

ACTINOMICETOMA

Editado por

José Antonio Serrano
Instituto de Investigaciones. Sección de Biotecnología.
Facultad de Farmacia y Bioanálisis,
Universidad de Los Andes, Mérida, Edo. Mérida, Venezuela.

Ángel Horacio Sandoval
Departamento de Sistemas Biológicos
Universidad Autónoma Metropolitana – Xochimilco.
México

Blaine L. Beaman
Departamento de Microbiología e Inmunología.
Universidad de California. Davis. CA. EE.UU.

Mérida - Venezuela, 2005

Colaboradores



Medical Microbiology and Immunology. University of California, School of Medicine, Davis. CA.95616 USA.

Blaine L. Beaman



Groupe de Recherche "Pathogènes opportunistes et environnement"
UMR CNRS 5557 Ecologie Microbienne (Centre for Microbial Ecology) Laboratoire de Mycologie. Faculté de Pharmacie. Université Claude Bernard Lyon 1, 8, avenue Rockefeller 69373 Lyon Cedex 08, France.

Patrick Boiron



Service de Parasitologie Hôpital Tenon, 4 rue de la Chine, 75020, Paris, Francia.

Michel Develoux



Mycetoma Research Centre University of Khartoum. Professor of Surgery Department of Surgery. PO Box 102 Khartoum, Sudan, Africa.



School of Biology & Psychology. University of Newcastle upon Tyne
King George VI Building
Newcastle upon Tyne NE1 7RU United Kingdom

Michael Goodfellow



Department of Medical Mycology. Vallabhbhai Patel Chest Institute.
University of Delhi, Delhi – 110007, India.

Harish C. Gugnani



Servicio de Dermatología. Hospital Universitario “Antonio María
Pineda” y Facultad de Medicina Universidad Centroccidental “Lisandro
Alvarado”. Barquisimeto, Edo. Lara. Venezuela.

María A. Mejía



Laboratorio Multidisciplinario de Investigación Clínico-Epidemiológica
(Lab-MICE). Unidad de Medicina Interna. Facultad de Medicina.
Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.

Darío Novoa-Montero



Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina, U.A.N.L.
Gonzalitos # 235 NTE., Col. Mitras Centro. C.P. 64460. Monterrey, N.
L., México.

Mario C. Salinas



Departamento de Sistemas Biológicos Universidad Autónoma
Metropolitana – Xochimilco, México.

Ángel Horacio Sandoval



Departamento de Sistemas Biológicos Universidad Autónoma
Metropolitana – Xochimilco, México

Nora L. Sánchez S.



Instituto de Investigaciones. Sección de Biotecnología.
Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes
Mérida, Venezuela.

José A. Serrano



Department of Microbiology, Institute of Cardiovascular Diseases,
Madras Medical Mission, Chennai, India.

Pankajalakshmi V. Venugopal



Malar Mangai 3 1st. Avenue. Ashok Nagar. Chennai 600083. India.

C. P. Abirami



Malar Mangai 3 1st. Avenue. Ashok Nagar. Chennai 600083. India.

Taralakshmi V. Venugopal



Servicio de Dermatología. Hospital Universitario “Dr. José E.
González” de la Universidad Autónoma de Nuevo León. C.P.
64460. Monterrey, N. L., México.

Lucio Vera-Cabrera



Servicio de Dermatología. Hospital Universitario “Dr. José E. González” de la Universidad Autónoma de Nuevo León. C.P. 64460. Monterrey, N. L., México.

Oliverio Welsh



National Institute of Health Bethesda, MD, USA.

Hinda Zlotnik

Dedicatoria

La presente edición de este libro sobre el Actinomicetoma está dedicada de una manera especial a cuatro grandes pioneros latinoamericanos en la investigación y estudio de los Actinomicetos Patógenos, en particular de aquellos productores del Actinomicetoma; estos son los doctores Humberto Campíns y Dante Borelli de Venezuela, Antonio González Ochoa y Luis Felipe Bojalil de México y Carlos Da Silva Lacaz del Brasil.

A continuación se presenta una corta reseña biográfica de dichos profesores.



Dr. Humberto Campíns. (1911-1998): Nació en Ospino, Estado Portuguesa, Venezuela, el 5 de diciembre de 1911 y falleció en Caracas el 31 de diciembre de 1998. Doctor en Ciencias Médicas, Universidad Central de Venezuela. Especialista en Dermatología en el Hospital Saint Louis, París, Francia. Así mismo cursó estudios en esta especialidad y trabajó como asistente médico en los Hospitales “La Charité” en Berlín, en New York, en Italia y en Argentina. Fue fundador de los estudios de Dermatología en el Estado Lara y así mismo Fundador del Servicio de Dermatología del Hospital “Antonio M. Pineda” donde realizó la mayor parte de sus trabajos asistencial y de investigación. Se desempeñó en diversos cargos de la administración pública en el área de la salud. Publicó diversos trabajos sobre el estudio de los micetomas en sus aspectos de laboratorio, clínico y de su tratamiento.



Dr. Dante Borelli (1920-1977): Nació en Parma, Italia el 19 de febrero de 1920, y falleció en Caracas, el 11 de octubre de 1977 se graduó “Suma cum laude” de Dr. en Medicina en el año 1944 y como especialista en Dermatosifilografía en 1949; llega a Venezuela en 1948. Realiza estudios de Micología Médica en Montevideo, Uruguay. Fue Fundador de la Sección de Micología Médica del Instituto de Medicina Tropical de la Universidad Central de Venezuela. Realizó y publicó numerosos estudios sobre hongos patógenos y así mismo sobre Actinomicetos patógenos productores del Actinomicetoma. Autor y co-autor de numerosos trabajos de investigación al igual que de textos de micología médica tanto en español como en otros idiomas. Fue Profesor “Emeritus” de la Sociedad Internacional de Micología Humana y Animal (ISHAM).



Dr. González Ochoa (1910 – 1984): Nació en Ciudad Guzmán, Jalisco, México, el 9 de julio de 1910, se graduó de Médico Cirujano en Guadalajara. Realizó sus estudios de Postgrado en Medicina Tropical y de Micología Médica en París, Francia donde trabajó con los Doctores Langeron y Sabouraud. También cursó estudios en el Instituto de Enfermedades Tropicales de Hamburgo, Alemania y en los departamentos de Micología Médica del Instituto Nacional de Salud Pública de los Estados Unidos y de la Facultad de Medicina de la Universidad de Duke de los Estados Unidos. Es autor y co-autor de numerosos trabajos de investigación sobre Actinomicetos Patógenos productores de Actinomicetoma; así como de libros sobre Medicina Tropical, Dermatología y Terapéutica de Enfermedades producidas por Hongos.



Dr. Carlos da Silva Lacaz: (1915-2002): Nació en Guaratinguetá, Estado de São Paulo, Brasil, el 19 de septiembre de 1915. Realizó sus estudios médicos en la Universidad de São Paulo de Brasil; se doctoró en el año 1945 y en el año de 1953 fue nombrado Catedrático por Concurso en Microbiología e Inmunología; fue Profesor Titular del Departamento de Medicina Tropical y Dermatología de la Facultad de Medicina de la Universidad de São Paulo. Fue Fundador y Director del Instituto de Medicina Tropical de la Universidad de São Paulo; director de la Facultad y de la Escuela de Enfermería de la Universidad de Sao Paulo. Fue Secretario de

Higiene del Municipio de São Paulo; Miembro de la American Academy of Microbiology en Estados Unidos. Recibió numerosos homenajes y distinciones académicas y oficiales. Autor y co-autor de numerosos trabajos de investigación, así como de libros de Micología Médica, Historiografía Médica y libros de medicina.



Dr. Luis Felipe Bojalil Jaber: Nació el 12 de marzo de 1925 en Mérida, Yucatán, México, pero desde pequeño se crió en la ciudad de Campeche, Edo. de Campeche. Profesor Distinguido de la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Xochimilco. Actualmente se desempeña como Coordinador del Programa de Superación Académica de la Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco y es Director de la Revista “Reencuentro. Análisis de Problemas Universitarios”. En su destacada carrera profesional ha publicado más de 80 artículos científicos en revistas nacionales e internacionales, igualmente ha participado en más de 200 conferencias en diversos países y es miembro de más de 20 organizaciones científicas. Se ha desempeñado en distinguidos cargos académicos y docentes de los cuales destacan: Rector de la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Xochimilco, Director de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud/UAM-Xochimilco. Profesor de la Facultad de Medicina-UNAM, Jefe del Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina-UNAM, Jefe del Departamento de Microbiología en el Departamento de Patología Hospital General-UNAM. Fue pionero en los estudios de taxonomía, serología e inmunología de las nocardias.

ÍNDICE

Lista de Colaboradores	iii
Dedicatoria	ix
Prefacio <i>José Antonio Serrano, Ángel Horacio Sandoval</i> <i>Blaine L. Beaman</i>	xv
Preface <i>José Antonio Serrano, Ángel Horacio Sandoval</i> <i>Blaine L. Beaman</i>	xvi
Presentación <i>Dr. Luis Felipe Bojalil Jaber</i>	1
Presentation <i>Dr. Luis Felipe Bojalil Jaber</i>	7
CAPÍTULO I. Aspectos taxonómicos, bacteriológicos, citoquímicos y de diagnóstico microbiológico de actinomicetos aerobios productores de actinomicetoma. <i>Horacio Sandoval Trujillo, Nora Lidia Sánchez-Saucedo, José Antonio Serrano, Michael Goodfellow</i>	13
CAPÍTULO II. Estudio biomolecular del actinomicetoma <i>Patrick Boiron</i>	.51
CAPÍTULO III. Actinomicetoma: Mecanismos de patogenicidad <i>Blaine L. Beaman y José A. Serrano</i>	61
CAPÍTULO IV. Reproducción experimental del actinomicetoma en animales de laboratorio <i>Hinda Zlotnik</i>	79
CAPÍTULO V. La respuesta del huésped a la infección por <i>Nocardia brasiliensis</i> <i>Mario C. Salinas Carmona</i>	87
CAPÍTULO VI. Patología del actinomicetoma <i>María A. Mejía de Alejo y José A. Serrano</i>	99
CAPÍTULO VII. Aspectos clínicos, radiológicos y terapéuticos del actinomicetoma <i>Oliverio Welsh; Lucio Vera-Cabrera y María A. Mejía de Alejo</i>	117
CAPÍTULO VIII. Actinomicetoma en África Occidental	

<i>Michel Develoux</i>	131
CAPÍTULO IX. Actinomicetoma en Nigeria: estudios epidemiológicos y experimentales <i>Harish C. Gugnani</i>	149
CAPÍTULO X. Epidemiología de los micetomas actinomicóticos en la India <i>Pankajalakshmi V. Venugopal y Taralakshmi V. Venugopal</i>	159
CAPÍTULO XI. Actinomicetoma en África <i>A. H. Fahal</i>	169
CAPÍTULO XII. Epidemiología del actinomicetoma en Las Américas <i>José A. Serrano y Dario Novoa-Montero</i>	189
CAPÍTULO XIII. Los modelos clínico-epidemiológicos aplicados a la investigación del actino-micetoma. Propuesta para usar pragmáticamente la epidemiología empírica en Latinoamérica. <i>Dario Novoa-Montero y José A. Serrano</i>	215

Prefacio

El presente libro sobre el Actinomicetoma representa el primer libro que se publica totalmente dedicado al actinomicetoma. El presente libro abarca tanto aspectos de la microbiología (pura o aplicada), como aspectos de la inmunología, de la clínica, de la patología, del tratamiento y de la epidemiología del actinomicetoma y de sus agentes causales.

Este libro resulta del esfuerzo conjunto de un grupo de investigadores, que a nivel mundial, están activos en el campo de la investigación sobre el actinomicetoma, por lo tanto en sus páginas se recogen una serie de trabajos únicos, por la información que presentan, sobre los agentes etiológicos del actinomicetoma, así como sobre otros aspectos relacionados a la enfermedad infecciosa que los mismos producen. Tanto los microorganismos, agentes etiológicos, como la enfermedad (el actinomicetoma), a pesar de su importancia social y como problema de salud pública, sobre todo en países del Tercer Mundo, no han sido plenamente estudiados, quedando un poco relegados del interés general de otros investigadores.

El Grupo Internacional de Investigación sobre los Actinomicetos Patógenos (GIIAP), se organizó en Mérida Venezuela en el año de 1990, pero oficialmente se constituyó en Oaxtepec, Morelos, México el 4 de marzo de 1992. Está constituido por investigadores, docentes y estudiantes de las Universidades: de Los Andes, (Venezuela), Autónoma Metropolitana-Xochimilco (México), Centro-occidental "Lisandro Alvarado" (Venezuela), así como de la Universidad de São Paulo (Brasil), la Universidad de Lyon I (Francia), la Universidad de Newcastle Upon Tyne (Reino Unido), y la Universidad Autónoma de Nuevo León (México), grupos que así mismo mantienen relaciones activas de cooperación con otras universidades e institutos de investigación, de África, de la India y de Japón.

El GIIAP a través de sus miembros ha tratado de mantener el interés de la comunidad científica por el estudio en particular de los actinomicetos patógenos, realizando no tan sólo esfuerzos en el área de su investigación sino también de la docencia, en particular en el nivel de postgrado. Es así como se han dictado, entre los años 1980 al 1993 ocho cursos internacionales sobre los actinomicetales y asimismo se han hecho varias ediciones del Manual de Laboratorio para el Estudio y Diagnóstico de los Actinomicetos Patógenos y a través de los programas de intercambio de estudiantes se ha contribuido a la formación tanto de profesionales a nivel de maestría, como de doctorado, al igual que se ha fomentado el intercambio de estudiantes de pregrado.

Esta edición del libro *El Actinomicetoma* representa un esfuerzo conjunto de todos estos especialistas que con cariño, fervor y mucho trabajo muestran su experiencia sobre estos microorganismos patógenos tanto para el hombre como para los animales.

Mérida, Venezuela, 2005

Dr. José Antonio Serrano
Dr. Ángel Horacio Sandoval
Dr. Blaine L. Beaman

Preface

This book is a joint worldwide effort sponsored by GIIAP on mycetoma research. It presents a collection of ideas and opinions put together for the first time in a text format dealing exclusively with Actinomycetomas. The text reviews the microbiological, immunological, clinical, pathological, therapeutic and epidemiological aspects of Actinomycetomas. Thus, it represents a comprehensive collection of studies on the etiology and biology of diseases caused by Aerobic Actinomycetes.

It is important to note that despite the worldwide social and public health problems generated by Actinomycetomas, not enough research has been carried out on this topic to significantly improve either our basic knowledge or enhance fundamental health conditions. This is particularly true in most third world countries, where Actinomycetomas and related illnesses have reached epidemic proportions. As a result, an international group of researchers got together to address this dilemma. They came to the decision that developing a research organization to deal with this public health problem on a worldwide basis was the most practical approach.

As a consequence of the discussions stated above, an International Research Group on Pathogenic Actinomycetes (Grupo Internacional de Investigación sobre Actinomicetos Patógenos; GIIAP), initiated activities in the city of Mérida, Venezuela in 1990. Later this group became officially established in the city of Oaxtepec, Morelos, Mexico on March 4th 1992. Shortly afterwards, GIIAP consisted of researchers, professors and students from the Universidad de Los Andes (Venezuela), Universidad Autónoma Metropolitana, Xochimilco (Mexico), Universidad Autónoma de Nuevo León (México), Universidade São Paulo (Brazil), University of Lyon (France), The University of Newcastle Upon Tyne (UK), and the University of California at Davis (USA). Also, GIIAP maintains close contacts and affiliations with other Universities and Research Institutions in Africa, India and Japan.

One of the major tasks performed by members of GIIAP is to encourage the scientific community to continue research on Pathogenic Actinomycetes especially at the graduate school level. Thus, between 1980 and 1993, a total of eight International courses were offered on Pathogenic Actinomycetes resulting in several editions of the Lab Manual for the Study and Diagnosis of Pathogenic Actinomycetes. Moreover, through International Student Exchange Programs, GIIAP has contributed to the development of human resources by upgrading academic standards of Undergraduate and Graduate students as well as professionals at all participating Universities. Finally, all of this effort has culminated in the preparation of the book "The Actinomycetoma" which represents a joint effort from scientists, who through their endeavor, dedication and hard work have managed to publish their findings and experiences on these pathogenic microorganisms that adversely affect both human and animal life in all regions of this planet.

José Antonio Serrano, M.D. DMs.
Ángel Horacio Sandoval Ph.D.
Blaine L. Beaman Ph.D.

PRESENTACIÓN

Dr. Luis Felipe Bojalil Jaber
Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco

Años de trabajo de un importante grupo de profesores e investigadores, sobre los actinomicetomas, se recogen en este libro, en el que se describe una gran variedad de los aspectos que caracterizan a esta enfermedad y de los microorganismos que la producen.

Los temas en su conjunto, nos dan una amplia visión de lo que se denomina actinomicetoma. Los aspectos clínicos y epidemiológicos son tratados con mucha propiedad. Nos muestran las formas radiológicas de los micetomas, mencionan los fármacos utilizados en el tratamiento.

Otros temas sobre los actinomicetomas, son tratados igualmente, los estudios sobre los aspectos biomoleculares de los actinomicetos, los mecanismos involucrados en la producción de la enfermedad, la reproducción experimental en animales y el que se refiere a la respuesta del huésped a la infección, son de particular importancia.

El capítulo dedicado a la taxonomía nos indica cuáles son los géneros y especies causales de la enfermedad.

En este libro se ha tenido la oportunidad de conjuntar una serie de trabajos de científicos muy destacados de varias partes del mundo y de lugares en los que realmente los actinomicetomas representan un importante problema de salud. Participan autores africanos, hindúes y latinoamericanos y se añaden algunas contribuciones de quienes en los Estados Unidos, Inglaterra y Francia han hecho avances importantes sobre el conocimiento de los actinomicetomas y sus agentes causales.

Hay que reconocer el esfuerzo del comité editorial, que, además de presentarnos este libro, son activos difusores de las investigaciones sobre actinomicetomas patógenos. Han sido capaces de crear, junto con otros colegas, el Grupo Internacional de Investigación sobre los Actinomicetos Patógenos (GIAP), verdadera red internacional de destacados investigadores, con vocación de educadores como lo muestran a través de la organización de cursos, simposios y asesorías para la formación de estudiantes de posgrado.

Este libro es una contribución más de esta singular organización. Se trata de un libro, con un enfoque que abarca multitud de aspectos referentes a los actinomicetomas, amplio en el tema y en la visión global, que seguramente será de gran utilidad no sólo para los especialistas, sino también para aquellos que tienen como profesión la biología, la medicina y la farmacología y desde luego para estudiantes de esas carreras o afines.

Un reconocimiento a todos los especialistas que han aunando sus esfuerzos con el propósito de difusión del conocimiento sobre los actinomicetos patógenos. El reconocimiento se extiende al Comité Editorial y a las instituciones de las que proceden los investigadores, que también han participado en esta empresa.

El libro está dedicado, de acuerdo con los autores, a cuatro pioneros latinoamericanos en la investigación y estudio de los actinomicetos patógenos. Esto tiene un significado especial porque se trata de un reconocimiento a Latinoamérica, que no siempre ha estado presente en el campo de las ciencias. Es un llamado quizá, a poner más esfuerzo en el desarrollo científico de nuestros pueblos.

La ciencia ha sido motor de cambios sociales, económicos y culturales muy importantes en el mundo. El desarrollo de la ciencia ha llegado a ser una cuestión de estado y supervivencia. En los países

latinoamericanos la ciencia y la tecnología tienen que transformar la pobreza en que se debaten los pueblos.

También cabe señalar que los actinomicetomas, tema de este libro son enfermedades más frecuentes en campesinos, en gente expuesta a inhalación de “polvos” de suelos o infecciones en suelos contaminados. En cuanto a los agentes etiológicos son muchos y muy variados, pero *N.brasiliensis* es el agente causal más importante en el mundo. El número de casos reportados en Brasil, México, Sudán y Venezuela causados por *N.brasiliensis*, representan más de la mitad de todos los actinomicetomas reportados en el mundo.

En esos cuatro países, por cierto se han producido el mayor número de trabajos sobre actinomicetos patógenos, de aquí que no sea casual que los editores de este libro, el Dr. Horacio Sandoval de México y el Dr. José A. Serrano de Venezuela hayan propuesto dedicar este libro a los profesores Humberto Camping (Venezuela, 1911-1998); Dante Borelli (1920-1977), aunque nacido en Italia, sus estudios sobre hongos patógenos los realizó en Venezuela.

A Carlos da Silva Lacaz (Brasil, 1915-2002) y a los mexicanos: Antonio González Ochoa (1910-1984) y Luis F. Bojalil (1925) seguramente tratando de señalar que a los autores les corresponde ahora la responsabilidad de seguir construyendo la tradición que sobre el estudio de los actinomicetos patógenos ya se configura en Latinoamérica.

Quiero manifestar mi testimonio de aprecio y reconocimiento a quienes me precedieron, los mismos que se mencionan en este libro, contemporáneos unos, maestros, otros.

Mi reconocimiento también al grupo internacional de investigación sobre actinomicetos patógenos (GIAP), que han mantenido el interés por más de veinticinco años en la investigación, al mismo tiempo que en formación de jóvenes investigadores y en la difusión del conocimiento de estos microorganismos.

Se me ha solicitado hacer una breve semblanza sobre mi trabajo científico, sobre todo de nuestros estudios sobre el género *Nocardia*, que coincide con el tema del libro.

La Ciencia en México

Ya hace poco más de 50 años que empecé mi carrera científica, en un país en el que los jóvenes tenían grandes deseos de participar en la investigación científica, un país en pleno crecimiento que quería reconstruir a grandes pasos lo que la revolución mexicana había destruido. Una época en que se reconoce la importancia de la ciencia, para el desarrollo del país. Hubo circunstancias especiales que fortalecieron nuestra capacidad científica. En los años 30's se crea el Instituto de Enfermedades Tropicales que viene a impulsar el campo de la microbiología y el estudio de las enfermedades infecciosas, tiene la virtud de concentrar una pléyade de investigadores ya formados, que habían hecho carrera, o se habían formado en otros países, como los Estados Unidos y Francia. Cabe mencionar a los doctores Zozaya, Mazotti, Martínez Baez, Beltrán, Varela, González Ochoa y otros a quienes todavía se les recuerda como parte de los grandes investigadores mexicanos.

Esta generación, se vio enriquecida también por la inmigración de científicos españoles, tantos y tan notables, que tenemos que considerarlos como parte de los creadores de la ciencia mexicana moderna; entomólogos, histopatólogos, parasitólogos, farmacólogos y de otras especialidades, ellos poblaron nuestras escuelas.

No se pretende hacer un relato histórico, sino sólo de dar una idea de las condiciones científicas que prevalecían en el país en los años 40s. Los mexicanos con los españoles dan un impulso grande total al campo científico, con gran repercusión en la educación y en la creación de nuevas escuelas y facultades y el impulso de la investigación en biología, física, letras y humanidades.

La infraestructura científica en el México actual, que se ha ido creando a lo largo de los últimos 50 años es cualitativa y cuantitativamente muy diferente. El número de investigadores y trabajos publicados ha ido creciendo, de tal manera, que actualmente existe una base sólida por desarrollar la investigación, pequeña aún, comparada con el tamaño del país, pero en las instituciones y las universidades y en los científicos mismos, ya existe la percepción de la necesidad de avanzar en el desarrollo de la ciencia.

En los años 50, al comienzo de mi carrera científica, era difícil encontrar instalaciones adecuadas para la investigación, como el Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales, que ya hemos mencionado, con magníficas instalaciones y sus excelentes médicos e investigadores, resultó ser un centro de estudio para muchos estudiantes, fue ahí donde hice mis primeros trabajos, en el laboratorio del Dr. Antonio González Ochoa, que fue mi maestro. El Dr. González Ochoa, llegó a México para hacerse cargo del Laboratorio de Micología del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales, venía de París, después de una estancia con el Dr. Langeron, discípulo de Pasteur.

El Laboratorio de Micología del Dr. González Ochoa con el tiempo se convirtió en un Centro de Investigación de educación y de entrenamiento, el más importante de México. Lugar en el que se formaron en el campo de la micología, un número considerable de investigadores y de profesionales en dermatología. Por ello, la dedicatoria que se hace en este libro a este ilustre maestro, es más que merecida.

Los Trabajos de Investigación

Mencionaremos de manera principal y breve los trabajos sobre *Nocardia*, aunque tenemos que señalar que la gran mayoría de trabajos publicados fueron sobre *Mycobacteria*, tema que desarrollé ampliamente porque después de dejar el laboratorio de González Ochoa empecé a trabajar en la Unidad de Neumología del Seguro Social, en donde se hacía fundamentalmente diagnóstico y tratamiento de tuberculosis. En esta época no se cultivaba el bacilo tuberculoso, no se hacían pruebas de resistencia a antibióticos como la estreptomina, que hacía pocos años se empezaba a usar, por esa razón y por

tratarse de una clínica de servicio, no se planteaba hacer investigación alguna. Como es natural, hubo que adaptar el laboratorio, para empezar a probar diversos medios de cultivo, introducir cultivos de rutina, empezar a hacer pruebas de resistencia a fármacos, se probaron nuevos productos como la isoniacida antifímico potente de nueva aparición. Se trabajó sobre velocidad de crecimiento de micobacterias en diversos medios de cultivo. Se propuso, para evitar la rápida aparición de resistencia, el uso de dos agentes terapéuticos para el tratamiento de tuberculosis, etc. como consecuencia se presentaron trabajos en congresos y conferencias, en universidades y unidades de servicio. Lo que describimos aquí puede no ser muy relevante como investigación científica, pero en México fue una novedad el enfoque que se dio para mejorar el diagnóstico y tratamiento de esta enfermedad.

Este trabajo duró unos 5 años, cuando ya nos pasamos al Hospital General, a una Unidad de Patología, dependiente de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Tardamos dos años en empezar a trabajar nuevamente, porque no había un lugar adecuado para la investigación, fue necesario diseñar el espacio, que se construyó, en esos dos años, lo que se llamó Unidad de Patología que iba a desempeñar un papel muy importante en la educación médica, en la formación de recursos sobre todo en los campos de histopatología, microbiología, parasitología, bioquímica e inmunología.

Antes de empezar a trabajar en esta nueva Unidad, fui encargado de reestructurar e introducir los métodos que en ese tiempo eran modernos, en los laboratorios de tuberculosis del Pabellón 27 de ese hospital. Dos o tres años después en 1957, fui becado por la OMS-OPS y viajé a los Estados Unidos, poco tiempo antes Runyón, había publicado una clasificación sobre lo que se llamó micobacterias atípicas, esto fue, en parte, el motivo de la visita, aunque estas se ampliaron a centros importantes, en donde se hacían investigaciones sobre tuberculosis: Washington, Minnesota, Salt Lake City, Colorado, sitios en donde se trabajaban destacados estudiosos de la tuberculosis.

Volviendo a la Unidad de Patología se continuó la investigación sobre micobacterias, la bibliografía sobre lo publicado en este tiempo es amplia y los trabajos aparecieron en una gran variedad de revistas internacionales.

En este tiempo empezamos los estudios sobre *Nocardia*. Hablaremos un poco sobre este género por ser parte del tema objeto del libro que ahora se publica.

Se publicaron más de 40 trabajos, muchos de ellos contribuyeron de manera importante al conocimiento de las especies de *Nocardia*, desde el punto de vista de la taxonomía, inmunología y diagnóstico. Mencionaremos solamente algunos datos, puesto que en la literatura científica, se ha dado cuenta de estas contribuciones. En 1959, se publicó un artículo en el que se mostraba la posibilidad de diferenciar *N.brasiliensis* de *N.asteroides* por un método muy sencillo. La *N.brasiliensis* crece bien en medios de gelatina diluida y alcaliniza el medio, mientras que *N.asteroides* no crece en estos medios, que permanecen con un pH ácido o neutro.

El estudio de polisacáridos de *Nocardia*, dio resultados importantes, se describieron dos polisacáridos, el Poli I, resultó ser idéntico tanto en *N.asteroides*, como en *N.brasiliensis*, se le consideró como un polisacárido del grupo de ácido resistentes, puesto que también produce reacción cruzada con sueros de tuberculosis y de lepra. El polisacárido II, que contiene arabinosa, galactosa y manosa, a diferencia del polisacárido I, que contiene sólo arabinosa y galactosa, resultó ser especie específico, puesto que este no cruza, ni con sueros de tuberculosis ni de lepra. Una prueba más de que el Poli I, de *Nocardia* podía considerarse como de grupo, fue el aislamiento de un polisacárido similar en *M.fortuitum*. Otros aislamientos de polisacáridos en bacilos ácido resistentes, llevaron a la misma conclusión y dieron una amplia visión de las similitudes y diferencias que existen en las diferentes especies.

Se emprendieron estudios sobre lo que se llamó sensitinas, substancias proteicas obtenidas de manera similar a como se obtiene el PPD. Fueron estandarizadas en un laboratorio de Holanda. Se demostró

claramente que las sensitinas obtenidas de *N.brasiliensis*, daban una reacción positiva, después de una inyección intracutánea en enfermos con micetoma por *N.brasiliensis*, mientras que la respuesta fue negativa en enfermos con micetomas por *S.maduræ* u otras actinomicosis, tampoco producían reacción en individuos enfermos de tuberculosis o con otras enfermedades de tipo crónico o en individuos no enfermos. Las sensitinas de *Nocardia asteroides*, dieron una respuesta negativa en individuos con micetomas por *N.brasiliensis* o en otras enfermedades.

De esta manera las sensitinas de *N.brasiliensis* (0, 2, δ) demostraron ser altamente específicas y útiles para ayudar al diagnóstico de micetomas causados por este microorganismo.

Los extractos purificados citoplásmicos de *N.brasiliensis*, se utilizaron para estudios epidemiológicos (0.5 μ g por 0.1 ml.) en zonas de cultivo de caña como Zacatepec, Estado de Morelos, resultando positivos más del 70% de individuos, aparentemente sanos, mientras que en zonas no endémicas la proporción fue de sólo un 10%.

Entre 1972 a 1976, antes de cerrar nuestra actividad científica al menos sobre microorganismos, dedicamos nuestro esfuerzo a la obtención de sustancias somáticas, obtenidas tanto de micobacterias como de nocardias, buscando proteínas capaces de inducir una respuesta inmune o bien hipersensible. No resultó fácil obtener proteínas purificadas en las fracciones celulares, en todos los casos las proteínas siempre iban unidas a componentes poliglucosados de los que no fue posible separarlas.

Estas fracciones no inducían hipersensibilidad retardada cuando se inyectaban en animales, aunque podían usarse de manera similar al PPD, se decidió entonces usar ribosomas, para obtener proteínas purificadas. Las fracciones ribosomales contienen aproximadamente 58% de ARN y 42% de proteínas, tanto las fracciones ribosomales como las proteínas aisladas de los ribosomas fueron capaces de inducir una respuesta hipersensible en animales sensibilizados con BCG. En el caso de ribosomas obtenidos de *N.brasiliensis*, también se demostró la existencia de esta respuesta, en animales sensibilizados con *N.brasiliensis*.

Pero la observación más importante se dio, cuando se demostró que tanto las fracciones ribosomales y también las proteínas aisladas de ellas, fueron capaces de inducir hipersensibilidad en animales, con respuestas similares a las obtenidas con PPD, lo que nos indicó la posibilidad de usar fracciones ribosomales, como una vacuna no viva. Es bien conocido el hecho de que sólo los bacilos vivos son capaces de despertar en los individuos una respuesta celular que conduce a la inmunidad, aquí estamos en presencia de una proteína purificada que es capaz de inducir una respuesta de hipersensibilidad retardada que pudiera estar vinculada con la respuesta inmune. Los estudios sobre este tema no fueron seguidos. En 1974 después de una visita a la Universidad de Cambridge, dejé la Universidad Autónoma de México, para pasar a una universidad nueva, que en ese tiempo empezó a construirse, la Universidad Autónoma Metropolitana, que tiene tres unidades separadas geográficamente, yo me incorporé a la UAM-Xochimilco.

Actualmente esta universidad, tiene un lugar importante en el concierto nacional, pero hace 30 años, en sus comienzos, hubo que dedicarle intensos esfuerzos, no sólo para ir construyendo sus edificios a medida que crecía, sino que se trataba de construir una universidad innovadora en sus métodos de enseñanza y una organización que pudiera transformar el tipo de educación tradicional, que estuviera más vinculada con las necesidades sociales. Este proyecto educativo presenta el conocimiento de manera más integrada, en forma de unidades de enseñanza-aprendizaje, en las que se conjuga la investigación, la docencia y el servicio, a estas unidades se les dio el nombre de módulos y se busca además que los estudiantes aprendan a usar la información para resolver los problemas que cada módulo plantea.

El lograr la participación de los estudiantes en su propia formación, resulta ser un eje fundamental en este modelo educativo.

Fui profesor fundador de esta universidad, en la que desempeñé puestos académicos-administrativos como el ser Director de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud y posteriormente Rector de la Unidad Universitaria Xochimilco.

Después de dejar los puestos de administración académica, dediqué mis esfuerzos a desarrollar programas de formación y superación académica de profesores.

Iniciamos lo que llamamos posgrados internacionales, haciendo convenios con universidades como la de Londres, Liverpool, la Habana y Murcia, para lograr lo que ya se ha logrado, que nuestros profesores pudieran obtener grados académicos, hasta doctorado, en las instituciones extranjeras, con la modalidad de que el 80% del trabajo se realizara en nuestra universidad y que las tesis de grado sean una continuación del trabajo de los profesores y que el tema a desarrollar esté vinculado a problemas nacionales.

Hasta aquí este breve relato, en el que queda la duda que ya no se va a resolver, del camino que hubiera sido más importante, no en lo personal sino como contribución social, si el haber continuado el trabajo de investigación o como se hizo, cambiar a una carrera docente, en la que la construcción de una nueva universidad innovadora y la formación de recursos para la licenciatura y la investigación ocupara la línea fundamental.

PRESENTATION

Years of work of an important group of scholars and researchers on actinomycetomes are gathered in this book. It describes many of the different aspects characteristic of this disease as well as the microorganisms which produce it.

The collected essays allow a wide vision of what is called actinomycetome. Clinical and epidemiological aspects are treated in all propriety. Radiological forms of mycetomes are shown; drugs used in treatment mentioned.

Other aspects of actinomycetomes are presented as well, such as biomolecular studies of actinomycetes, mechanisms involved in the production of the disease, experimental reproduction in animals and, particularly important, the host's response to infection.

The chapter on taxonomy shows the genus and species responsible for the disease.

This book has represented an opportunity to collect the work of very distinguished scientists from different parts of the world and especially places where actinomycetomes represent an important health problem. African, Indian and Latin American authors are included, as well as American, English and French researchers who have made relevant contributions to the knowledge of actinomycetomes and their causal agents.

The editorial committee's efforts deserve special praise. Besides presenting us this book, the editors take active part divulging research on pathogenic actinomycetomes. They have been able to create, together with other colleagues, the International Group of Research on Pathogenic Actinomycetomes, a truly international network of distinguished researchers, with a vocation to educate as they have shown through the organization of courses, symposia and the tutoring of graduate students.

This book is another contribution of this remarkable organization. In its approach it covers actinomycetomes in their many diverse aspects. It is comprehensive in subject matter and global vision and will surely be very useful not only to specialists but also to professionals of biology, medicine and pharmacology, as well as to students in these areas.

We owe recognition to every one of the specialists – and the institutions supporting them- who have joined their efforts with the purpose of divulging knowledge on pathogenic actinomycetes.

The authors have dedicated this book to four Latin American scientists, pioneers in the study of pathogenic actinomycetes. There is a special meaning in this because of its implicit recognition of Latin America, which has not always been present in the field of sciences. It is perhaps a call to action, for us to make a greater effort to foster the scientific development of our peoples.

Science has been the motor for deep social, economic and cultural change throughout the world. The development of science has come to be a matter of state and survival. In Latin American countries science and technology have to help the people overcome unending conditions of poverty.

It is also important to notice that actinomycetomes, subject matter of this book, are diseases more frequently affecting peasants, people exposed to the inhalation of "dust" from the soil or infections from contaminated soils. Regarding the etiological agents, there are many and very diverse, but *N.brasiliensis* is the most important causal agent in the world. The number of cases reported in Brazil, México, Sudan and Venezuela caused by *N.brasiliensis* represent more than half of all the actinomycetomes reported in the world.

It should be said that it is these four countries which have produced the greatest number of works on pathogenic actinomycetes, so it is not surprising that the editors of this book, Dr. Horacio Sandoval from México and Dr. Jose A. Serrano from Venezuela have proposed to dedicate this book to professors Humberto Camping (Venezuela, 1911-1998); Dante Borelli (1920-1977), who, although born in Italy, conducted his research on pathogenic fungi in Venezuela; Carlos da Silva Lacaz (Brazil, 1915-2000); Antonio Gonzalez Ochoa (México, 1910-1984) and Luis F. Bojalil (México, 1925) surely trying to point out that it is the authors' responsibility to continue building the tradition on the study of pathogenic actinomycetes which has been established in Latin America. I want to express my appreciation and recognition to those who came before me, the same men mentioned in this book, colleagues and mentors.

