de 500 mg / día, asociada a sulfametoxazol-trimetoprim a la dosis anteriormente mencionada.

Para los casos por Nocardia spp que no responden a las sulfas o que causen alteraciones en los pacientes o bien, que los agentes causales no sean sensibles, puede usarse estreptomycinina 1 mg / día; clofazimina 100 mg / día; rifampicina 600 mg / día e isoniazida 300-600 mg / día, con las indicaciones y controles inherentes a éstos fármacos.

Un nuevo esquema terapéutico es a base de amikacina (aminoglucósido) por vía intramuscular a la dosis de 15 mg / kg / día en 21 días, dando buenos resultados sólo que este fármaco es caro y tóxico, por lo que no puede ser empleado para todos los pacientes ni por tiempo prolongado.

Para micetomas causados por A. maduræ se sugiere que el tratamiento de elección debe ser combinado a base de estreptomycinina 1 g / día más sulfametoxazol-trimetoprim 400-80 mg / día, a pesar de usar este esquema a base de fosfomicina 500 mg / día más ketoconazol 200 mg / día, obteniendo resultados satisfactorios.

La cirugía está contraindicada en los casos de micetoma por actinomicetos, debido a que en la mayoría de ellos en proceso continúa en el muñón,

también puede provocar diseminación linfática y/o hematológica, de mal pronóstico. (1,5,11,13,15)

11.- PROFILAXIS

Las medidas profilácticas que más se recomiendan, consisten en hacer conciencia de este padecimiento en los grupos más expuestos como son: campesinos, obreros, etc. e insistir en el uso cotidiano de calzado cerrado. (1)

ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS
DEL GENERO Nocardia

Nocardia brasiliensis:

Es un actinomiceto aerobio causante del 85% de los micetomas en México.

- a) CULTIVO: Crece en medio de Sabouraud agar o extracto de levadura agar, estos medios no deben contener clo ramfenicol ya que inhibe su crecimiento, ni ningún an tibacteriano de amplio espectro.

Las colonias se desarrollan entre 8 y 10 días a temperatura ambiente, son de tamaño limitado, secas, de consistencia dura o acartonada, de color blanco o blanco-amarillento y cuando provienen de resiembras, toman una tonalidad naranja con porciones pulverulentas blancas; su forma es acuminada y surcada, dando el aspecto de una "palomita de maíz"; en raras ocasiones presenta un ligero pigmento beige-café, que se difunde a través del medio; despiden un olor característico a humedad o "tierra mojada".

- b) MICROMORFOLOGIA: Es un microorganismo grampositivo y

parcial ácido alcohol resistente (AAR), al microscopio se observan numerosos filamentos microfónicos, tabicados, que se fragmentan en formas bacilares y coccoides. (1,2,4,5)

Nocardia asteroides:

Es un actinomiceto aerobio, agente etiológico de la mayoría de las nocardiosis, su patología queda primordialmente referida al pulmón, rara vez se encuentra causando micetomas.

- a) CULTIVO: Crece en medio Sabouraud y extracto de Jeva dura agar, su desarrollo es inhibido por el cloramfenicol.

Las colonias se desarrollan entre 10 y 12 días a temperatura ambiente, son de tamaño limitado, secas, de color naranja o amarillo naranja y raras veces presenta porciones blanquecinas pulverulentas, las colonias son de forma acuminada, surcada y de consistencia suave; al reverso no presenta pigmento y también despiden olor característico a humedad.

- b) MICROMORFOLOGIA: Es un microorganismo grampositivo y

parcial ácido alcohol resistente. Al microscopio se observan numerosos filamentos microsifonados, tabicados, con formas cocoides y bacilares. (1,2,4,5)

Nocardia otitidis-cavarum (N.caviae):

Es un actinomiceto aerobio, que produce micetomas en 0.1% de los casos. Los pocos casos registrados se asemejan a la infección producida por N.brasiliensis.

- a) CULTIVO: Crece en medio Sabouraud o extracto de leva dura agar y su desarrollo es inhibido por el cloramfenicol.

Las colonias se desarrollan entre 8 y 10 días a temperatura ambiente, son de tamaño limitado, secas, de consistencia dura, de color blanco, planas y toman un aspecto "yesoso"; no presentan pigmentos y tienen olor característico a humedad.

- b) MICROMORFOLOGIA: Por su micromorfología es prácticamente indistinguible de otras especies de Nocardia.

(1,2,4,5)

CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS DEL GENERO NOCARDIA
 (Según Gordon y Mihm 1962 y modificada por Mahgoub)

PRUEBA BIOQUIMICA	<u>N.asteroides</u>	<u>N.brasiliensis</u>	<u>N.otitidis-cavarum</u> (<u>N.caviae</u>)
Hidrólisis de caseína	-	+	-
Licuefacción de gelatina	-	+	-
Tirosina	-	+	-
Xantina	-	-	+
Hipoxantina	-	+	+
Urea	+	+	+
Galactosa	+-	+	-
Inositol	-	+	+
Manitol	-	+	+
Ramnosa	+-	-	-
Supervivencia a 50°C durante 8 h.	+-	-	+

M A T E R I A L

Aguja de disección	Pinza de Möhr
Algodón	Portaobjetos
Almidón	Soporte universal
Anillo metálico	Termómetro
Asa micológica	Tubos de ensayo de 12 x 75
Baño de agua	Tubos de ensayo de 13 x 100
Cubreobjetos	Tubos de ensayo de 16 x 150
Cajas de Petri	
Embudo	
Etiquetas	
Frascos goteros	
Gradillas	
Matraces Erlenmeyer de 250 ml.	
Matraces Erlenmeyer de 500 ml.	
Mechero	
Papel filtro	
Pinza millipore	