My recognition as well to the international group of researchers dedicated to the study of pathogenic actinomycetes (GIIAP, in Spanish), who have kept the interest in research for more than twenty-five years without neglecting the formation of young researchers and the divulgation of the knowledge on these microorganisms.

I have been asked to make a brief presentation of my scientific work, especially our studies on the gender *Nocardia*, which coincide with the subject matter of this book.

Science in México

I started my scientific career more than 50 years ago, in a country where young people had a great desire to participate in scientific research, a country in full growth, which wanted to reconstruct in an accelerated way what the Mexican revolution had destroyed. It was a time when the importance of science for the development of the country was acknowledged. There were special circumstances that helped strengthen our scientific capacity. The Institute of Tropical Diseases, which fostered the field of microbiology and the study of infectious diseases, was created in the 1930s. It concentrated an important group of scientists who had completed their professional studies or had accomplished a career in other countries, like the United States and France. Included in this group were doctors Zozaya, Mazotti, Martinez Baez, Beltrán, Varela, Gonzalez Ochoa and others who are still remembered as some of the great Mexican researchers.

This generation was also enriched by the immigration of Spanish scientists, so many of them and so remarkable, that we have to consider them as partly responsible of the creation of modern Mexican science. Entomologists, histopathologists, parasitologists, pharmacologists and other specialists peopled our schools.

I do not intend to make a historical recount, but only to briefly describe the conditions in the practice of scientific research prevailing in the country in the 1940s. Mexican and Spanish scholars give a great impulse to the scientific field, with a deep influence in education, creating new schools and graduate programs, fostering research in biology, physics, letters and humanities.

Nowadays, scientific infrastructure in Mexico, which has been created throughout the last 50 years, is very different in quality and quantity. The number of researchers and published works has grown in such a way that it can be said there exists a solid base for the development of research even if, compared to the size of the country, it is a small one. Institutions, universities and scientists themselves perceive the need to further the development of science.

In the 1950s, when I started my scientific career, it was difficult to find appropriate facilities for research. The Institute of Tropical Diseases, which I have already mentioned, with magnificent facilities and excellent physicians and researchers, turned out to be a fertile environment for many students. It was there I realized my first works in the laboratory of Dr. Gonzalez Ochoa, who was my mentor. Dr. Gonzalez Ochoa returned to Mexico to lead the Mycology Laboratory of the Institute of Tropical Diseases. He came from Paris, after a stay with Dr. Langeron, disciple of Pasteur.

Dr. Gonzalez Ochoa's Mycology Laboratory became in time the most important Research Center in Mexico, devoted to the education and training of young scientists. In it were formed a considerable number of researchers and professionals of Dermatology in the field of Mycology. For that reason, this book has been, very deservedly, dedicated to this distinguished teacher.

Research Works

I will briefly mention the works on *Nocardia*, although I must point out the majority of published works concerned Mycobacteria, subject I developed widely because after leaving Dr. Gonzalez Ochoa's laboratory I started to work at the Pneumology Unit of the Institute for Social Security (Seguro Social) whose primary function was the diagnosis and treatment of tuberculosis. At that time the tuberculosis bacillus was not cultivated and resistance tests to streptomycin, which was recently being used, were not applied. For these reasons, and because it was a center for medical attention, research was not considered to be one of its tasks. It was necessary to adapt the laboratory to be able to evaluate diverse media of cultivation, to introduce routine cultivations, to start applying drug resistance tests. New products, like the powerful antitubercular isoniazid, were also tested. We worked on the speed of growth of mycobacteria in several cultivation media. The use of two therapeutic agents for the treatment of tuberculosis and other disease was suggested to prevent or delay resistance. In consequence, works were presented in congresses and conferences, in universities and service units. What I describe here might not be very relevant as scientific research, but in Mexico the approach to the improvement of diagnosis and treatment of the disease was novel.

This work lasted around 5 years, after which we moved to the General Hospital, to the Pathology Unit, sponsored by the School of Medicine of the National University of Mexico.

It took us two years to start working again, because there was not an adequate place to conduct research. It was necessary to design the facilities, which were built along those two years. What came to be called Pathology Unit would play a very important role in medical education, in the formation of resources especially in the fields of histopathology, microbiology, parasitology, biochemistry and immunology.

Before I started to work in this new Unit, I received the commission to restructure and introduce the then considered modern methods in the tuberculosis laboratories of Pavilion 27 at the hospital. Two or three years afterwards, in 1957, I received a scholarship from the WHO-PHO and traveled to the US. Shortly before that, Runyon had published a classification of what were called atypical bacteria and this was, in part, what moved me to visit that country, although I also covered several important centers for the research on tuberculosis: Washington, Minnesota, Salt Lake City, Colorado, places all where distinguished tuberculosis scholars were at work.

Back to the Pathology Unit, we continued research on mycobacteria. Papers on what was published at that time are plentiful and the articles appeared in many diverse international journals.

It was then that we started studying *Nocardia*. We will talk a little about this genus, as it is part of the subject of the present book.

More than 40 works were published. Many of them were relevant to the knowledge of the species of *Nocardia*, from the point of view of taxonomy, immunology and diagnosis. I will mention only a few data, because scientific literature has accounted for these contributions. In 1959, I published an article describing the possibility to differentiate *N.brasiliensis* from *N.asteroides* using a simple method. *N.brasiliensis* grows well in media of diluted gelatin, turning the medium alkaline. *N. asteroides* does not grow in these media, which keep their neutral or acid pH.

The study of *Nocardia* polysaccharides threw important results. Two polysaccharides were described. Poly I turned out to be identical both in *N.asteroides* and in *N.brasiliensis*. It was considered to be a polysaccharide of the group of acid fast microorganism, because it also produces a cross reaction with tuberculosis and leper serums. *Polysaccharide* II, which contains arabinose, galactose and mannose, as opposed to *polysaccharide* I, which only contains arabinose and galactose, turned out to be a species specific, because it would not produce a cross reaction neither with tuberculosis nor with leper serums. Another proof that the *Nocardia* Poly I could be considered representative of a whole group was the isolation of a similar polysaccharide in *M.fortuitum*. The isolation of other polysaccharides in acid resistant bacillus led us to the same conclusion and presented a wide vision of the similarities and differences existing among the different species.

We conducted studies on what were called sensitines, protein substances obtained in a similar way as PPD. They were standardized in a laboratory in Holland. It was clearly demonstrated that the sensitines obtained from *N.brasiliensis* generated a positive reaction after an intracutaneous injection in people affected by mycetome provoked by *N.brasiliensis* while the response was negative in people whose mycetomes were caused by *S.maduræ* or other actinomycetes. Neither did it produce a reaction in people affected by tuberculosis or other chronic diseases nor in healthy individuals. *Nocardia asteroides* sensitines gave a negative response in individuals affected by *N.brasiliensis* or other illness.

This is how *N.brasiliensis* sensitines (0, 2, δ) proved to be highly specific and useful in the diagnosis of mycetomes provoked by this microorganism.

Purified cytoplasmic extracts of *N.brasiliensis* were used for epidemiological studies (0.5ug/1 ml) in sugar cane cultivation zones such as Zacatepec, Morelos State, where more than 70% of seemingly healthy individuals threw a positive result whereas in not endemic zones the proportion of positive results was only 10%.

From 1972 to 1976, before ending our scientific activity on microorganisms, we devoted our efforts to obtain somatic substances, both from mycobacteria and nocardia, looking for proteins capable of inducing an immune or hypersensitive response. It was not easy to obtain purified proteins in cellular fractions; in every case proteins were joined to polyglucosated components from which it was not possible to separate them.

These somatic fractions did not induce retarded hypersensitivity when injected into animals, although they could be used in a similar way to PPD. We then decided to use ribosomes, to obtain purified proteins. Ribosomal fractions contain approximately 58% of RNA and 42% of proteins. Both ribosomal fractions and the isolated proteins from ribosomes were able to induce a hypersensitive response in animals sensitized with BCG. In the case of ribosomes obtained from *N.brasiliensis*, we could also demonstrate the existence of this response in animals sensitized with *N.brasiliensis*.

The most important observation occurred, however, when we could prove that both ribosomal fractions and the isolated proteins from them were capable of inducing hypersensitivity in animals, with responses similar to those obtained with PPD, which led us to the possibility of using ribosomal fractions as a not living vaccination. It was well known that only living bacillus can provoke a cellular response conducting to immunity in individuals. Here we are in presence of a purified protein capable of inducing a retarded hypersensitivity response, which could be linked to the immune response.

Studies on the subject were interrupted. In 1974, after a visit to Cambridge University, I left the National Autonomous University of Mexico to become part of a new university, then in process of construction, the Metropolitan Autonomous University, with three geographically separate units. I joined the UAM – Xochimilco unit.

Nowadays this university is an important actor in the national education scene, but when it started, 30 years ago, we had to dedicate intense efforts, not only to little by little build its physical premises but also to realize our purpose: to create an innovative university in its teaching methods and an organization that could transform traditional education, to bring it closer to social needs. This educational project presents knowledge in a more integral way, in the form of teaching-learning units, in which research, teaching and service are joined together. These blocs were given the name of modules. Students work through modules progressively and are expected to learn to use information to solve the problems each module presents.

This educational model is focused on the idea that students must take active part in their own formation.

I was a founding professor in this university, where I also held academic- administrative positions like Director of the Division of Biological and Health Sciences and afterwards Rector of the University at the Xochimilco Unit.

After leaving positions of academic administration, I dedicated my efforts to develop programs of faculty formation and academic improvement. We started what we call international graduate programs, in agreement with the universities of London, Liverpool, Havana and Murcia so that our professors could obtain academic degrees, up to PhDs in foreign institutions. These graduate programs have special characteristics. Candidates elaborate 80% of the degree work in our university and their dissertations are a continuation of their previous work. Their subject matter is linked to national problems.

Here I finish this brief story, which leaves open a question that will not be answered, about which road would have been more important, not from a personal point of view but as a social contribution, to have continued my research work or, as I did, to dedicate my efforts to a teaching career motivated fundamentally by the construction of a new innovative university and the formation of resources for scientific and research careers.

Dr. Luis Felipe Bojalil Jaber
México, 2005

CAPÍTULO I

ASPECTOS TAXONÓMICOS, BACTERIOLÓGICOS, CITOQUÍMICOS Y DE DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE ACTINOMICETOS AEROBIOS PRODUCTORES DE ACTINOMICETOMA.

Horacio Sandoval Trujillo¹, Nora Lidia Sánchez-Saucedo¹
José Antonio Serrano², Michael Goodfellow³

¹ Laboratorio de Producción de Biológicos Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco México DF, México. hsandov@correo.xoc.uam.mx ; nsanchez@correo.xoc.uam.mx

² Instituto de Investigaciones. Sección de Biotecnología. Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, Edo. Mérida, Venezuela. jacielo@cantv.net

³ Universidad de Newcastle upon Tyne. UK, School of biology. m.goodfellow@ncl.ac.uk

Abstract

The etiologic agents of actinomycetomas belong to the pathogenic aerobic Actinomycetes. This group of microorganisms includes members of genera *Nocardia*, *Actinomadura*, *Rhodococcus* and *Streptomyces*. All of them are Gram positive filamentous bacteria. Characteristically they develop aerial and substrate mycelia with true branching. *Nocardia* species can be partially acid-fast. The precise identification of the aerobic pathogenic Actinomycetes is done on the basis of colonial morphology (both macro and micro characteristics), the presence or absence of diffusible pigments, and the nature of the aerial mycelium. Physiological tests for identification of these actinomycetes include utilization of sugars as well as decomposition of amino acids and proteins. The chemical composition of the cell wall is determined by either thin layer chromatography or high-performance liquid chromatography of whole-cell hydrolysates to determine the presence of either LL or meso DAP, types of carbohydrates and the mycolic acid composition.

The use of genomic methods based on the analysis of sequences and polymorphisms of either the 16S rRNA gene or the hsp-65 gene has been of value for differentiating many species, particularly of those belonging to the genus *Nocardia*.

Introducción

Gracias a los estudios que en estos últimos años se han logrado desarrollar con las técnicas de biología molecular aplicadas a los microorganismos, se ha hecho posible que hayan sido reportadas una gran diversidad de nuevas especies bacterianas. Esto ha dado pie, a innumerables listados de especies, considerando cada país, sus propios listados, de acuerdo a las colecciones de microorganismos existentes en cada uno de ellos. Este hecho ha generado la dificultad de consultar una base confiable, que incluya todas las especies bacterianas existentes, y que regule la correcta nomenclatura de cada especie propuesta y asimismo, avale las pruebas pertinentes para decidir el *status* taxonómico de un microorganismo.

Existen en el mundo 484 colecciones de microorganismos en 65 países registradas en la *Home Page of Culture Collections in the World* (Página de Web de Colecciones de microorganismos en el Mundo) de todas las especies, con fines de conservación, investigación y comerciales, ante esta necesidad, existe una página WEB, de J.P. Euzéby, cuya dirección URL es: <http://bacterio.cict.fr>, tiene los listados existentes de bacterias de las diferentes colecciones, y es posible consultar el *status* taxonómico de cada especie bacteriana registrada en alguna colección.

Aunque no exista una clasificación oficial de bacterias, las nomenclaturas válidas están reguladas conforme las Reglas de Nomenclatura, donde juega un papel importante el *Internacional Committee of Systematic Bacteriology* (*Comité Internacional de Bacteriología Sistemática*), este organismo emite

listados de especies aprobadas o validadas que cumplen los requisitos establecidos en el *Internacional Code of Nomenclature of Bacteria* o "*Internacional Code of Nomenclature of Prokaryotes*" ("*Código Internacional de Nomenclatura Bacteriana*").

Las especies bacterianas que tienen validez son avaladas al ser publicadas en: *List of Bacterial names with Standing Nomenclature*, (*Lista de nombres Bacterianos con nomenclatura vigente*).

Desde 1999, la Comisión Judicial del "*Internacional Committee of Systematic Bacteriology*" (*Comité Internacional de Bacteriología Sistemática*), decidió reemplazar el término *Bacteria* por *Prokariotes*, este cambio trajo grandes consecuencias, ya que no es muy común utilizar el término "*Prokariotes*", generando grandes conflictos. En la revisión de 1975, el "*Bacteriological Code*" (*Código Bacteriológico*), introdujo un nuevo concepto, "*Valid Publication*" (*Publicación Válida*) de nombres de bacterias, la publicación de la "*Approved Lists of Bacterial Names*" (*Lista de Nombres de Bacterias Aprobados*) fue parte de este concepto, siendo un punto de inicio en la "*Approved Lists of Bacterial Names*" contiene 2.212 nombres de género, especie o subespecie y 124 taxones mayores hasta mayo del 2005.

Los criterios para estar en la lista es el siguiente:

1. El nombre es citado en la *Approved Lists of Bacterial Names*
2. El nombre debe ser publicado en el *Internacional Journal of Systematic Bacteriology* (IJSE), por sus siglas en inglés o el *Internacional Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (IJSEM) por sus siglas en inglés, como se llama actualmente la revista.
3. El nombre considerado *Validly Publisher* (*Publicación validada*) por el anuncio de la *Validation List* (*Lista de Validación*)

La *Validation List* son listas publicadas por la IJSEM o IJSE, validando la publicación del nombre de la bacteria en otro lugar, el anuncio en la lista de validación es responsabilidad del autor, o autores.

Existe otro listado, que incluye las cepas que por omisión no se incluyeron en la *Validation List* (*Lista de Validación*) ni de especies aprobadas, pero que han sido reportadas, que posteriormente serán incluidas en la lista de especies aprobadas. Tabla 1.2.

Terminología más usada:

sp.nov. (*species nova*) nuevos aislamientos considerados como especies nuevas aprobadas y publicadas en la *Approved Lists of Bacterial Names*

comb.nov (*combinatio nova*). es una nueva combinación publicada como especie válida y transferida a otro género, o subespecies publicadas transferidas a otra especie.

nom rev (*nomen revictum*) Nombre cuya publicación fue posterior a enero de 1980, y no fue incluida en la Lista de Nombres de Bacterias Aprobadas, y es propuesta por un autor o por diferentes autores o para el mismo taxon (de acuerdo a la opinión del autor).

genus: Indica que la cepa está reconocida como género.

specie: Reconocida como especie a partir del primero de enero 1980

Existen 67 cepas de *Nocardia* en la *Approved Lists of Bacterial Name* (Tabla 1.1) con diferentes estatus de *sp.nov.*, *com.nov.*, género y *sp.nov. com. rev.* Dos se encuentran *in press* listos para su publicación en la IJSEM (referencias) y dos cepas aceptadas que están por incluirse en la Lista de Validación (referencias) hasta abril del 2005.

De *Actinomadura* hay registradas 52 especies y 2 subespecies, de las cuales, 22 son especies nuevas, 23 reconocidas a partir de 1980, 2 especies *comb. nov.*, 1 género, 3 *sp.nov., nom.rev.*, y 1 *sp.nov., nom.rev., comb.nov.* (Tabla 1.1)

Hay 34 especies de *Rhodococcus* donde se tienen, 16 especies *sp.nov*, 9 especies reconocidas a partir de 1980 y 6 especies en diversos *status* al igual que *Nocardia* y *Actinomadura*, de *Streptomyces*, hay registradas mas de 500 cepas, en sus diversos *status* taxonómicos, donde la gran mayoría, son utilizadas en la industria, como productores de antibióticos y enzimas, las especies patógenas de *Streptomyces* son *S.somaliensis* y *S.paraguayensis* consideradas especies aprobadas. A este gran número de especies ya aprobadas se anexan las que están en la lista de validación y las que no fueron incluidas por omisión, (Tabla 1.1 y Tabla 1.2)

En la Tabla 1.2, se muestra la lista de cepas que no fueron incluidas, principalmente *Nocardia*, por omisión en la lista de especies aprobadas, se mencionan únicamente las patógenas, ya que hay una gran cantidad de especies *Streptomyces* y *Actinomadura* con fines industriales que no se presentan en ese listado.

A partir de 1980 el listado de especies nuevas supera las ya existentes, lo que demuestra la gran heterogeneidad existente en las especies ya reconocidas, como lo son *Nocardia*, *Actinomadura*, *Rhodococcus* y *Streptomyces*, cuestionando, hasta donde esta el límite que permita tener especies nuevas o que las revisiones de cepas ya tipificadas den nuevas especies, siendo estos cuatro grupos, los mas diagnosticados como agentes causales de micetoma.

Tabla 1.1
Lista de Todas las Especies de *Actinomadura* y *Nocardia* Aprobadas
(Euzeby 2005) Revisión hasta el 24 de mayo del 2005.

<i>Actinomadura</i> Lechevalier and Lechevalier 1968 (Approved Lists 1980), <i>genus</i> .	1975 (Approved Lists 1980), <i>species</i> .	(Approved Lists 1980), <i>species</i> .
<i>Actinomadura africana</i> Preobrazhenskaya and Sveshnikova 1974 (Approved Lists 1980), <i>species</i> .	<i>Actinomadura cremea</i> subsp. <i>cremea</i> Preobrazhenskaya <i>et al.</i> 1975, subsp. nov.	<i>Actinomadura hibisca</i> Tomita <i>et al.</i> 1991, sp. nov.
<i>Actinomadura atramentaria</i> Miyadoh <i>et al.</i> 1987, sp. nov.	<i>Actinomadura cremea</i> subsp. <i>rifamycini</i> Gauze <i>et al.</i> 1987, subsp. nov.	<i>Actinomadura kijaniata</i> Horan and Brodsky 1982, sp. nov.
<i>Actinomadura aurantiaca</i> Lavrova and Preobrazhenskaya 1975 (Approved Lists 1980), <i>species</i> .	<i>Actinomadura echinospora</i> (Nonomura and Ohara 1971) Kroppenstedt <i>et al.</i> 1991, comb. nov.	<i>Actinomadura latina</i> Trujillo and Goodfellow 1997, sp. nov.
<i>Actinomadura carminata</i> Gauze <i>et al.</i> 1973 (Approved Lists 1980), <i>species</i> .	<i>Actinomadura fastidiosa</i> Soina <i>et al.</i> 1975 (Approved Lists 1980), <i>species</i> .	<i>Actinomadura libanotica</i> Meyer 1981, sp. nov.
<i>Actinomadura catellatispora</i> Lu <i>et al.</i> 2003, sp. nov.	<i>Actinomadura ferruginea</i> Meyer 1981, sp. nov.	<i>Actinomadura livida</i> Lavrova and Preobrazhenskaya 1975 (Approved Lists 1980), <i>species</i> .
<i>Actinomadura citrea</i> Lavrova <i>et al.</i> 1972 (Approved Lists 1980), <i>species</i> .	<i>Actinomadura fibrosa</i> Mertz and Yao 1990, sp. nov.	<i>Actinomadura longicatena</i> Itoh <i>et al.</i> 1996, sp. nov.
<i>Actinomadura coerulea</i> Preobrazhenskaya <i>et al.</i> 1975 (Approved Lists 1980), <i>species</i> .	<i>Actinomadura flava</i> Gauze <i>et al.</i> 1974 (Approved Lists 1980), <i>species</i> .	<i>Actinomadura longispora</i> Preobrazhenskaya and Sveshnikova 1974 (Approved Lists 1980), <i>species</i> .
<i>Actinomadura coeruleofusca</i> Preobrazhenskaya and Sveshnikova 1974 (Approved Lists 1980), <i>species</i> .	<i>Actinomadura flexuosa</i> (<i>ex</i> Krasil'nikov and Agre 1964) Meyer 1989, sp. nov., nom. rev., comb. nov.	<i>Actinomadura luteofluorescens</i> (Shinobu 1962) Preobrazhenskaya <i>et al.</i> 1975 (Approved Lists 1980), <i>species</i> .
<i>Actinomadura coeruleoviolacea</i> Preobrazhenskaya and Terekhova 1987, sp. nov.	<i>Actinomadura formosensi</i> (Hasegawa <i>et al.</i> 1986) Zhang <i>et al.</i> 1998, comb. nov.	<i>Actinomadura macra</i> (<i>ex</i> Celmer <i>et al.</i> 1979) Huang 1980, sp. nov., nom. rev.
<i>Actinomadura cremea</i> Preobrazhenskaya <i>et al.</i>	<i>Actinomadura fulvescens</i> Terekhova <i>et al.</i> 1987, sp. nov.	<i>Actinomadura madurae</i> (Vincent 1894) Lechevalier and Lechevalier 1968 (Approved Lists 1980), <i>species</i> .
	<i>Actinomadura glauciflava</i> Lu <i>et al.</i> 2003, sp. nov.	<i>Actinomadura malachitica</i> Lavrova <i>et al.</i> 1972 (Approved Lists 1980), <i>species</i> .
	<i>Actinomadura glomerata</i> Itoh <i>et al.</i> 1996, sp. nov.	
	<i>Actinomadura helvata</i> Nonomura and Ohara 1971	

Actinomadura mexicana
Quintana *et al.* 2004, sp.
nov.

Actinomadura meyerae
corrig. Quintana *et al.* 2004,
sp. nov.

Actinomadura namibiensis
Wink *et al.* 2003, sp. nov.

Actinomadura napierensis
Cook *et al.* 2005, sp. nov.

Actinomadura nitritigenes
Lipski and Altendorf 1995,
sp. nov.

Actinomadura oligospora
Mertz and Yao 1986, sp.
nov.

Actinomadura pelletieri
(Laveran 1906) Lechevalier
and Lechevalier 1968
(Approved Lists 1980),
species.

Actinomadura polychroma
Galatenko *et al.* 1987, sp.
nov.

Actinomadura pusilla
Nonomura and Ohara 1971
(Approved Lists 1980),
species.

Actinomadura recticatena
Terekhova *et al.* 1987, sp.
nov.

Actinomadura roseola
Lavrova and
Preobrazhenskaya 1975
(Approved Lists 1980),
species.

Actinomadura
roseoviolacea Nonomura
and Ohara 1971 (Approved
Lists 1980), *species*.

Actinomadura rubra
(Sveshnikova *et al.* 1969)
Meyer and Sveshnikova
1974 (Approved Lists 1980),
species.

Actinomadura rubrobrunea
(ex Krasil'nikov *et al.* 1968)
Kroppenstedt *et al.* 1991, sp.
nov., nom. rev., comb. nov.

Actinomadura
rugatobispora Miyadoh *et*
al. 1991, nom. nov.

Actinomadura salmonea
Preobrazhenskaya *et al.*
1975 (Approved Lists 1980),
species.

Actinomadura spadix
Nonomura and Ohara 1971
(Approved Lists 1980),
species.

Actinomadura spiralis
Meyer 1981, sp. nov.

Actinomadura turkmeniaca
Terekhova *et al.* 1987, sp.
nov.

Actinomadura umbrina
Galatenko *et al.* 1987, sp.
nov.

Actinomadura
verrucosospora Nonomura
and Ohara 1971 (Approved
Lists 1980), *species*.

Actinomadura vinacea
Lavrova and
Preobrazhenskaya 1975
(Approved Lists 1980),
species.

Actinomadura viridilutea
(Agre and Guzeva 1975)
Zhang *et al.* 2001, comb.
nov.

Actinomadura viridis
(Nonomura and Ohara 1971)
Miyadoh *et al.* 1989, comb.
nov.

Actinomadura yumaensis
Labeda *et al.* 1985, sp. nov.

Nocardia Trevisan 1889
(Approved Lists 1980),
genus.

Nocardia abscessus Yassin
et al. 2000, sp. nov.

Nocardia africana Hamid *et*
al. 2001, sp. nov.

Nocardia alba Li *et al.*
2004, sp. nov.

Nocardia amarae
Lechevalier and Lechevalier
1974 (Approved Lists 1980),
species.

Nocardia aobensis
Kageyama *et al.* 2005, sp.
nov.

Nocardia araoensis
Kageyama *et al.* 2004, sp.
nov.

Nocardia arthritidis
Kageyama *et al.* 2005, sp.
nov.

Nocardia asiatica
Kageyama *et al.* 2004, sp.
nov.

Nocardia asteroides
(Eppinger 1891) Blanchard
1896 (Approved Lists 1980),
species.

Nocardia autotrophica
(Takamiya and Tubaki
1956) Hirsch 1961
(Approved Lists 1980),
species.

Nocardia beijingensis Wang
et al. 2001, sp. nov.

Nocardia brasiliensis
(Lindenberg 1909) Pinoy
1913 (Approved Lists 1980),
species.

Nocardia brevicatena
(Lechevalier *et al.* 1961)
Goodfellow and Pirouz
1982, comb. nov.

Nocardia caishijiensis
Zhang *et al.* 2003, sp. nov.

Nocardia calcarea Metcalf
and Brown 1957 (Approved
Lists 1980), *species*.

- Nocardia carnea* (Rossi Doria 1891) Castellani and Chalmers 1913 (Approved Lists 1980), *species*.
- Nocardia cellulans* Metcalf and Brown 1957 (Approved Lists 1980), *species*.
- Nocardia cerradoensis* Albuquerque de Barros *et al.* 2003, sp. nov.
- Nocardia coeliaca* (Gray and Thornton 1928) Waksman and Henrici 1948 (Approved Lists 1980), *species*.
- Nocardia corynebacterioides* Serrano *et al.* 1972 (Approved Lists 1980), *species*.
- Nocardia crassostreae* Friedman *et al.* 1998, sp. nov.
- Nocardia cummidelens* Maldonado *et al.* 2001, sp. nov.
- Nocardia cyriacigeorgica* corrig. Yassin *et al.* 2001, sp. nov.
- Nocardia farcinica* Trevisan 1889 (Approved Lists 1980), *species*.
- Nocardia flavorosea* Chun *et al.* 1998, sp. nov.
- Nocardia fluminea* Maldonado *et al.* 2001, sp. nov.
- Nocardia globerula* (Gray 1928) Waksman and Henrici 1948 (Approved Lists 1980), *species*.
- Nocardia higoensis* Kageyama *et al.* 2004, sp. nov.
- Nocardia hydrocarbonoxydans* Nolfo and Hirsch 1962 (Approved Lists 1980), *species*.
- Nocardia ignorata* Yassin *et al.* 2001, sp. nov.
- Nocardia inohanensis* Kageyama *et al.* 2004, sp. nov.
- Nocardia kruczakiae* Conville *et al.* 2005, sp. nov.
- Nocardia mediterranei* (Margalith and Beretta 1960) Thiemann *et al.* 1969 (Approved Lists 1980), *species*.
- Nocardia neocaledoniensis* Saintpierre-Bonaccio *et al.* 2004, sp. nov.
- Nocardia niigatensis* Kageyama *et al.* 2004, sp. nov.
- Nocardia nova* Tsukamura 1983, sp. nov.
- Nocardia orientalis* (Pittenger and Brigham 1956) Pridham and Lyons 1969 (Approved Lists 1980), *species*.
- Nocardia otitidiscaviarum* corrig. Snijders 1924 (Approved Lists 1980), *species*.
- Nocardia paucivorans* Yassin *et al.* 2000, sp. nov.
- Nocardia petroleophila* Hirsch and Engel 1956 (Approved Lists 1980), *species*.
- Nocardia pigrifrangens* Wang *et al.* 2004, sp. nov.
- Nocardia pinensis* Blackall *et al.* 1989, sp. nov.
- Nocardia pneumoniae* Kageyama *et al.* 2004, sp. nov.
- Nocardia pseudobrasiliensis* Ruimy *et al.* 1996, sp. nov.
- Nocardia pseudovaccinii* Kim *et al.* 2002, sp. nov.
- Nocardia puris* Yassin *et al.* 2003, sp. nov.
- Nocardia restricta* (Turfitt 1944) McClung 1974 (Approved Lists 1980), *species*.
- Nocardia rugosa* (ex di Marco and Spalla 1957) Goodfellow and Lechevalier 1988, sp. nov., nom. rev.
- Nocardia salmonicida* (ex Rucker 1949) Isik *et al.* 1999, sp. nov., nom. rev.
- Nocardia saturnea* Hirsch 1960 (Approved Lists 1980), *species*.
- Nocardia seriolae* Kudo *et al.* 1988, sp. nov.
- Nocardia shimofusensis* Kageyama *et al.* 2004, sp. nov.
- Nocardia sienata* corrig. Kageyama *et al.* 2004, sp. nov.
- Nocardia soli* Maldonado *et al.* 2001, sp. nov.
- Nocardia sulphurea* Goodfellow and Lechevalier 1988, sp. nov.
- Nocardia takedensis* Yamamura *et al.* 2005, sp. nov.
- Nocardia tenerifensis* Kämpfer *et al.* 2004, sp. nov.
- Nocardia testacea* corrig. Kageyama *et al.* 2004, sp. nov.
- Nocardia thailandica* Kageyama *et al.* 2005, sp. nov.

- Nocardia transvalensis* Pijper and Pullinger 1927 (Approved Lists 1980), *species*.
- Nocardia uniformis* (ex Marton and Szabó 1959) Isik *et al.* 1999, sp. nov., nom. rev.
- Nocardia vaccinii* Demaree and Smith 1952 (Approved Lists 1980), *species*.
- Nocardia vermiculata* Kageyama *et al.* 2005, sp. nov.
- Nocardia veterana* Gürtler *et al.* 2001, sp. nov.
- Nocardia vinacea* Kinoshita *et al.* 2002, sp. nov.
- Nocardia xishanensis* Zhang *et al.* 2004, sp. nov.
- Nocardia yamanashiensis* Kageyama *et al.* 2004, sp. nov.
- Rhodococcus* Zopf 1891 (Approved Lists 1980), *genus*.
- Rhodococcus aetherivorans* Goodfellow *et al.* 2004, sp. nov.
- Rhodococcus aichiensis* corrig. Tsukamura 1983, sp. nov.
- Rhodococcus aurantiacus* (ex Tsukamura and Mizuno 1971) Tsukamura and Yano 1985, sp. nov., nom. rev.
- Rhodococcus baikonurensis* Li *et al.* 2004, sp. nov.
- Rhodococcus bronchialis* (Tsukamura 1971) Tsukamura 1974 (Approved Lists 1980), *species*.
- Rhodococcus chlorophenicus* Apajalahti *et al.* 1986, sp. nov.
- Rhodococcus chubuensis* Tsukamura 1983, sp. nov.
- Rhodococcus coprophilus* Rowbotham and Cross 1979 (Approved Lists 1980), *species*.
- Rhodococcus corallinus* (Bergey *et al.* 1923) Goodfellow and Alderson 1977 (Approved Lists 1980), *species*.
- Rhodococcus corynebacterioides* (Serrano *et al.* 1972) Yassin and Schaal 2005, comb. nov.
- Rhodococcus equi* (Magnusson 1923) Goodfellow and Alderson 1977 (Approved Lists 1980), *species*.
- Rhodococcus erythropolis* (Gray and Thornton 1928) Goodfellow and Alderson 1979 (Approved Lists 1980), *species*.
- Rhodococcus fascians* (Tilford 1936) Goodfellow 1984, comb. nov.
- Rhodococcus globerulus* Goodfellow *et al.* 1985, sp. nov.
- Rhodococcus gordoniae* Jones *et al.* 2004, sp. nov.
- Rhodococcus jostii* Takeuchi *et al.* 2002, sp. nov.
- Rhodococcus koreensis* Yoon *et al.* 2000, sp. nov.
- Rhodococcus luteus* (ex Söhngen 1913) Nesterenko *et al.* 1982, sp. nov., nom. rev., comb. nov.
- Rhodococcus maanshanensis* Zhang *et al.* 2002, sp. nov.
- Rhodococcus marinonascens* Helmke and Weyland 1984, sp. nov.
- Rhodococcus maris* (ex Harrison 1929) Nesterenko *et al.* 1982, sp. nov., nom. rev., comb. nov.
- Rhodococcus obuensis* Tsukamura 1983, sp. nov.
- Rhodococcus opacus* Klatter *et al.* 1995, sp. nov.
- Rhodococcus percolatus* Briglia *et al.* 1996, sp. nov.
- Rhodococcus pyridinivorans* Yoon *et al.* 2000, sp. nov.
- Rhodococcus rhodnii* Goodfellow and Alderson 1979 (Approved Lists 1980), *species*.
- Rhodococcus rhodochrous* (Zopf 1891) Tsukamura 1974 (Approved Lists 1980), *species*.
- Rhodococcus roseus* (ex Grotenfelt 1889) Tsukamura *et al.* 1991, sp. nov., nom. rev.
- Rhodococcus ruber* (Kruse 1896) Goodfellow and Alderson 1977 (Approved Lists 1980), *species*.
- Rhodococcus rubropertinctus* (Hefferan 1904) Tsukamura 1974 (Approved Lists 1980), *species*.
- Rhodococcus sputi* Tsukamura 1978 (Approved Lists 1980), *species*.
- Rhodococcus terrae* (Tsukamura 1971)

Tsukamura 1974 (Approved Lists 1980), *species*.

Rhodococcus tukisamuensis
Matsuyama *et al.* 2003, sp.
nov.

Rhodococcus
wratislaviensis (Goodfellow
et al. 1995) Goodfellow *et*
al. 2002, comb. nov.

Rhodococcus yunnanensis
Zhang *et al.* 2005, sp. nov.

Rhodococcus zopfii
Stoecker *et al.* 1994, sp. nov.

TABLA 1.2

Lista de Especies Aprobadas que Aún no Han Sido Incluidas (Euzeby 2005) Revisión hasta el 24 de mayo del 2005.

"*Nocardia anaemiae*" Kageyama *et al.*, sp. nov. — Proposed type strain: strain IFM 0323 = NBRC 100462 = JCM 12396 = DSM 44821. — Reference: KAGEYAMA (A.), YAZAWA (K.), NISHIMURA (K.) and MIKAMI (Y.): *Nocardia anaemiae* sp. nov. isolated from an immunocompromised patient and the first isolation report of *Nocardia vinacea* from humans. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi*, 2005, **46**, 21-26.

"*Nocardia mexicana*" Rodríguez-Nava *et al.*, sp. nov. — Proposed type strain: strain CIP 108295. — Reference: RODRÍGUEZ-NAVA (V.), COUBLE (A.), MOLINARD (C.), SANDOVAL (H.), BOIRON (P.) and LAURENT (F.): *Nocardia mexicana* sp. nov., a new pathogen isolated from human mycetomas. *J. Clin. Microbiol.*, 2004, **42**, 4530-4535.

GÉNERO *Nocardia*

Aspectos taxonómicos

El género *Nocardia*, fue descrito por primera vez por Trevisan en 1889, las especies patógenas responsables de actinomicetomas son *N.asteroides*, *N.brasiliensis*, *N.otitidiscaviarum*, siendo mas comúnmente registradas en la clínica.

N.brasiliensis es el segundo actinomiceto mas frecuentemente aislado, asociado a infecciones cutáneas, después de *N.asteroides*.