REACTIVOS:

Agua destilada	Hipoxantina
alcohol acetona	Leche descremada
Alcohol ácido	Lugol
Almidón	NaOH 0.1 N
Azul de metileno	Peptona de carne
Carbohidratos	Rojo de fenol
Cristal violeta	Safranina
Extracto de levadura	Tirosina
Fucsina fenicada	Xantina
Gelatina	

EQUIPO:

Autoclave	Incubadora
Balanza granataria	Microscopio
Estufa	Refrigerador

MEDIOS DE CULTIVO:

Agar almidón

Agar bacteriológico

Agar dextrosa Sabouraud

Agar manitol

Infusión de cerebro corazón (BHI)

Caldo urea

Caseína

Gelatina

Medio de hipoxantina, xantina y tirosina

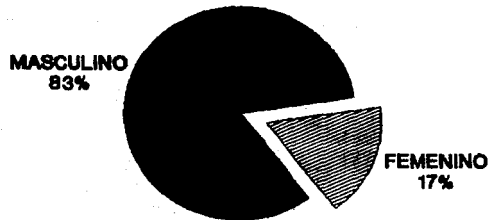
Medio para carbohidratos

M E T O D O L O G I A

Se seleccionaron 50 pacientes con diagnóstico clínico de micetoma, de ellos solamente se incorporaron 35 al estudio; que correspondieron a micetomas ocasionados por Nocardia spp.; el resto (15) se excluyeron por tener etiología diferente o por no haber aislado el microorganismo.

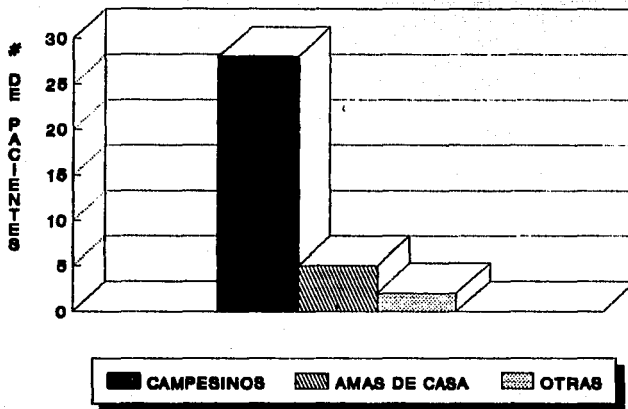
De los 35 pacientes estudiados, 29 (82.8%) correspondieron al sexo masculino y 6 (17.1%) al femenino, sus edades fluctuaron entre 15 y 70 años, edad promedio 38.6 años. El 80 % son campesinos mientras que el porcentaje restante correspondió a amas de casa y ocupaciones diversas.

SEXO

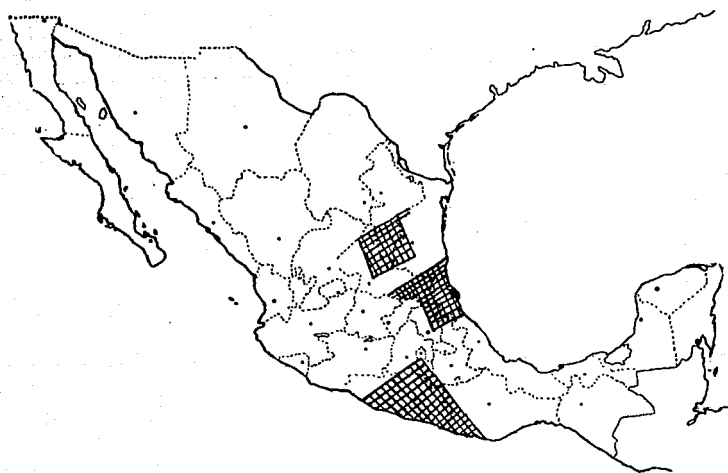


EDAD: Máxima 70 años
Mínima 16 años
Promedio 38.6

OCUPACION:

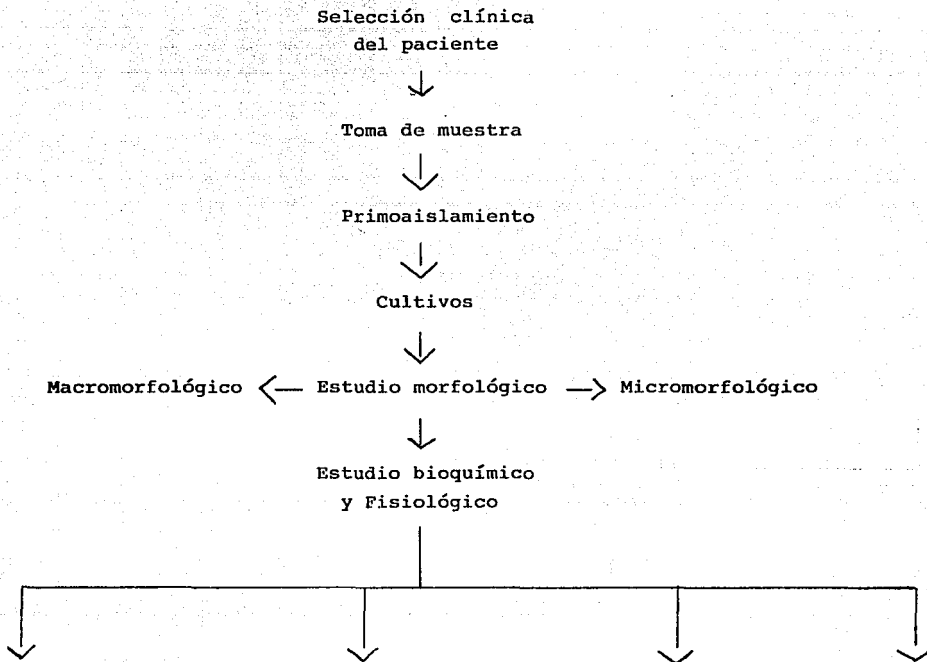


En cuanto a la zona geográfica, 10 (28.5%) provienen de la zona Guerrero-Morelos y 12 (34.2%) de la huasteca, el resto corresponden a diferentes estados de la República.



Zonas epidemiológicas del micetoma en México.

Para el estudio se realizó el siguiente diagrama de flujo:



Valoración de la Actividad proteolítica y utilización de metabo

- Caseína
- Gelatina
- Xantina
- Hipoxantina
- Tirosina
- Urea

Determinación del Perfil Bioquímico de carbohidratos:

- Glucosa
- Galactosa
- Ramnosa
- Manitol
- Inositol
- Sorbitol

- Almidón

Valoración Térmica supervivencia durante 8 h a:

50 °C

10 °C

A A R

a) SELECCION CLINICA DEL PACIENTE: Se seleccionaron 50 pacientes que asistieron a la consulta en el Servicio de Dermatología del Hospital General de México SS. En la que se les diagnosticó clínicamente como micetoma, confirmados por examen directo y cultivos.

b) TOMA DE MUESTRA: Se seleccionan las fístulas más activas, de preferencia que no estén abiertas y en las que el paciente refiera prurito. Se realiza la asepsia de la piel y con ayuda de una aguja de disección estéril, se hace la incisión para drenar el material seropurulento.

Con el asa micológica se recoge el material seropurulento que contiene a los "granos" (formas parasitarias), este material se coloca entre porta y cubreobjetos con una gota de lugol. Se hace la observación al microscopio con el fin de describir el grano por su forma, tamaño, color, consistencia y presencia o ausencia de clavos.

c) ADAPTACION DEL MICROORGANISMO A MEDIO LIQUIDO (BHI)
PRIMOISLAMIENTO: De las mismas fístulas donde se obtuvieron granos, con el asa micológica se vuelve a re

colectar material seropurulento para hacer la primera siembra en el medio de Agar Dextrosa Sabouraud. Se incuba a temperatura de 28 a 35°C durante 8-14 días.

Una vez que háy crecimiento del microorganismo se toma una asada y se resuspende en el medio BHI, con el fin de rejuvenecer la cepa y obtener un crecimiento más rápido. El inóculo deberá permanecer sobre la superficie del líquido, debido a que el microorganismo es aerobio.

Los tubos se incuban a una temperatura de 28 a 35°C por 6 días aproximadamente hasta observar abundante desarrollo sobre la superficie.

- d) CULTIVOS: Del crecimiento obtenido en el medio líquido, se toman dos asadas y se resiembra en el medio Agar Dextrosa Sabouraud y se incuba a una temperatura de 28 a 35°C durante 8 días. Al cabo de dicho tiempo se hace un estudio morfológico macro y microscópico.

Finalmente se conservan las cepas en refrigeración, para detener su crecimiento y realizar pruebas posteriores.

ESTUDIO MORFOLOGICO

- a) **MACROSCOPICO:** A cada uno de los cultivos se les practicó un examen macroscópico, con el fin de determinar el tamaño, aspecto, forma, color, consistencia y olor característico de las colonias.
- b) **MICROSCOPICO:** Para observar las características microscópicas de cada cepa, se realizó una tinción de Gram. (Anexo)

ESTUDIO BIOQUIMICO Y FISIOLOGICO

1.- VALORACION DE LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA Y UTILIZACION DE METABOLITOS:

- a) **HIDROLISIS DE CASEINA:** Con el asa micrológica estéril se toma una asada de la cepa y se coloca en el centro de la caja de Petri que contiene el medio de caseína.
Se incuba en un intervalo de temperatura de 28 a 35°C durante 7-14 días.
La prueba se considera positiva cuando se forma un halo de hidrólisis alrededor de las colonias desarrolladas.

Para considerar negativa la prueba, deben transcurrir 21 días a partir de la siembra sin que ocurra la hidrólisis, pese que el microorganismo presente desarrolle.

- b) LICUEFACCION DE GELATINA: Se toma una asada de la cepa, se siembra por picadura teniendo cuidado de inocular la parte central del medio de cultivo.

Se incuba a la temperatura de 28-35°C durante 21 días. La prueba se considera positiva cuando al desarrollar las colonias licuan la gelatina.

Para considerar la prueba como negativa, deben transcurrir 21 días sin que ocurra la licuefacción del medio.

- c) ASIMILACION DE XANTINA, HIPOXANTINA Y TIROSINA: Se toma una asada de la cepa y se coloca en el centro de la caja de Petri que contiene el medio adicionado de xantina, hipoxantina o tirosina respectivamente.

Se incuba a una temperatura de 28-35°C durante 7-14 días.

La prueba se considera positiva, cuando en el transcurso del tiempo de incubación se forma un halo de asimilación alrededor de las colonias desarrolladas; esto se puede observar, debido a que estos metabo

litos son insolubles y quedan suspendidos en el medio.