La identificación convencional a nivel clínico de especies de *Nocardia*, incluye: examen microscópico, para determinar la morfología se utiliza la tinción de Gram, y ácido resistencia por las técnicas de Ziehl Neelsen, y/o Kinyoun, además de cuatro pruebas de hidrólisis de xantina, hipoxantina, tirosina y caseína, la descomposición de urea y resistencia a lisozima.

La susceptibilidad a los antibióticos, sigue siendo hasta la fecha, un análisis para la selección de antimicrobianos adecuados para un tratamiento determinado, no se le da un carácter taxonómico en la clínica. Han surgido especies nuevas, basadas principalmente en la sensibilidad a los antibióticos y estudios de biología molecular, Wallace *et al* (1995) describen un taxón dentro de *N.brasiliensis* y apoyada en una resistencia inusual a la minociclina en aislamientos de *Nocardia* de casos clínicos, la clasificación existente de *N.asteroides*, han utilizado el criterio de sensibilidad a los antibióticos, para poder separar grupos altamente heterogéneos, como lo es *N.asteroides*, se han definido seis grupos dentro de *N.asteroides*, estudios a nivel molecular, Conville *et al* (2000) demuestran diferencias en estos criterios.

N.asteroides, tiene definidos seis patrones de identificación de acuerdo a la susceptibilidad a los antimicrobianos Wallace, et al. 1988:

- I. Ampicilina, carbencilina y cefalosporinas, resistentes a ciprofloxacina, más de la mitad resistentes a imipenem.
- II. Igual en susceptibilidad al tipo I, pero susceptible a ciprofloxacina.
- III. Susceptible a ampicilina pero resistente a carbencilina y susceptible a eritromicina (*N.nova*).
- IV. Resistentes a amikacina y pueden hidrolizar hipoxantina.
- V. Resistente a penicilinas y cefalosporinas, pero susceptible a ciprofloxacina (*N.farcinica*).
- VI. Resistente a penicilinas y cefoprofloxacina, pero susceptible a cefalosporinas

La similitud existente entre *N.asteroides*, *N.nova* y *N.farcinica* (Wallace, *et al* 1991), ha obligado a la búsqueda de criterios adicionales que contribuyan a su separación, la susceptibilidad a los antibióticos es uno de ellos. No es contundente la clasificación con estos criterios, ya que existe una gran heterogeneidad en el grupo de *N.asteroides*, La resistencia a los antibióticos a contribuido a resolver la controversia existente entre *N.asteroides* y *N.farcinica*, a quienes se le separa fácilmente en el grupo V de acuerdo con Wallace *et al* (1990). Estos criterios, junto con técnicas de biología molecular, contribuyeron a la descripción de *N.pseudobrasiliensis* a partir de *N.brasiliensis* por Wallace *et.al* (1995).

Roth et al (2003), hace un estudio filogenético de 74 cepas de *Nocardia*, donde se incluyen, cepas tipo de *N.asteroides* y cepas de referencia de la mayoría de las que conforman el grupo de *Nocardia* validadas, utilizando una identificación molecular por 16S rADN, bioquímicas y susceptibilidad a los antibióticos, se encontraron 10 taxones sin clasificar, en los cuales es necesaria una revisión más profunda, ya que son cepas asignadas como *N.asteroides*.

N.carnea, *N.transvaliensis* y *N.otitidiscaviarum* no son fácilmente separables por pruebas convencionales, y muchas veces son diagnosticados como *N.asteroides*. A nivel clínico, son fácilmente

separables *N.asteroides* y *N.brasiliensis*, utilizando pruebas bioquímicas convencionales, no se busca otro actinomiceto, a menos que haya alguna prueba cruzada.

El advenimiento de la biología molecular, trajo consigo un mayor conocimiento del genoma, de ahí, la revisión de diversas especies -ya identificadas previamente-, utilizando técnicas de biología molecular (PCR-RFLP, 16S ribosomal, hibridación ADN:ADN, (Roth et al, 2003) a sí como estudios quimiotaxonómicos (McNabb, et al 1997), siguen demostrado la gran heterogeneidad del género *Nocardia*.

La similitud bioquímica de las especies de *Nocardia*, hacen difícil su identificación con pruebas bioquímicas convencionales, las especies nuevas, descritas por biología molecular, no son identificables por pruebas convencionales como lo es la *N.cyriaciageorgica* reportada por Yassin et al (2001), o la *N.puris* reportada por Yassin et al (2003) Los estudios taxonómicos de colecciones de *Nocardia*, previamente definidos, arrojan nuevas especies, como la propuesta por Rodríguez et al, (2004), *Nocardia mexicana*, o por Wallace et al (1995), *N.pseudobrasiliensis*, a partir de especies descritas como *N.brasiliensis*. A partir del ADN es posible identificar, rápidamente nuevas especies, aunque no es una tecnología que se tenga en los laboratorios clínicos convencionales.

Adicionalmente a estas pruebas, desde hace 15 años, las Galerías de Asimilación de Substratos, pruebas enzimáticas (Biehle et al 1996, Biehle et al 1997, Bizet et al 1997, Muir et al 1997), substratos fluorogénicos (Hamid, et al, 1994), han sido descritos como bacterias de pruebas, tanto con fines de identificación, como taxonómicos para las diferentes especies de Actinomicetos (Khan et al 1998), pero no han sido suficientes para incorporarse a las rutinas de los laboratorios clínicos, tanto particulares como de hospitales, siendo las bioquímicas convencionales, características morfológicas macroscópicas y microscópicas, los primeros criterios a nivel clínico para identificar Actinomicetos.

Kiska, et al (2002), propone un esquema de identificación de 4 a 7 días para 8 especies de *Nocardia* de interés médico, que incluye *N.nova*, *N.asteroides* I, *N.asteroides* VI, *N.asteroides* IV, *N.farcinica*, *N.otitidiscaviarum*, *N.brasiliensis*, *N.pseudobrasiliensis*, *N.transvaliensis* y *N.brevicatena*, las pruebas comprenden, susceptibilidad a los antibióticos, gentamicina, tobramicina, amikacina y eritromicina, por el método de Kirby-Bauer, opacificación en agar Middelbrook 7H11 (7 días), liquefacción de gelatina, utilización de acetamida y citrato, producción de arilsulfatasa, las galerías de asimilación API 20C (4 a 7 días) tienen 19 substratos, pero solamente 7 substratos ayudan a identificar especies, glucosa, glicerol, galactosa, N. acetil-glucosamina, inositol, adonitol y trealosa, así como crecimiento a 35°/45°C, no es posible utilizar una sola batería de pruebas, son necesarias pruebas complementarias, ya que con la sensibilidad a antimicrobianos y las galerías, no todas las especies pudieron separarse, ya que presentan similitudes bioquímicas, siendo el perfil muy similar, traslapándose los resultados.

Existen otros criterios que pueden ayudar a identificar algunas especies de Actinomicetos, como lo son los ácidos grasos, se han podido separar especies ya clasificadas, como lo demuestran MacNaab et al ,(1997) de aislamientos de *N.asteroides*, han sido separadas especies de *N.farcinica*, *N.nova*, *N.brasiliensis*, aunque *N.farcinica* puede ser fácilmente identificable por su capacidad de opacificar el agar Middelbrook,7H11 cepas de *Streptomyces* fueron reclasificadas utilizando este criterio.

A nivel de género, pueden utilizarse criterios como, menaquinonas, ácidos grasos, fosfolípidos, determinación de ac. diaminopimélico, tipo de pared, pero, a nivel clínico, estos criterios quedan fuera de las posibilidades de los laboratorios convencionales.

Existen pruebas no convencionales, como lo son las galerías de identificación, API-ZYM API 20E, BioMerieux ID32C, Muir et al (1997) describen de 293 aislamientos, fueron identificadas especies como *N.asteroides*, *N.brasiliensis*, *N.farcinica*, *N.dassonvillei*, *Streptomyces* y *Rhodococcus*, se pudo observar la existencia de pequeñas discrepancias con los métodos convencionales.

Las pruebas bioquímicas convencionales, siguen siendo las utilizadas en los laboratorios clínicos y en hospitales, la tinción de Gram y la ácido resistencia complementan el diagnóstico, junto con la morfología colonial, muy característica de los Actinomicetos.

Los sustratos de asimilación, no son utilizados en forma convencional como identificación de Actinomicetos, ni tampoco las determinaciones citoquímicas y los estudios de biología molecular, la búsqueda de nuevas técnicas diagnósticas, que determinen en forma rápida y eficiente un Actinomiceto, sigue siendo, hasta la fecha, de gran interés en la investigación de estos microorganismos.

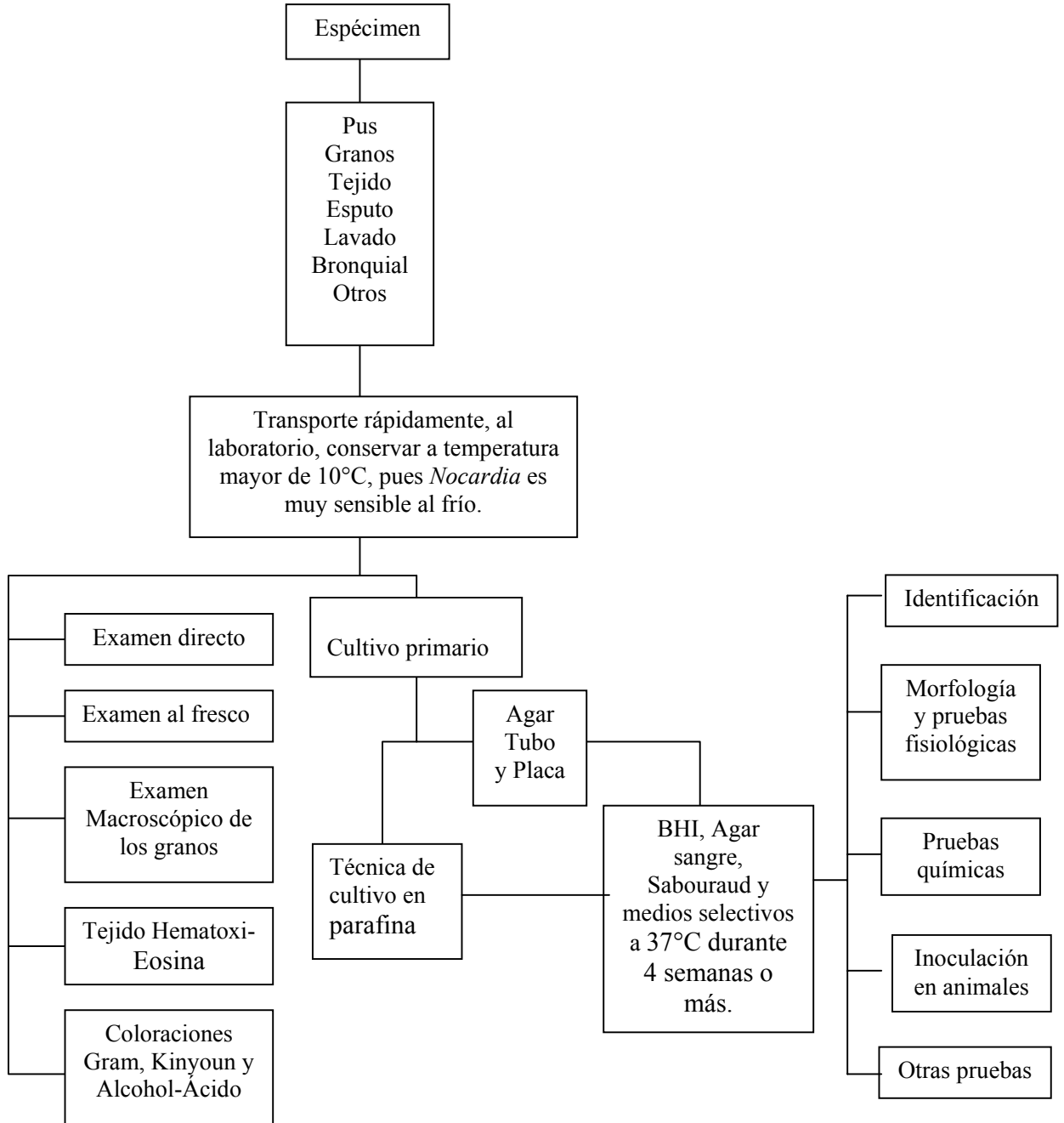
Identificación de actinomicetos patógenos: Examen directo de los granos

A los granos que son expulsados por fistulas de las lesiones del actinomicetoma se les realiza un examen directo, primeramente son examinados macroscópicamente para determinar sus principales características, tales como: tamaño, color, forma o consistencia de los mismos, estos son colocados en una lámina de vidrio, a la cual, sobre la superficie del grano se coloca una gota de NaOH al 10% o de KOH de 10% al 40%, esta concentración va a depender de la consistencia del grano, luego se coloca en una laminilla (cubreobjetos) y se realiza una ligera presión sobre la laminilla, logrando así aplastar al grano, posteriormente se examina al microscopio óptico. De esta manera es posible determinar algunas de las características del granulo tales como: presencia de hifas o de clavos, pigmento, septación de los filamentos, presencia o ausencia de cuerpos esporulados. Estas preparaciones pueden ser coloreadas con Gram o Kinyoun. Los granos también pueden ser obtenidos de los materiales de biopsia de las lesiones, bien sean de muestras de tejido obtenidos de manera quirúrgica o de muestras obtenidos por biopsia o aspiración con agujas finas. Los granos representan materia prima para lograr cultivos de microorganismos que constituyen los agentes etiológicos del actinomicetoma. (ver diagrama 1). (ver capítulo II del libro)

Para el cultivo de los granos, estos son lavados en solución fisiológica estéril con o sin antibióticos, luego inoculados en los medios líquidos de cultivo, tales como BHI, sabouraud's o dextrosa agar o caldo peptona extracto de levadura e incubados a 37°C y 25°C, debido a que la temperatura óptima de crecimiento difiere entre los diferentes agentes etiológicos. (Serrano-Sandoval 2005)

En el diagrama 1.2 y la tabla 1.3 se pueden observar las características fisiológicas y bioquímicas que permiten el diagnóstico y diferenciación de los actinomicetos aerobios.

DIAGRAMA 1.1
(Serrano y Sandoval 2005)



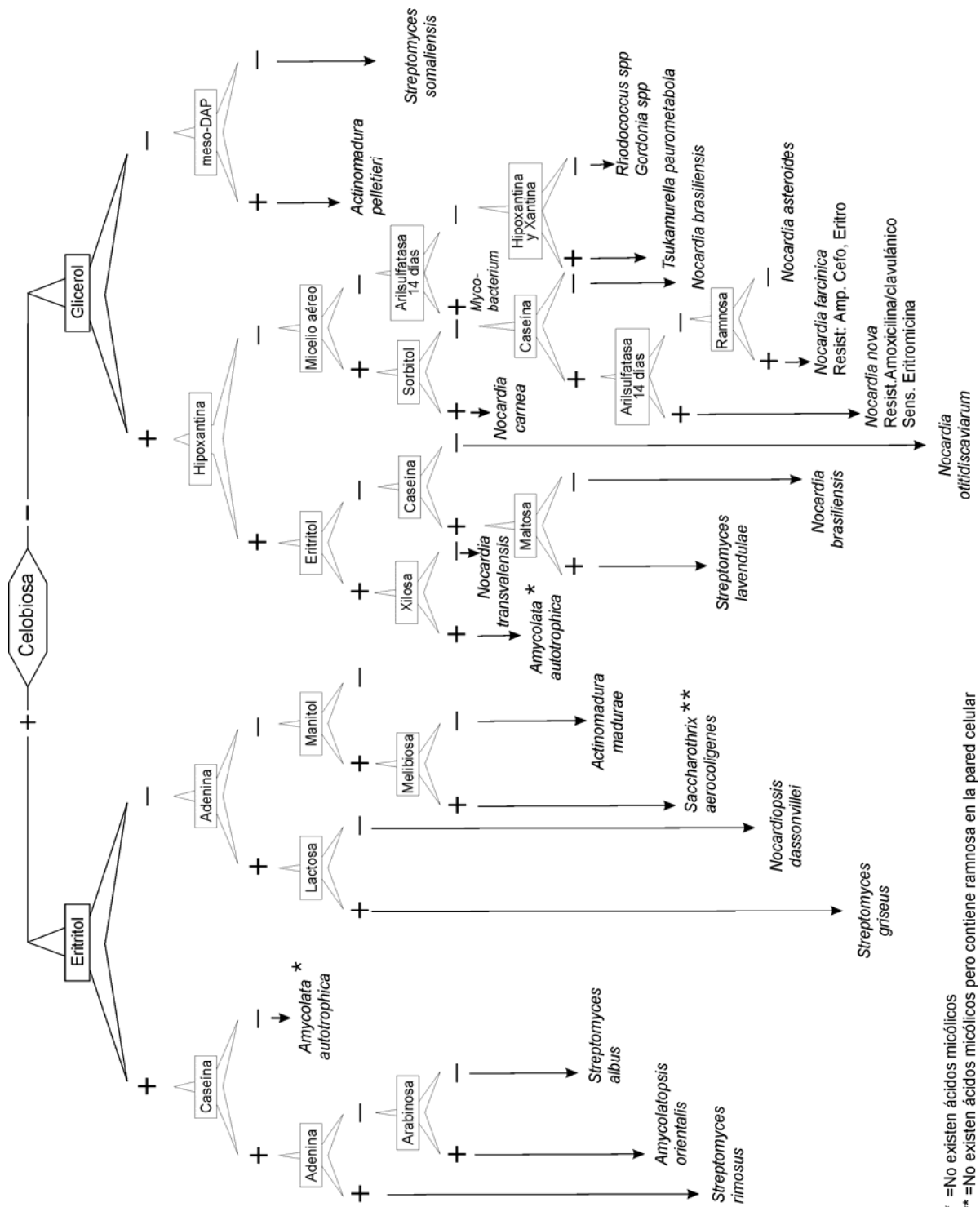


DIAGRAMA 1.2
McNeil y Brown, 1994.

* =No existen ácidos micólicos

** =No existen ácidos micólicos pero contiene rammosa en la pared celular

TABLA 1.3
CARÁCTERÍSTICAS PARA DIAGNÓSTICO Y DIFERENCIACIÓN ENTRE ORGANISMOS DE LOS
GÉNEROS *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Nocardia* y *Actinomadura*

CARÁCTERÍSTICAS	<i>Mycobacterium</i>	<i>Rhodococcus</i>	<i>Nocardia</i>	<i>Actinomadura</i>
Producción macroscópica de hifa, aérea evidente	-	-	+	+
Crecimiento a 10°C	-	+	V (2%+)	-
Descomposición de Tirosina	-	V	V	+
β-Lactamasa	V	-	V	-
Sensibilidad a la Penicilina	-	+	V (2%+)	+
Tipo de pared celular	IV	IV	IV	III
Ácido Micólico	+	-	-	-
Ácido Nocardiomicólico				
Tipo A	-	V	+	-
Tipo B	-	V	-	-
Hidrólisis de Caseína	-	-	V	+
Lisozima	+	+	-	+
Contenido de G + C del DNA	64 - 70%	51 - 68%	64.4 67 %	****
+ = 90-100%+; V = 11-89% (BRADLEY, 1971; LECHEVALIER ET. AL., 1971; WAYNE Y CROSS, 1968).				

Características generales

Las principales características de este grupo son: Gram positivas. Algunas especies ácido resistentes a parcialmente ácido resistentes. Aerobios facultativos. No móviles, producen pigmentos; los pigmentos carotenoides son los más comunes y mejor conocidos, las cepas patógenas relacionadas con el actinomicetoma son: *N.asteroides*, *N.brasiliensis*, *N.otitidiscaviarum* y *N.transvaliensis*.

Entre sus características quimiotaxonómicas se encuentran:

Pared celular tipo IV, contienen ácido-meso-DAP,

Patrón de azúcares de pared celular: arabinosa y galactosa, (Tipo A),

Presentan residuos N-glicosilados en su pared celular.

Patrón de ácidos grasos: C 16:0, C 18:0, C 18:1, 10 metil-C 18:0.

Menaquinonas: MK -8(H₄), -9(H₂) y en algunos casos menaquinonas cíclicas

Tipo de fosfolípido. Fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol y fosfatidilmonósido.

Ácidos micólicos de 46 a 60 átomos de carbono, con 3 dobles enlaces y una mayor proporción de cadenas insaturadas.

Tienen Ac. tuberculoesteárico.

Generalmente resistentes a la lisozima. Se reconocen fagos virulentos para pocas especies; se ha reportado evidencia de un sistema lisogénico para al menos una especie.

El contenido de G + C del ADN nocárdico varía de 64-72 moles %. La distribución parece discontinua y puede estar gruesamente correlacionada a los **grupos I, II y III**:

Grupo I: 61-63% de G + C;

Grupo II 66-68% de G + C

Grupo III: 68-72% de G + C.

Nocardia asteroides

Su contenido de G + C del ADN varía de 67.0 - 69.4 moles %. Pertenece al grupo III, Ácido-alcohol resistentes. Resistente al NaCl al 2.5%,

Apariencia macroscópica:

Producen colonias delgadas y escamosas sobre la gelatina nutritiva sin licuarla. Sobre medio a base de sales minerales y glucosa producen colonias delgadas y escamosas, irregulares, de color amarillo naranja. Sobre agar glucosa extracto de levadura, son producidas colonias acumuladas, plegadas, irregulares llegando a ser de color anaranjado rojizo profundo y cubiertas con micelio aéreo blanco.

Apariencia Microscópica: Micelio fino y ramificado, menor de 1 micrómetro de diámetro, frecuentemente fragmenta a cocos y bacilos. Las células son usualmente de ovales a cilíndricas, variando en longitud de acuerdo a la cepa, y algunas veces permanecen intactas. Las esporas observadas por Gordon y Mihm (1958) fueron similares, pero también se han visto células esféricas en cultivos formando esporas.

El grado de fragmentación varía considerablemente. En cultivos viejos el crecimiento micelial en agar nutritivo diluido puede ser clasificado en cinco tipos. El más simple es:

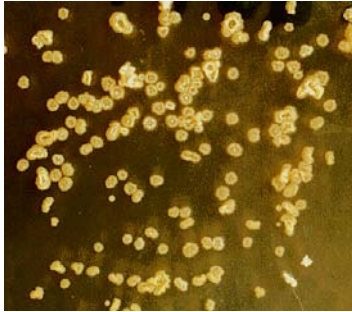
Hifas largas, ramificadas y no fragmentadas.

Hifas fragmentadas y en zig-zag, a veces con formación de estructuras complicadas por ramificaciones laterales parecidas a *Micropolyspora*.

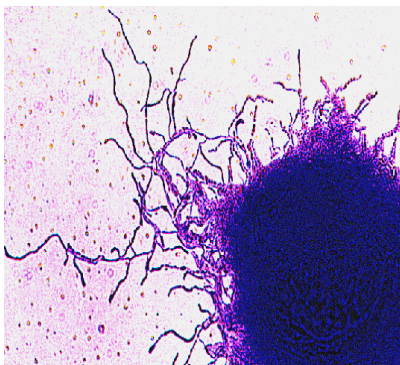
Hifas con muchas ramificaciones cortas y ramificadas o hifas largas, rectas con cierto grado de ramificación.

Ocasionalmente las hifas pueden terminar en espirales o las ramificaciones pueden ocurrir en verticilos.

Fotos de colonias



N. asteroides, Agar BHI



N. asteroides. Tinción de Gram. 100x

La cantidad de micelio aéreo se puede variar cambiando el medio o la temperatura de incubación. La división de las hifas en cadenas de esporas en forma de rosario algunas veces.

La ácido resistencia es variable. Cerca del 70% de los aislamientos son parcialmente ácido resistentes. El número de células que retienen la fucsina fenicada varía del 10% al 80%.

Presentan gránulos metacromáticos, pero al microscopio de luz no se han visto los glóbulos de lípidos observados en microscopía electrónica.

Morfología en material clínico:

Se forman gránulos pequeños, también se pueden observar hifas ramificadas y algunas veces con fragmentación. Las hifas tienen 0.5 a 1.0 micrómetro de diámetro con ramificaciones en ángulo recto pero en ocasiones se ven acúmulos de hifas cuya distribución es generalmente difusa. (ver capítulos 6 y 7 del libro)

Perfil bioquímico.

Fermentan el adonitol, la arbutina, la dextrina, la D-fructuosa, la D-glucosa y la manosa, sin producir gas.

Degrada esculina, alantoína, benzina, los tweens 20, 40, 60 y la urea. Las siguientes sustancias sirven como únicas fuentes de carbono y energía: el ácido adipico, la D-fructosa, la D-glucosa, el glicerol, la maltosa, el manitol, la manosa, la parafina, el ácido sebácico, el acetato de sodio, el butirato de sodio, el malato-H de sodio, el propionato de sodio, el piruvato de sodio, el succinato de sodio y la testosterona.

Utilización de fuentes de carbono de acuerdo con Wink (2002).

Glu	Ara	Suc	Xyl	Ino	Man	Fru	Rha	Raf	Cel
+	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-

Glu: glucosa, **Ara:** arabinosa, **Suc** sacarosa, **Xyl**, xilosa, **Ino:** inositol, **Fru:** fructosa, **Rha:** ramnosa, **Raf:** rafinosa, **Cel:** celobiosa.

Enzimas: Galerías API-ZYM

Ge	Cit	Ure	Arg	Onp	Trp	Lys	Odc	VP	Ind	H₂S
-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Ge: gentobiosa, **Cit:** citrato, **Ure:** urea, **Arg:** arginina, **Onp:** orto-nitro-fenil-D-galactopiranosido., **Trp:** triptofano, **Lys:** lisina, **Odc:** ornitina **VP:** Voges-Proskawer, **Ind:** indol, **H₂S:** ácido sulfhídrico

Alcaliniza la leche tornasolada en una semana, no hay cambio posterior. Reducen el nitrato. Crece en un rango de temperatura: 10 - 50°C, su temperatura óptima es de 28 - 30°C con un rango de pH: 6.0-- 10.0 siendo su pH óptimo de 7.5. El crecimiento no es inhibido por 7% de sales, no es sensible a la penicilina (discos de 5 UI). Es resistente a la lisozima. (Wink, 2002).

Los aislamientos (diferentes cepas) de este organismo difieren marcadamente en patogenicidad para ratones. La mayoría de las cepas requieren de un adyuvante antes de que ocurra la invasión de tejido. Sin embargo, algunas cepas matan ratones por intoxicación aguda en 1 ó 2 días. Los conejos y cobayos son más susceptibles que los ratones.

Beaman y col. (1987), aislaron una cepa patógena de *N.asteroides* denominada *N.asteroides* GUH2, infecta el cerebro de los ratones después de una inyección intravenosa. Los ratones se recuperan de una dosis subletal (2.7×10^5 UFC/ratón), el número de bacterias se mantiene constante de 48 a 120 h post-infección, seguido de una disminución gradual, a los 13 días de la inoculación, el cerebro, aparentemente esta estéril pero muestra signos de daño neurológico similar a la sintomatología que presenta en el mal de Parkinson (Kohbata and Beaman 1991).

Nocardia brasiliensis

Parcialmente ácido resistente. Grupo morfológico III.

El contenido de G + C del ADN varía de 67 - 68 moles %.

Cepa de referencia: (Lindenberg 1909) (Pinoy 1913) ATCC 19296, DSM 43758, (citado por Wink, 2002)

N.brasiliensis, ha sido considerada como una especie homogénea, aunque, en, Wallace *et al* 1995, describieron un nuevo taxón de *Nocardia*: *N.pseudobrasiliensis*, definido a partir de aislamientos de *N. brasiliensis*, utilizando endonucleasas de restricción “65 kDa heat shock protein gene”, DNA16S, homología ADN:ADN.

Rodríguez-Nava, et al, (2004) describieron una nueva especie *N. mexicana* a partir de un cepas, previamente identificadas como *N. brasiliensis*.

N. brasiliensis es de lento crecimiento, es saprófito del suelo, puede ser aislado utilizando el método de parafina, o Sauton-UAM-X, (Sandoval, et al 1997), se requiere el uso de antibióticos (antifúngicos y antimicrobianos), puede crecer en medio Sabouraud, mycosel, Muller Hinton y BHI.

Apariencia macroscópica:

Las colonias en agar nutritivo son de color anaranjado sucio, granulares, acumuladas con hifa aérea escasa y blanca en los bordes.

Sobre agar nitrato glicerol las colonias son acumuladas, de color coral con micelio aéreo escaso en los márgenes.

Sobre agar extracto de levadura glucosa, las colonias son de color amarillo a naranja o color tostado (canela), elevadas, plegadas. La producción de hifa aérea blanca es variable, de nula a abundante dependiendo de la cepa. En cultivos viejos puede llegar a producirse un pigmento soluble amarillo. Crecimiento anaranjado tostado, seco, granulado, con micelio aéreo escaso y blanco sobre la superficie de un pedazo de papa.



N. brasiliensis. Agar BHI.

Apariencia microscópica.

Presenta filamentos ramificados formando micelio extensivo sobre la mayoría de los medios, alrededor de 1 μm de diámetro. La fragmentación empieza en el centro de la colonia después de alrededor de 4 días de incubación y produce células bacilares y cocoides irregulares. El micelio vegetativo de color amarillo-anaranjado a café con hifa aérea delgada y blanca sobre la superficie. Las colonias son granulares, acumuladas, convolutas. Producen un exopigmento amarillo pardo sobre la mayoría de los medios orgánicos.

Morfología en material clínico

Produce gránulos multilobulados observables en material clínico, así experimentalmente en ratones blancos, cobayos y conejos, la *N. brasiliensis* puede ser aislada de materiales clínicos de diversos tipos de infecciones bien localizadas (actinomicetoma) o sistémicas. (ver capítulos VI y VII de este libro)

Perfil Bioquímico

Fermentan la arbutina, la D-arabinosa, la D-fructosa, la D-galactosa, el DL-inositol, la glucosa, el glicerol, el manitol, la manosa, el sorbitol y la trealosa. Hidroliza la esculina, la caseína, la gelatina, la guanina, la hipoxantina, la queratina, la tirosina y la urea, sin producción de gas.

Las siguientes sustancias sirven como únicas fuentes de carbón y energía: el acetato, el butirato, el citrato, la D-fructosa, la D-galactosa, la glucosa, el inositol, el malato, la maltosa, el manitol, la manosa, la parafina, la L-prolina, el propionato, el piruvato, el ácido sebácico, el sorbitol y el succinato.

Coagulan en forma lenta a la leche tornasolada, seguida de peptonización alcalina, con producción de película amarillo-naranja. Reducen el nitrato.

Crecen en un rango de temperatura: 10 - 45°C, no crece a 50°C, su rango de pH es de 6.0 - 9.0. Crece bien en 5% de cloruro de sodio. Completamente inhibido a 7% de cloruro de sodio. No sensible a penicilina (discos de 5 UI). Resistente a la lisozima.(Wink 2002).

Utilización de fuentes de carbono de acuerdo Wink (2002).

Glu	Ara	Suc	Xyl	Ino	Man	Fru	Rha	Raf	Cel
+	-	-	-	+	-	(+)	-	-	-

Glu: glucosa, **Ara:** arabinosa, **Suc** sacarosa, **Xyl,** xilosa, **Ino:** inositol, **Fru:** fructosa, **Rha:** ramnosa, **Raf:** rafinosa, **Cel:** celobiosa.

Enzimas: Galerías API-ZYM

Ge	Cit	Ure	Arg	Onp	Trp	Lys	Odc	VP	Ind	H ₂ S
+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Ge: gentobiosa, **Cit:** citrato, **Ure:** urea, **Arg:** arginina, **Onp:** orto-nitro-fenil-D-galactopiranosido:, **Trp:** triptofano, **Lys:** lisina, **Odc:** ornitina **VP:** Voges-Proskawer, **Ind:** indol, **H₂S:** ácido sulfhídrico

Nocardia otitidiscaviarum (N.caviae)

Cepa de referencia: Snijders 1924. status: Aprobada ATCC 14629 y DSM 42242 (citado por Wink, 2002)

El contenido de G + C del ADN es 65.4 moles %.Grupo III, ácido resistentes en ciertos medios, como el agar ácido oléico de Dubos.

Apariencia macroscópica

Las colonias sobre agar nutritivo son elevadas, convolutas, irregulares y duras; de color rosa sucio. Micelio aéreo delgado y blanquecino en cultivos más viejos

Fotografía de la colonia



N.otitidiscaviarum en agar BHI

Apariencia microscópica

Fragmentos miceláneos cocoides y bacilares producen extensivamente microcolonias ramificadas. La fragmentación es retardada por 5 días, permitiendo el desarrollo de micelio aéreo y vegetativo abundante. Este último es ramificado y algunas veces enrollado.

Los fragmentos bacilares son producidos en el centro de la microcolonia y la división celular se produce a una tasa acelerada con las colonias envejecidas. Tanto el micelio aéreo como el vegetativo fragmentan en segmentos hifales más pequeños, algunos de los cuales llegan a ser cocoides en cultivos más viejos.

Crecimiento escaso sobre gelatina nutritiva, no hay licuefacción.

Crecimiento elevado, convoluto, granular e irregular sobre un pedazo de papa. Crecimiento vegetativo grisáceo cubierto con hifa blanquecina aérea.

Perfil bioquímico

Fermentación de la arabinosa, la D-fructosa, la D-glucosa, el glicerol, el inositol, la maltosa, el manitol y la trealosa. Sin producción de gas.

Los siguientes compuestos sirven como única fuente de carbono: la D-fructosa, el glicerol, la maltosa, el manitol, la parafina, el acetato de sodio, el butirato de sodio, el propionato de sodio, el piruvato de sodio, la testosterona y la trealosa.

La hipoxantina, la xantina y la urea son hidrolizadas, coagula y alcaliniza de la leche tornasolada, el nitrato es reducido.

Rango de temperatura: 20 - 45°C. Temperatura óptima: 30°C. Completamente inhibida a 50°C. Rango de pH: 7.0 -10.0, pH óptimo: 7.5. No inhibido por 7% de cloruro de sodio. No sensible a la penicilina (discos con 5 UI). Resistente a la lisozima.

Utilización de fuentes de carbono de acuerdo con Wink (2002).

Glu	Ara	Suc	Xyl	Ino	Man	Fru	Rha	Raf	Cel
+	-	-	-	+	-	-	+	-	-

Glu: glucosa, **Ara:** arabinosa, **Suc** sacarosa, **Xyl,** xilosa, **Ino:** inositol, **Fru:** fructosa, **Rha:** ramnosa, **Raf:** rafinosa, **Cel:** celobiosa.

Enzimas: Galerías API-ZYM

Ge	Cit	Ure	Arg	Onp	Trp	Lys	Odc	VP	Ind	H ₂ S
-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-

Ge: gentobiosa, **Cit:** citrato, **Ure:** urea, **Arg:** arginina, **Onp:** orto-nitro-fenil-D-galactopiranosido:, **Trp:** triptofano, **Lys:** lisina, **Odc:** ornitina **VP:** Voges-Proskawer, **Ind:** indol, **H₂S:** ácido sulfhídrico

Produce el 100% de mortalidad en ratones blancos en un lapso de 7 días, cuando es inyectada con mucina gástrica como adyuvante. Los conejos y cobayos usualmente sobreviven, pero desarrollan lesiones de acuerdo a la vía de inoculación. Aislados de infección del oído de un cobayo en Sumatra y de suelos de los Estados Unidos e India. Diaz-Corrales *et al* (2004), reportan la cepa de GAM 5 *N. otitidiscaviarum* aislada de un paciente con micetoma, capaz de inducir manifestaciones neurológicas, similares a las que se desarrollan en el mal de Parkinson.

Nocardia transvaliensis

Pijper and Pullinger 1927. *Status*, Aprobada. ATCC 6865, DSM 43136, IMET 7500, NCTC 2392. (citado por Wink, 2002)

El contenido de G + C del ADN es 69.0 moles % pertenecen al grupo morfológico III son ácido resistentes.

Apariencia morfológica

Extensivo micelio vegetativo y aéreo, producido por elementos bacilares germinados. La fragmentación es retardada por 5 o más días, así las microcolonias resultan del micelio esparcido. El estroma vegetativo está algo sombreado de rosa a naranja sobre la mayoría de medios y el micelio aéreo es blanco. La hifa vegetativa en bastones más cortos como lo hace el micelio aéreo. forman gotitas de exudado incoloras en la mayoría de medios de cultivo.

Crecimiento pobre sobre agar nutritivo, colonias rosadas pequeñas, llegando a estar cubiertas con hifa aérea blanca con el paso del tiempo.

Crecimiento pobre sobre agar almidón, no hay hidrólisis. Sobre una superficie de pedazo de papa el crecimiento es elevado, acumulado, convoluto de color salmón, cubierto con micelio aéreo blanco. Leche tornasolada alcalina; no hay coagulación o peptonización.

Crecimiento escaso sobre gelatina nutritiva, no hay licuefacción. Colonias pequeñas, convolutas sobre agar nitrato glicerol de color coral con hifa aérea blanca escasa. Sobre agar peptona glucosa colonias pequeñas, elevadas, de color salmón con una cubierta delgada de hifa aérea blanca.

Perfil Bioquímico

Hidroliza hipoxantina, tirosina y urea, reduce nitratos. Forma ácido a partir de eritritol, galactosa, glucosa, tienen una temperatura óptima de 28 – 30°C, con rango de pH entre 5 – 8, siendo su pH óptimo de 7.5, son resistentes a la lisozima (100 µg), (Wink 2002)

Utilización de fuentes de carbono de acuerdo con Wink (2002).

Glu	Ara	Suc	Xyl	Ino	Man	Fru	Rha	Raf	Cel
-	-	-	-	+	-	+	+	-	-

Glu: glucosa, **Ara:** arabinosa, **Suc** sacarosa, **Xyl,** xilosa, **Ino:** inositol, **Fru:** fructosa, **Rha:** ramnosa, **Raf:** rafinosa, **Cel:** celobiosa.

Enzimas: Galerías API-ZYM

Ge	Cit	Ure	Arg	Onp	Trp	Lys	Odc	VP	Ind	H₂S
-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-

Ge: gentobiosa, **Cit:** citrato, **Ure:** urea, **Arg:** arginina, **Onp:** orto-nitro-fenil-D-galactopiranosido:, **Trp:** triptofano, **Lys:** lisina, **Odc:** ornitina **VP:** Voges-Proskawer, **Ind:** indol, **H₂S:** ácido sulfhídrico

GÉNERO *Actinomadura*

Aspectos taxonómicos

El género *Actinomadura* fue originalmente propuesto por Lechevalier y Lechevalier (6); en él se agruparon aquellas nocardias que forman un micelio estable y cuyas paredes celulares contienen meso-DAP (tipo A2), sin azúcares características, tienen pared celular tipo III. En la octava edición del manual Bergey's, este taxón fue considerado como un género *Insertae sedis*. Posteriormente fue incluido en la lista de nombres bacterianos aprobados. El género estaba constituido por tres especies: *A.dassonvillei*, *A.maduræ* y *A.pelletieri*, llegando a contener 26 especies. Después, Meyer *et al*, 1970 transfirió *A.dassonvillei* al nuevo género *Nocardioopsis*, como *N.dassonvillei*. El género *Actinomadura* ha sufrido diversas revisiones y reclasificaciones a través del uso de taxonomía numérica, citoquímica y método de sistemática molecular Goodfellow *et al*. (1995); esto ha revelado que el género es muy heterogéneo en su composición, pero podemos destacar que, de las 27 especies validadas para el género *Actinomadura*, solamente 3 tienen un valor clínico-patogénico para los humanos. Una de las tres especies de *A.latina* ha sido propuesta por Trujillo y Goodfellow, (1997), se encuentran ya en la *Lista de Nombres de Bacterias Aprobadas*, (Tabla 1.1) para algunas cepas que previamente habían sido clasificadas como *A.pelletieri*.

Características generales

Son bacterias Gram positivas, quimioorganotróficas, aeróbicas con hifas vegetativas extensamente ramificadas formando un micelio de sustrato denso y no fragmentado; micelio aéreo moderadamente desarrollado o ausente, cuando el micelio aéreo está ausente las colonias tienen un aspecto cartilaginoso o de cuero. El micelio aéreo maduro forma cadenas cortas u ocasionalmente largas de artrosporas. las cadenas de esporas son largas ganchudas (rizos abiertos) o espirales irregulares (1 a 4 vueltas) la superficie de la espora es lisa o verrugosa. El color del micelio aéreo maduro va de blanco, gris a marrón, amarillo, rojo (rosa y rojo), azul, verdoso o violeta.

El rango de temperatura de incubación va de 24 a 45°C, algunas especies crecen a temperaturas del rango termófilo (arriba de 55°C); poseen pared celular tipo III que contiene ácido meso-DAP como principal ácido diaminado y cantidades grandes de galactosa en la mayoría de las especies, aunque algunas especies contienen cantidades pequeñas de ácido L-DAP, el hidrolizado de células intactas contiene el azúcar madurosa, no se encuentran ácidos micólicos, las menaquinonas son predominantemente de los tipos MK-9(H₄) y MK-9(H₆), también pueden encontrarse menaquinonas de los tipos MK-9(H₂) y MK-9(H₈).

Se aíslan de suelos de diferentes regiones, también pueden encontrarse en especímenes clínicos, se sabe que *A.maduræ* y *A.pelletieri* son causantes de actinomicetoma humano en áreas tropicales y subtropicales, particularmente en África y América, se piensa que el hábitat natural de estas especies patógenas de *Actinomadura* es el medio ambiente, particularmente las capas superficiales del suelo a partir de donde invaden el cuerpo humano mediante polvo o partículas contaminadas que penetran en lesiones de las extremidades inferiores, esta es la explicación más aceptada de la etiología del “pie de madura” debido a que esta enfermedad generalmente se localiza en extremidades inferiores, no obstante pueden también presentarse en otras zonas del cuerpo. Se ha reportado que algunas cepas virulentas de *A.maduræ* producen una colagenasa que tiene un papel significativo en la patogenicidad del organismo.

Pueden emplearse muchos medios diferentes para el aislamiento de cepas de *Actinomadura*, especialmente a partir de suelo, los que han resultado más adecuados son: Agar de harina de avena, agar de extracto de levadura-extracto de malta, agar de almidón y sales minerales, agar de Bennett-sacarosa y agar de glicerol-asparagina. Las cepas pueden ser aisladas por técnicas de dilución después de incubación por 14 a 21 días, el enriquecimiento de *Actinomadura* en procedimientos de aislamiento de suelo puede conseguirse por métodos relativamente sencillos que van desde el calentamiento de las muestras de suelo (100°C por una hora) hasta la adición de algunos antibióticos para inhibir el crecimiento de los

contaminantes que comúnmente son *Streptomyces*, los antibióticos que mejores resultados han dado son estreptomina (0.5, 1.0 ó 2.0 µg/ml), rubomicina (5.0, 10.0 ó 20.0 µg/ml) y bruneomicina (0.5, 1.0 ó 2.0 µg/ml).

Actinomadura madurae

Lechevallier y Lechevallier. 1970a. *Actinomadura madurae* cepa tipo NCTC 5654(citado por Wink, 2002)

El contenido de G + C del ADN de este género va de 65 a 69 moles %

Pared Celular: meso-DAP tipo III.

Azúcares asociados a la pared celular: glucosa, galactosa, manosa, ribosa y madurosa.

Fosfolípidos: fosfatidil glicerol y fosfatidil inositol.

Menaquinonas: MK-9(H₆)

Presenta cadenas cortas de espora ganchudas o rizadas en grupos que emergen directamente de la superficie del agar o unidos a hifas aéreas largas, se presentan de 3 a 12 esporas elípticas o redondas de superficie verrugosa por cadena, el crecimiento en agar de harina de avena es bueno, las colonias presentan aspecto de cuero, no se observa micelio aéreo, el micelio vegetativo es incoloro al centro y a menudo rojo en los extremos, no se observan pigmentos difusibles. En agar de extracto de levadura - extracto de malta se observa crecimiento moderado, las colonias tienen aspecto cartilaginoso, no hay micelio aéreo y el micelio vegetativo presenta un color rosa oscuro o café-violáceo, no hay pigmentos difusibles. En agar de almidón y sales minerales el crecimiento es pobre, las colonias tienen superficie granular y no presentan micelio aéreo, el micelio vegetativo es blanco grisáceo sin pigmentos difusibles. En medio de peptona-glucosa el crecimiento es pobre y presenta aspecto cartilaginoso, no hay micelio aéreo, el micelio vegetativo es de rosa a rojo sin pigmentos difusibles, crecen entre 10 y 45°C, su temperatura óptima está entre 28 y 37°C. Se aísla de especímenes clínicos (micetoma) y suelo, el contenido de G + C del ADN es de 66.0 a 68.2 moles %.

Apariencia macroscópica



Actinomadura pelletieri

Cadenas cortas de 2 a 6 esporas esféricas de superficie verrugosa, ganchudas en espirales de dos o tres vueltas en agar de harina de avena se observa crecimiento moderado de superficie cartilaginosa sin micelio aéreo, el micelio vegetativo es de rosa a café rojizo sin pigmentos difusibles. En agar de extracto de levadura-extracto de malta hay crecimiento moderado de superficie cartilaginosa con trazas de micelio

aéreo con hifas estériles, el micelio vegetativo es de rosa a café rojizo sin pigmentos difusibles. En agar de harina de avena-nitrato hay crecimiento moderado de superficie cartilaginosa, micelio aéreo con trazas de hifas esporulativas, el micelio vegetativo es incoloro y no tiene pigmentos difusibles. En medio peptona-glucosa hay crecimiento moderado con superficie cartilaginosa sin micelio aéreo, el micelio vegetativo es café rojizo sin pigmentos difusibles. El contenido de G + C del ADN es de 66.5 a 67.3 moles % TM. (ver capítulos VI, VIII y X en este libro).

GÉNERO *Streptomyces*

Entre las principales características del Género *Streptomyces* se encuentran: Pared Celular: LL-DAP (Tipo I), poseen ácido glutámico, ácido murámico, glucosamina y alanina, carecen de arabinosa en su pared celular.

Ác. grasos: C16:0 iso, C17:0, C17:0 anteiso.

Menaquinonas: MK-9(H₆), MK-9(H₈)

Fosfolípidos: difosfatidilglicerol, fosfatidil-etanolamina, fosfatidil-inositol, manósido.

% de G + C del ADN: 69 – 78 %

Principal cepa patógena *Streptomyces somaliensis* (Brumpt 1906) Eaksman and Herici (1948b,1965) (*Indiella somaliensis* Brumpt 1906, 555) Cepa tipo: ATCC 33201

Los *Streptomyces* son bacterias Gram positivas que forman filamentos extensivamente ramificados que no fragmentan como los de *Nocardia*. Las células son usualmente no ácido resistentes y pueden ser diferenciadas de *Nocardia* con base en un análisis de pared celular.

La pared celular de *Nocardia* contiene arabinosa y ácido meso-diaminopimélico. Todas las cepas de *Streptomyces* carecen de arabinosa y contienen ácido L-diaminopimélico en sus paredes celulares. Los *Streptomyces* son organismos del suelo pero ocasionalmente pueden causar micetoma en el hombre (muy difícil de distinguir del micetoma por *N.brasiliensis*). Los *Streptomyces* forman micelio aéreo con esporas, sin embargo, existen mutantes que no producen esporas sobre el “micelio aéreo” que pueden ser muy difíciles de distinguir de *Nocardia* a menos que el análisis de pared celular sea llevado a cabo.

Los *Streptomyces* son más importantes como fuentes de antibióticos que como patógenos ocasionales en el hombre. Poco más de quinientos antibióticos han sido descubiertos como productos de varios miembros de este género, siendo muchos de éstos de gran valor práctico. De esta manera, los *Streptomyces* son el centro de una industria farmacéutica multimillonaria en dólares.

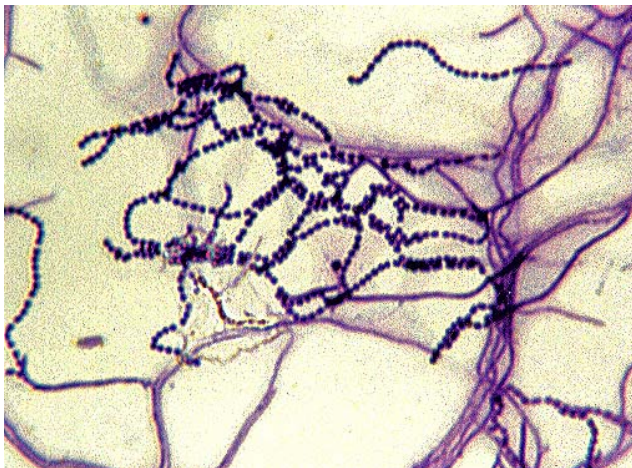
Poseen pared celular del tipo I que contiene glucosamina, ácido murámico, ácido glutámico y alanina y cantidades mayores de ácido L-diaminopimélico (L-DAP) y glicina, llevan a cabo la utilización de caseína, tirosina, gelatina, leche púrpura de bromocresol en 2 semanas a 27°C y es ligeramente positiva para almidón. No utilizan xantina y urea. No forma ácido de lactosa y xilosa. En pus se observan gránulos duros de color amarillo a café, redondos a ovales de 1 - 2 mm de diámetro.

En agar Hickey y Tresner los gránulos pueden ser grandes o diminutos, redondos, densos y homogéneos; pero se tiñen de color púrpura ligero y a menudo son parcialmente rosa en parches; tienden al rompimiento en tiras paralelas, los borde son lisos, suavemente definidos. Crecen lentamente en agar glucosa-Sabouraud a una temperatura óptima de 30°C.



Streptomyces somaliensis en agar BHI

El crecimiento es coriáceo, eventualmente acumulado, plegado, de color crema a café o negro, con micelio aéreo blanquecino. No fragmentada; la hifa aérea puede formar cadenas de conidios características del género.



Streptomyces sp. Tinción de Gram. 100x

GÉNERO *Rhodococcus*

Los *Rhodococcus* constituye un taxón conformado por 12 especies las cuales son: *R.coprophilus*, *R.equi*, *R.erythropolis*, *R.fascians*, *R.globerulus*, *R.marionascens*, *R.opacus*, *R.percolatus*, *R.rhodnii*, *R.rhodocrous*, *R.ruber* y *R.zopfii*. La principal presentación clínica de las infecciones causadas por *R.equi* en humanos es neumonía focal nodular o cavitada, la cual se puede complicar con empiema, derrame pleural, neumotórax o granulomas endobronquiales. *R.equi* también se ha descrito en casos de micetoma (Severo et al 1992).

Las infecciones por *R.equi* son mas frecuentes en hombres que en mujeres con una rata de 3:1 (Kedlaya et al 2001). Aproximadamente 66% de todos los casos clínicos reportados han sido descritos en pacientes portadores de VIH y alrededor de un 10% en pacientes con trasplantes de órganos como complicación por el uso de terapias inmunosupresoras (Weinstock et al 2002), también se ha reportado micetoma en pacientes con VIH (Antinori et al 1992).

El resto de los casos han sido reportados en pacientes inmunocomprometidos por otras causas tales como: diabetes, insuficiencia renal, linfoma, leucemia, cáncer pulmonar y alcoholismo (24, 28). Tan solo 19 casos han sido descritos en pacientes inmunocompetentes de los cuales 6 correspondieron a pacientes pediátricos (Nasser et al 2001, Kedlaya et al 2001). La mortalidad por *R.equi* en pacientes inmunocompetentes es de 20 a 35% mientras que en pacientes inmunocomprometidos se eleva hasta mas de un 50% (Kohl et al 2002).

Son catalasa positivos y sensibles a la lisozima. Presentan un tipo de metabolismo oxidativo de los carbohidratos. Son arilsulfatasa negativas, y no son capaces de degradar la caseína, la celulosa, la quitina, la elastina, la xantina o el xilán. No contienen micobactinas. Su pared celular contiene ácidos micólicos con 34 a 52 átomos de carbono y hasta 3 dobles enlaces y siendo la mayor parte de la cadena de carbonos de tipo saturada e insaturada y con la presencia de ácidos grasos 10-metil-ramificado (ácido tuberculoesteárico).

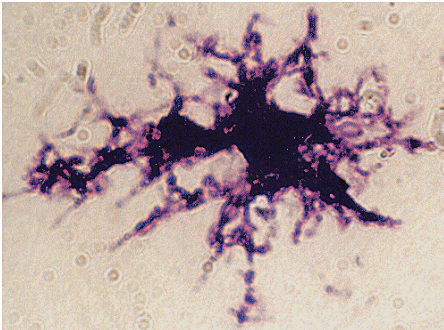
Los ésteres de ácidos grasos liberados por pirólisis y cromatografía de gases de los ésteres micólicos presentan de 12 a 18 átomos de carbono. Las células contienen como fosfolípidos principales al: disfosfatidil-glicerol, fosfatidil-etanolamina y fosfatidilinositol-dimánósidos. Como menaquinonas presentan el tipo de las menaquinonas deshidrogenadas con 8 unidades de isopropeno (MK-8(H₂)). Presentan una relación de G+C de 67 a 73 mol%.(Sánchez et al 2004)

Apariencia macroscópica



Rhodococcus rhodochrous, Agar BHI

Apariencia microscópica



Rhodococcus sp. tincion de Gram. 100x,

Bibliografía:

Antinori S., Esposito r., Cernuschi M., Galli M., Galimberti L, Tocall L., Moroni M.,1992. Disseminated Rhodococcus equi infection initially presenting as foot micetoma in an HIV-positive patient. AIDS 6(7):790-2

Beaman, B. L., and S.E. Moring. 1988. Relationship among cell wall composition, stage of growth and virulence of *Nocardia asteroides* GUH-2. Infect. Immun. 56:557-563.

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th edn, eds Buchanan R. E. Gibbons, N. E. Williams & Wilkins, Baltimore, 1974.

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th edn, eds Buchanan R. E. Gibbons, N. E. Williams & Wilkins, Baltimore,

Biehle, J.R., Stephen J.C., Felland T. and Zimmer B.L., 1996. Novel Method for Rapid Identification of *Nocardia* Species by Detection of Preformed Enzymes. J.Clin.Microbiol. 34(1):103-107.

Bizet C, Barreau C, Harmant C, Nowakowski M, Pietroid A. 1997. Identification of *Rhodococcus*, *Gordona* and *Dietzia* species using carbon source utilization test ("Biotype-100" strips). Res Microbiol. 148(9):799-809..

McNeil M.M., Brown J., 1994. The medically important aerobic Actinomycetes: Epidemiology and microbiology. Clin.Microbiol.Reviews. 7(3):357-417.

Conville PS, Fischer SH, Cartwright CP, Witebsky FG., 2000. Identification of *Nocardia* species by restriction endonuclease analysis of an amplified portion of the 16S rRNA gene. 38(1):158-64.

Diaz-Corrales F.J., Colasante C., Contreras Q., Puig M., Serrano J.A., Hernández L., Beaman G.L., 2004. *Nocardia otitidiscaviarum* (GAM-5) induces parkinsonian like alterations in mouse. Braz. J.Med.Biol. Res. 37(4):539-48.

Euzéby, J.P., List of Bacterial names with standing in nomenclature. Dirección URL: <http://bacterio.cict.fr>,

Goodfellow, M.; Trujillo, M. E. and Alderson, G.: Approaches towards the identification of sporoactinomycetes that cause actinomycetoma. The Biology of the Actinomycetes eds DeBabov V.G, Dudnik Y.V, Danilenko VN, All Russia Scientific Research Institute for Genetics, Moscow. 271-86, 1995.

Hamid M.E., Chun J., Magee J.G., Minnikin D.E., Goodfellow M. 1994. Rapid characterisation and identification of mycobacteria using fluorogenic enzyme test. Zentralbl Bakteriol. 280(4):476-87.

Khan Z.U., Chugh T.D., Chandy R., Provost F., Boiron P. 1998. A study of the enzymatic profile of soil isolates of *Nocardia asteroides*. Mycopathologia. 143(3):151-4.

Kiska DL, Hicks K, Pettit DJ., 2002. Identification of Medically relevant *Nocardia* species with an Abbreviated Battery of Tests. J.Clin.Microbiol. 40(4):1346-1351.

Kohbata S., and Beaman B.L., 1991. L-Dopa-responsive movement disorder caused by *Nocardia asteroides* localized in the brains of mice. Infect Immun. 59:181-191.

McNabb A., Shuttleworth, R., Beheme, R., and Colby D.W., 1997. Fatty acid characterization of rapidly growing pathogenic aerobic Actinomycetes as a means of identification. J.Clin.Microbiol. 35(6):1361-1368.

Meyer, J.: Genus *Actinomyces* Lechevalier and Lechevalier 1970a, 400 al , Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol 4, ed. Williams ST, Williams & Wilkins, Baltimore. 2511-26.

Muir, D.B., Pritchard, R.C., 1997. Use of bioMérieux ID 32C Yeast Identification System for Identification of Aerobic Actinomycetes of Medical Importance. J.clin.Microbiol.35(12):3240-3243.

- Nasser A.A, Bizri AR. 2001 Chronic scalp wound infection due to *Rhodococcus equi* in an immunocompetent patient. *J. Infect.* 42:67-8.
- Kedlaya, I.J., Ing M.B., Wong S.S. 2001. *Rhodococcus equi* infections in immunocompetent host: case report and review. *Clin Infect Dis* 32:e39-e46.
- Pottumarthy S., Limaye A P, House YB, Swasy SR, Cookson GT. 2003. *Nocardia veterana*, a new emerging pathogen. *J. Clin. Microbiol.* 41(4):1705-9.
- Rodriguez-Nava V., Couble A, Molinard C., Sandoval T.H., Boiron P., Laurent F., 2004. *Nocardia mexicana* sp. nov. A new pathogen isolated from human mycetomas. *J. Clin Microbiol* 42(10):4530-4535.
- Roth A, Andrees S, Kroppenstedt RM, Harmsen D, Mauch H. 2003. Phylogeny of genus nocardia based on reassessed 16S rRNA gene sequences reveals under species in and division of strains classified as *Nocardia asteroides* into three established species and two unnamed taxa. 41(2):851-6.
- Sandoval Trujillo AH, Sánchez Saucedo N.L., Ramírez Durán N. y Chavero Berr B. 1997. Design of a new economic method for the isolation of nocardioform actinomycetes from the soil. *J. Mycol. Med.* 7:232-233.
- Serrano, J. A. y Sandoval, H.: Identificación y diagnóstico de Actinomycetales patógenos. Publicaciones del Vicerrectorado Académico de la Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela, 2005.
- Serrano, J. A.; Díaz C., F. y Uzcátegui N., M. 2001. El género *Actinomadura*. Aspectos de su taxonomía, microbiología patológica, clínica y terapéutica. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* 21(2):
- Severo LL., Petrillo V.F., Coutinho L.M., 1987. Actinomycetoma caused by *Rhodococcus* sp. *Mycopathologia.* 98(3):129-31.
- Trujillo, M. E. and Goodfellow, M.: Polyphasic taxonomic study of clinically significant actinomadurae including the description of *Actinomadura latina* sp. nov., *Zentralbl Bakteriologie.* 25: 212-133, 1997
- Wallace R. J. Jr, Brown B.A., Blacklock Z, Ulrico R., Ken J., Brown J.M., McNeil M.M., Onyi, G., Steingrube V.A. and Gibson J. 1995 New *Nocardia* taxon among isolates of *Nocardia brasiliensis* associated with invasive disease. *J. Clin. Microbiol.* 33(6):1528-1533.
- Wallace R. J. Jr, Tsukamura M, Brown B, Brown J, Steingrube VA, Zhang Y, Nash DR. 1990. Cefotaxime-Resistant *Nocardia asteroides* Strains are isolates of the controversial species *Nocardia farcinica*. 28(12):2726-2732.
- Wallace R.J. Jr., Brown B.A., Tsukamura M, Brown J.M and Onyi G. 1991. Clinical and Laboratory Features of *Nocardia nova*. *J. Clin. Microbiol.* 29(11):2407-2411
- Weinstock D.M., Brown A.E. 2002. *Rhodococcus equi*: and emerging pathogen. *Clin Infect Dis.* 34:1379-1385
- Wink, J., 2002. CD: An order in the class of actinobacteria important to the pharmaceutical industry. Electronic manual. The Actinomycetales. Copyright Aventis Pharma Dutschand GmbH.
- Yassin A.F., Straubler B., Schumann P., Schaal K.P., 2003. *Nocardia puris* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol Microbiol.* 53(5) :1595-9.
- Yassin AF., Rainey FA, Steiner U., 2001. *Nocardia cyriacigeorgici* sp. nov. *Int J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 1419-1423

REFLEXIONES SOBRE EL CONCEPTO DE ESPECIE BACTERIANA

Abstract

The bacterial taxonomists have not still reached a general agreement to define the fundamental unit of biological diversity, the species. Lately bacterial taxonomists have improved the methods to define the species like phenotypic and genetic clusters, but the delineation of the species has not been guided by a theory-based concept. For eukaryotes it has been developed a universal concept of species: as a group of organisms whose divergence is constrained by a force of cohesion; the divergence among the different species is irreversible; and they are ecologically different. In the case of bacteria, these universal properties are not sustained by the traditionally defined species, but for a different concept of cluster; the ecotypes. These are defined as populations of organisms that occupy the same ecological niche whose divergence is recurrently purged for the natural selection. The molecular methods suggest that a typical species contains many ecotypes. From this point of view traditional species could be considered more as a genus than a species

A pesar de los extraordinarios éxitos en la Sistemática Bacteriana, aun no se ha alcanzado el consenso para definir la unidad fundamental de diversidad bacteriana: la especie. Los bacteriólogos reconocen que la diversidad bacteriana esta organizada en clusters discretos fenotípicos y genéticos y que están separados por amplias diferencias y a estos se les ha llamado especies (Sneath, 1985). Sin embargo hay que reflexionar si la especie bacteriana debe ser concebida como un simple cluster de organismos fenotípicamente y genéticamente similares o deberíamos considerar que una especie tuviera características específicas tanto desde el punto de vista genético como ecológico, evolutivo y filogenético.

Dados los recientes avances en la tecnología, los taxónomos han inventado métodos avanzados para construir árboles filogenéticos (Hennig, 1966) así como nuevos algoritmos computacionales para implementar dichos métodos (Swofford, 1998) También la tecnología de secuenciación de DNA es ahora realmente accesible, tanto que la investigación taxonómica actual esta basada en las variaciones de la secuencia y en filogenias derivadas de éstas secuencias.

La Sistemática microbiana han construido un árbol universal de la vida, de tal suerte que cualquier organismo recién descubierto puede ser acomodado junto a sus parientes más cercanos (Woese, 2000. DeLong, 2001). Al extremo de que con simples datos de secuencia, frecuentemente se han establecido nuevos taxones y divisiones en el mundo bacteriano (DeLong, 2001). Por otro lado la búsqueda de secuencias nuevas ha permitido descubrir nuevas especies y aun se ha podido caracterizar especies que no ha sido posible cultivar y hasta se les ha dado nombre (Murray, 1995).

En términos generales una especie ya no se considera simplemente como un conjunto de organismos similares; en la actualidad se le define como una unidad fundamental de ecología y evolución con un comportamiento dinámico.

En el caso del Concepto de Especie Biológica de Mayr, una especie es vista como un grupo de organismos cuya divergencia se contrapone a la recombinación entre ellos. Sin embargo no ha sido posible incorporar a la Sistemática Bacteriana en esta u otra teoría. A este respecto la taxonomía numérica basada en características fenotípicas resulta más que un método para delimitar especie, un procedimiento para ahondar en la historia natural de un grupo de bacterias.

En la ultimas tres décadas los taxónomos han incorporado las técnicas de Biología Molecular al arsenal de métodos para delimitar especies, y es así que en los años 70 se adoptó la metodología genética para descubrir las relaciones existentes entre los **clusters**; la hibridación de genomas completos es un método para medir la proporción en que dos genomas son homólogos. Se determinó que cepas de la

misma especie, definida fenotípicamente, casi siempre comparten 70% o más de sus genomas y que cepas de diferentes especies comparten menos del 70% (Johnson, 1973). Es así que un nivel de homología del 70% fue adoptado como *estándar de oro* para determinar si dos cepas deberían ser consideradas de la misma especie (White, 1978. Wayne, 1987).

Los taxónomos han utilizado más recientemente los datos de divergencia de las secuencias de algunos genes, particularmente del gen 16SrRNA, para delimitar a las especies. Stackebrandt y Goebel (Stackebrandt, 1994) encontraron que especies diferentes presentan una diferencia de más del 3% en la secuencia del gen 16S rRNA, confirmado por hibridación DNA:DNA, mientras que cepas con menos del 3% de diferencia podrían considerarse miembros de la misma especie. Así un límite de 3% de diferencia ha sido recomendado como un criterio para determinar a las especies.

Cada especie tiene una “fuerza de cohesión” que se opone a la divergencia genética entre sus miembros (al menos en el caso de animales y plantas sexuadas) esta fuerza cohesiva es el intercambio genético. El problema de la hibridación ha sido resuelto por el Concepto de la Cohesión de las Especies de Meglitsch (Meglitsch, 1954) y Templeton (Templeton, 1989) y se definiría a la especie como un grupo de organismos cuya divergencia es contenida por una o mas fuerzas de cohesión.

Este concepto de cohesión de las especies es muy útil en el caso de definir grupos de bacterias que forman clusters separados fenotípicamente a pesar de su recurrente recombinación entre ellos. En contraste con los animales y plantas, la recombinación genética en las bacterias es altamente promiscua, ya que los animales pierden la capacidad de intercambiar genes cuando su DNA mitocondrial alcanza el 3% de diferencia, sin embargo, las bacterias puede continuar intercambiando genes aun cuando la diferencia entre los DNA sea de 25% (Duncan, 1989. Vulic, 1997. Majeovski, 1999).

Por lo tanto, una especie asexual puede entonces ser entendida como un grupo de organismos cuya divergencia esta constreñida y recurrentemente llevada a las condiciones originales por intermitentes eventos de selección natural.

Se podría considerar que una nueva especie se forma cuando un linaje asexual evoluciona en un nuevo nicho ecológico (usa un conjunto diferente de recursos o microhabitats) de tal manera que ésta nueva especie no puede ser desplazada por mutantes mejor adaptadas de la población original.

Cuando dos poblaciones asexuadas alcanzan un punto de divergencia tal que puedan sobrevivir a los eventos periódicos de selección de cada una, esta fuerza de cohesión no las limitará más y, por lo tanto, pueden considerarse como especies separadas.

En resumen, cualquier especie, sea altamente sexual (como plantas y animales) o asexual como las bacterias estarán sujetas a fuerzas de cohesión. En las especies sexuadas el intercambio genético es la fuerza más importante. En las especies asexuadas la selección natural periódica es una fuerza poderosa que regresa la diversidad genética a un estado basal.

En los años 60s, (Ravin, 1960. Ravin, 1963) se intentó aplicar el Concepto Biológico de Especie a las bacterias; con el considerando de que las bacterias son sexuadas y que pueden intercambiar genes aun con parientes muy lejanos, se definió a la *genoespecie* como un grupo de bacterias que pueden intercambiar genes y la *taxoespecie* como el **cluster** fenotípico fundamental de la Sistemática Bacteriana. Contrariamente a lo que pasa con plantas y animales las *geno* y *taxoespecies* bacterianas no se corresponden: muchos **clusters** conservan sus diferencias fenotípicas a pesar de estar incluidas en la misma *genoespecie* (Ravin, 1963). La falta de correspondencia entre *genoespecies* y *taxoespecies* sugiere que la capacidad de intercambiar genes tiene poco efecto en la evolución fenotípica de las bacterias.

En la actualidad, Frederick M. Cohan (Cohan, 2002) ha planteado una interesante propuesta que se basa en el concepto de *ecotipo* y en el destino de las mutantes que normalmente aparecen en las poblaciones bacterianas.

Un *ecotipo* es un conjunto de cepas que usan los mismos, o similares, recursos ecológicos, de tal manera que una mutante mejor adaptada, que aparezca el seno de ese *ecotipo* puede competir hasta llevar a la extinción al mismo *ecotipo*, pero no afectará a otros *ecotipos*. Por ejemplo, una mutante de un *ecotipo* de *Streptococcus pyogenes* adaptado a vivir en la garganta puede llevar a la extinción a miembros de su mismo *ecotipo* pero no afectará a *ecotipos* estrechamente relacionado pero adaptados a vivir en la piel.

Los *ecotipos* bacterianos así descritos comparten las propiedades fundamentales de las especies, en ambos casos hay una intensa “fuerza de cohesión”. Una vez que diferentes *ecotipos* bacterianos han divergido a tal punto que escapan a los eventos periódicos de selección del otro, entonces no hay mas fuerza de cohesión que pueda prevenir su divergencia, convirtiéndose en *ecotipos* bacterianos ecológicamente distintos y por lo tanto se convierten en linajes evolutivos irreversiblemente separados, cada uno con sus propio destino y tendencia evolutiva (Simpson, 1961. Wiley, 1961. de Queiroz, 1998). Desde este punto de vista una especie bacteriana puede ser entendida como linajes evolutivos mantenidos juntos por periodos de selección *ecotipo*-específico.

Para cumplir con los principales objetivos de la Sistemática; descubrir, describir, y clasificar la diversidad de los organismos vivos, los taxónomos han concluido que la unidad básica de diversidad biológica es la especie; las especies son grupos de organismos cuya divergencia está contrarrestada por una o mas fuerzas de cohesión, son ecológicamente distintas unas de otras y están irreversiblemente separadas. En el caso de las bacterias, estas propiedades universales de las especies no se corresponden con las especies como han sido consideradas tradicionalmente, que se semejarían más a géneros, sino con lo que hemos descrito como *ecotipos* y éstas serían poblaciones de organismos que ocupan el mismo nicho ecológico y cuya divergencia es recurrentemente eliminada por selección natural.

Las especies actuales parecen contener muchos *ecotipos*, y no es de sorprender ya que por décadas los microbiólogos han encontrado considerable variación en los rasgos metabólicos dentro de las especies (Logan, 1984) aun, la hibridación DNA:DNA ha mostrado variación dentro de estas llamadas especies, como ha sido demostrado al secuenciar el genoma de varias cepas de la misma especie (Alm, 1999. Parkhill, 2000. Read, 2000. Tettelin, 2000. Perna, 2001)

Bibliografia:

- Alm RA, Ling LL, Moir DT, King BL, Brown ED, et al. 1999. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 397:176–180
- Cohan F.M. 2002 What are Bacterial Species? *Annu. Rev. Microbiol* 56:457–487
- DeLong E, Pace N. 2001. Environmental diversity of Bacteria and Archaea. *Syst. Biol.* 50:470–478
- de Queiroz K. 1998. The general lineage concept of species, species criteria, and the process of speciation. In *Endless Forms: Species and Speciation*, ed. DJ Howard, SH Berlocher, pp 57–75. Oxford: Oxford Univ. Press
- Duncan KE, Istock CA, Graham JB, Ferguson N. 1989. Genetic exchange between *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*: variable hybrid stability and the nature of species. *Evolution* 43:1585– 1609
- Hennig W. 1966. *Phylogenetic Systematics*. Urbana: Univ. Illinois Press
- Johnson JL. 1973. Use of nucleic-acid homologies in the taxonomy of anaerobic bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 23:308–315
- Logan NA, Berkeley RC. 1984. Identification of *Bacillus* strains using the API system. *J. Gen. Microbiol.* 130:1871–82
- Majewski J, Cohan FM. 1999. Adapt globally, act locally: the effect of selective sweeps on bacterial sequence diversity. *Genetics* 152:1459–1474
- Meglitsch PA..1954. On the nature of species. *Syst. Zool.* 3:491–503
- Murray RGE, Stackebrandt E. 1995. Taxonomic note: implementation of the provisional status *Candidatus* for incompletely described procaryotes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45:186–187
- Parkhill J, Achtman M, James KD, Bentley SD, Churcher C, et al. 2000. Complete DNA sequence of a serogroup A strain of *Neisseria meningitidis* Z2491. *Nature* 404:502–506
- Perna NT, Plunkett G 3rd, Burland V, Mau B, Glasner JD, et al. 2001. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature* 409:529–533
- Ravin AW. 1960. The origin of bacterial species: genetic recombination and factors limiting it between bacterial populations. *Bacteriol. Rev.* 24:201–220,
- Ravin AW.1963. Experimental approaches to the study of bacterial phylogeny. *Am. Nat.* 97:307–318
- Read TD, Brunham RC, Shen C, Gill SR, Heidelberg JF, et al. 2000. Genome sequences of *Chlamydia trachomatis* MoPn and *Chlamydia pneumoniae* AR39. *Nucleic Acids Res.* 28:1397–1406
- Simpson GG. 1961. *Principles of Animal Taxonomy*. New York: Columbia Univ. Press,
- Sneath PHA. 1985. Future of numerical taxonomy. In *Computer-Assisted*

Stackebrandt E, Goebel BM. 1994. Taxonomic note: a place for DNA:DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44:846– 849

Swofford DL. 1998. *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*And Other Methods)*. Version 4. Sunderland, MA: Sinauer

Templeton AR. 1989. The meaning of species and speciation: a genetic perspective. In *Speciation and Its Consequences*, ed. D Otte, JA Endler, pp. 3–27. Sunderland, MA: Sinauer

Tettelin H, Saunders NJ, Heidelberg J, Jeffries AC, Nelson KE, et al. 2000. Complete genome sequence of *Neisseria meningitidis* serogroup B strain MC58. *Science* 287:1809–1815

Vulic M, Dionisio F, Taddei F, Radman M. 1997. Molecular keys to speciation: DNA polymorphism and the control of genetic exchange in enterobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:9763–9767

Wayne LG, Brenner DJ, Colwell RR, Grimont PAD, Kandler O, et al. 1987. Report of the *ad hoc* committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37:463–464

White MJD. 1978. *Modes of Speciation*. San Francisco: Freeman

Wiley EO. 1978. The evolutionary species concept reconsidered. *Syst. Zool.* 27:17– 26

Woese CR. 2000. Interpreting the universal phylogenetic tree. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:8392–96

CAPÍTULO II

ESTUDIO BIOMOLECULAR DEL ACTINOMICETOMA (DIAGNÓSTICO)

Patrick Boiron

Groupe de Recherche "Pathogènes opportunistes et environnement" UMR CNRS 5557 Ecologie Microbienne (Center for Microbial Ecology) Laboratoire de Mycologie Faculté de Pharmacie Université Claude Bernard Lyon 18, avenue Rockefeller 69373. Lyon Cedex 08 – France
(e-mail: boiron@univ-lyon1.fr.)