Para considerar negativa la prueba, deben transcurrir 21 días a partir de la siembra sin que se forme dicho halo de utilización.

- d) UTILIZACION DE UREA: Se toma una asada de la cepa y se inocular en el medio que contiene urea, con la misma asa se agita el medio posteriormente se incuba a la temperatura de 28 a 35°C durante 8 días. Para considerar la prueba positiva, debe ocurrir el vire del indicador ya que cuando se degrada la urea, hay liberación de iones amonio los cuales se encargan de alcalinizar el medio.

2.- DETERMINACION DEL PERFIL BIOQUIMICO DE CARBOHIDRATOS:

- a) Para determinar la asimilación de los carbohidratos, se utilizó un medio base con indicador, adicionado del carbohidrato al 2% en estudio; (glucosa, galactosa, ramnosa, manitol, inositol y sorbitol). Se tomó una asada del microorganismo y se inoculó en el medio anteriormente descrito. Se incubó a una temperatura de 28 a 35°C durante 7-14 días.

La prueba se considera positiva cuando hay forma

ción de un color amarillo estable, lo que indica que hay suficiente producción de iones H^+ para acidificar el medio. Una prueba negativa es cuando al cabo de 21 días no se observa ningún cambio del indicador.

- b) ASIMILACION DEL ALMIDON: Se utilizó el medio de Sabouraud adicionado de almidón de papa. Se siembra el microorganismo por la técnica de estría, se incuba a una temperatura de 28 a 35°C durante 7-14 días.

Cuando hay suficiente desarrollo de la cepa se investiga la presencia de almidón residual, bañando la superficie del agar con lugol.

La prueba se considera positiva, cuando se forma un halo de hidrólisis adyacente a las colonias desarrolladas.

La prueba es negativa cuando no ocurre la hidrólisis del almidón, dando una coloración azul oscuro debido a la formación de un complejo almidón-iodo.

3.- VALORACION TERMICA:

A) Supervivencia a 50°C durante 8h.

a) A partir de la cepa original se siembra en caldo Sabouraud. Se incuba a una temperatura de 28-35°C durante 8-10 días.

b) Transcurrido el tiempo de incubación, se someten los cultivos anteriores a 50°C durante 8h.

c) Resembrar en agar Sabouraud inclinado e incubar a la temperatura de 28-35°C durante 8-10 días.

d) Observar el crecimiento o no del microorganismo.

B) Supervivencia a 10°C durante 8h.

a) Sembrar el microorganismo en caldo Sabouraud e in cubar a la temperatura de 28-35°C durante 8-10 días.

b) Someter los cultivos a 10°C durante 8h en un baño de hielo.

Continuar con los pasos c) y d) del procedimiento anterior.

(+) = DESARROLLO

(-) = NO DESARROLLO

- 4.- ACIDO ALCOHOL RESISTENCIA: Para la determinación de la ácido alcohol resistencia de cada cepa, se les realizó la tinción de Ziehl-Neelsen modificada. (Anexo)

R E S U L T A D O S

ESTUDIO MORFOLOGICO

MACROMORFOLOGIA: De las cepas desarrolladas 30 pre sentaron colonias secas, de consistencia dura, de color blanco o blanco-amarillento, de forma acuminada, dando el aspecto de "palomita de maíz" y con olor a humedad. Por las características anteriores se sugiere que estas colo nias corresponden a N.brasiliensis.

Tres de los cultivos presentaron colonias de tamaño limitado, secas, de consistencia suave, de color amarillo- naranja y también con olor a humedad. Por lo anteriormen te mencionado se presume que éstos corresponden a N.aste roides.

El resto de las cepas presentaron colonias secas, pla nas, de color blanco de aspecto "yesoso", de tamaño limita do, también con olor a humedad. Dichas características nos hacen suponer que estas cepas corresponden a N.caviae.

MICROMORFOLOGIA: Todas las cepas presentaron filamen tos microsifonados, tabicados que se fragmentan en formas bacilares y cocoides, que son características del género Nocardia spp.

Los resultados bioquímicos y fisiológicos se reportan en el siguiente orden:

TABLA 1 ACTIVIDAD PROTEOLITICA Y UTILIZACION DE METABOLITOS. Consta de las siguientes pruebas: hidrólisis de caseína, licuefacción de gelatina, utilización de xantina, hipoxantina, tirosina y urea.

TABLA 2 DETERMINACION DEL PERFIL BIOQUIMICO DE CARBOHIDRATOS. Incluye a los azúcares simples tales como: glucosa, galactosa y ramnosa, azúcares alcohol como el manitol, inositol y sorbitol. Se encuentra también incluida la asimilación del almidón.

TABLA 3 VALORACION TERMICA. Se reporta la supervivencia de las cepas a la temperatura de 50 y 10°C durante 8h.

TABLA 4 DETERMINACION DE LA ACIDO ALCOHOL RESISTENCIA.