Abstract

Mycetomas are defined as granulomatous tumor-like lesions, that are often polyfistulized, and of either fungal or Actinomycete in origin. The lesions are caused by the proliferation of the infectious agent within tissues. For a long time, morphological, microscopic, and macroscopic characteristics, combined with some physiological properties of the isolated organisms were the only methods used to identify the specific Actinomycete causing the actinomycetoma. The study of chemotaxonomic characteristics alone is not easily applicable for the routine identification of the strains causing actinomycetomas. The use of molecular techniques such as PCR (polymerase chain reaction) for the identification of genera (PCR-RFLP/rDNA 16S) and species (PCR-RFLP/Hsp 65) constitute important procedures in diagnosis. But these molecular methods developed and published less than one decade ago, need to be re-evaluated. Indeed, the genus *Nocardia* went through a taxonomic revolution during the last ten last years. In this context, identification by direct sequencing of one or more genes (multilocus sequencing) followed by analysis of the genomic data banks seems to be an alternative for defining the genera belonging to the family of Actinomycetes.

Introducción

Los micetomas se definen como pseudotumores granulomatosos, a menudo polifistulados, de origen micótico o actinomicótico, causados por la proliferación de los agentes infecciosos en los tejidos (Boiron *et al* 1998). Los micetomas presentan un desarrollo crónico, y un carácter inflamatorio. No son contagiosos y su evolución es lenta. Esta patología está caracterizada por la formación de abscesos que se abren en la piel a través de numerosas fistulas, de las que se escapa pus que contiene granos. Estos granos constituyen el elemento característico de la enfermedad.

Los agentes etiológicos responsables de la enfermedad pueden ser hongos (se hablará entonces de *eumicetomas* o *maduromicosis*), o bacterias filamentosas pertenecientes al grupo de los Actinomicetales (se hablará entonces de actinomycetomas) (Hay *et al* 1992. Develoux *et al* 1999).

En la mayoría de los casos, los granos contenidos en el pus o en las biopsias, son visibles a simple vista. De su pigmentación natural se derivan las subdivisiones de la clasificación de los micetomas (Mahgoub, 1985), por lo que la clasificación basada en el color de los granos es muy útil en la práctica cotidiana, sobre todo en zonas rurales apartadas. En efecto, los granos negros son siempre fúngicos, los granos rojos son siempre actinomicóticos y debidos a *Actinomadura pelletieri*. Los granos amarillos o blancos pueden ser tanto fúngicos como actinomicóticos.

Hay numerosas especies de actinomicetos y hongos que pueden ser agentes causales de micetomas. Se cuenta, hasta ahora, con cerca de unas cuarenta especies potencialmente agentes de micetomas: una treintena de especies fúngicas y una docena de especies de actinomicetos. Algunas de entre ellas son excepcionalmente raras.

No se piensa que la lista ya esté completa; sin embargo, hay que proceder con gran prudencia al momento de describir un nuevo agente. En efecto, para que un caso se considere micetoma debe haber

una herida previa y después una úlcera; pero siempre hay que tener en cuenta que la herida se puede contaminar con algunos agentes exteriores que no tienen ninguna relación con el agente causal y sean encontrados en el examen, confundiendo así el diagnóstico.

Diagnóstico de los actinomicetomas

Normalmente no es posible predecir la naturaleza del agente patógeno según el aspecto de la lesión, su localización o su imagen radiológica. Por otra parte, la mayoría de los agentes causantes de micetomas están presentes en el suelo y pueden ser la causa de una contaminación de las muestras clínicas. Su responsabilidad en la infección debe ser establecida por la demostración del grano en los tejidos y el aislamiento repetido del microorganismo a partir de los granos (Boiron, 1996).

EXAMEN DIRECTO DE LOS GRANOS

Examen macroscópico

En la mayoría de los casos, el pus y las biopsias revelan la presencia de granos que son los primeros verdaderamente orientadores del diagnóstico (Mariat *et al* 1977).

El aspecto macroscópico del grano y la observación del grano prensado entre porta y cubreobjetos permiten hacerse una idea, a veces bastante precisa, del agente causal. Los granos, que pueden medir de 0.5 a 5 mm, son a menudo fácilmente visibles a simple vista y un estudio de su morfología, textura, color y forma puede indicar con un buen grado de certeza la identidad del organismo en cuestión.

El examen microscópico es indispensable en algunos casos donde los granos son muy pequeños (en particular en el caso de *Nocardia*) y permite confirmar el diagnóstico gracias al estudio morfológico de los granos.

Observación microscópica

Para la observación microscópica, el grano se coloca entre porta y cubreobjetos y se añade hidróxido de sodio al 10%. La dimensión de los filamentos, el aspecto morfológico y la pigmentación conducen a la diferenciación de los micetomas fúngicos y actinomicetomas. Gracias a la observación microscópica, se puede ver que los granos de actinomicetos están formados por filamentos finos de 0.5 a 1 μm de grosor, mientras que los granos fúngicos contienen hifas de 2 a 6 μm de diámetro, presentando a menudo células periféricas hipertrofiadas, vesiculares (de 15 μm o más) (Welsh, 1993).

Esta aproximación etiológica es muy útil para el médico en instituciones hospitalarias aisladas donde no siempre es posible practicar un cultivo o un examen anatomopatológico.

Examen histopatológico

El examen anatomopatológico es útil cuando no hay emisión de granos por las fistulas, cuando se trata de una forma enquistada o cuando se presenta un cuadro clínicamente atípico (Daghfous *et al* 1993; Discamps & Roche, 1979).

Cultivo

Después del examen directo, (si en ningún grano se ve una imagen clara) debe considerarse un cultivo de los granos, o del pus que sale de las fistulas.

Lavado

El cultivo de los granos sin haberles hecho lavados previos, resulta generalmente en el crecimiento de gérmenes secundarios que pueden encubrir o inhibir el crecimiento de los microorganismos responsables de los micetomas. Varios lavados con suero fisiológico pueden ser necesarios con el fin de quitar los restos celulares y el pus de los granos.

El lavado se realiza en tubos de ensayo; después de agitación energética el pus se diluye en el líquido y los granos, por ser de mayor densidad, caen rápidamente al fondo del tubo. En el caso de los eumicetomas, el suero fisiológico deberá contener antibióticos, como el sulfato de gentamicina (400 µg/ml), la penicilina G (20 U/ml) y la estreptomina (40 µg/ml) o el cloranfenicol (50 µg/ml).

Elección del medio de aislamiento

Una vez cuidadosamente lavados, los granos son depositados uno por uno a dos centímetros de distancia a la superficie de las gelosas inclinadas en tubo. No se recomienda el uso de cajas de Petri cuyo medio se secaría antes de que el hongo o el actinomiceto hayan tenido tiempo de crecer, ya que su crecimiento es lento, sobre todo al inicio. Es importante sembrar varios granos ya que no todos son viables.

Por lo que se refiere a los actinomicetomas, cuando ningún grano es visible a simple vista, es necesario sembrar el pus o la secreción haciendo estrías en la superficie de los medios inclinados. La elección de los medios de aislamiento es importante y deberá guiarse por los datos del examen directo.

Los granos fúngicos se depositan sobre medio de Sabouraud glucosado al 2 %, añadidos de antibióticos antibacterianos (cloranfenicol-gentamicina). Es necesario evitar la Actidiona pues aunque el hongo pudiera ser resistente, si podría retrasar su crecimiento al menos al principio.

Los granos actinomicéticos, todos se deben a actinomicetos aerobios, se sembrarán en medio de Sabouraud glucosado al 2 % sin antibiótico antibacteriano, o sobre medio de Lowenstein-Jensen, también puede usarse sobre gelosas peptonadas nutritivas ordinarias, aunque estas últimas que tiene el inconveniente de favorecer el desarrollo de gérmenes bacterianos contaminantes cuyo crecimiento será más rápido que el del agente responsable del micetoma. En caso de granos blancos, cuando la duda subsiste, es necesario sembrar en todos los medios anteriores.

Temperatura de incubación

La incubación debe hacerse a dos temperaturas: una serie a 27°-30°C, otra a 37°C, ya que algunos agentes se desarrollan más rápidamente entre una u otra temperatura y su identificación puede depender de esta característica.

Tiempo de aparición de las colonias

El tiempo de aparición de las colonias será como mínimo de 8 a 10 días, para los más rápidos; y es necesario al menos un mes de incubación para observar la morfología típica de las colonias y la difusión de un pigmento en el medio. Entre un mes y un mes y medio es el plazo indispensable antes de considerar negativo a un cultivo. Por otro lado, es necesario verificar que el crecimiento del agente etiológico no haya sido retrasado o incluso inhibido por algún contaminante.

IDENTIFICACIÓN DE LOS CULTIVOS

Identificación morfológica

La identificación de las colonias se hace normalmente por el estudio de los aspectos macroscópicos (color anverso-reverso, tamaño, pigmento difusible) y microscópicos (Peloux & Quilici, 1979).

Identificación a nivel de género

El método químico clásico de identificación de los actinomicetos se basa en el sistema quimiotaxonomico de Lechevalier que permite distinguir diez quimiotipos (Goodfellow & Lechevalier, 1989). Este sistema se basa en la presencia de aminoácidos parietales (ácido 2,4-diaminobutírico, ácido 2,6-diaminopimélico (meso-DAP), glicina, lisina, ornitina, ácido aspártico) y de lípidos parietales (ácidos grasos, fosfolípidos, menaquinonas, ácidos micólicos), así como de azúcares celulares

(arabinosa, galactosa, madurosa, xilosa), la presencia mayoritaria de uno u otro (o varios) de estos elementos pueden ser característicos de un género en particular (Boiron *et al* 1993).

El análisis de estos distintos compuestos tiene que realizarse con técnicas sofisticadas y complejas. Algunos de estos caracteres son estudiados, en particular, por cromatografía en capa fina. La Cromatografía de Alta Presión y la de Gases también se han utilizado pero se requieren de un equipo costoso y delicado que debe ser manejado por técnicos bien entrenados.

Identificación de especies de *Nocardia*

La diferenciación de las especies del género *Nocardia* se basa en los esquemas de Goodfellow y Gordon (Goodfellow & Lechevalier, 1989), basados en el estudio de la degradación de distintas sustancias, el crecimiento y la producción de ácido sobre distintos substratos o la sensibilidad a distintos inhibidores. Estas pruebas consisten en reacciones específicas realizadas en tubo de ensayo. Debido al crecimiento lento de *Nocardia*, la lectura de las pruebas de identificación, en particular de las actividades enzimáticas, no puede efectuarse sino después de varios días de incubación. Finalmente la identificación de algunas cepas y algunas especies sigue siendo, a veces, ambigua.

Esto explica porqué las tres especies *N. asteroides*, *N. nova* y *N. farcinica*, que representan la mayoría de los aislados clínicos, resultan especialmente difíciles de separar fenotípicamente, por lo que a menudo se agrupan bajo el término genérico de complejo *N. asteroides* sin más distinción.

Diagnóstico molecular

Durante mucho tiempo, los aspectos morfológicos, microscópicos y macroscópicos, juntamente con algunos caracteres fisiológicos fueron los únicos criterios utilizables para clasificar e identificar a los actinomicetos. Sin embargo dado lo tardado y delicado del estudio de los distintos caracteres quimiotaxonómicos resultan difícilmente aplicables para la identificación de los aislados rutinariamente.

Con el desarrollo de las herramientas moleculares, estos sistemas complejos se substituyeron poco a poco durante las dos últimas décadas y además de la determinación del contenido en GC, que sólo proporciona una información gruesa, y de los datos de las hibridaciones ADN-ARNr (Mordarski *et al* 1977 ; Mordarska *et al* 1978) y ADN-ADN que permitieron confirmar el escaso grado de homología de las cepas que pertenecen al género *Nocardia* con las que pertenecen a géneros cercanos, las técnicas de amplificación y de determinación de secuencias han permitido individualizar claramente al género *Nocardia*, dentro de los actinomicetos, validando a las nuevas especies descubiertas (Mordarski *et al* 1980), comenzando una etapa crucial para la clasificación y los métodos de identificación de estas bacterias.

DIAGNÓSTICO A NIVEL DE GÉNERO

Nocardia

Los resultados publicados relativos a las técnicas de hibridación ADN-ARNr y de determinación de secuencias de los genes que codifican para el ARNr (Chun & Goodfellow, 1995; Ruimy *et al* 1994, 1996) llevaron a varios investigadores a interesarse por las potencialidades que ofrecía el estudio del ADNr 16S (Conville *et al* 2000). La alineación de las secuencias de ADN ribosomal 16S de más de 80 cepas de *actinomicetos* (*Nocardia*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Gordonia*, *Dietzia*, *Tsukamurella*) permitió seleccionar iniciadores específicos para el género *Nocardia* (Laurent *et al* 1999). Estos iniciadores permiten la amplificación específica de un fragmento de 596 pares de bases en las cepas que pertenecen al género *Nocardia*; la ausencia de amplificación de este fragmento demostraría que las cepas estudiadas no pertenecen al género *Nocardia*. Además, cuando se obtiene una amplificación, la especificidad del fragmento de 596 pb se comprueba gracias a la posición específica de los lugares de restricción de las enzimas seleccionadas (Mln I y Sac I). Hasta ahora, esta técnica es la única que

garantiza una identificación inequívoca de cepas de *Nocardia* en menos de 24 horas a partir de las colonias del aislamiento primario.

Streptomyces

Se ha descrito un método de identificación por PCR, a nivel de género, para aislados clínicos de *Streptomyces sp.* Esta técnica se basa en la amplificación específica de los fragmentos que codifican para el gen del ARNr 16S. La especificidad de la prueba se evaluó sobre 34 cepas de *Streptomyces sp.* y 47 cepas no-*Streptomyces*. Los resultados demostraron que todas las cepas de *Streptomyces sp.* Probadas pueden distinguirse de las especies representativas de los géneros *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Gordonia*, y *Tsukamurella* utilizando el par de iniciadores seleccionado. (Mehling *et al* 1995; Rodríguez Nava *et al* 2001).

Diagnóstico a nivel de especie

Por lo que se refiere a la definición molecular de las distintas especies del género *Nocardia*, varias técnicas han sido objeto de evaluación. Se propuso una técnica de ribotipificación que utilizaba, después de restricción del ADN total por la enzima Eco RI, una sonda de ADNr codificante para una parte del ARNr 16S (Laurent *et al* 1996). La sonda era obtenida por una reacción de PCR que utilizaba iniciadores específicos seleccionados. Esta técnica presenta una excelente especificidad de especie y permite una distinción fácil de aquellas que pertenecen al género *Nocardia* sobre la base de los ribotipos obtenidos. Parece ser una herramienta taxonómica importante para el estudio del género *Nocardia*. Sin embargo, su uso en rutina aún es discutible.

Se desarrolló pues, una técnica más rápida y simple. La identificación de especies del género *Nocardia*, se basó en el análisis de los perfiles de restricción del gen que codificaba la proteína de choque térmico de 65 kDa (Hsp 65). Estas proteínas están presentes en todas las células y microorganismos y cuya homología se sitúa como mínimo entre 40% o 50%. El gen que codifica para esta proteína se eligió inicialmente como objetivo de amplificación para el estudio de *Mycobacterium* debido a la alta conservación de las secuencias en todas las especies de este género (Plikaytis *et al* 1992; Telenti *et al* 1993). Habida cuenta de la proximidad taxonómica de los géneros *Mycobacterium* y *Nocardia*, varios autores intentaron ampliar este enfoque para el estudio de las bacterias que pertenecían al género *Nocardia* (Lungu *et al* 1994; Steingrube *et al* 1995, 1997). Así pues, un esquema diagnóstico para la identificación de especie pudo establecerse sobre la base del análisis de los perfiles de restricción (después de digestión por las enzimas Bsa H I, Bst E II, Hinf I y Msp I) de un fragmento de 440 bp que codificaba para una parte de la proteína de choque térmico Hsp 65.

Esta técnica permitió, en función del número de lugares de restricción, sus posiciones y el tamaño de los fragmentos generados, identificar las especies del género *Nocardia* (Steingrube *et al* 1995, 1997). Esta técnica constituye actualmente la técnica de referencia para la identificación de las especies del género *Nocardia*. La combinación de las técnicas de PCR para el diagnóstico de género (PCR-RFLP/ADNr 16S) y especie (PCR-RFLP/Hsp 65) constituye un avance importante en el diagnóstico a nivel de especie de estos microorganismos.

Conclusión

Estas técnicas moleculares, desarrolladas y publicadas en la última década, deben hoy evaluarse de nuevo. En efecto, el género *Nocardia* conoció una verdadera revolución a nivel taxonómico durante los últimos diez años. Mientras que se habían descrito solamente diez especies entre 1888 (año de la descripción de las primeras cepas por *Nocardia*) y 1996, el Comité Internacional de Sistemática de Procariotes reconoce hoy una treintena de especies dentro del género *Nocardia* (la última, *Nocardia asiatica*, se publicó en 2004). Ahora bien, ningún dato está disponible acerca de la posición de estas nuevas especies en los esquemas diagnósticos anteriormente establecidos. Además, la caracterización de tal diversidad en el género *Nocardia* plantea el problema de la capacidad que tienen las técnicas de PCR-RFLP para diferenciar correctamente un número cada vez mayor de especies.

En este contexto, la determinación de secuencias de uno o más genes (secuencias “*multilocus*”) seguido de la búsqueda en los bancos genómicos de secuencias homólogas cercanas se revela como una alternativa interesante para los géneros que pertenecen a los *Actinomicetos*. En efecto, con los recientes desarrollos tecnológicos, la determinación de secuencias combina rapidez y simplicidad debidos al desarrollo secuenciadores miniaturizados con un costo final que resulta competitivo, al menos en los países desarrollados. Dos factores limitan actualmente tal planteamiento: el acceso a bancos genómicos "propios" que incluyan secuencias irreprochables de cepas de referencia de cada una de las especies y el desarrollo de un programa informático de comparación de datos para llegar a la identificación bacteriana.

Bibliografía:

Boiron, P., Provost, F. & Dupont, B. (1993). Méthodes de laboratoire pour le diagnostic de la nocardiose. Institut Pasteur.

Boiron, P. 1996. Mycétome, p. 152-160. In: A. Eyquem. (ed.), Microbiologie clinique, Piccin Nueva Libraria, Paris.

Boiron, P., Locci, R., Goodfellow, M., Gumaa, S.,A., Isik, K., Kim, B., McNeil M.,M., Salinas Carmona, M. C. & Shojaei, H. (1998). Nocardia, nocardiosis and mycetoma. Med. Mycol. 36 Suppl., 26-37.

Chun, J. & Goodfellow, M. (1995). A phylogenetic analysis of the genus Nocardia with 16S rRNA gene sequences. Int. J. Syst. Bacteriol. 45:240-245.

Conville, P. S., Fischer, S. H., Cartwright, C. P. & Witebsky, F. G. (2000). Identification of Nocardia species by restriction endonuclease analysis of an amplified portion of the 16S rRNA gene. J. Clin. Microbiol. 38:158-164.

Daghfous, M., Mokhtar, I., Fazaa, B. & Kamoun, M.R. (1993). Contribution anatomo-clinique à l'étude des mycétomes. Tunis. Med. 71, 529-534.

Develoux, M., N'Diaye, B. & Dieng, M. T. (1999). Les mycétomes. J. Mycol. Med. 9, 197-209.

Discamps, G. & Roche, J. C. (1979). Aspects histopathologiques des mycétomes africains. Med. Trop. 39, 17-25.

Goodfellow, M., & Lechevalier, M. P. (1989). Genus Nocardia Trevisan 1889, 9AL, p. 2350-2361. In: S.T. Williams, M.E. Sharpe, and J.G. Holt (ed.), Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 4. Williams and Wilkins, Baltimore.

Kageyama, A., Poonwan, N., Yazawa, K., Mikami, Y. & Nishimura, K. (2004). Nocardia asiatica sp. nov., isolated from patients with nocardiosis in Japan and clinical specimens from Thailand. Int. J Syst. Evol. Microbiol. 54:125-130.

Hay, R. J., Maghoub, E. S., Leon, G., Al-Sogair S. & Welsh O. (1996). Mycetoma J. Med. Vet. Mycol. 30, 41-49.

Laurent, F., Carlotti, A., Boiron, P., Villard, J. & Freney, J. (1996). Ribotyping: a tool for taxonomy and identification of the Nocardia asteroides complex species. J. Clin. Microbiol. 34:1079-82.

Laurent, F., Provost, F. & Boiron, P. (1999). Rapid identification of clinically relevant Nocardia species to genus level by 16S rRNA gene PCR. J. Clin. Microbiol. 37:99-102.

Lungu, O., Della Latta, P., Weitzman, I. & Silverstein, S. (1994). Differentiation of Nocardia from rapidly growing Mycobacterium species by PCR-RFLP analysis. Diag. Microbiol. Infect. Dis. 18:13-18.

Mahgoub, E. S. (1985). Mycetoma. Semin. Dermatol. 4, 230-239.

- Mariat, F., Destombes, P., Segretain, G. (1977). The mycetomas: clinical features, pathology, etiology and epidemiology. *Contrib. Microbiol. Immunol.* 4:1-39.
- Mehling, A., Wehmeier, U. F. & Piepersberg, W. (1995). Nucleotide sequences of streptomycetes 16S ribosomal DNA: towards a specific identification system for streptomycetes using PCR. *Microbiology* 141:2139-2147.
- Mordarska, H., Cebrat, S., Bach, B. & Goodfellow, M. (1978). Differentiation of nocardioform actinomycetes by lysozyme sensitivity. *J. Gen. Microbiol.* 109:381-384.
- Mordarski, M., Schaal, K. P., Szyba K., Pulverer G. & Tkacz, A. (1977). Interrelation of *Nocardia asteroides* and related taxa as indicated by deoxyribonucleic acid reassociation. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 27:66-70.
- Mordarski, M., Goodfellow, M., Tkacz, A., Pulverer, A., Schaal, K. P. (1980). Ribosomal ribonucleic acid similarities in the classification of *Rhodococcus* and related taxa. *J. Gen. Microbiol.* 118:313-319.
- Peloux, Y. & Quilici, M. (1979). Les agents des mycétomes, étude bactériologique et parasitologique. *Med. Trop.* 39, 39-43.
- Plikaytis, B. B., Plikaytis, B. D., Yakrus, M. A., Butler, R., Woodley, C., Silcox, V. A. & Shinnick, T. M. (1992). Differentiation of slowly growing *Mycobacterium* species, including *Mycobacterium tuberculosis*, by gene amplification and restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Clin. Microbiol.* 30:1815-1822.
- Rodriguez Nava, V., Couble, A., Casoli, E., Bugnard, V., Laurent, F., Sandoval, H. & Boiron, P. (2001). Identification of clinical isolates of *Streptomyces* species using the polymerase chain reaction. *J. Mycol. Med.* 11:131-34.
- Ruimy, R., Boiron, P., Boivin, V. & Christen, R. (1994). A phylogeny of the genus *Nocardia* deduced from the analysis of small-subunit ribosomal DNA sequences, including transfer of *Nocardia amarae* to the genus *Gordonia* as *Gordonia amarae*. *Microbiol. Lett.* 123: 261-268.
- Ruimy, R., Riegel, P., Carlotti, A., Boiron, P., Bernardin, G., Monteil, H., Wallace, R. J., Jr & R. Christen. (1996). *Nocardia pseudobrasiliensis* sp. nov., a new species of *Nocardia* which groups bacterial strains previously identified as *Nocardia brasiliensis* and associated with invasive diseases. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46: 259-264.
- Steingrube, V. A., Brown, B. A., Gibson, J. L., Wilson, R. W., J. Brown, Blacklock, Z., Jost, K., Locke, S., Ulrich, R. F. & Wallace, R. J., Jr. (1995). DNA amplification and restriction endonuclease analysis for differentiation of 12 species and taxa of *Nocardia*, including recognition of four new taxa within the *Nocardia asteroides* complex. *J. Clin. Microbiol.* 33:3096-3101.
- Steingrube, V. A., Wilson, R. W., Brown, B. A., Jost, K., Gibson, J. L., Brown, J., Blacklock, Z., Gibson, J. L. & Wallace, R. J., Jr. (1997). Rapid identification of clinically significant species and taxa of aerobic Actinomycetes, including *Actinomadura*, *Gordonia*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, and *Tsukamurella* isolates, by DNA amplification and restriction endonuclease analysis. *J. Clin. Microbiol.* 35:817-822.

Telenti, A., Marchesi, F., Balz, M., Bally, F., Bottger, E. C. & Bodmer, T. (1993). Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J. Clin. Microbiol.* 31:175-178.

Welsh O. (1993). Mycetoma. *Semin. Dermatol.* 12:290-295.

CAPÍTULO III ACTINOMICETOMA: MECANISMOS DE PATOGENICIDAD

Blaine Beaman¹ y José A. Serrano²

¹Department of Medical Microbiology and Immunology, University of California School of Medicine, Davis, California 95616 (e-mail: blbeaman@ucdavis.edu)

²Instituto de Investigaciones. Sección de Biotecnología. Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, Edo. Mérida, Venezuela.
Correo electrónico (jacielo@cantv.net)

Abstract

Mycetomas are chronic diseases caused by both fungi (eumycetomas) and aerobic Actinomycetes (actinomycetomas). *Madurella mycetomatis* is the most common fungal species diagnosed in eumycetomas whereas the most common causes of actinomycetomas worldwide are *Nocardia brasiliensis*, *Actinomadura madurae*, and *Streptomyces somaliensis*. However, the etiologies differ from region to region.

No experimental animal models of mycetoma have been discovered for either *Actinomadura* species or *Streptomyces* species isolated from human mycetomas, but several species of *Nocardia* isolated may produce mycetomas in mice.

Guimares et al. (2003) characterized and compared host responses in both actinomycetomas and eumycetomas in humans. They suggested that cell mediated immunity played a role in mycetoma pathogenesis. Mahgoub et al. (1977) reported defective T-cell responses in patients with mycetomas suggesting that T lymphocytes were necessary for host resistance to *N.brasiliensis*. The role of anti-*N.brasiliensis* antibodies and cytokines in host protection is not clear. Salinas-Carmona (2000) suggested that passive immunity with antibodies against *N.brasiliensis* protected mice from becoming infected, but hyperimmune serum had no effect on mycetomas already established.

The nocardiae adhere to, invade, grow, and kill host cells locally resulting in tissue damage. This results in the release of various inflammatory factors that cause significant increases in polymorphonuclear neutrophils (PMNs) at the site of nocardial growth. Studies show that PMNs are not very effective at killing nocardia, but they inhibit nocardial growth. During this process, these PMNs become activated to secrete various cytokines including Interferon Gamma (INF- γ), which in turn, activate Macrophages and T lymphocytes. With the help of $\gamma\delta$ -T lymphocytes, the nocardial infection is resolved and the tissue damage is repaired. Thus, an effective host response to nocardiae depends on PMNs, activated macrophages, T cells including $\gamma\delta$ -T lymphocytes, and the secretion of various cytokines including INF- γ IL-1, IL-6, and TNF- α

Infection of mice utilized to define the roles of T-lymphocytes and splenic cells on host resistance suggested that (a) Athymic and asplenic mice were significantly more susceptible to nocardiae than controls; (b) L-forms of *N.otitidiscaviarum* were induced within immunocompetent hosts, whereas they were not observed in the immunodeficient animals and (c) T-cell deficient mice were impaired in the development of mycetomas.

Introducción

¿Qué es un micetoma? La palabra *micetoma* significa “tumor a hongos”. Los primeros casos documentados de micetoma fueron descritos en 1846 por Godfrey, quien lo denominó “enfermedad tuberculoide del pie” (morbus tuberculosis pedis). Los micetomas no son tumores, pero sí son enfermedades crónicas que pueden ser causadas por diversos tipos de hongos, así como por diferentes bacterias, las cuales pertenecen a los actinomicetales. A las infecciones causadas por hongos se les identifica como *eumicetomas* y a aquellas causadas por actinomicetos aerobios

patógenos, como *actinomycetomas*. Los micetomas ocasionados bien sea por hongos o por actinomycetos, son clínica y patológicamente similares, ya que se caracterizan por producir una infección crónica de tipo purulento-granulomatosa, que compromete tanto a los músculos como a los huesos (Godfrey, 1846; Fahal, 2004). La lesión se caracteriza por presentar tractos fistulosos por los cuales drenan secreciones sero-sanguíneo-purulentas, las cuales contienen granos. Estos granos están compuestos por paquetes de células (microcolonias) de los agentes etiológicos, así como por células y restos celulares del huésped. Estos granos presentan variaciones en su tamaño, composición, textura y color. En estos granos es muy resaltante la presencia de polimorfonucleares. El color del grano y el tipo de repuesta del tejido al examen histológico, son característicos para cada tipo de agente etiológico; debido a este hecho, muchas veces el diagnóstico etiológico se basa en la observación de los granos producidos a nivel de la lesión.

Tanto el eumicetoma como el actinomycetoma se caracterizan, a nivel clínico, por la presencia de un edema subcutáneo, el cual es de tipo progresivo; en el actinomycetoma este proceso se produce de manera más rápida que en el eumicetoma. En la lesión se pueden observar la presencia de múltiples nódulos, los cuales, por medio de tractos fistulosos, pueden supurar y drenar los granos característicos del agente etiológico del micetoma. El proceso de diagnóstico clínico del micetoma requiere de estudios radiológicos, de ultrasonido, citología, cultivo microbiológico, histología y estudios de inmunodiagnóstico (Fahal, 2004). (Ver capítulos VI y VII).

Agentes etiológicos de los micetomas (eumicetomas)

Madurella mycetomatis (esta especie tiene los siguientes nombres taxonómicamente válidos: *mycetomatis*, *mycetomitis* y *mycetomi*) es el agente causal más comúnmente diagnosticado como productor del eumicetoma (Ellabib *et al* 2003). Sin embargo, han sido reportados diferentes agentes que producen granos blancos o granos negros que causan eumicetomas en humanos. Entre éstos se encuentran: *Fusarium solani* (Tomimori-Yamashita J *et al* 2002), *Sporothrix schenckii*, (Pelzer K *et al* 2000), *Cylindrocarpon* spp. (Hemashettar BM *et al* 2000), *Leptosphaeria senegalensis* (Khatri *et al* 2002), *Rhinoclediella atrovirens* (Dieng MT *et al* 2003), *Curvularia lunata* (Janaki C *et al* 1999), *Arthrographis kalrae* (Degavre B *et al* 1997), *Phialophora parasitica* (Hood SV, *et al* 1997), *Acremonium* sp., *Pseudallescheria boydii*, (Gugnani HC *et al* 1995; Venugopal PV *et al* 1995), *Fusarium* species (Restrepo A, 1994), *Madurella grisea*, *Pyrenochaeta romeroi*, *Exophiala jeanselmei*, *Leptosphaeria tompkinsii*, (Venugopal PV *et al* 1993), *Polycyrtella hominis*, (Campbell CK, 1987), *Pseudallescheria boydii*, *Acremonium kiliense*, y *Trichophyton violaceum* (Hay RJ & Collins MJ, 1983) y *Neotestudina rosatii* (Hay RJ & Mackenzie DW, 1982).

Agentes etiológicos del actinomycetoma

La taxonomía de los actinomycetos ha sido revisada y actualizada de manera permanente, por lo que los nombres de muchos de los microorganismos asociados con el actinomycetoma han variado; sin embargo, muchos de los nombres originales de estos microorganismos aún se encuentran en uso. Esto se aplica de manera particular a los microorganismos pertenecientes al género *Nocardia* (Goodfellow, 1998).

En el presente trabajo no se entrará en detalles sobre los aspectos taxonómicos de estos organismos. Actualmente existen cerca de 32 nombres válidos publicados de especies de *Nocardia*. Debido a esta continua variación de la nomenclatura de estos microorganismos, no es necesario producir una lista de las especies actualmente aceptadas. Muchas de estas especies de *Nocardia* han sido reportadas como agentes causales de actinomycetoma; sin embargo, *N.brasiliensis*, el complejo *N.asteroides*, *N. otitidiscaviarum* y *N.transvalensis* son los más comúnmente diagnosticados. A nivel mundial, *N.brasiliensis*, *Actinomadura madurae* y *Streptomyces somaliensis* son los agentes etiológicos más frecuentemente reportados. Otros actinomycetos patógenos que han sido reportados

como agentes causales de actinomictoma en humanos, incluyen *A.pelletieri*, *A.latina*, *N.dassonvillei*, *N.farcinica* y *N.nova* (Schaal, 1998; Goodfellow, 1998). (Ver capítulos I y XII).

Incidencia y distribución geográfica del micetoma

Se desconoce la incidencia real del actinomictoma. Estas infecciones han sido diagnosticadas en la mayoría de las regiones del mundo, pero las mismas parecen ser reportadas con más frecuencia en las áreas tropicales y subtropicales; aún así, muchos trabajos señalan la baja incidencia de estas infecciones. Una revisión de casos reportados a nivel mundial desde 1950, arrojó 5.000 casos, lo que indica una media de 92 casos anuales a nivel mundial. Sin embargo, estos resultados no reflejan la realidad del problema, dado que muchos casos no son oficialmente registrados. Por lo tanto, es muy probable que el número de casos diagnosticados durante este lapso sea significativamente mayor. Por ejemplo, sólo en México, la incidencia parece ser mayor de 70 casos anuales (López-Martínez *et al* 1992). Sin lugar a dudas, se requiere de una mejor vigilancia epidemiológica para lograr establecer la real incidencia y la prevalencia del número de casos de actinomictomas (ver Capítulo XII).

La etiología de los actinomictomas difiere significativamente de región a región. En algunas áreas del mundo, *Nocardia* se detecta con mayor frecuencia, mientras que en otras regiones, *Nocardia* es más escasa y las especies de *Actinomadura* son más prevalentes. Por ejemplo, en un análisis de 130 casos de micetomas diagnosticados en Senegal, 76 (58%) fueron causados por actinomictos (Dieng MT *et al* 2003). La mayoría de estos casos se debió a *Actinomadura pelletieri* (71%), seguido por *Actinomadura madurae* (22%) y *Streptomyces somaliensis* (7%). Ninguno de estos casos reportados se debió a *Nocardiae*. En contraste, Chávez *et al* (2002) reportaron que en México, el 85% de los casos fueron causados por *N.brasiliensis*, y Salinas-Carmona (Salinas-Carmona, 2000) señala que *N. brasiliensis* ocasiona el 90% del total de los casos de actinomictomas en México (López-Martínez *et al* 1992). En Níger, África occidental, *Streptomyces somaliensis* es más prevalente en la zona desértica norte, mientras que *Actinomadura pelletieri* es más común en la región sur del país y *Madurella mycetomatis* es el agente etiológico más frecuente de eumictoma en ambas regiones. Además, la incidencia y distribución de las especies en Níger, difieren de las áreas endémicas de África occidental y oriental. Develoux *et al* (1995, 1998) señalan que, en general, los eumictomas y actinomictomas parecen ser más frecuentes en las zonas tropicales más septentrionales del continente americano, tales como México y Venezuela; en África, principalmente en Senegal, Mauritania y Sudán; y en la India.

Modelos animales utilizados en la investigación de los actinomictomas

La dificultad para estudiar los mecanismos de cualquier enfermedad infecciosa, radica en lograr desarrollar o utilizar un modelo animal apropiado. Los modelos animales de las enfermedades infecciosas han permitido a los investigadores, clínicos y epidemiólogos, estudiar la interacción huésped-parásito en cuanto a la administración de dosis infecciosas o letales, vías de inoculación, curso natural de la infección, mecanismos normales de defensa del huésped, incluyendo tanto las respuestas naturales como las adquiridas, datos histopatológicos, procedimientos de diagnóstico, prevención de la enfermedad y terapia. Los modelos animales tienen un valor sin precedentes en el desarrollo de nuevos agentes quimioterapéuticos, debido a que las propiedades toxicológicas y farmacológicas de cualquier fármaco en desarrollo, deben ser establecidas antes de utilizarlas en seres humanos. Debido a todas estas aplicaciones potenciales, el desarrollo de un modelo animal para el actinomictoma ha sido un área de constante investigación; prácticamente desde que estas infecciones fueron diagnosticadas.

Desafortunadamente, esto ha traído serias consecuencias, ya que la mayoría de los modelos animales se ha logrado establecer solamente con *Nocardia*. Hasta el momento, no se han desarrollado modelos animales experimentales de micetomas, tanto en las especies de

Actinomadura como en los *Streptomyces* aislados de micetoma humano. Es difícil probar la etiología de la mayoría de los actinomictomas, ya que los postulados de Koch para probar una etiología, no han sido cumplidos ni para las especies *Actinomadura* ni para *Streptomyces somaliensis*. En contraste, los postulados de Koch han sido cumplidos para los micetomas provocados por *Nocardia*. Los problemas con las otras etiologías, han sido principalmente su dificultad para reproducir la enfermedad de manera experimental, combinados con la dificultad de aislar el agente etiológico de las lesiones, a pesar de que la presencia de los organismos puede ser observada histológicamente. (Ver Capítulo IV).

Por lo tanto, el diagnóstico de los actinomictomas se realiza usualmente por la apariencia histológica de los granos coloreados con hematoxilina y eosina (H&E) en cortes de parafina y se complementa con las características clínicas del paciente.

En 1908, Nicolle y Pinoy fueron los primeros investigadores que lograron inocular un agente causal de eumictoma, *Madurella mycetomitis*, en las patas de las palomas. En contraste, intentos iniciales por inducir actinomictomas de manera experimental en animales de laboratorio, a menudo produjeron resultados negativos o contradictorios. Estas observaciones contradictorias, fueron posiblemente el resultado de dificultades asociadas con el manejo de los actinomicetos, la variabilidad en la preparación del inóculo, la cepa del organismo utilizada, la vía de inoculación y el tipo de animal utilizado. Por ejemplo, en los estudios realizados por Nakayama (1906), la inyección intraperitoneal de *Nocardia asteroides* en los cobayos, provocó una peritonitis leve no mortal. Mientras que en los experimentos de MacCallum (1902), se reportó la muerte tanto de los cobayos como de los conejos que habían sido inoculados con *N.mojanoasteroides* por vía intraperitoneal, subcutánea o intravenosa.

No obstante, algunas de las contribuciones iniciales más destacadas, tales como las realizadas por Strauss y Kligman (1951), González-Ochoa y Sandoval (1955) y Mackinnon & Artagaveytia-Allende (1956) para la reproducción experimental de actinomictoma, merecen ser destacadas. Strauss y Kligman utilizaron mucina para incrementar el grado de virulencia de *N.asteroides* en los ratones de laboratorio, demostrando que cuando esta combinación fue administrada intraperitonealmente, los abscesos se produjeron de manera rutinaria. González-Ochoa y Sandoval (1955) y Mackinnon y Artagaveytia-Allende (1956) establecieron la posibilidad de producir granos de *Nocardia* (gránulos) intraperitonealmente en diferentes animales de laboratorio. Aunque estas lesiones no fueron progresivas y eventualmente sanaron, Mackinnon y Artagaveytia-Allende (1956) también demostraron que *N.brasiliensis* sobrevivió por más de tres meses y que la inoculación de *N.asteroides* en los testículos de los cobayos, produjo lesiones que se abrieron de manera espontánea a través de la piel. El exudado de estas lesiones contenía abundantes granos con formas celulares tipo “clava” (*club-shape*), dispuestos en la periferia del grano (Mackinnon y Artagaveytia-Allende, 1956).

Basándose en estos resultados, y en lo que ya se conocía en aquella época sobre la histología y evolución de los actinomictomas, Macotela-Ruiz y Mariat (1963) razonaron que el desarrollo de esta enfermedad podría requerir de una sensibilización anterior con el agente causal. Para probar esta hipótesis, los investigadores sensibilizaron la piel de ratones, de cobayos y de hámsteres con microorganismos muertos de *N.brasiliensis* y *N.asteroides*, previos a la inoculación subcutánea con cultivos vivos de los mismos organismos. Las cepas de *Nocardia* utilizadas por estos investigadores habían sido aisladas de casos humanos con actinomictomas.

Las suspensiones de los microorganismos se prepararon inicialmente en forma de “pellets” de 60 mg de organismos vivos y posteriormente suspendidos en agua. Estas suspensiones fueron administradas en las patas traseras de los animales. Después de 2 meses de inoculación, aparecieron

lesiones subcutáneas parecidas a un micetoma con presencia de tractos fistulosos y de granos, los cuales se observaron en el 50% de los ratones y los hámsteres inoculados con *N.asteroides*, y en un 66,6% de los ratones; y en un 100% de los hámsteres que fueron inoculados con *N.brasiliensis*. Adicionalmente, los granos formados en los ratones infectados por *N.brasiliensis* se observaron más compactos que en aquellos animales infectados con *N.asteroides*. Los animales que no fueron sensibilizados con organismos vivos previamente a la inoculación, también desarrollaron lesiones de tipo micetoma con granos que tenían similares características histológicas a las producidas en los animales sensibilizados y en los humanos infectados. Por ello, Macotela-Ruiz y Mariat (1963) concluyeron que la sensibilización previa con células de *Nocardiae*, no parecía necesaria para el desarrollo de lesiones de tipo micetoma, posterior a la inoculación con organismos vivos.

Rippon y Lorincz (1964) notaron que las cepas de *Streptomyces (Actinomadura) madurae* producen un factor difusible que tiene una acción proteolítica que actúa sobre el colágeno purificado de manera irreversible. Como resultado de esta observación estos autores postularon que esta actividad enzimática podría ser importante en el proceso de patogenicidad de este organismo. Para corroborar esta idea, los investigadores Rippon y Peck (1967) inocularon ratones negros C-57 en las almohadillas plantares, con cortisona y células vivas de *Actinomadura madurae* y obtuvieron lesiones micetómicas en el lugar de la inoculación. En contraste, una cepa de *Actinomadura madurae* carente de colagenasa no produjo lesiones en los ratones, al ser inoculada conjuntamente con cortisona. De estos resultados, los investigadores concluyeron que la patogenicidad del organismo se debía fundamentalmente a su actividad colagenolítica. No obstante, el hecho de que se añadiera cortisona al inóculo, complicó sus observaciones, ya que se ha demostrado que los esteroides alteran la susceptibilidad de la infección por *Nocardia* en ratones (Mishra *et al* 1973). No obstante, el hecho de que para estos estudios se seleccionara un lugar de inoculación diferente, ocasionó alguna evidencia inicial de que la vía de inoculación influye visiblemente en los resultados. Es importante destacar que estos investigadores jamás obtuvieron micetomas por *Actinomadura* en el ratón “normal” sin el uso de cortisona.

En otros experimentos realizados por González-Ochoa y Kumico Hojyo, 1967, procedieron a inocular ratones blancos, obteniendo resultados exitosos (Por ejemplo la producción de un micetoma típico sin tendencia a sanar espontáneamente, extendiéndose a las zonas adyacentes involucrando los tejidos blandos y el hueso). Los investigadores produjeron micetomas en ratones similares a los de seres humanos. Los inóculos utilizados por estos investigadores consistieron en “pellets” de peso seco de bacterias en cantidades de 20, 10, 2, 1 ó 0,2 mg, combinados con bacterias adicionales tomadas de pacientes infectados con micetomas. Estas mezclas se administraron a grupos de animales (50 ratones) que no habían recibido sensibilización anterior con la misma *Nocardia*. Los animales se mantuvieron bajo temperaturas de 20°C y se revisaron cada semana durante los primeros dos meses y cada dos semanas durante el resto del experimento.

Los ratones desarrollaron lesiones típicas de un micetoma cuya severidad correspondía con la dosis de *Nocardia* inoculada. Por ejemplo, los animales inoculados con dosis de 20mg, presentaron un cuadro inflamatorio severo, por lo que se hizo necesaria la amputación de los dedos de las patas, e inclusive, en algunos casos, de la pata completa, y en algunos animales hasta parte del muslo de la pierna. Los animales que recibieron las dosis más bajas de 1 ó 2 mg presentaron inicialmente una inflamación leve en la pata, que persistió y evolucionó durante las primeras 4 a 6 semanas después de la inoculación; el resultado final fue idéntico: todos los inóculos utilizados, independientemente del tamaño, lograron reproducir lesiones típicas de micetoma.

En otros experimentos realizados por González-Ochoa y Kumico Hojyo (1967) en los que administraron inóculos de 2mg, encontraron que, una semana después, el 50% de los ratones inoculados en la almohadilla plantar presentaron una inflamación severa que, luego de una semana,

desapareció en un 30% de los ratones inoculados. Las lesiones persistieron en forma leve en el resto de los ratones. En la tercera semana, la inflamación se tornó aún más severa, y se presentó en aquellos animales que aún no habían manifestado alguna sintomatología. En la cuarta semana, el 50% de los animales presentaban lesiones. La inflamación continuó progresando y el número de animales que no habían manifestado ninguna sintomatología disminuyó. Ya en la sexta semana, el porcentaje de animales que presentaban lesiones se había incrementado a un 80%, con marcada tendencia a continuar creciendo, de manera que a los seis meses de haberse presentado la infección, aproximadamente el 100% de los animales infectados presentaba lesiones visibles de micetoma. Con el tiempo, en casi todos los animales, los edemas desarrollaron tractos fistulosos y se observaron gránulos tanto en el pus como en los tejidos. En todas las etapas del micetoma fue posible aislar *N. brasiliensis*. Además, en algunos de los animales hubo invasión ósea con formación de cavidades similares a las que han sido descritas en los micetomas humanos. (González-Ochoa y Kumico Hojyo 1967).

La inoculación de *Nocardia spp.* en la almohadilla plantar de los ratones blancos, fue utilizada posteriormente por González-Ochoa y Sandoval (1960) para investigar la virulencia de diferentes cepas de *N. asteroides*, *N. brasiliensis* y *N. otitidiscaviarum*. En estos experimentos, se demostró que *N. brasiliensis* era un patógeno más virulento que *N. asteroides* y *N. otitidiscaviarum* y que, a su vez, estas dos últimas eran igualmente patógenas. Además, estos hallazgos demostraron el valor de este modelo animal en el estudio de los actinomicetomas (González-Ochoa y Sandoval 1960).

Los resultados presentados por González-Ochoa y Kumico Hojyo (1967), demostraron que tanto la vía de inoculación como la dosis inoculada, marcan una gran diferencia en el resultado final. Sin embargo, el inóculo utilizado en sus experimentos no fue bien definido, dado que consistía en peso seco de organismos mezclados, en algunos casos, con bacterias de infecciones humanas. En un esfuerzo por reproducir los resultados alcanzados por González-Ochoa y Kumico Hojyo, y tratando de definir la dosis exacta de *Nocardia spp.* requerida para establecer un actinomicetoma experimental en ratones, Zlotnik y Buckley (1980), siguieron un enfoque ligeramente diferente. Ellos utilizaron una sola inyección de suspensiones de células, bien sea de *N. asteroides*, *N. brasiliensis* o *N. otitidiscaviarum* con un rango de 10^4 a 10^6 CFU/0.1ml; usando el adyuvante de Freund incompleto o en solución salina, para inocular en la almohadilla plantar de los ratones BALB/c. Todas las cepas de estas 3 especies de *Nocardia* aisladas de casos humanos de actinomicetomas, fueron capaces de producir micetomas crónicos en ratones BALB/c con inflamación traumática que aparecía al mes de haber sido inoculado el ratón con la suspensión bacteriana más el adyuvante. En los ratones infectados con 10^4 CFU, aparecieron inflamaciones muy severas alrededor de los 2 meses y a los tres meses se hicieron evidentes lesiones semejantes a micetomas.

En todos los animales inoculados, la enfermedad se manifestó de manera progresiva y en algunos de los ratones inoculados con 10^6 CFU (UFC) a los seis meses la infección se había extendido al muslo y se encontraron abscesos en la cavidad peritoneal. Los microorganismos inoculados fueron recuperados de las lesiones y los estudios histopatológicos revelaron la presencia de granos de *N. brasiliensis* y *N. otitidiscaviarum* en los ratones infectados. Un pequeño número de animales que habían sido inoculados con bacterias suspendidas en solución salina, desarrollaron un edema inicial que persistió y en los cuales la lesión continuó con una respuesta inflamatoria de tipo retardado, la cual se inició tres meses después de la inoculación inicial. A los seis meses, los animales presentaban en sus cojinetes plantares una típica lesión de micetoma. Estos resultados indican que la dosis infectante determina el tiempo de aparición y el curso que seguirá la enfermedad; y que la presencia de un adyuvante no era necesaria para inducir micetoma en los ratones BALB/c. La adición del adyuvante al inóculo contribuye a acelerar la aparición del cuadro clínico de la infección con el mismo resultado final del desarrollo de micetomas crónicos caracterizados por la tendencia a

no sanar de manera espontánea e inclusive con un posible comprometimiento del hueso en la región donde se desarrolló el micetoma experimental.

Respuesta del huésped e inmunidad

Se han publicado pocos estudios en referencia a la respuesta del huésped al actinomietoma. Guimares *et al* (2003) caracterizaron y compararon las respuestas de los huéspedes tanto en los actinomietomas como en los eumietomas en humanos. Estos investigadores encontraron que ambas enfermedades se caracterizaban por la presencia de linfocitos T-CD4 y CD8 rodeados por agregados de neutrófilos con macrófagos. En este estudio no se observaron linfocitos-B en las lesiones. Estos autores también reportaron que en las lesiones de los actinomietomas se observaba un alto número de linfocitos CD8+ y de macrófagos, al ser comparados con el patrón celular presente en las lesiones de los eumietomas. Al comparar cortes histológicos de tejido de piel normal con cortes de tejidos provenientes de ambos tipos de micetoma, se pudo observar que en estos últimos las células epidérmicas de Langerhans parecían estar ausentes. Los autores sugieren que la inmunidad mediada por células podría jugar un papel en la patogénesis del micetoma, y que las alteraciones morfológicas y la marcada reducción de las células de Langerhans en las lesiones de micetomas, podrían reflejar una respuesta inmuno-celular deprimida. Estos autores pensaron que este hecho podría explicar parcialmente la cronicidad de la infección, así como también la carencia de respuesta al tratamiento por parte de los micetomas.

De igual manera, Rodríguez *et al* (1996) expusieron la idea de que los resultados obtenidos por ellos en un modelo murino de actinomietomas, utilizando diferentes especies del género *Nocardia* y la cuantificación de los títulos de la prueba de ELISA, podrían indicar un estado de inmunosupresión provocado por *N.brasiliensis*, el cual no es inducido por otras *Nocardia*. En base a estas interesantes observaciones, los investigadores pensaron que valía la pena realizar estudios adicionales sobre este particular.

El Hassan *et al* (2001) estudiaron la respuesta del huésped en humanos, en lesiones de actinomietomas causadas por *Streptomyces somaliensis*. A diferencia de las observaciones arriba mencionadas, estos autores reportaron un patrón histológico de reacción inflamatoria alrededor del grano, consistente de dos tipos diferentes de reacción tisular. En el tipo 1, pudieron observar tres capas: Una capa de células neutrofilicas rodeando al grano, una capa intermedia principalmente compuesta de macrófagos y una capa periférica constituida por linfocitos y células plasmáticas. La capa 1 se coloreaba positivamente para neutrófilos, la 2 para macrófagos y linfocitos T y la capa 3 presentaba linfocitos B. En el segundo tipo de reacción tisular, no se observaba la capa de neutrófilos en este tipo de reacción inflamatoria y los gránulos estaban rodeados solamente por macrófagos y células gigantes; hecho éste confirmado por estudios de inmuno-histoquímica, de inmuno-globulina G y de IgM, así como también fue demostrada la presencia de complemento en la superficie de los granos y asimismo recubriendo los filamentos bacterianos dentro de los granos. A pesar de no existir una capa diferenciada compuesta de polimorfonucleares, se observó la presencia de neutrófilos y macrófagos dispersos en la lesión. Aparentemente, estos fagocitos estarían actuando en el proceso de fragmentación del grano. A nivel de la lesión y en los nódulos linfáticos regionales se observó un perfil de citocinas donde predominaban las interleucinas-10 e IL-4, sugiriendo un patrón inmune del tipo TH2.

En humanos, los actinomietomas debidos a *Nocardia brasiliensis* no parecen asociarse con la presencia de inmunosupresión en los pacientes, ya que en los casos de infecciones muy graves tratados con amputación quirúrgica o en aquellos casos con invasión a los órganos adyacentes, este tipo de lesiones parecen ocurrir en individuos inmunocompetentes (Salinas-Carmona *et al* 1997; Welsh & López 1985). Sin embargo, Mahgoub *et al* (1977) reportaron respuestas defectuosas de células-T en pacientes con micetomas, lo que sugiere que el “funcionamiento normal” de los

linfocitos-T era necesario para generar una adecuada resistencia del huésped a *N.brasiliensis*. Serológicamente se demostró que los pacientes con un cultivo positivo de *N.brasiliensis*, también tenían anticuerpos anti-*Nocardia* circulantes que reconocían los antígenos inmunodominantes, P2 P26 y P61 (Salinas-Carmona *et al* 1992; Vera-Cabrera *et al* 1992). Además, Bojalil y Magnusson estudiaron la hipersensibilidad tardía en pacientes sanos, pacientes con actinomicetoma o tuberculosis a quienes se les inyectó sensitinas aisladas de *Nocardia asteroides* o de *Nocardia brasiliensis*. En los pacientes con micetomas por *Nocardia*, se obtuvo una reacción dérmica positiva y de igual forma, se observó una reacción cruzada con los pacientes con tuberculosis (Bojalil y Magnusson, 1963). Salinas-Carmona *et al* (1993) seleccionaron el antígeno P24 para utilizarlo en sus pruebas de ELISA, debido a que este antígeno no presentaba reactividad cruzada con el suero obtenido de pacientes con tuberculosis o lepra. Estos autores, sugieren que el antígeno P26 y el P61 son los responsables por las reacciones cruzadas (Salinas-Carmona, 2001). Salinas-Carmona *et al* (1993) recomiendan el uso del antígeno P24 tanto para el diagnóstico serológico así como para monitorear la respuesta al tratamiento médico por parte del paciente, esto debido al hecho de que el uso de este antígeno provee de una prueba serológica muy sensible y específica la cual puede ser usada de manera rutinaria en los laboratorios clínicos. El papel de los anticuerpos anti-*N.brasiliensis* y las citocinas en la protección del huésped no está claro. Salinas-Carmona *et. al.* (2000) sugirieron que la inmunidad pasiva con anticuerpos contra *N.brasiliensis* parecía proteger a los ratones de la infección, pero el tratamiento de los ratones con suero hiperinmune no provocó ningún efecto en los micetomas existentes. Silva y Faccioli (1992), reportaron que el factor alfa de necrosis tumoral (TNF- α) era importante para eliminar a *N.brasiliensis* del hígado y del bazo en ratones infectados intraperitonealmente, pero la función de esta citosina en el desarrollo del micetoma se desconoce.

No obstante, aparentemente no existen modelos murinos de actinomicetoma provocado por agentes distintos a las *Nocardias*; existen varios reportes incluyendo los descritos anteriormente que utilizan *Nocardia brasiliensis* en modelos murinos de actinomicetomas (Salinas-Carmona, 2000; Salinas-Carmona *et al* 1999; Rodríguez *et al* 1996; Zlotnik y Buckley, 1980). Se ha demostrado que los resultados histopatológicos en lesiones de actinomicetomas en humanos producidas por *N.brasiliensis* son idénticas a las inducidas en ratones experimentales (Salinas-Carmona, 2000). La función de las distintas células huésped y los componentes activos en la prevención y eliminación de los actinomicetomas no se ha establecido. No obstante, en la nocardiosis pulmonar causada por *N. asteroides* GUH-2, se podría deducir el siguiente escenario: las *Nocardias* se adhieren, invaden, crecen y matan a las células huésped destruyendo el tejido local (Beaman, 1996; Beaman y Beaman, 1998). Este daño resulta en la liberación de varios factores inflamatorios que contribuyen al aumento significativo de los neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) en el lugar de crecimiento nocardial (Beaman, 2000; Beaman *et al* 1978; Ellis y Beaman, 2002). Estudios anteriores indican que los PMNs no son muy efectivos al momento eliminar a las nocardias, pero si lo son en inhibir su crecimiento (Filice, 1985; Filice y Niewoehner, 1987; Pomeroy y Filice, 1988). Durante este proceso los polimorfonucleares se activan y secretan varios tipos de citocinas incluyendo Interferon Gamma (INF- γ), estos a su vez activan macrófagos y linfocitos T (Abbas *et al* 2000; Ellis y Beaman 2002).

Con la ayuda de $\gamma\delta$ -linfocitos T la infección por *Nocardia* se cura y el tejido dañado se repara (King *et al* 1999; Ferrick *et al* 2000; Tam *et al* 2001). Todos estos eventos de respuesta celular dependen de las dosis utilizadas, pero estos en algunos casos las nocardias pueden sobrepasarlos (King *et al* 1999; Tam *et al* 2001). Por lo tanto una respuesta efectiva del huésped a las *Nocardias*, depende de los polimorfonucleares, macrófagos activados, células T, incluyendo $\gamma\delta$ -linfocitos T y la secreción de varias citocinas incluyendo INF- γ IL-1, IL-6 y probablemente TNF- α (Abbas *et al* 2000; Beaman *et al* 1978; Beaman, 2000; Davis-Scibienski y Beaman 1980; Ellis y Beaman, 2002; Moore *et al* 2000; Pujic y Beaman, 2001; Beaman y Beaman, 2000; Filice, 1985; Filice y

Niewoehner, 1987; Pomeroy y Filice, 1988; Salina-Carmona *et al* 1999; Silva y Faccioli, 1992). Los anticuerpos, las células B y las células plasmáticas no parecen tener o jugar un papel determinante en el proceso de infección, pero los anticuerpos pueden desempeñar una función en el sentido de prevenir las etapas iniciales de la adherencia e invasión del tejido (Beaman, 2000; Moore *et al* 2000; Pujic y Beaman, 2001; Beaman y Beaman, 2000; Filice, 1985; Filice y Niewoehner, 1987; Pomeroy y Filice, 1988). Observaciones preliminares sugieren que este mismo proceso puede ocurrir posterior a la infección con *N. brasiliensis*-17-E (Beaman y Ferrick, datos no publicados). Los datos actuales sugieren que los linfocitos T CD4+ y CD8+, células NK, mastocitos, eosinófilos, linfocitos B y el complemento no son requeridos para obtener una respuesta pulmonar adecuada a *Nocardia asteroides* GUH-2 en el modelo murino. Pero en su lugar los linfocitos T- $\gamma\delta$ parecen ser más críticos para lograr una respuesta del huésped en el modelo murino pulmonar (Beaman, 2000; Pujic y Beaman, 2001; Beaman y Beaman, 2000; Ellis y Beaman, 2002; King *et al* 1999; Ferrick *et al* 2000; Tam *et al* 2001; Beaman, datos no publicados).

Terapéutica de los micetomas

Los micetomas son enfermedades crónicas causadas tanto por hongos verdaderos como por actinomicetos aeróbicos, en el tratamiento de éstas infecciones han sido utilizadas diversos tipos de drogas antimicrobianas presentando las mismas diferentes grados de éxito en su uso. Para el tratamiento de los eumicetomas, la combinación de drogas anti-fúngicas y cirugía han sido también indicadas (Welsh *et al* 1995). Welsh *et al* (1995), han tratado con éxito a mini-eumicetomas utilizando procedimientos quirúrgicos. Para el tratamiento del micetoma debido a *M.mycetomatis*, se recomienda el uso de 400mg diarios de Ketoconazol, lo cual constituye el tratamiento de elección para este tipo de eumicetoma (Serrano *et al* 1998). La efectividad de otros agentes anti-fúngicos comúnmente usados es variable (Welsh *et al* 1995). Por ejemplo, el Fluconazol no es efectivo en el tratamiento del eumicetoma, en cambio la respuesta terapéutica al Itraconazol varía. La respuesta a la Anfotericina B, ha demostrado ser muy variable (de buena a pobre). El Trimetropin-sulfametoxazol, usado solo o en combinación con Diaminodifenilsulfona, parece ser el tratamiento más indicado para el actinomicetoma.

En el caso de los actinomicetomas el uso de la cirugía tiene poco éxito (Welsh *et al* 1995). Aunque el uso del Trimetropin-sulfametoxazol solo o en combinación con Dapsone durante un período variable de tiempo como agentes de primera línea para el tratamiento del actinomicetoma, la baja respuesta a la terapia combinada de drogas, con altas tasas de recaída han llevado al de terapia alternas con otras drogas, tales como la Gentamicina, Amikacina y la Cefotaxina (Sharma *et al* 2003). La Amikacina está indicada para su uso en infecciones crónicas que no responden a la terapia usual y en aquellos casos en los que se presenta peligro de diseminación a órganos adyacentes (Welsh *et al*, 1995). Chaudhuri *et al* (1997) probaron la acción de 8 antibióticos contra 30 cepas aisladas de casos de actinomicetoma en humanos, las cuales pertenecían a 7 especies diferentes de actinomicetos. Estos autores reportaron que muchas de las cepas aisladas habían desarrollado resistencia parcial o total a los antibióticos comúnmente utilizados tales como: Cotrimazol, Estreptomina y Ampicilina, sin embargo; la mayoría eran sensibles a la Amikacina y la Ciprofloxacina. Vera-Cabrera *et al* 2001, investigaron la sensibilidad *in vitro* de una nueva oxazolidinona: el Linezolid; estos autores compararon la actividad del Linezolid con la de la Amikacina, el trimetropin-sulfametoxazol y al ácido clavulónico-amoxicilina contra 25 cepas de *N.brasiliensis* aisladas de pacientes con micetoma. Estos autores encontraron que todas estas cepas de *N.brasiliensis* eran sensibles al Linezolid con una dosis inhibitoria mínima del 50% (MIC_{50%} con promedio de 1 μ g/ml) los autores sugieren que este antibiótico podría ser utilizado como una buena droga alterna en el tratamiento del actinomicetoma causado por *N.brasiliensis*.

Posibles mecanismos de patogenicidad de *Nocardia* en el actinomicetoma

Beaman y sus colegas han estudiado, desde el año 1965, de manera multidisciplinaria los posibles mecanismos de la patogénesis de *Nocardia*, así como también los tipos de respuesta del huésped a estos microorganismos (Beaman y Beaman 1994; Beaman y Beaman 2000; Beaman, 2000; Pujic y Beaman, 2001); no obstante pocos de estos reportes discutían aspectos relativos a *N.brasiliensis* (Serrano *et al* 2000). Estudios sobre la virulencia de *Nocardia spp.* realizados por Beaman y Maslan (1978); Beaman *et al* (1980) a pesar de que los mismos no estaban directamente relacionados con la producción experimental de actinomicetoma en animales, no obstante; los mismos contribuyeron a la comprensión de algunos factores que determinan la susceptibilidad a las infecciones por *Nocardia*. Beaman y Maslan (1978) demostraron que las células en fase logarítmica de crecimiento de *N.asteroides* GUH-2 inyectadas por vía endovenosa al ratón eran más virulentas que aquellas del mismo cultivo en fase estacionaria. Así mismo encontraron que suspensiones homogéneas de células en fase “log” de todas las cepas de *N.asteroides*, *N.brasiliensis* y *N.otitidiscaviarum* (*caviae*), inyectadas por vía endovenosa, eran mas virulentas que aquellas en fase estacionaria del mismo cultivo (Beaman, 2000; Beaman y Beaman 2000; Beaman y Beaman, 1994; Beaman *et al* 1978; Pujic y Beaman, 2001). Además, el tipo de medio utilizado para cultivar los organismos también afectó la virulencia.

En estudios posteriores, Beaman *et al* (1980), demostraron que la ruta de inoculación de *Nocardia* para los ratones afectaba, tanto la virulencia como la capacidad de respuesta del huésped. Por ejemplo, ellos demostraron que células *N.asteroides* GUH-2 en la fase estacionaria inicial son 10 veces más virulentas que el mismo cultivo de *N.otitidiscaviarum* inyectado por vía intravenosa a los ratones. No obstante, la dosis letal para estos dos organismos son la misma al inyectarse por vía intraperitoneal. Conde *et al* 1982, realizaron una evaluación del efecto del ciclo de crecimiento de *N.brasiliensis* y su habilidad de inducir micetomas en los ratones por medio de inoculación en la almohadilla plantar. Estos investigadores encontraron que la fase de crecimiento no influía en la habilidad de la cepa *N.brasiliensis* de ocasionar una enfermedad progresiva. Esta discrepancia aparente, se explica por las diferencias en la tasa de crecimiento de las cepas de *N.brasiliensis* utilizadas, los tipos de cepas de los ratones utilizados, y la vía de infección [Ej. en la almohadilla plantar vs. inoculación intravenosa] (Beaman y Beaman, 1994; Beaman y Sugar, 1983) dado que las células de *N.brasiliensis* 17E en su fase “log” son aproximadamente 10 veces más letales para los ratones posterior a una inoculación intravenosa que las células tomadas del mismo cultivo en su fase estacionaria.

Curiosamente, las cepas de *N.brasiliensis* 17E (aislada originalmente de un micetoma humano) no inducirá un micetoma en los ratones, incluso cuando el inóculo es extremadamente grande bien sea de las células (10^8 UFC) en fase “log” o estacionaria son inyectadas en la pata (Beaman, datos no publicados). En contraste, dosis relativamente bajas de células de esta cepa en la fase “log” son muy virulentas al inyectarse por vía intravenosa en ratones, en dosis letales al 50% (células en fase logarítmica $DL_{50\%}$ es aproximadamente 10^6 UFC), y los ratones que sobrevivieron a una dosis letal ($DL_{50\%}$) desarrollaron micetomas de apariencia clásica en las patas, cola y en las partes más frías del cuerpo en un lapso de tiempo de semanas a meses (Serrano *et al* 2000). Estas observaciones tienden a contradecir la creencia de que los micetomas se derivan de la inoculación directa y no de la expansión sistémica a través del torrente sanguíneo.

Debido a que las respuestas inmuno-celulares y tumorales han sido reconocidas por su capacidad de alterar la susceptibilidad de las infecciones de *Nocardia* en el huésped humano, varios investigadores han tratado de infectar ratones inmuno-comprometidos con *Nocardia spp.* para definir aún más el rol de los linfocitos T y la influencia de las células del bazo en la resistencia del huésped al agente infeccioso. Por ejemplo, Folb, Timme y Horowitz (1977) infectaron ratones atímicos (nude nu/nu) tanto con *N.asteroides* como con *N.brasiliensis*, encontrando que ambos organismos producían una infección diseminada y con una alta mortalidad en los ratones desnudos

comparado con los ratones blancos suizos y otras cepas endogámicas. Además, la pérdida de habilidad de los ratones desnudos de producir un granuloma en respuesta a *N.brasiliensis*, sugiere que los linfocitos T pueden jugar un papel crucial en el desarrollo del granuloma. Los experimentos realizados por Mahgoub (1987) unos años después, utilizando ratones desnudos también demostró que no existía evidencia de lesiones de micetoma en los ratones desnudos infectados con *Streptomyces somaliensis*, *A.madurae*, *A.pelletieri* y *N.brasiliensis*. Estas observaciones al igual que las realizadas por Beaman y col. (1978), donde estos investigadores evaluaron la susceptibilidad de los modelos murinos inmunodeficientes [Ej. ratones atímicos congénitos (Nude; nu/nu) anaesplénicos hereditarios (Dh/+)] la infección por *N.asteroides*; demostraron que las células T son esenciales para una respuesta del huésped apropiada a la virulencia de nocardiae. Más recientemente se demostró que los linfocitos T- $\gamma\delta$ eran las células más críticas requeridas para una respuesta huésped exitosa contra nocardiae (King et al 1999; Ferrick et al 2000; Tam et al 2001).

Beaman y Scates (1981) inyectaron suspensiones de células de *N.otitidiscaviarum* CDC cepa 112 en ratones normales, atímicos y anaesplénicos usando diferentes rutas para determinar los mecanismos de inducción de micetomas. Entre las más importantes conclusiones a las cuales llegaron estos autores destacan las siguientes:

- a) Los ratones atímicos y anaesplénicos fueron significativamente más susceptibles a los agentes infectantes que los controles, independientemente de la vía de inoculación.
- b) Los micetomas de evolución crónica y progresiva causados por este organismo únicamente ocurrieron en los ratones que fueron inyectados por vía endovenosa.
- c) Las formas-L de *N.otitidiscaviarum* fueron inducidas en los huéspedes inmunocompetentes, en cambio, estas formas sin pared celular no fueron observadas en los animales inmunodeficientes.
- d) Los ratones deficientes en células T, fueron incapaces de desarrollar micetomas típicos. Independientemente de los eventos que condujeron al desarrollo de un micetoma se pudo notar una respuesta temprana de inmunidad mediada por células a *N.otitidiscaviarum* que comprometían a linfocitos T, macrófagos y leucocitos polimorfonucleares los cuales eran capaces de inhibir el crecimiento de estos organismos. Las bacterias ya fagocitadas eran, de manera progresiva, despojadas de su pared celular, lo que iba dando lugar a las formas-L, las cuales aparecían para replicarse y persistir en el huésped. A medida en que las formas-L se replicaban dentro del huésped se iban formando pequeños grupos de esferas y gránulos que se acumulaban para conformar gránulos bacterianos. Las células deficientes de pared celular presentes en estos gránulos en desarrollo revertían a formas celulares con pared y éstas células revertidas, continuaban creciendo en la periferia del gránulo. Este proceso inducía una respuesta del huésped caracterizada por la presencia de leucocitos polimorfonucleares seguidos de linfocitos y macrófagos (Beaman y Beaman 1994; Beaman, 2000; Beaman y Beaman, 2000; Pujic y Beaman, 2001).

Salinas-Carmona y col. (1999) utilizaron la almohadilla plantar de ratones BALB/c para demostrar el hecho de que la respuesta de los anticuerpos murinos a *Nocardia brasiliensis* en actinomicetoma experimental es idéntica a aquella de los pacientes con micetoma, cuando la misma es determinada tanto por la Prueba de ELISA o de “Western blot”. Sin embargo, los resultados de los micetomas experimentalmente inducidos también corroboraron hallazgos previos de que un inóculo de células de *Nocardia brasiliensis* suspendidas en solución salina era suficiente para inducir micetoma y que la respuesta inflamatoria inicial progresaba hasta el desarrollo de un micetoma bien definido (Zlotnik y Buckley, 1980). Una conclusión adicional fue que la producción de micetomas se lograba reproducir mejor cuando se usaban células de la fase “log” y no células de la fase estacionaria, una observación similar a esta ya había sido reportada (Beaman et al 1978; Zlotnik y Buckley, 1980).

Vera-Cabrera *et al* (1998) lograron determinar la habilidad de células de *N.brasiliensis* HUJEG-1 para inducir micetomas en la almohadilla plantar de ratas Lewis “normales” inmunocompetentes, en ratas atímicas (nu/nu) y sus heterocigotos de la misma camada (nu/+). Tanto las ratas Lewis como los heterocigotos atímicos presentaron lesiones inflamatorias en la pata; la misma se caracterizaba por abscesos y con la presencia de fístulas. Sin embargo, estas lesiones comenzaron a curarse de manera espontánea entre los 20 y 25 días después de la inoculación. Las ratas atímicas presentaron un proceso de infección más invasivo, el cual condujo a la muerte de algunos de los animales. Los procesos inflamatorios iniciales se caracterizaron por la presencia de manera predominante de linfocitos polimorfonucleares en el área de la lesión. Luego de 20 días de evolución del proceso inflamatorio, la mayoría de los componentes del infiltrado celular se componía de histiocitos, linfocitos, células de Langerhans y fibroblastos. Se observó La presencia de granos en las ratas Lewis “normales” y en los heterocigotos nu/+ luego de 15 días de la inoculación, en las ratas atímicas homocigotas (nu/nu) no se observaron granos (Vera-Cabrera *et al*, 1998). Estos resultados preliminares reportados por estos autores, son similares a los previamente reportados en ratones inmunodeficientes (nu/nu) por Beaman *et al* en 1978. Estos resultados evidencian la necesidad de realizar más investigaciones para evaluar el modelo de actinomicetoma en ratas. Hasta el momento, es el ratón el modelo experimental más reproducible para la producción experimental del actinomicetoma causado por *Nocardia*.