TABLA 1

ACTIVIDAD PROTEOLITICA Y UTILIZACION DE METABOLITOS							
NO.CEPA	CASEINA	GELATINA	XANTINA	HIPOXANTINA	TIROSINA	UREA	MICROORGANISMO
1	-	-	+	+	-	+	<u>N.caviae</u>
2	+	+	-	+	+	+	<u>N.brasiliensis</u>
3	+	+	-	+	+	+	<u>N.brasiliensis</u>
4	+	+	-	+	+	+	<u>N.brasiliensis</u>
5	+	+-	-	+	+	+	<u>N.brasiliensis</u>
6	+	+	-	+	+	+	<u>N.brasiliensis</u>
7	+	+	-	+	+	+	<u>N.brasiliensis</u>
8	-	-	+	+	-	+	<u>N.caviae</u>
9	+	+	-	+	+	+	<u>N.brasiliensis</u>
10	+	+	-	+	-	+	<u>N.brasiliensis</u>
11	+	+	-	+	-	+	<u>N.brasiliensis</u>
12	+	+	-	+-	-	+	<u>N.brasiliensis</u>
13	+	+	-	+	-	+	<u>N.brasiliensis</u>
14	+	-	-	+	-	+	<u>N.brasiliensis</u>
15	-	-	-	-	+-	+	<u>N.asteroides</u>
16	+	+	-	+	+	+	<u>N.brasiliensis</u>
17	+	+	-	+	+	+	<u>N.brasiliensis</u>
18	+	+	-	+	+	+	<u>N.brasiliensis</u>

TABLA 1 (cont.)

ACTIVIDAD PROTEOLITICA Y UTILIZACION DE METABOLITOS							
NO.CEPA	CASEINA	GELATINA	XANTINA	HIPOXANTINA	TIROSINA	UREA	MICROORGANISMO
19	+ -	-	-	+	+	+	<u>N.transvalensis</u> (?)
20	+	+	-	+	+	+	<u>N.brasiliensis</u>
21	+	+	-	+	+	+	<u>N.brasiliensis</u>
22	+	+	-	+	+	+	<u>N.brasiliensis</u>
23	+	+	-	+	+	+	<u>N.brasiliensis</u>
24	+	-	-	+	+	+	<u>N.brasiliensis</u>
25	+	+	-	+	+	+	<u>N.brasiliensis</u>
26	+	+	-	+	+	+	<u>N.brasiliensis</u>
27	+	+	-	+	+	+	<u>N.brasiliensis</u>
28	+	+	-	+	+	+	<u>N.brasiliensis</u>
29	+	+	-	+	+	+	<u>N.brasiliensis</u>
30	+	+	-	+	+	+	<u>N.brasiliensis</u>
31	+	-	-	+	+	+	<u>N.brasiliensis</u>
32	+	+	-	+	+	+	<u>N.brasiliensis</u>
33	-	-	-	-	-	+ -	<u>N.asteroides</u>
34	-	-	-	-	-	+	<u>N.asteroides</u>
35	+	+	-	+	+	+	<u>N.brasiliensis</u>

TABLA 2

DETERMINACION DEL PERFIL BIOQUIMICO DE CARBOHIDRATOS								
NO.CEPA	GLUCOSA	GALACTOSA	RAMNOSA	MANITOL	INOSITOL	SORBITOL	ALMIDON	MICROORGANISMO
1	+	-	-	+	+	-	-	<u>N.caviae</u>
2	+	+	-	+	+	-	-	<u>N.brasiliensis</u>
3	+	+	-	+	+	-	-	<u>N.brasiliensis</u>
4	+	+	-	+	+	-	-	<u>N.brasiliensis</u>
5	+	+	-	+	+	-	-	<u>N.brasiliensis</u>
6	+	+	-	+	+	-	-	<u>N.brasiliensis</u>
7	+	+	-	+	+	-	-	<u>N.brasiliensis</u>
8	+	-	-	+	+	-	-	<u>N.caviae</u>
9	+	+	+	+	+	-	-	<u>N.brasiliensis</u>
10	+	+	-	+	+	-	-	<u>N.brasiliensis</u>
11	+	+	-	+	+	-	-	<u>N.brasiliensis</u>
12	+	+	-	+	+	-	-	<u>N.brasiliensis</u>
13	+	+	-	+	+	-	-	<u>N.brasiliensis</u>
14	+	+	-	+	+	-	-	<u>N.brasiliensis</u>
15	+	+	-	-	-	-	-	<u>N.asteroides</u>
16	+	+	-	+	+	-	-	<u>N.brasiliensis</u>
17	+	+	-	+	+	-	-	<u>N.brasiliensis</u>
18	+	+	-	+	+	-	-	<u>N.brasiliensis</u>

TABLA 2 (cont.)

DETERMINACION DEL PERFIL BIOQUIMICO DE CARBOHIDRATOS								
NO.CEPA	GLUCOSA	GALACTOSA	RAMNOSA	MANITOL	INOSITOL	SORBITOL	ALMIDON	MICROORGANISMO
19	+	+	-	+	+	+	+	<u>N.transvalensis</u> (?)
20	+	+	-	+	+-	-	-	<u>N.brasiliensis</u>
21	+	+	-	+	+	-	-	<u>N.brasiliensis</u>
22	+	+	-	+	+	-	-	<u>N.brasiliensis</u>
23	+	+	-	+	+	-	-	<u>N.brasiliensis</u>
24	+	+	-	+	+	-	-	<u>N.brasiliensis</u>
25	+	+	-	+	+	-	-	<u>N.brasiliensis</u>
26	+	+	-	+	+	-	-	<u>N.brasiliensis</u>
27	+	+	-	+	+	-	-	<u>N.brasiliensis</u>
28	+	+	-	+	+	-	-	<u>N.brasiliensis</u>
29	+	+	-	+	+	-	-	<u>N.brasiliensis</u>
30	+	+	-	+	+	-	-	<u>N.brasiliensis</u>
31	+	+	-	+	+	-	-	<u>N.brasiliensis</u>
32	+	+	-	+	+	-	-	<u>N.brasiliensis</u>
33	+	+	+-	-	-	-	-	<u>N.asteroides</u>
34	+	+	+-	-	-	-	-	<u>N.asteroides</u>
35	+	+	-	+	+	-	-	<u>N.brasiliensis</u>

TABLA 3

VALORACION TERMICA (T°C) DURANTE 8 h.

NO.CEPA	50°C	10°C	MICROORGANISMO
1	+	+	<u>N.caviae</u>
2	-	+	<u>N.brasiliensis</u>
3	-	+	<u>N.brasiliensis</u>
4	-	+	<u>N.brasiliensis</u>
5	-	+	<u>N.brasiliensis</u>
6	-	+	<u>N.brasiliensis</u>
7	-	+	<u>N.brasiliensis</u>
8	+	+	<u>N.caviae</u>
9	-	+	<u>N.brasiliensis</u>
10	-	+	<u>N.brasiliensis</u>
11	-	+	<u>N.brasiliensis</u>
12	-	+	<u>N.brasiliensis</u>
13	-	+	<u>N.brasiliensis</u>
14	-	+	<u>N.brasiliensis</u>
15	-	+	<u>N.asteroides</u>
16	-	+	<u>N.brasiliensis</u>
17	-	+	<u>N.brasiliensis</u>
18	-	+	<u>N.brasiliensis</u>

TABLA 3 (cont.)

VALORACION TERMICA (T°C) DURANTE 8 h.

NO.CEPA	50°C	10°C	MICROORGANISMO
19	-	+	<u>N.transvalensis</u> (?)
20	-	+	<u>N.brasiliensis</u>
21	-	+	<u>N.brasiliensis</u>
22	-	+	<u>N.brasiliensis</u>
23	-	+	<u>N.brasiliensis</u>
24	-	+	<u>N.brasiliensis</u>
25	-	+	<u>N.brasiliensis</u>
26	-	+	<u>N.brasiliensis</u>
27	-	+	<u>N.brasiliensis</u>
28	-	+	<u>N.brasiliensis</u>
29	-	+	<u>N.brasiliensis</u>
30	-	+	<u>N.brasiliensis</u>
31	-	+	<u>N.brasiliensis</u>
32	-	+	<u>N.brasiliensis</u>
33	-	+	<u>N.asteroides</u>
34	-	+	<u>N.asteroides</u>
35	-	+	<u>N.brasiliensis</u>

TABLA 4

PARCIAL ACIDO ALCOHOL RESISTENCIA

NO. DE CEPA	
1	+
2	+
3	+
4	+
5	+
6	+
7	+
8	+
9	+
10	+
11	+
12	+
13	+
14	+
15	+
16	+
17	+
18	+

TABLA 4 (cont.)

PARCIAL ACIDO ALCOHOL RESISTENCIA

NO. DE CEPA	
19	-
20	+-
21	+
22	+
23	+
24	+
25	+
26	+
27	+
28	-
29	+
30	+
31	+
32	+
33	+
34	+
35	+

DISCUSION DE RESULTADOS

En el presente trabajo se valoró el comportamiento bioquímico y fisiológico que presentaron 35 cepas del género Nocardia frente a diferentes condiciones y sustratos para lograr su tipificación.

En base a los resultados observados en la tabla 1, la hidrólisis de la caseína sigue siendo una prueba determinante para identificar a N.brasiliensis ya que sólo esta especie es capaz de hidrolizarla, mientras que la asimilación de la xantina, es una prueba confirmativa para N.caviae que es la única que la da positiva. Para diferenciar a N.asteroides de las otras dos especies, es mediante la hipoxantina ya que ésta no tiene la capacidad de utilizarla mientras que las otras sí la tienen.

El resto de las pruebas mostradas en la misma tabla, no son determinantes para la diferenciación de especies.

En cuanto a la asimilación de carbohidratos, se observó que sólo N.brasiliensis fue capaz de asimilar la galactosa. Los otros azúcares simples no son determinantes, ya que la glucosa todo el género la dió positiva y la asimilación de ramnosa fue negativa para la mayoría de los casos. Con respecto a los azúcares alcohol, se logró diferenciar a N.asteroides de las otras especies, debido a que ésta no utiliza al manitol ni al inositol, mientras que las otras sí los asimilan.

Referente a la utilización del almidón, se observó que no es una prueba confirmativa para la diferenciación de especies, ya que en todos los casos resultó ser negativa con excepción de la cepa #19 (se analizará posteriormente).

En la valoración térmica, se encontró que sólo una especie fue capaz de sobrevivir después de someterla durante 8h a 50°C, la cual correspondió a N. caviae.

Con respecto a la prueba de 10°C durante 8h, resultó que las tres especies se mantuvieron viables, por lo que esta prueba no se considera determinante para la identificación de las especies.

En cuanto a la ácido alcohol resistencia, se observó que la mayoría de las cepas presentaron una parcial ácido alcohol resistencia, con excepción de dos casos, las cepas #15 y 19 las cuales resultaron ser negativas, posiblemente porque no resistieron la decoloración con alcohol ácido; sin embargo la prueba de AAR es muy subjetiva porque depende de cada cepa, del medio de cultivo, del número de re siembras y de la tinción.