Referencias

- Abbas, AK; Lichtman, AH y Pober, JS. (Eds) 2000. Cellular and Molecular Immunology 4th ed. W.B. Saunders Co., New York. pp. 1-553.
- Beaman, BL. 2000. The Pathogenesis of *Nocardia*. In: Fischetti, VR; Novick, J; Ferretti, D. Portnoy, and Rood J. (Eds.) *Gram Positive Pathogens*: ASM Press Chapt. 61: pp.594-606.
- Beaman, BL. Differential binding of *Nocardia asteroides* in the murine lung and brain suggest multiple ligands on the nocardial surface. *Infection and Immunity*, 1996; 64: 4859-4862.
- Beaman, BL. and Beaman, L. *Nocardia asteroides* as an invasive intracellular pathogen of the brain and lungs, In: J. Hacker and T. Oelschlaeger (eds.) *Bacterial Invasion into Eukaryotic Cells*; Subcellular Biochemistry, 2000; 33:167-198.
- Beaman, BL. and Beaman L. Filament tip associated antigens (FTAAs) involved in adherence to and invasion of pulmonary epithelia in vivo and Hela cells in vitro by *Nocardia asteroides*. *Infection and Immunity*, 1998; 66: 4676-4689.
- Beaman, BL., and Beaman, L. *Nocardia* species: Host-Parasite relationships. *Clin. Microbiol. Rev.* 1994; 7: 213-264.
- Beaman, BL; Goldstein, E; Gershwin, ME; Maslan, S. and Lippert, W. 1978. Lung response of congenitally athymic (nude), heterozygous, and Swiss Webster mice to aerogenic and intranasal infection by *Nocardia asteroides*. *Infection and Immunity* 22:867-877.
- Beaman, B.L., M.E. Gershwin, S. Maslan. 1978. Infectious agents in immunodeficient murine models: pathogenicity of *Nocardia asteroides* in congenitally athymic (nude) and hereditarily asplenic (Dh/+) mice. *Infection and Immunity* 20: 381-387.
- Beaman, B.L. and S. Maslan. 1978. Virulence of *Nocardia asteroides* during its growth cycle. *Infection and Immunity* 20: 290-295.
- Beaman, B.L., S. Maslan, S. Scates, and J. Rosen. 1980. The effect of the route of inoculation on host resistance to *Nocardia*. *Infection and Immunity* 28: 185-189.
- Beaman, B.L. and S.M. Scates. 1981. Role of L-forms of *Nocardia caviae* in the development of chronic mycetomas in normal and immunodeficient murine models. *Infection and Immunity* 33:893-907.
- Beaman B.L. and A.M. Sugar. 1983. *Nocardia* in naturally acquired and experimental infections in animals. *Journal of Hygiene* 91: 393-419.
- Bojalil L.F. and M. Magnusson. 1960. Specificity of skin reactions of humans to *Nocardia* sensitins. *Am. Rev. Rep. Dis.* 88:409-411.
- Campbell CK. 1987. *Polycytella hominis* gen. et sp. nov., a cause of human pale grain mycetoma. *J. Med. Vet. Mycol.* 25:301-305.
- Chaudhuri BN, Maiti PK, Sil J. 1997. Antibiotic sensitivity patterns of actinomycetes isolated from patients of actinomycetoma. *Indian J. Med. Res.* 105:162-166.

- Chavez G, Estrada R, Bonifaz A. 2002. Perianal actinomycetoma experience of 20 cases. *Int. J. Dermatol.* 41:491-493.
- Conde C., E.I. Melendro, M. Fresan, and L. Ortiz-Ortiz. 1982. *Nocardia brasiliensis* mycetoma induction and growth cycle. *Infection and Immunity* 38: 1291-1295.
- Davis-Scibienski, C. and B. L. Beaman. 1980. Interaction of alveolar macrophages with *Nocardia asteroides*: Immunological enhancement of phagocytosis, phagosome lysosome fusion, and microbicidal activity. *Infection and Immunity* 30:578-587.
- Degavre B, Joujoux JM, Dandurand M, Guillot B.1997. First report of mycetoma caused by *Arthrographis kalrae*: successful treatment with itraconazole. *J. Amer. Acad. Dermatol.* 37:318-320.
- Develoux M, Audoin J, Treguer J, Vetter JM, Warter A, Cenac A.1988. Mycetoma in the Republic of Niger: clinical features and epidemiology. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 38: 386-390.
- Develoux M, Ndiaye B, Dieng MT. 1995. Mycetomas in Africa. *Sante.* 5: 211-217.
- Dieng MT, Sy MH, Diop BM, Niang SO, Ndiaye B. 2003. Mycetoma: 130 cases. *Ann. Dermatol. Venerol.* 130:16-19.
- el Hassan AM, Fahal AH, Ahmed AO, Ismail A, Veress B. 2001. The immunopathology of actinomycetoma lesions caused by *Streptomyces somaliensis*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 95: 89-92.
- Ellabib MS, Refaai A, Khalifa Z, Kavanagh K. 2003. Isolation and identification of *Madurella mycetomatis* from two cases of black grain mycetoma in Libya. *Mycoses.* 46:339-341.
- Ellis, T.N. and B.L. Beaman. 2002. Polymorphonuclear Neutrophils are Activated to Produce Interferon- γ in Response to Pulmonary Infection with *Nocardia asteroides*. *Leukocyte Biology.* 72:373-381.
- Fahal AH. 2004. Mycetoma: a thorn in the flesh. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 98:3-11.
- Ferrick, D.A., King, D.P., Jackson, K.A., Braun, R.K., Tam, S., Hyde, D.M., and Beaman, B.L. 2000. Intraepithelial gamma delta T lymphocytes: sentinel cells at mucosal barriers. *Springer Seminars in Immunopathology.* 22(3):283-296.
- Filice, G.A. 1985. Inhibition of *Nocardia asteroides* by neutrophils. *J. Infect. Dis.* 151:47-56.
- Filice, G.A. and D.E. Niewoehner. 1987. Contribution of neutrophils and cell-mediated immunity to control of *Nocardia asteroides* in murine lungs. *J. Infect. Dis.* 156:113-121.
- Folb, P.I. A. Timme and A. Horowitz. 1977. *Nocardia* infections in congenitally athymic (nude) mice and in other inbred mouse strains. *Infection and Immunity* 18: 459-466.
- Godfrey, J. 1864. Disease of the foot not hitherto described. *Lancet.* 1:593-594.
- Gonzalez-Ochoa, A. 1973. Virulence of nocardiae. *Canadian Journal of Microbiology.* 19: 901-904.

- Gonzalez -Ochoa, A. and T. Kumico-Hojyo. 1967. Reproduction of mycetoma by *Nocardia brasiliensis* in mice. In Proceedings of the 5th International Congress of Chemotherapy. AIII:2/9:323-330. Wiener Medizinischen Akademie, eds., Vienna, Austria.
- Gonzalez-Ochoa, A. and M. Sandoval. 1955. Caracteristicas de los actinomicetos patogenos mas comunes. Revista del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales (Mexico) 16:149-161.
- Gonzalez-Ochoa, A. and D.L.A. Sandoval. 1960. Aislamiento de *Nocardia brasiliensis* y *Nocardia asteroides* a partir de suelos. Revista del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales (Mexico) 22:15-24.
- Goodfellow, M. 1998. *Nocardia* and related genera. In: Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections. Collier, L., A. Balows and M. Sussman and Ballows A. and B.I. Duerden (Eds.) Arnold, Oxford University Press, Inc. New York. 9th Ed. Vol. 2. pp463-489.
- Guimaraes CC, Castro LG, Sotto MN. 2003. Lymphocyte subsets, macrophages and Langerhans cells in actinomycetoma and eumycetoma tissue reaction. Acta Trop. 87: 377-384.
- Gugnani HC, Ezeanolue BC, Khalil M, Amoah CD, Ajuu EU, Oyewo EA. 1995. Fluconazole in the therapy of tropical deep mycoses. Mycoses. 38:485-488.
- Hay RJ, and Collins MJ. 1983. An ultrastructural study of pale eumycetoma grains. Sabouraudia. 21:261-269.
- Hay RJ, and Mackenzie DW. 1982. The histopathological features of pale grain eumycetoma. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 76:839-844.
- Hemashettar BM, Siddaramappa B, Padhye AA, Sigler L, Chandler FW. 2000. White grain mycetoma caused by a *Cylindrocarpon* sp. in India. J. Clin. Microbiol. 38:4288-4291.
- Hood SV, Moore CB, Cheesbrough JS, Mene A, Denning DW. 1997. Atypical eumycetoma caused by *Phialophora parasitica* successfully treated with itraconazole and flucytosine. Brit. J. Dermatol. 136:953-956.
- Janaki C, Sentamilselvi G, Janaki VR, Devesh S, Ajithados K. 1999. Case report. Eumycetoma due to *Curvularia lunata*. Mycoses. 42:345-346.
- Khatri ML, Al-Halali HM, Fouad Khalid M, Saif SA, Vyas MC. 2002. Mycetoma in Yemen: clinicoepidemiologic and histopathologic study. Int. J. Dermatol. 41:586-593.
- King, D.P., D.M. Hyde, K.A. Jackson, D.M. Novosad, T.N. Ellis, L. Putney, M.Y. Stovall, L.S. van Winkle, B.L. Beaman, and D.A. Ferrick. 1999. Cutting Edge: Protective response to pulmonary injury requires $\gamma\delta$ -T lymphocytes. Journal of Immunology 162:5033-5036.
- Lopez Martinez R, Mendez Tovar LJ, Lavallo P, Welsh O, Saul A, Macotela Ruiz E. 1992. Epidemiology of mycetoma in Mexico: study of 2105 cases. Gac. Med. Mex. 128: 477-481.
- MacCallum, W.G. 1902. On the history of *Actinomyces asteroides*. Zentralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde (1. Original) 31: 528-547.

- Mackinnon, J.E. and R.C. Artagaveytia-Allende. 1956. The main species of pathogenic aerobic actinomycetes causing mycetomas. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 50:31-40.
- Macotela-Ruiz, E. and F. Mariat. 1963. Sur la production de mycetomes experimentaux par *Nocardia brasiliensis* et *Nocardia asteroides*. Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique 56:46-54.
- Maghoub, E.S. 1978. Experimental infection of athymic nude New Zealand mice, Nu/Nu strain with mycetoma agents. Sabouraudia 16:225-228.
- Maghoub, E.S., S.A. Gumaa and A.M. El Hassan, 1977. Immunological status of mycetoma patients. Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique 70: 48-54.
- Mishra, S.K., R.S. Sandhu, H.S. Randhawa, V.N. Damodaran and S. Abraham. 1973. Effect of cortisone administration on experimental nocardiosis. Infection and Immunity 7:123-129.
- Moore, T.A., M.W. Newstead, R.M. Strieter, B. Mehrad, B.L. Beaman, and T.J. Standiford. 2000. Bacterial clearance and survival are dependent on CXC chemokine receptor-2 ligands in a murine model of pulmonary *Nocardia asteroides*. Journal of Immunology 164:908-915.
- Nakayama, H. 1906. Impfversuch mit Aktinomyces asteroides Eppinger an Meerschweinchen zugleich ein Beitrag zur Frage der Überempfindlichkeit. Archives für Hygiene 58: 207-212.
- Nicolle, C. and E. Pinoy. 1908. Un cas de mycetoma a grains noirs. Bulletin. de la Societe de Pathologie Exotique 1:95-99.
- Pelzer K, Tietz HJ, Sterry W, Haas N. 2000. Isolation of both *Sporothrix schenckii* and *Nocardia asteroides* from a mycetoma of the forefoot. Brit. J. Dermatol. 143:1311-1315.
- Pomeroy C. and G.A. Filice. 1988. Effect of intravenous silica on the course of *Nocardia asteroides* pneumonia. Infect. Immun. 56:2507-2511.
- Pujic, P. and B. L. Beaman. 2001. *Actinomyces* and *Nocardia* In: M. Sussman, (Ed.) *Molecular Medical Microbiology* Academic Press (Chap. 43) pp. 937-960.
- Restrepo A. 1994. Treatment of tropical mycoses. J. Amer. Acad. Dermatol. 31S:91-102.
- Rippon, J.W. and G.L. Peck. 1967. Experimental infection with *Streptomyces madurae* as a function of collagenase. Journal of Investigative Dermatology 49(4): 371-378.
- Rippon, J.W. and A.L. Lorincz. 1964. Collagenase activity of *Streptomyces (Nocardia) madurae*. Journal of Investigative Dermatology 43: 483-486.
- Rodriguez Mdel C, Torres JA, Zlotnik H. 1996. Investigation of the temporal humoral immune response in a murine model of actinomycetoma. Puerto Rico Health Sci. J. 15: 91-95.
- Salinas-Carmona MC. 2001. Anti-*Nocardia brasiliensis* antibodies in patients with actinomycetoma and their clinical usefulness. Gac. Med. Mex. 137: 1-8.

- Salinas-Carmona MC. 2000. *Nocardia brasiliensis*: from microbe to human and experimental infections. *Microbes Infect.* 2: 1373-1381.
- Salinas-Carmona, M.C., M.A. Castro Corona, A. Licon-Trillo, O. Welsh, S. Nagesh, K.D. Eisenach and A. Rendon, 1997. Constrictive pericarditis and recurrent mycetoma due to *Nocardia brasiliensis* in non-immunocompromised patient. *J. Mycol.* 7:47-50.
- Salinas-Carmona, M.C., E. Torres-Lopez, A.I. Ramos, A. Licon-Trillo, D. Gonzalez-Spencer. 1999. Immune Response to *Nocardia brasiliensis* antigens in an experimental model of actinomycetoma in BALB/c mice. *Infection and Immunity* 67: 2428-2432.
- Salinas-Carmona, M.C., X. Vera, O. Welsh and M. Rodríguez. 1992. Antibody response to *Nocardia brasiliensis* antigens in man. *Zbl. Bakt.* 276: 390-397.
- Salinas-Carmona, M.C., O. Welsh and S.M. Casillas, 1993. Enzyme-linked immunosorbent assay for serological diagnosis of *Nocardia brasiliensis* and clinical correlation with mycetoma infections. *J. Clin. Microbiol.* 31:2901-2906.
- Schaal, K.P. 1998. Actinomycoses, Actinobacillosis, and related diseases *In: Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections*. Collier, L., A. Balows and Hausler, W.J. and M. Sussman (Eds.) Arnold, Oxford University Press, Inc. New York. 9th Ed. Vol. 3. pp777-798.
- Serrano, J.A., Beaman, B.L., and Boiron, P. 2000. Relationship of body temperature to localization of mycetomas caused by *Nocardia brasiliensis* in a murine model. *J Mycol Med*, 10(N4):210-215.
- Serrano, J.A., Pisani, J.D. & Lopez, F.A. Black grain Minimycetoma caused by *Pirenochaeta mackinnonii*. The first clinical case of eumycetoma reported in Barinas state, Venezuela. *J Mycol Med*. 8:34-39. 1998.
- Sharma N, Mendiratta V, Sharma RC, Hemal U, Verma M. 2003. Pulse therapy with amikacin and dapsone for the treatment of actinomycotic foot: a case report. *J. Dermatol.* 30:742-747.
- Silva C.L., and L.H. Faccioli. 1992. Tumor necrosis factor and macrophage activation are important in clearance of *Nocardia brasiliensis* from livers and spleens of mice. *Infect. Immun.* 60:3566-3570.
- Strauss, R.E. and A.M. Kligman. 1951. The use of gastric mucin to lower the resistance of laboratory animals to systemic fungus infections. *Journal of Infectious Diseases* 88: 151-155.
- Tam, S., D. King, and B.L. Beaman. 2001. Increase of $\gamma\delta$ T lymphocytes in murine lungs occurs during recovery from pulmonary infection by *Nocardia asteroides*. *Infection and Immunity* 69:6165-6171.
- Tomimori-Yamashita J, Ogawa MM, Hirata SH, Fischman O, Michalany NS, Yamashita HK, Alchorne M. 2002. Mycetoma caused by *Fusarium solani* with osteolytic lesions on the hand: case report. *Mycopathologia*.153:11-14.
- Venugopal PV, Venugopal TV. 1995. Pale grain eumycetomas in Madras. *Australia J. Dermatol.* 36:149-151.

Venugopal PV, Venugopal TV, Ramakrishna ES, Ilavarasi S. 1993. Antimycotic susceptibility testing of agents of black grain eumycetoma. *J. Med. Vet. Mycol.* 31:161-164.

Vera-Cabrera L, Gomez-Flores A, Escalante-Fuentes WG, Welsh O. 2001. In vitro activity of PNU-100766 (linezolid), a new oxazolidinone antimicrobial, against *Nocardia brasiliensis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:3629-3630.

Vera-Cabrera, L., M.A. Rodriguez-Quintanilla, M.A., Salinas-Carmona, M.C., and Welsh, O. 1998. Experimental mycetoma by *N. brasiliensis* in rats. *Journal de Mycologie Medicale* 8: 183-187.

Vera-Cabrera, L., M.C. Salinas-Carmona, O. Welsh-Lozano and M.A. Rodríguez, 1992. Isolation and purification of two immunodominant antigens from *Nocardia brasiliensis*. *J. Clin. Microbiol.* 30:1183–1187.

Welsh, O and R. Lopez, 1985. Micetoma con diseminación pulmonar. *Med. Cut. Iber. Lat.* 13: 517–523.

Welsh O, Salinas-Carmona, MC, Rodriguez MA. 1995. Treatment of eumycetoma and actinomycetoma. *Curr. Top. Med. Mycol.* 6:47-71.

Zlotnik, H. and H.R. Buckley. 1980. Experimental Production of actinomycetoma in BALB/c mice. *Infection and Immunity* 29: 1141-1145.

CAPÍTULO IV

REPRODUCCIÓN EXPERIMENTAL DEL ACTINOMICETOMA EN ANIMALES DE LABORATORIO

Hinda Zlotnik*

National Institutes of Health Bethesda, MD. (e-mail: ZlotnikH@nigms.nih.gov)

* Este capítulo fue escrito en su carácter personal y no representa las opiniones del NIH, DHHS o Gobierno Federal de EUA.

Abstract

The search for a suitable animal model for actinomycetoma dates back to the beginning of the XIX century. A review of the different investigations on the subject reveals that the inoculation of live *Nocardia spp.* with or without adjuvant into the foot pad of albino or BALB/c mice results in a chronic, fistulous tumor with actinomycotic grains, i.e., typical mycetoma. As in humans, this mycetoma grows by contiguity, and shows no tendency to spontaneous cure. Further use of this model has allowed the study of host-parasite interactions in actinomycetoma such as the immunological response to an infecting agent as well as the assessment of the virulence of different *Nocardia* species as well as of different strains.

Using immunodeficient (e.g. athymic) or immunocompetent mice and different routes of inoculation the conclusion has been reached that the T cell response against *Nocardia spp.* plays a role in the formation of the typical grains. In immunocompetent mice inoculated in the foot pads with *Nocardia spp.*, histopathological studies of the evolution of the actinomycetoma have shown that the grains are surrounded by epithelioid and Langerhans cells as well as giant ones. As the actinomycetoma progresses in those mice bone destruction eventually occurs.

In 1998, immunocompetent and immunodeficient Lewis rats were inoculated in the foot pads with a unicellular suspension of *Nocardia brasiliensis*. These inoculations resulted in the formation of inflammatory lesions characterized by the presence of abscesses. However, while the immunodeficient rats eventually died, the lesions in the immunocompetent ones began to heal 20-25 days post-inoculation.

The continued exploration of the host-parasite relationships in the footpad model of actinomycetoma in albino or BALB/c mice with new genetic technologies (such as microarrays) offers the possibility to learn which genes are expressed or inhibited during the initial contact with the pathogen and as the infection progresses. Moreover, this model will continue to be of value in the evaluation of novel chemotherapeutic agents.

La disponibilidad de modelos animales ha permitido estudiar aspectos únicos de los procesos infecciosos que requieren necesariamente el uso de un ser vivo. Por ejemplo, los modelos animales han permitido la investigación de la presentación clínica y características patológicas de algunas infecciones, así como la vía y ruta de inoculación, dosis infecciosa mínima, evolución de la infección, respuesta inmunológica al agente infeccioso, y vehículos para la prevención y tratamiento. Los modelos animales experimentales también han servido para evaluar pruebas diagnósticas y para realizar ensayos clínicos encaminados al descubrimiento y desarrollo de nuevas sustancias quimioterapéuticas. Con las nuevas tecnologías genéticas ahora disponibles, como lo son los “microchips” de ADN, los modelos animales ofrecen la posibilidad de determinar aquellos genes que se expresan o inhiben durante el inicio o el curso de una infección así como los genes que contribuyen a la respuesta inmunológica a un agente infeccioso.

La investigación de la reproducción experimental del actinomicetoma en animales de laboratorio se inició a principios del siglo XIX y surgió del interés de poder contar con un modelo que permitiera estudiar el curso de la infección. El propósito de este capítulo es el de proveer un relato cronológico de las contribuciones más importantes al desarrollo de un modelo óptimo para el estudio del actinomicetoma causado por *Nocardia spp.*

Los primeros investigadores que inocularon las patas de palomas con un agente causal de micetoma, el hongo *Madurella mycetomi*, fueron Nicolle y Pinoy en 1908. Las extremidades inferiores fueron elegidas como sitio de inoculación porque es la región del cuerpo humano dónde ocurren los micetomas con mayor frecuencia (López-Martínez *et al* 1992). Previamente, MacCallum (1902) y Nakayama (1906) trataron de infectar cobayos, y conejos con *Nocardia asteroides* por vía intraperitoneal con resultados mixtos, ya que los animales o sólo desarrollaban una peritonitis leve que se curaba de manera espontánea o morían luego de haber sido inoculados. Resultados similares fueron reportados años más tarde por González-Ochoa y Sandoval (1955) y Mackinnon y Artagaveytia-Allende (1956) quienes encontraron que la producción de abscesos intraperitoneales en diferentes animales experimentales, luego de administrar un inóculo de *Nocardia spp.*, era variable. En algunos casos las lesiones que se producían contenían granos inicialmente pero no evolucionaban más y sanaban espontáneamente, mientras que, en otros casos las lesiones se tornaban supurativas y contenían gran abundancia de granos.

Strauss y Kligman (1951) notaron que para que se produjeran abscesos intraperitoneales de *Nocardia* de manera consistente en ratones de laboratorio, se requería añadir mucina al inóculo. Por lo tanto, se pensó que la presencia de un adyuvante era indispensable para que se iniciara el proceso infeccioso. Basándose en estos hallazgos, Macotela-Ruiz y Mariat (1963) postularon que era posible que se necesitara sensibilizar a los animales experimentales con el agente causal de la infección antes de inocularlos con el mismo agente para que se produjeran lesiones actinomicetómicas. Para corroborar esta hipótesis, dichos investigadores administraron inyecciones subcutáneas a ratones y cobayos que contenían microorganismos muertos de *N.brasiliensis* y *N.asteroides* procedentes de cepas aisladas de pacientes infectados antes de administrarles en las patas traseras un inóculo de 60 mg de organismos vivos del mismo género y especie utilizados para la sensibilización. Después de un período de incubación de dos meses, la mitad de los ratones y cobayos inoculados con *N.asteroides* desarrollaron lesiones fistulosas con granos. De los ratones y cobayos inoculados con *N.brasiliensis*, el 66.6% de los ratones y el 100% de los cobayos presentaron lesiones con fistulas y granos que eran más compactos que los que se veían en los animales infectados con *N.asteroides*. Sin embargo, como los animales que no fueron sensibilizados antes de recibir los inóculos también desarrollaron lesiones actinomicóticas con granos semejantes a las observadas en los animales sensibilizados, Macotela-Ruiz y Mariat concluyeron que el desarrollo del actinomicetoma no necesariamente requiere sensibilización previa con el agente causal.

En 1964, Rippon y Lorincz, evaluaron la posible relación entre la producción de enzimas proteolíticas y la patogenicidad de ciertos actinomicetos. Utilizaron ratones negros C57 que fueron inoculados en las almohadillas plantares con cortisona y células vivas de *Actinomadura (Streptomyces) madurae* productoras de colagenasa. Interesantemente el resultado de estas inoculaciones fue la producción de lesiones micetómicas que no se presentaron en ratones inoculados con cepas de *A. (Streptomyces) madurae* carentes de la colagenasa. A pesar de que se concluyó que la patogenicidad del *Actinomadura* estaba ligada a la producción de la actividad colagenolítica, no se hizo ninguna referencia al posible rol de la cortisona como un agente inmunosupresor en el proceso infeccioso (Mishra *et al* 1973).

En 1967 y dados los limitados ensayos dirigidos a la reproducción del actinomicetoma en modelos experimentales, González-Ochoa y Kumico-Hojyo procedieron a infectar grupos de 50 ratones

blancos subcutáneamente en la almohadilla plantar con diferentes dosis de *Nocardia spp.* Los inóculos utilizados consistieron en peso seco de bacterias (20; 10; 2; 1; ó 0.2 mg.) procedentes tanto de cultivos como de pacientes infectados. La temperatura a la que se mantuvieron los ratones fue de 10°C y se revisaron cada semana durante los primeros dos meses y cada dos semanas durante el resto del experimento. Los ratones desarrollaron lesiones típicas de un micetoma cuya severidad correlacionaba con la dosis de *Nocardia* inoculada. Por ejemplo, los ratones inoculados con 20 mg. de crecimiento de *Nocardia* presentaron un cuadro inflamatorio y de lesiones micetómicas, más dramáticas que la de los ratones infectados con 2 mg. Esta inflamación se tornó fistulosa y progresó hasta el punto en que ocurrió la amputación temprana de los dedos de la pata o incluso de la pata completa y en algunos animales hasta de parte del muslo de la pierna. Los animales que recibieron las dosis más bajas de 1.0 ó 2.0 mg presentaron inicialmente una inflamación leve en la pata que persistió y evolucionó dando lugar a lesiones actinomicetómicas típicas caracterizadas por fistulas, granos y tendencia a la cronicidad.

En otros experimentos también realizados por González-Ochoa y Kumico-Hojyo (1967) en los que administraron inóculos de 2 mg preparados en solución salina a grupos de ratones blancos, los investigadores encontraron que una semana después de la inoculación en la almohadilla plantar el 50% de los animales presentaban inflamación marcada en el sitio inoculado. Una semana más tarde, esta inflamación había disminuido en aproximadamente el 30% de los ratones inoculados mientras que persistía de manera mínima en los ratones restantes. A la tercera semana, la inflamación se tornó más severa y empezó a presentarse en aquéllos animales que no habían manifestado ninguna sintomatología. Durante la cuarta semana, el 50% de los ratones presentaban lesiones micetómicas y ya para la sexta semana, el 80% de los animales mostraban una tumoración fistulosa. Con el tiempo las lesiones actinomicetómicas continuaron desarrollándose y, luego de seis meses, el 100% de los animales presentaban el típico actinomicetoma caracterizado por una tumoración marcada, fistulas supurativas y granos. Interesantemente, el agente causal de la infección (*N. brasiliensis*) fue recuperado de los animales infectados durante las etapas antes descritas. En algunos ratones infectados también ocurrió invasión ósea y la formación de cavidades en el hueso en las etapas tardías de la infección experimental, tal y como sucede en los seres humanos que padecen de *actinomicetoma*.

En 1969, González-Ochoa evaluó el efecto de otras variables en el modelo de la almohadilla plantar del ratón notando que la sensibilización previa de los ratones con *N. brasiliensis*, adición de estafilococos al inóculo, o incubación a 10°C versus temperatura ambiente en nada alteraban la evolución del micetoma con relación a los lotes testigos. Basándose en estos resultados positivos, investigó, en 1973, en el mismo modelo la virulencia de diferentes cepas de *N. brasiliensis*, *N. asteroides* y *N. (caviae) otitidiscaviarum*. En este estudio se demostró que *N. brasiliensis* era un patógeno más virulento que *N. asteroides* y *N. (caviae) otitidiscaviarum*; y que éstas dos últimas especies eran igualmente patógenas. Importantemente, estos hallazgos validaron el uso del modelo de la almohadilla plantar del ratón para el estudio de la relación huésped-parásito en el actinomicetoma, marcando también el inicio de una serie de otras investigaciones que se detallan a continuación.

Zlotnik y Buckley (1980) utilizaron la inoculación en la almohadilla plantar del ratón para tratar de definir la dosis de *Nocardia* que producía un micetoma, ya que en los experimentos realizados por González-Ochoa y Kumico-Hojyo las dosis usadas correspondían a peso seco de bacterias. Grupos de ratones BALB/c fueron inoculados en la almohadilla plantar con una única dosis de suspensiones de *N. asteroides* o *N. brasiliensis* o *N. (caviae) otitidiscaviarum* que contenían de 10^4 a 10^6 CFU/0.1 ml en adyuvante incompleto de Freund o en solución salina. Todos los animales inoculados con las suspensiones de bacterias con adyuvante desarrollaron lesiones actinomicetómicas al mes post-inoculación que fueron precedidas por una inflamación severa. Cuando la dosis de bacterias

administrada fue de 10^4 , se detectó una respuesta inflamatoria marcada a los dos meses post-inoculación, y aproximadamente a los tres meses de evolución de la infección se produjeron las lesiones actinomicetómicas. En los ratones que recibieron dosis de 10^6 CFU la infección también progresó de un estadio inflamatorio a tumefacción fistulosa acompañada de amputación de los dedos de la pata, de la pata completa y de la extensión de las lesiones al muslo a los seis meses post-inoculación. La autopsia de estos animales reveló que también presentaban adenopatía intra-abdominal con invasión de los órganos internos. De éstos se cultivó el agente infeccioso así como se recuperaron granos compactos de filamentos sin clavos (Figura 4.1). En los ratones que recibieron suspensiones de bacterias en salina, también se les desarrollaron micetomas pero el curso de la infección fue diferente: la respuesta inflamatoria inicial fue mínima y casi desapareció a la semana post-inoculación, pero a los tres meses aproximadamente, la tumoración era totalmente semejante a la producida por los inóculos preparados con el adyuvante. Estos resultados sugieren que no sólo la dosis determina el curso y la evolución de la infección sino que el uso de adyuvante no es necesario para que se produzca el actinomicetoma. No obstante, la presencia de adyuvante parece acelerar el curso de la infección, una observación de gran relevancia en el estudio clínico y evolución del actinomicetoma humano.

En 1980, Linares, Linares y Marín analizaron con bastante detalle la evolución patológica e inmunológica del actinomicetoma en ratones blancos de seis semanas de edad. El inóculo utilizado fue preparado de una cepa de *N.brasiliensis* aislada de un paciente de actinomicetoma y se administró en las almohadillas plantares o en el muslo de la pata, o en ambos sitios (Rippon y Peck, 1967). Los ratones blancos y tres ratones negros, también inoculados con la misma cepa, se observaron para documentar los síntomas que desarrollaban. Los ratones blancos presentaron marcada inflamación a la semana de inoculados. Esta inflamación persistió y ya para la décima semana post-inoculación los ratones presentaban tumoración fistulosa típica del actinomicetoma. Pruebas intradérmicas realizadas en estos ratones contra antígenos de *N.brasiliensis* resultaron negativas. Los resultados de los estudios histopatológicos de muestras de tejidos infectados revelaron la presencia de granos dentro de los abscesos que se hallaban rodeados de células epitelioides y algunas células de Langerhans y células gigantes.

Con el tiempo también se observó una osteomielitis y periostitis en los huesos del área infectada y algunos granos dentro de la médula ósea. A las once semanas post-inoculación, las lesiones actinomicóticas supuraban material purulento y la destrucción ósea era visible en las placas radiológicas. Los estudios histológicos realizados con dos de los ratones blancos infectados, uno con doce y el otro con trece semanas de evolución de la infección, a los cuáles se les dio por vía intravenosa una inyección de azul de tripán, mostraron que las células teñidas con el colorante (histiocitos, macrófagos y polimorfonucleares) se concentraban alrededor de los granos actinomicóticos. Las células cebadas que se teñían con fucsina eran muy escasas en la piel y en los tejidos infectados de los ratones. Los ratones blancos que habían recibido el inóculo en el muslo, también desarrollaron lesiones actinomicóticas. Sin embargo, estos ratones se veían enfermizos y presentaban síntomas de un mal sistémico como lo son pérdida de peso y pelo. Algunos incluso murieron espontáneamente presentando extensas lesiones supurativas en la pata trasera y hepato y esplenomegalia. Cuando los sueros de los ratones se probaron por inmunodifusión a las catorce semanas post-infección los resultados fueron positivos. Por otra parte, los ratones negros infectados no desarrollaron actinomicetomas. Esto indica que la susceptibilidad de las cepas de ratón a la infección por *Nocardia* es variable.

Otros aspectos de la virulencia de las diferentes especies de *Nocardia* fueron estudiados por el grupo de Beaman (Beaman and Maslan, 1978; Beaman et al 1980). Aunque estos estudios no se hicieron para tratar de establecer modelos experimentales de actinomicetoma demostraron algunos factores que afectan la patogenicidad de las *nocardias*. Por ejemplo, Beaman y Maslan (1978)

encontraron que las células de la fase logarítmica de crecimiento de *N.asteroides* GUH-2 eran mucho más virulentas para los ratones de laboratorio que las células de la fase estacionaria, al menos cuando se administraban por vía intravenosa. Lo mismo ocurría con células de fase logarítmica de *N.brasiliensis* y *N.(caviae) otitidiscaviarum*. El medio en el que se cultivaban las cepas de *Nocardia* así como la ruta de inoculación también se encontró que afectaban la virulencia del patógeno y la respuesta del huésped. La cepa de *N.asteroides* GUH-2 en específico resultó ser diez veces más virulenta que una de *N.otitidiscaviarum* cuando se inyectaron por vía intravenosa aún cuando las dosis letales de las dos cepas eran las mismas por vía intraperitoneal. Conde y colaboradores (1982) utilizaron esta información para analizar si la capacidad de *N.brasiliensis* de inducir micetomas se relacionaba de alguna manera a la fase de crecimiento bacteriana. Los resultados de sus experimentos contradijeron los hallazgos de Beaman y Maslan (1978) porque mostraron que la fase de crecimiento de la *Nocardia* no influía en la producción de actinomicetomas en el ratón. Esta diferencia se ha atribuido al uso de distintas cepas con diferentes velocidades de crecimiento (Beaman and Sugar, 1983).

En todo modelo animal se reconoce que las respuestas inmunológicas de tipo humoral y celular pueden afectar la susceptibilidad de un huésped a la infección por *Nocardia spp.* Es por esto que algunos investigadores han experimentado con ratones inmunodeficientes para determinar cuál rama de la respuesta inmunológica es crítica para el desarrollo del cuadro clínico típico del actinomicetoma. Folb, Timme y Horowitz (1977) infectaron ratones atímicos con *N.brasiliensis* o *N.asteroides* encontrando que ambas especies de *Nocardia* producían una infección diseminada y alta mortalidad en los ratones. Además, los ratones atímicos no produjeron granulomas por lo que los linfocitos T parecen jugar un papel importante en este proceso (Maghoub, 1978). Otros experimentos realizados por Beaman y Scates (1981) demostraron que:

- i) las formas “L” de *Nocardia* sólo se producen en ratones inmunocompetentes y que ratones sin bazo o sin timo son más susceptibles a infecciones por *Nocardia* independientemente de la vía de inoculación que se use,
- ii) los ratones carentes de células T no desarrollan granos por lo que dichas células parecen no ser necesarias para que ocurra una respuesta inmunológica de tipo celular a *Nocardia spp.* y
- iii) esta respuesta de tipo celular es la que determina la formación de los granos.

En 1999, Salinas-Carmona y sus colaboradores volvieron a utilizar la inoculación de la almohadilla plantar del ratón para estudiar la respuesta humoral a *N.brasiliensis*. Los ratones BALB/c inoculados con suspensiones del patógeno en solución salina desarrollaron un actinomicetoma semejante al que se observa en el humano, corroborando los hallazgos reportados por Zlotnik y Buckley en 1980. La respuesta humoral de los ratones infectados se encontró que era semejante a la de los pacientes con actinomicetoma cuando se detectó la presencia de anticuerpos usando las técnicas de ELISA y Western blot. En este estudio, los investigadores también notaron que la producción de actinomicetoma era más reproducible cuando se inoculaban células de la fase de crecimiento logarítmica y no de la fase estacionaria.

La única otra investigación reciente de un modelo alternativo experimental del actinomicetoma, fue la realizada por Vera-Cabrera y col en 1998. Estos investigadores usaron una suspensión unicelular de *N.brasiliensis* HUJEG-1 para producir micetoma en la almohadilla plantar de ratas Lewis inmunocompetentes, atímicas congénitas (rnu/rnu) o heterocigóticas (rnu/+). Tanto las ratas Lewis inmunocompetentes como las heterocigóticas desarrollaron lesiones inflamatorias en las patas que se caracterizaron por la presencia de abscesos y fistulas. Estas lesiones empezaron a sanar a los 20-25 días post-inoculación. La infección que se desarrolló en las ratas atímicas homocigóticas fue más invasiva y causó la muerte de los animales. Como se había observado anteriormente (Linares *et al* 1980), el infiltrado inflamatorio inicialmente estaba compuesto de polimorfonucleares. A los 20

días, este infiltrado contenía histiocitos, linfocitos, células de Langerhans y fibroblastos. En el caso de las ratas Lewis inmunocompetentes y las heterocigóticas *rnu*⁺, pero no en las ratas atímicas, estas lesiones inflamatorias contenían granos. Estos resultados indican lo que ya otros habían concluido (Folb, Timme and Horowitz, 1977, Beaman and Scates, 1981): que la respuesta de tipo celular es crítica para el desarrollo del típico granuloma.

De la discusión antes dada es aparente que el modelo experimental del actinomicetoma que más se ha estudiado y que ha probado ser reproducible y análogo a la infección del ser humano es el que consiste en la inoculación de la almohadilla plantar del ratón. Su uso en la evaluación de factores que afectan el curso de la infección indica que se puede utilizar para todo tipo de investigaciones, especialmente aquellas que requieren un huésped viviente, como lo son las encaminadas al desarrollo de nuevos fármacos o a la prevención del padecimiento.