Es importante mencionar que se aisló una cepa (#19), que tuvo un comportamiento totalmente diferente con respecto a las otras tres especies y probablemente corresponda a N. transvalensis, microorganismo que ha sido reportado capaz de asimilar a la hipoxantina, tirosina y urea, pero no

utiliza a la xantina, además formó ácido a partir de manitol, inositol y sorbitol. Fue la única cepa que hidrolizó francamente al almidón. Este perfil bioquímico no corresponde a ninguna de las tres especies conocidas.

Para alcanzar una tipificación correcta, es importante seguir un perfil de pruebas bioquímicas, morfológicas y térmicas, y no es recomendable el uso de una sola prueba, debido a que se pueden generar falsos positivos y negativos.

CONCLUSIONES

- 1.- Nuestro estudio demostró que para realizar la tipificación de las diversas especies del género Nocardia, es necesario realizar una serie de pruebas (fisiológicas, morfológicas, etc.), ya que pruebas aisladas no nos permiten confirmar una especie.
- 2.- Mediante las observaciones micro y macromorfológicas, diversas tinciones y pruebas térmicas no son concluyentes para determinar una especie; sin embargo, son necesarias para complementar un estudio y diferenciar las de otros microorganismos como Streptomyces spp. y Actinomadurae spp.
- 3.- N.brasiliensis (84%) sigue siendo la principal especie aislada en México; sin embargo en un estudio de tipificación completo, nos permite identificar especies poco comunes como N.asteroides y N.otitidis-cavarrum (caviae) e inclusive un probable reporte de N.transvalensis (no reportada en México).

- 4.- Los datos clínicos y epidemiológicos del micetoma en México prácticamente son los mismos: mayor frecuencia en el sexo masculino, se encuentran entre la 3a.-5a. décadas en pacientes campesinos que provienen de regiones como Guerrero-Morelos y la huasteca.

A N E X O

F O R M U L A C I O N

AGAR ALMIDON:

Fórmula en gramos por litro de agua
destilada:
Agar Sabouraud 65 g
Almidón 20 g
Agua 1000 ml

AGAR DEXTROSA SABOURAUD:

Fórmula en gramos por litro de agua
destilada:
Dextrosa 40 g
Mezcla de peptonas 10 g
Agar 15 g
pH final 5.6

INFUSION DE CEREBRO CORAZON (BHI):

Fórmula en gramos por litro de agua
destilada:
Infusión de cerebro de ternera .. 200.0 g
Infusión de corazón de res 250.0 g

Peptona de gelatina	10.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Fosfato disódico	2.5 g
Dextrosa	2.0 g
pH final	7.4

CALDO UREA:

Fórmula en gramos por litro de agua destilada:

Extracto de levadura	0.1 g
Fosfato de potasio monobásico	9.1 g
Fosfato dibásico	9.5 g
Urea	20.0 g
Rojo de fenol	0.01 g
pH final	6.8

CASEINA:

Fórmula para 100 ml. de agua destilada:

A	Dextrosa	1.0 g
	Agua destilada	50 ml.
	Lecche descremada	1.5 g
B	Agua destilada	50 ml.

GELATINA:

Fórmula en gramos por litro de agua
destilada:

Gelatina 14.0 g
Agua destilada 1000 ml.

MEDIO PARA INVESTIGACION DE CARBOHIDRATOS:

(glucosa, galactosa, ramnosa, manitol, inositol y
sorbitol)

Fórmula para 1000 ml. de agua destilada:

Extracto de carne de res 1.000 g
Mezcla de peptonas 10.000 g
Cloruro de sodio 75.000 g
Carbohidrato 20.000 g
Agar 15.000 g
Rojo de fenol 0.025 g
pH final 7.4

**MEDIO PARA INVESTIGACION DE XANTINA, HIPOXANTINA Y
TIROSINA:**

Peptona 5 g
Extracto de carne 3 g

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Agar	15 g
Xantina o hipoxantina	4 g
Tirosina	5 g

TINCIÓN DE GRAM:

- Fijar el frote directamente a la flama
- Teñir con cristal violeta durante 1 minuto
- Lavar ligeramente con agua destilada
- Cubrir la preparación con lugol durante 1 minuto
- Lavar ligeramente con agua destilada
- Decolorar con alcohol acetona al 50%
- Lavar ligeramente con agua destilada
- Teñir de contraste con safranina durante 1 minuto
- Lavar directamente con agua y dejar secar.

TINCIÓN DE ZIEHL-NEESEN MODIFICADA (actinomicetos)

- Fijar el frote directamente a la flama
- Teñir con fucsina básica en vapores de agua durante 10 minutos
- Decolorar con alcohol ácido modificado (1%)
- Lavar ligeramente con agua destilada
- Teñir de contraste con azul de metileno durante 5 minutos
- Lavar ligeramente con agua y dejar secar.

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

- 1.- Bonifaz, A. (1990): Micología Médica Básica. Ed. Méndez Cervantes. México, D.F. pp. 135-165.
- 2.- Saúl, A. (1983): Micetoma In: Lecciones de Dermatología. 10a. edición. Ed. Méndez Cervantes. México, D.F. pp: 128-138.
- 3.- Mahgoub, E.S. y Murray, I. (1973): Mycetoma. London W. Heinemann Publish.
- 4.- Rippon, J.W. (1982): Medical Mycology, The pathogenic Fungi and pathogenic Actinomycetes. W.B. Saunders company. pp: 79-98.
- 5.- Saúl, A. Bonifaz, A. et al (1987): Mycetoma due to N. ca viae. Int. J. Dermat. 26 (3) 174-177.
- 6.- Bonifaz, A. Fong, Y. (1989): Función leucocitaria de polimorfonucleares en pacientes con micetoma actinomicético. Dermatología Rev. Mex. 32 : 3
- 7.- Pérez, R. Bonifaz, A. (1990): Micetoma con diseminación linfática. Dermatología Rev. Mex. 34 : 1 46-47.

- 8.- Galindo,J. Perea,F. Bonifaz,A. (1987): Micetoma peri anal. Dermatología Rev. Mex. 31 : 1 1-4.
- 9.- Borelli,D. (1976): Micetoma Generalidades. Dermatología Rev. Mex. 20 : 3 255-264.
- 10.- Arenas,R. (1990): Micetomas en niños. Estudio de 5 casos. Dermatología Rev. Mex. 34 : 3 205-208.
- 11.- Ruiz-Pineda. (1973): Un caso de micetoma. Dermatología Rev. Mex. 17 : 2-3 268-270.
- 12.- Ramírez-Serrallonga. Hernández-Rocha. (1981): Micetoma en región dorsal. Dermatología Rev. Mex. 25 : 2 184-186.
- 13.- Macotela Ruiz, Suárez de la Torre, Castillo Rodríguez (1981): Los micetomas. Rev. Méd. del IMSS. 19 : 6. 731-738.
- 14.- Lavalle,P. Arenas,R. (1982): Minimicetomas múltiples por N.brasiliensis, estudio de dos casos. Mem. del IX Congreso Mexicano de Dermatología. 197-207.
- 15.- Caire,P. Arenas,R. Suchil,P. (1987): Tratamiento de

- micetomas por Nocardia. Experiencia en 50 pacientes. II Simposio Internacional de Micetomas. Taxco Gro. México.
- 16.- Padierna, Suchil, Sánchez. (1987): Micetoma por N.brasiliensis análisis inmunológico. II Simposio Internacional de Micetomas. Taxco Gro. México.
- 17.- López Martínez R. Méndez-Tovar y cols. (1987): Epidemiología del micetoma en México. II Simposio Internacional de Micetomas. Taxco Gro. México.
- 18.- Lavalle, P. (1987): Micetoma: Concepto, nomenclatura, clasificación y diferenciación. II Simposio Internacional de Micetomas. Taxco, Gro. México.
- 19.- Colón, L. Zlotnik, H. (1987): Purificación y Caracterización Enzimática de una fosfatasa Acida de N.brasiliensis. II Simposio Internacional de Micetomas. Taxco Gro. México.
- 20.- Magaña Lozano M. (1984): Mycetoma. Int. J. Dermatología. 23 : 1 221-236.
- 21.- Arguero, Garza, Ishida, Trujillo, Alba, Bonifaz. (1987): Patogenicidad en ratón de cepas de actinomicetos aislados de micetomas humanos. II Simposio Inter

nacional de Micetomas. Taxco, Gro. México.

- 22.- Mariat, E. (1963): Sur la distribution géographique des agents de mycétomes. Bull Soc. Path. Exot. 56. 35-45.
- 23.- Magaña Lozano M. (1989): Los micetomas, sus repercusiones óseas. Dermatología Rev. Mex. 32 : 22-26.
- 24.- Aceves, R. (1978): Micetoma; análisis de 140 casos estudiados en la ciudad de Guadalajara, Jal. México. Dermatología Rev. Mex. 22 : 3 199-225.
- 25.- Saúl, A. Fernández, D. (1975): Investigación de la inmunidad celular en 10 casos de micetoma por N. brasiliensis. Dermatología Rev. Mex. 22 : 3 199-225.
- 26.- Méndez-Tovar, López-Martínez, R. (1987): Comparación de patogenicidad entre cepas de N. brasiliensis aisladas del suelo y cepas aisladas de pacientes. II Simposio Internacional de Micetomas. Taxco, Gro. México.
- 27.- Macotela, E. (1979): Los micetomas: en desarrollo y estado actual de la Micología Médica en México. Simposio Syntex. pp 41-53.

- 28.- Bueno,D. Arenas R y Navarrete (1987): Minimicetomas por N.brasiliensis; estudio histológico de 13 casos. Med. Cutan. Ibero-Lat AM 15 : 277-280.
- 29.- Palestine,R. y Rogers,R. (1982): Diagnosis and treatment of mycetoma. J. Am. Acad. Dermatol. 1:107-111.
- 30.- Welsh,O. López,R.L. (1985): Micetomas con diseminación pulmonar. Med. Cutan. Ibero-Lat Am. 3:517-524.
- 31.- Welsh,O. Et al. (1987): Amikacin alone an in combination with trimethoprim-sulfametoxazole in the treatment of actinomycotic mycetoma. J. Am. Acad. Dermatol. 17 : 443-448.
- 32.- Lavalle,P.(1987): Micetomas: La experiencia mexicana, problemas actuales. Mem. II Simposio Internacional de Micetomas. Taxco, Gro. México. p 21.
- 33.- Lavalle,P. Saúl,A. y Peniche,J. (1963): La sulfadime toxipiridazina en el tratamiento de los micetomas. Mem. I cong. Mex. de Dermatol. México,D.F. 526-534.
- 34.- León,G. (1983): Micetomas en el HGM. Tesis de Post grado HGM. México,D.F.

35.- Mahgoub,E.S. (1987): On the treatment of mycetomas.
Mem. II Simposio Internacional de Micetomas. Taxco,
Gro. México. p. 43.

36.- Magaña,M. (1984): Micetoma. Revisión. Inter. J. Der
matol. 23 : 221-236.