Bibliografía

Beaman, B.L. and S. Maslan. 1978. Virulence of *Nocardia asteroides* during its growth cycle. *Infection and Immunity* 20: 290-295.

Beaman, B.L., S. Maslan, S. Scates, and J. Rosen. 1980. The effect of the route of inoculation on host resistance to *Nocardia*. *Infection and Immunity* 28: 185-189.

Beaman, B.L. and S.M. Scates. 1981. Role of L-forms of *Nocardia caviae* in the development of chronic mycetomas in normal and immunodeficient murine models. *Infection and Immunity* 33:893-907.

Beaman B.L. and A.M. Sugar. 1983. *Nocardia* in naturally acquired and experimental infections in animals. *Journal of Hygiene* 91: 393-419.

Conde C., E.I. Melendro, M. Fresan, and L. Ortiz-Ortiz. 1982. *Nocardia brasiliensis* mycetoma induction and growth cycle. *Infection and Immunity* 38: 1291-1295.

Folb, P.I. A. Timme and A. Horowitz. 1977. *Nocardia* infections in congenitally athymic (nude) mice and in other inbred mouse strains. *Infection and Immunity* 18: 459-466.

González-Ochoa, A. and M. Sandoval. 1955. Características de los actinomicetos patógenos más comunes. *Revista del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales (México)* 16:149-161.

González -Ochoa, A. and T. Kumico-Hojyo. 1967. Reproduction of mycetoma by *Nocardia brasiliensis* in mice. In *Proceedings of the 5th International Congress of Chemotherapy*. AIII:2/9:323-330. Wiener Medizinischen Akademie, eds., Vienna, Austria.

González-Ochoa, A. 1969. Experimental Production of mycetoma by *Nocardia brasiliensis* in the mouse. *Gaceta Médica de México*. 99(8) 773-781.

González-Ochoa, A. 1973. Virulence of nocardiae. *Canadian Journal of Microbiology* 19: 901-904.

Linares, G.L., L. M. Linares and C. Marín. Experimental *Nocardia brasiliensis* mycetoma. pp. 322-328 in Fifth International Conference on the Mycoses. Scientific Publication 396. Pan American Health Organization, Washington, D.C., 1980.

López-Martínez, R., L.J. Méndez-Tovar, P. Lavalle., O. Welsh, A. Saul, E. Macotela-Ruiz. 1992. Epidemiology of Mycetoma in Mexico: study of 2,105 cases. Gaceta Médica Mexicana 128: 477-481.

MacCallum, W.G. 1902. On the history of *Actinomyces asteroides*. Zentralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde (1. Original) 31: 528-547.

Mackinnon, J.E. and R.C. Artagaveytia-Allende. 1956. The main species of pathogenic aerobic actinomycetes causing mycetomas. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 50:31-40.

Macotela-Ruiz, E. and F. Mariat. 1963. Sur la production de mycetomes experimentaux par *Nocardia brasiliensis* et *Nocardia asteroides*. Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique 56:46-54.

Maghoub, E.S. 1978. Experimental infection of athymic nude New Zealand mice, Nu/Nu strain with mycetoma agents. Sabouraudia 16:225-228.

Mishra, S.K., R.S. Sandhu, H.S. Randhawa, V.N. Damodaran and S. Abraham. 1973. Effect of cortisone administration on experimental nocardiosis. Infection and Immunity 7:123-129.

Nakayama, H. 1906. Impfversuch mit *Actinomyces asteroides* Eppinger an Meerschweinchen zugleich ein Beitrag zur Frage der Überempfindlichkeit. Archives für Hygiene 58: 207-212.

Nicolle, C. and E. Pinoy. 1908. Un cas de mycetoma a grains noirs. Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique 1:95-99.

Rippon, J.W. and A.L. Lorincz. 1964. Collagenase activity of *Streptomyces (Nocardia) madurae*. Journal of Investigative Dermatology 43: 483-486.

Rippon, J.W. and G.L. Peck. 1967. Experimental infection with *Streptomyces madurae* as a function of collagenase. Journal of Investigative Dermatology 49(4): 371-378.

Salinas-Carmona, M.C., E. Torres-López, A.I. Ramos, A. Licon-Trillo, D. González-Spencer. 1999. Immune Response to *Nocardia brasiliensis* antigens in an experimental model of actinomycetoma in BALB/c mice. Infection and Immunity 67 (5): 2428-2432.

Strauss, R.E. and A.M. Kligman. 1951. The use of gastric mucin to lower the resistance of laboratory animals to systemic fungus infections. Journal of Infectious Diseases 88: 151-155.

Vera-Cabrera, L., M.A. Rodríguez-Quintanilla, P. Boiron, M.C. Salinas-Carmona, and O. Welsh. 1998. Experimental mycetoma by *Nocardia brasiliensis* in rats. Journal de Mycologie Médicale 8 (4): 183-187.

Zlotnik, H. and H.R. Buckley. 1980. Experimental Production of actinomycetoma in BALB/c mice. Infection and Immunity 29: 1141-1145.

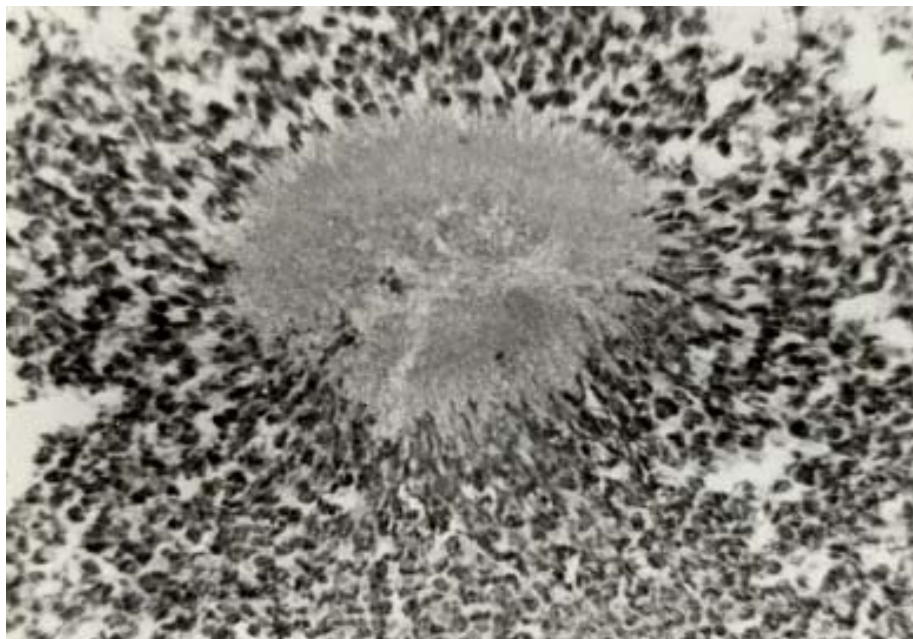


Fig. 4.1. Grano de *Nocardia brasiliensis*, note la intensa reacción inflamatoria a polimorfonucleares que rodea al grano.

Capítulo V

LA RESPUESTA DEL HUÉSPED A LA INFECCIÓN POR *Nocardia brasiliensis*

Mario Cesar Salinas Carmona ¹

¹ Jefe del Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario,
Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, Nuevo León, México agosto, 2003.
(e-mail: msalinas@ccr.dsi.uanl.mx)

ABSTRACT

Nocardia brasiliensis is the most frequently isolated bacterium from human actinomycetoma cases in Mexico. This organism lives as a saprophyte in soil and enters the skin by traumatic inoculation. Host response to this infection is a remarkable inflammatory accumulation of granulocytes around the bacteria. Chronic infection up to seven years in humans is also characterized by multiple microabscesses separated by fibrosis. Macrophages are present after two weeks of infection and remain in chronic lesions. At the same time, there are many “foamy” cells with an enlarged cytoplasm. Adoptive immunity is evident since there is a strong IgG antibody titer, which can be used to assess the patient's response to antibiotic treatment and to monitor the status of the disease. There are elevated numbers of T lymphocytes present at the site of infection and circulating in the blood which can be identified by antigen stimulation. Recently, we demonstrated that antigen specific IgM antibodies prevented infection since both active and passive immunization with *N.brasiliensis* purified antigens induced complete protection. Nevertheless, vaccine development for *N.brasiliensis* and other intracellular pathogens, based on IgG antibody stimulation alone, failed. New strategies to induce protection by stimulating IgM production might be the XXI century successful vaccine approach.

Introducción

Todos los seres vivos, unicelulares o multicelulares responden a estímulos del medio ambiente con adaptaciones que les permiten sobrevivir. En la medida que aparecieron seres vivos sobre la faz de la tierra, éstos cambiaron y desarrollaron mecanismos de adaptación que les permitieron su supervivencia. La interacción de unos organismos con otros, no siempre es una relación de beneficio recíproco, por el contrario, con frecuencia implica daño o destrucción de alguno de ellos. La evolución de las especies, produjo organismos más complejos y variados que también incrementaron sus interacciones, esto obligó a los seres vivos a desarrollar formas de adaptación también mas sofisticadas.

La inflamación es el resultado de un proceso de cambios celulares, bioquímicos y moleculares como respuesta a estímulos físicos, químicos y biológicos. Durante muchos años, se consideró a la inflamación como un proceso patológico que se identifica por cuatro signos característicos que son: calor, rubor, tumor y dolor. La inflamación puede ser clasificada en aguda y crónica de acuerdo al tiempo de evolución de ésta, en el caso de la inflamación aguda, los tejidos además de congestión vascular y edema se infiltran de leucocitos polimorfonucleares. En cambio en los casos de inflamación crónica, se observa proliferación de fibroblastos, producción de colágeno y la infiltración predominante es de leucocitos mononucleares como linfocitos y macrófagos.

La inflamación, también podemos clasificarla en inmune y no inmune de acuerdo a si existe o no la participación de los efectores de este sistema. La eficiencia bactericida o microbicida de la respuesta inflamatoria aguda es muy buena en el caso de ciertos gérmenes Gram positivos, pero

insuficiente para las bacterias intracelulares facultativas como *Nocardia asteroides*, *N.brasiliensis*, *M.tuberculosis*, *M.leprae* etc.

La inflamación crónica, tiene como elemento distintivo la participación de linfocitos y monocitos-macrófagos. Los linfocitos T sensibilizados, secretan citocinas amplificadoras de la respuesta inmune, además de interleucinas que atraen otras células del sistema inmunológico. Algunas de estas citocinas, también estimulan la proliferación de linfocitos específicos para un antígeno determinado y con ello se aumenta notablemente el número de células capaces de responder al mismo estímulo antigénico. En este caso, si el estímulo antigénico fuese una bacteria intracelular facultativa que ha sido fagocitada por los macrófagos, estos tienen más posibilidades de poder destruir a estos microorganismos invasores. La activación de los mecanismos microbicidas presentes en los macrófagos activados, son inducidos por citocinas provenientes de los linfocitos T sensibilizados. En estas condiciones, los macrófagos producen interferón (IFN) y óxido nítrico (ON), que junto a otros mecanismos microbicidas dependientes de radicales del oxígeno son potentes agentes contra las bacterias fagocitadas. Este tipo de inflamación crónica con la participación del sistema inmune adquirido o adaptativo, no existe en organismos unicelulares ni en animales invertebrados muy primitivos.

En los párrafos siguientes describiremos la respuesta de un huésped infectado en forma natural como es el caso de los pacientes con actinomietoma por *N.brasiliensis*. También describiremos la respuesta adaptativa de los ratones infectados experimentalmente.

¿Por qué estudiar la respuesta contra *Nocardia brasiliensis*?

Nocardia brasiliensis es una bacteria Gram positiva parcialmente ácido resistente, no móvil, que vive como saprofito en el suelo. Es una bacteria intracelular facultativa que puede vivir y multiplicarse dentro de los macrófagos del huésped infectado, pero igual crece extracelularmente en los medios de cultivo. Esta bacteria produce en seres humanos una infección crónica y localizada conocida como actinomietoma. Otras bacterias como *Actinomadura madurae*, *Streptomyces somaliensis*, *Actinomadura pelletieri* y *Nocardia asteroides* también pueden producir actinomietoma (Welsh *et al*, 1994). Esta infección crónica produce al paso del tiempo generalmente años, una deformación del área infectada que con mas frecuencia ocurre en las extremidades. Esta infección de la piel, puede producir destrucción de los tejidos vecinos incluyendo músculos y hueso. Con menor frecuencia al extenderse la infección crónica llega incluso a invadir la pleura, el pulmón, el pericardio o cualquier órgano adyacente a la infección cutánea inicial (Welsh *et al*, 1995; Salinas *et al*, 1997).

Los mecanismos de patogenicidad y factores de virulencia de *Nocardia brasiliensis*, sólo son conocidos parcialmente, por lo cual no existe una vacuna para prevenir la infección, esta es la misma situación que ocurre con otros microorganismos intracelulares facultativos (*M.tuberculosis*, *M.leprae*, *C.immitis*).

El estudio de la interacción de la *N.brasiliensis* con las células y moléculas de un huésped infectado experimentalmente, nos permitirán entender la relación que se establece entre ellos y que determina que la infección se elimine o que por el contrario, se establezca. Con este tipo de estudios, podremos identificar los puntos vulnerables de la bacteria, y los mecanismos de defensa del huésped que controlan y eliminan la infección. Con esta información se puede plantear una estrategia para formular una vacuna que sirva para prevenir la infección.

La infección natural por *Nocardia brasiliensis*

La tierra del suelo, es rica en actinomicetos en donde abunda *Nocardia brasiliensis*, principalmente en la región comprendida entre los trópicos de Cáncer y Capricornio donde las condiciones de humedad y temperatura que existen en esta región geográfica, favorecen su multiplicación.

La infección natural en el hombre, es un hecho desafortunado que se da como resultado del no usar calzado adecuado las personas que viven en áreas rurales o suburbanas. En ocasiones el cargar leña o trabajar en el campo con árboles o restos vegetales producen la inoculación de la bacteria en la piel del área como la espalda, hombros, codos y manos (Salinas-Carmona *et al*, 1997). Estas bacterias son introducidas en forma traumática a través de la piel y aunque muchas personas llegan a inocularse con estas bacterias, pocas personas resultan con actinomicetoma.

Inmediatamente después de la inoculación de estas bacterias, se produce una reacción inflamatoria por parte del huésped, que consiste en la llegada de abundantes polimorfonucleares neutrófilos que fagocitan a estos microorganismos, aún en ausencia de anticuerpos opsonizantes. En la Figura 5.1, se observan los leucocitos polimorfonucleares y macrófagos de ratones que migraron a favor de un gradiente de concentración en una cámara modificada de Boyden. Allí podemos apreciar la cantidad de células que son atraídas por *N.brasiliensis* muertas por calor en comparación con la quimiotaxis de algunos componentes purificados de esta bacteria. En la mayoría de los casos de infecciones humanas por estos actinomicetos, la infección termina gracias a la fagocitosis y destrucción de las bacterias, allí en el sitio de la inoculación, pero en algunas personas la infección persiste y se hace crónica.

Las razones para esto, no son conocidas, ya que se trata de infecciones en personas que tienen un sistema inmunocompetente y sin embargo, *Nocardia brasiliensis* evade la respuesta inflamatoria del huésped y se adapta a vivir en el citoplasma de los macrófagos, pero también se multiplica en el espacio extracelular y forma colonias que luego salen acompañadas de líquido seroso o sanguinolento. Estas microcolonias son de un color amarillento cremoso y son conocidas con el nombre de "granos" o "gránulos" que salen por las fístulas hacia el exterior. En la Figura 5.2, se presenta una fotografía de una sección histopatológica de una pata de ratón con micetoma experimental por *N.brasiliensis*. En esta preparación, se observan varias microcolonias del agente causal, rodeadas de una gran cantidad de leucocitos polimorfonucleares formando un microabsceso característico de esta infección.

En la etapa crónica de la infección humana por *N.brasiliensis*, se presenta aumento de volumen y deformación del área donde pueden observarse abscesos, fístulas y cicatrices de úlceras previas. Una radiografía convencional con rayos X del área afectada de los pacientes, puede evidenciar que la infección se extendió al hueso en donde produce erosión y destrucción, que se observan como imágenes líticas muy sugestivas de esta infección (Salinas-Carmona *et al*, 1997).

La respuesta inmune del paciente infectado

La composición química de la gruesa pared de los actinomicetos incluida *Nocardia brasiliensis*, contiene lípidos complejos, como los ácidos micólicos, ácido tuberculoesteárico, además de ácido diaminopimélico, arabinosa, galactosa. Estos compuestos, además de las proteínas, inducen una respuesta inmune en el huésped infectado lo que nos permite asegurar que son componentes antigénicos. Es importante señalar que, los lípidos de la pared de las bacterias del género *Nocardia*, potencian la respuesta inmune contra antígenos de naturaleza proteica ejerciendo un efecto adyuvante parecido al de *Mycobacterium tuberculosis*.

La compleja composición química de lípidos, polisacáridos y proteínas inducen una fuerte respuesta en el huésped infectado con *Nocardia brasiliensis* que se manifiesta con un alto título de anticuerpos y una intensa respuesta proliferativa de linfocitos.

En 1975 Humphrey y White publicaron la existencia de reacciones serológicas cruzadas con antígenos de *Nocardia* y de *Mycobacterium*; estos autores utilizaron una técnica de baja sensibilidad y antígenos no específicos por lo cual, la serología no pudo ser utilizada como herramienta diagnóstica (Humphreys *et al*, 1975). Algunos años más tarde, en 1979, Blumer y Kaufmman utilizaron el suero de pacientes infectados con *M.tuberculosis*, con *M.leprae* y con *Nocardia brasiliensis* y lograron demostrar una fuerte respuesta de anticuerpos a través de una prueba de inmunodifusión (Blumer *et al*, 1979). Estos autores utilizaron extractos crudos de *Nocardia* como antígeno en la prueba de difusión y obtuvieron reacciones cruzadas con lo cual se demuestra la presencia de antígenos similares entre estas especies. En ambos trabajos se pone de relieve la alta inmunogenicidad de los componentes de la bacteria ya que siempre los pacientes mostraron altos títulos de anticuerpos.

En el caso de las infecciones por *Nocardia asteroides*, Sugar y Ángeles y otros autores, encontraron una proteína alrededor de 55-kDa secretada en el medio de cultivo, que podía ser usada como un antígeno específico. En ese mismo estudio, se encontró que la mayoría de los casos humanos de infecciones por *Nocardia asteroides*, reconocían este antígeno, aunque no todos los pacientes infectados con esta bacteria producen anticuerpos contra esa proteína en el ensayo de Western-blot (Angeles *et al*, 1987).

Kjlstrom y Beaman encontraron que los pacientes infectados con *N.asteroides* tenían anticuerpos contra otros antígenos secretados por lo cual desarrollaron una prueba de ELISA con antígenos citoplásmicos, además de los antígenos del filtrado del cultivo. Esta prueba fue utilizada para demostrar infecciones con *Nocardia* en ratones y lograron diferenciar infecciones con diferentes actinomicetos. Este panel diagnóstico fue aplicado también a pacientes y mostró cierta utilidad, sin embargo, es importante señalar que casi la mitad de los casos de infecciones humanas por *Nocardia asteroides* ocurren en pacientes inmunosuprimidos que no producen anticuerpos. En este grupo particular de pacientes con un sistema inmune deprimido, es donde se observa la urgente necesidad de pruebas clínicas que comprueben la presencia de infección activa.

Aunque existen publicaciones, que indican el uso de algunas pruebas con técnicas de biología molecular con este fin, todavía ninguna de ellas ha demostrado su utilidad como prueba rutinaria en el laboratorio clínico.

En 1992, Salinas Carmona y colaboradores, publicaron la existencia de tres antígenos inmunodominantes de *Nocardia brasiliensis* reconocidos por el suero de pacientes con actinomicetoma, con cultivos positivos para esta bacteria. Mediante una prueba de Western-blot se demostró la presencia de anticuerpos del isotipo o subclase IgG que reconocieron a unas proteínas de 61kDa, 26 kDa y 24 kDa.

Aunque hubo reconocimiento de otros antígenos esas tres proteínas no reaccionaban con el suero de pacientes con tuberculosis o lepra (Salinas-Carmona *et al*, 1992). Las proteínas de 61 y 24 kDa fueron posteriormente aisladas y purificadas utilizando técnicas fisicoquímicas convencionales (Vera-Cabrera *et al* 1992). La proteína de 24 kDa fue seleccionada para desarrollar una prueba de ELISA en micro placas de poliestireno, para confirmar el diagnóstico serológico de infecciones por *Nocardia brasiliensis*. Esta prueba de ELISA, permitió diferenciar entre sueros de pacientes con tuberculosis o lepra de sueros de pacientes con micetoma por *Nocardia brasiliensis* (Salinas-Carmona *et al*, 1993).

La utilidad clínica de esta prueba serológica de ELISA ha sido ampliamente demostrada ya que permite además diferenciar entre infección activa o pasada por *N. brasiliensis*. El título de anticuerpos IgG anti-proteína inmunodominante P24 está directamente relacionado al grado de infección, ya que el título es alto cuando la infección es activa y disminuye cuando el tratamiento médico es adecuado (Salinas-Carmona *et al*, 1993). Animales de experimentación como conejos y ratones infectados o inmunizados con *Nocardia brasiliensis* también reconocen a las proteínas de 61, 26 y 24 kDa como antígenos inmunodominantes (Salinas-Carmona *et al*, 1999).

El papel de los anticuerpos en las infecciones por *Nocardia brasiliensis*

El papel de la respuesta inmune humoral mediada por anticuerpos, ha sido investigado en diversas épocas por varios autores que utilizaron diferentes animales experimentales. Las conclusiones de esos autores es que ni los linfocitos B ni los anticuerpos protegen a los animales experimentales contra las infecciones por *Nocardia brasiliensis* (Beaman *et al*, 1982, Rico *et al*, 1982). En algunos artículos, incluso se sugiere que los anticuerpos anti *Nocardia brasiliensis* empeoran la inflamación inducida por la inyección de las bacterias vivas (Rico *et al*, 1982). Salinas-Carmona y Ernesto Torres, publicaron en 1996 que un suero hiperinmune proveniente de ratones BALB/c inmunizados con *Nocardia brasiliensis* muerta por calor, era capaz de conferir protección ya que evitaba el desarrollo de micetoma en ratones de la misma cepa. Sin embargo, en el mismo trabajo se encontró que el suero de ratones BALB/c que se recuperaron espontáneamente del micetoma, no protegió (Salinas-Carmona *et al*, 1996). En el mismo trabajo también se encontró que el suero de conejos inmunizados con *Nocardia brasiliensis* muerta por calor o con extracto celular crudo de esta misma bacteria tampoco fueron capaces de conferir protección a los ratones infectados (Salinas-Carmona *et al*, 1996).

Estos experimentos sugieren en apariencia que los anticuerpos son los responsables del efecto protector, pero el suero de los conejos y el de los ratones recuperados del micetoma tenían un título de anticuerpos IgG mayor, y no fueron capaces de proteger a los ratones, por lo cual se puede sugerir que otros factores presentes en el suero transferido como las citocinas, serían responsables de ese efecto. Por los estudios publicados hasta la fecha no podemos conocer claramente cual es el papel de los anticuerpos en la resistencia a esta infección ni tampoco podemos concluir que no participan en la eliminación de la infección.

La respuesta inmune de ratones infectados con *Nocardia brasiliensis*

Para definir el papel de la respuesta inmune en la protección contra infecciones con *Nocardia brasiliensis*, desarrollamos un modelo de actinomicetoma en ratones BALB/c infectados con la cepa de *Nocardia brasiliensis* "Hospital Universitario Dr. José E. González" (HUJEG-1), esta cepa se encuentra registrada en la colección Americana de cultivos tipo (ATCC # 700358). Las características morfológicas, bioquímicas, etc. de esta cepa fueron estudiadas por el Dr. Patrick Boiron de la Unité de Mycologie del Instituto Pasteur en Paris, Francia y por June Brown del Centro para el Control de Enfermedades en Atlanta Georgia (CDC). Ambos investigadores confirmaron y clasificaron como *Nocardia brasiliensis* a esta cepa aislada por el Dr. Manuel Rodríguez Quintanilla de un paciente con actinomicetoma atendido por el Dr. Oliverio Welsh Lozano de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León en Monterrey, México. En la Figura 5.3, se observa un ratón con micetoma experimental por *N. brasiliensis* y en una sección macroscópica de la lesión, se distinguen algunas fistulas.

Los ratones infectados con esta cepa de *Nocardia brasiliensis* produjeron un título elevado de anticuerpos anti-proteína inmunodominante P24, cuantificados por una técnica de ELISA. El suero de estos ratones también identificaron a las proteínas de 61, 26 y 24 kDa como proteínas inmunodominantes (Salinas-Carmona *et al*, 1999).

En este modelo de actinomicetoma las lesiones incluyen aumento de volumen de más de diez veces el tamaño normal de una pata trasera, con presencia de fistulas y abscesos de donde se obtienen microcolonias características en forma de granos o gránulos, similares a los que se desarrollan en los seres humanos. Las radiografías de la zona afectada también nos muestran la destrucción del hueso adyacente a la infección de forma similar a los pacientes.

La respuesta del huésped contra un antígeno no inmunodominante en infecciones por *N.brasiliensis*

Nocardia brasiliensis produce enzimas caseinolíticas que dan una reacción característica utilizada desde hace muchos años para diferenciar entre cepas de *Nocardia* (Serrano *et al*, 1992). En 1992, Salinas-Carmona y colaboradores identificaron la presencia de cuando menos dos clases catalíticas diferentes de proteasas, producidas por *Nocardia brasiliensis* y demostraron que en pacientes infectados al igual que en ratones con actinomicetoma, el título de anticuerpos anti-proteasa era bajo durante la infección activa, y luego se incrementaba durante la curación de la infección (Salinas-Carmona *et al*, 1992).

Ángel Licón y colaboradores, aislaron y purificaron una de estas enzimas caseinolíticas y demostraron que son inmunogénicas en ratones y que inducen anticuerpos IgM e IgG. En el mismo trabajo se demostró que la inmunidad activa con esta proteasa protege a los ratones contra el desarrollo de micetoma. La transferencia pasiva de suero hiperinmune anti-proteasa, en cambio sólo indujo protección parcial y temporal ya que posteriormente los animales desarrollaron la infección crónica (Licón-Trillo *et al*, 2003). Estos y otros experimentos no publicados nos permiten sugerir que en el suero transferido, existen otros elementos responsables de la protección que no corresponden a los anticuerpos IgG.

Respuesta inmune celular en las infecciones por *Nocardia brasiliensis*

La respuesta inmune celular de pacientes infectados por *Nocardia brasiliensis*, fue estudiada por González-Ochoa, Ortiz-Ortiz y Bojalil, inicialmente utilizaron un polisacárido como antígeno para evidenciar hipersensibilidad tardía en pacientes con micetoma. Los mismos autores, después utilizaron extractos de ribosomas para sensibilizar animales experimentales y posteriormente, los usaron para identificar a pacientes infectados con *Nocardia brasiliensis* mediante una prueba de intradermoreacción (Ortiz-Ortiz *et al*, 1972; Ortiz-Ortiz *et al*, 1972). Sin embargo en estos casos se obtuvieron reacciones cruzadas ya que no se pudo diferenciar entre pacientes con infecciones por *M. tuberculosis*.

La hipersensibilidad tardía contra polisacáridos de *Nocardia asteroides* y *Nocardia brasiliensis* fue estudiada en cobayos y pacientes, lográndose identificar un polisacárido llamado poli I Na para el caso de *Nocardia asteroides*, y poli I Nb para el caso de *Nocardia brasiliensis*, no se definió con claridad la composición química completa pero se propuso que se trataba de arabinogalactana. La arabinogalactana o poli I Na ó Nb son una misma molécula y demostraron una reacción cruzada con los sueros de conejos hiperinmunes, incluso con el suero de pacientes con tuberculosis o lepra. En cambio el poli II Na y el poli II Nb eran diferentes ya que los sueros de pacientes con tuberculosis, lepra y micetoma por *Actinomyces madurae* no dieron reacción cruzada. (Bojalil *et al*, 1963; Zamora *et al* 1963, Ortiz-Ortiz *et al* 1972).

Recientemente en el departamento de Inmunología del Hospital Universitario en Monterrey, Nuevo León, hemos utilizado un extracto crudo de proteínas del citoplasma de *N.brasiliensis* ATCC-700358 para investigar la presencia de hipersensibilidad tardía. Un extracto celular crudo de *Nocardia asteroides* fue preparado de manera similar y se utilizó para investigar la presencia de hipersensibilidad tardía a dos antígenos de *Nocardia asteroides* de los cuales uno fue deslipidado. Estos antígenos fueron inyectados en pacientes con diagnóstico clínico de tuberculosis pulmonar

resistente al tratamiento, en los cuales no se pudo demostrar la presencia de *Mycobacterium tuberculosis* en los cultivos. 20% de los pacientes incluidos en este estudio, dieron una intensa reacción al extracto proteico de *Nocardia asteroides* que llegó a medir más de 5 cm. de induración como puede apreciarse en la Figura 5.4 que aquí se presenta. Estos hallazgos nos indican una fuerte respuesta inmune celular contra antígenos de *N. asteroides* que fue el agente causal de las infecciones pulmonares de estos pacientes.

Los linfocitos de ganglios linfáticos de ratones BALB/c infectados experimentalmente con la cepa ATCC # 700358 de *Nocardia brasiliensis*, mostraron una intensa reacción proliferativa cuando fueron estimulados *in vitro* con antígenos de *Nocardia brasiliensis*. En la Figura 5.5, se observa la incorporación de timidina tritiada como evidencia de la intensa proliferación de los linfocitos T de los ratones infectados. Los resultados graficados, se expresan como índice de estimulación obtenidos a diferentes días después de la infección experimental. Estos resultados también nos sugieren una fuerte respuesta inmune celular contra los antígenos de *N. brasiliensis*.

Conclusiones y Perspectivas

En resumen, podemos decir que la respuesta del huésped a las infecciones por actinomicetos, en general se caracteriza por una intensa reacción inflamatoria, en la cual siempre están presentes los leucocitos polimorfonucleares. En el caso de infecciones crónicas, como en el actinomicetoma producido por *N. brasiliensis*, tanto en los humanos como en los ratones infectados experimentalmente también se observa una intensa respuesta inflamatoria de estos leucocitos polimorfonucleares. En este caso, los glóbulos blancos están alrededor de las células bacterianas, incluso unidas a las microcolonias; en la parte periférica del absceso, se observan los linfocitos y los macrófagos/monocitos junto con células plasmáticas y fibroblastos. La respuesta inmune contra estos microorganismos, involucra tanto al sistema inmune innato, como a la respuesta inmune adaptativa que queda de manifiesto en estos casos por una fuerte respuesta de anticuerpos y una intensa proliferación de linfocitos.

En el futuro inmediato, es urgente la necesidad de identificar los factores de patogenicidad y virulencia de los microorganismos patógenos que son intracelulares facultativos como la *N. brasiliensis*, *N. asteroides*, *N. farcinica*, *M. tuberculosis*, *M. leprae* etc. Si conocemos los factores bacterianos, de los cuales depende el daño que producen, y por otro lado, identificamos la respuesta del huésped que conduce a la eliminación de la infección, estaremos en la posibilidad de producir vacunas efectivas contra estos gérmenes.

Agradecimientos

La mayor parte del trabajo experimental referido en este capítulo ha sido apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) de México, y por el Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica (PAICYT) de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Mi agradecimiento para las estudiantes Luz I. Pérez Rivera y Alejandra Gallegos V. Por su cooperación en el Laboratorio de Inmunología. Se reconoce la labor profesional del Sr. Reynaldo Rodríguez por el cuidado de los roedores en el bioterio y del Dr. Antonio González por las fotografías.

Bibliografía

Angeles, A.M. and Sugar A.M. 1987 Identification of a common immunodominant protein in culture filtrate of three *Nocardia* species and use in etiologic diagnosis of mycetoma. J. Clin. Microbiol. 25:2278-2280.

Beaman B.L., Gershwin M.E., Ahmer A. , Scates S:M. And Deem R. 1982. Response of CBA/N X DBA2/F1 mice to *Nocardia asteroides*. Infect Immun 35:111-116.

Blumer, SO, and L. Kaufman. 1979. Microimmunodiffusion test for nocardiosis. J. Clin. Microbiol. 10:308-312.

Bojalil L.F. Zamora A. 1963. Precipitin and skin test in the diagnosis of mycetoma due to *Nocardia brasiliensis*.. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 113:40-43.

Goodfellow M., F. G Thomas A.C., Ward and A.L. James. 1990: Classification and identification of *Rhodococcus*. Zbl. Bakt 274:299-315.

Humpreys, D.W., J.G. Crowder and A. White 1975. Serological reactions to *Nocardia* antigens. Am. J. Med. Sci 269:323-336.

Kjelstrom J A and Beaman B L. 1993 Development of a serological panel for the recognition of nocardial infections in a murine model. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 16(4):291-301.

Licón-Trillo A., Castro-Corona M.A. and Salinas-Carmona M.C. 2003. Immunogenicity and biophysical properties of a *Nocardia brasiliensis* protease involved in pathogenesis of mycetoma. Immunology and Medical Microbiology 37:37:44.

Ortíz-Ortíz L., Bojalil L.E., Contreras F.M. 1972. Delayed hypersensitivity to polysaccharides from *Nocardia*. J. Immunol. 108:1409-1413.

Ortíz-Ortíz L. Contreras M.F., Bojalil L.F. 1972. The assay of delayed hypersensitivity to ribosomal protein from *Nocardia*. Sabouradia 10:147-151.

Ortíz-Ortíz L., Bojalil L.F. 1972. Delayed skin reactions to cytoplasmic extracts and epidemiological study of *Nocardia* infection. Clin. Exp. Immun. 12:225-229.

Rico G., Ochoa R., Oliva A., González-Mendoza, Walker S.M., Ortiz-Ortiz, L. 1982. Enhanced resistance to *Nocardia brasiliensis* infection in mice depleted of antigen-specific B cells. J. Immunol. 129:1688-1693.

Salinas-Carmona, M.C. Vera L. Welsh O. and Rodríguez, M. 1992. Antibody response to *Nocardia brasiliensis* in man. ZBL Bakt. 276:390-397.

Salinas-Carmona ,M.C., Pérez L.I., Welsh, O. Rodríguez, M. and Rinaldi M.G. 1992. Identification of intracellular proteases from *Nocardia brasiliensis*. J. Mycol. Med. 2:1-6.

Salinas C., M.C., Welsh, O. And Casillas, S.M. 1993. Enzyme-linked immunosorbent assay for serological diagnosis of *Nocardia brasiliensis* and clinical correlation with mycetoma infections. J. Clin. Microbiol. 31(11):2901-2903.

Salinas-Carmona, M.C., and Torres-López E. 1996. Role of passive humoral immunity in experimental mycetoma by *Nocardia brasiliensis*. Ann N.Y. Acad. Sci 797:263-265.

Salinas-Carmona M.C., Castro-Corona M.A., Licón-Trillo A., Boiron P., Welsh O., Nagesh S., Eisenach K.D. and Rendón A. 1997. Constrictive Pericarditis and recurrent Mycetoma due to *Nocardia brasiliensis* in non-immunocompromised patient . J. Mycol. Méd. 7:47-50

Salinas-Carmona M.C., Torres-López, E., Ramos,A.I., Licón-Trillo A. and González-Spencer, D. 1999. Immune Response to *Nocardia brasiliensis* antigen in an experimental model of actinomycetoma in BALB/c mice. Infect Immun 67:2428-2432.

Serrano, J.A. y Sandoval T., H. 1992. Manual de Laboratorio para el Estudio de los Actinomicetos patógenos. Universidad de los Andes. Consejo de Desarrollo Científico Humanístico y Tecnológico. Consejo de publicaciones, Mérida, Venezuela.

Vera-Cabrera L., Salinas-Carmona M.C., Welsh O. 1992. Isolation and purification of two immunodominant antigens from *Nocardia brasiliensis*. J. Clin. Microbiol. 30(5):1183-1188.

Welsh O. 1991. Mycetoma Current concepts in treatment. Int. J. Dermatol. 30:387-398.

Welsh O., Salinas- Carmona M.C., Rodríguez M. A., in: Hoepfich P.D., Jordan M.C., Ronald A.R. (Eds). Infectious Disease J.B., Lippincott Company Philadelphia. 1994, pp 1402-1404.

Welsh O., Salinas M.C. and Rodríguez, M. A. 1995. Treatment of eumycetoma and actinomycetoma In: Current topics in medical Mycology (Borgers, M., Hay, R. And Rinaldi, M.G. Eds pp 47-71. J.R. Prous Science Publishers, Barcelona.

Zamora A., Bojalil L.F.,Bastarrachea F. 1963 Immunologically active polysaccharides from *N. asteroides* and *N. brasiliensis*. J. Bacteriol. 85:549-555.

Figuras

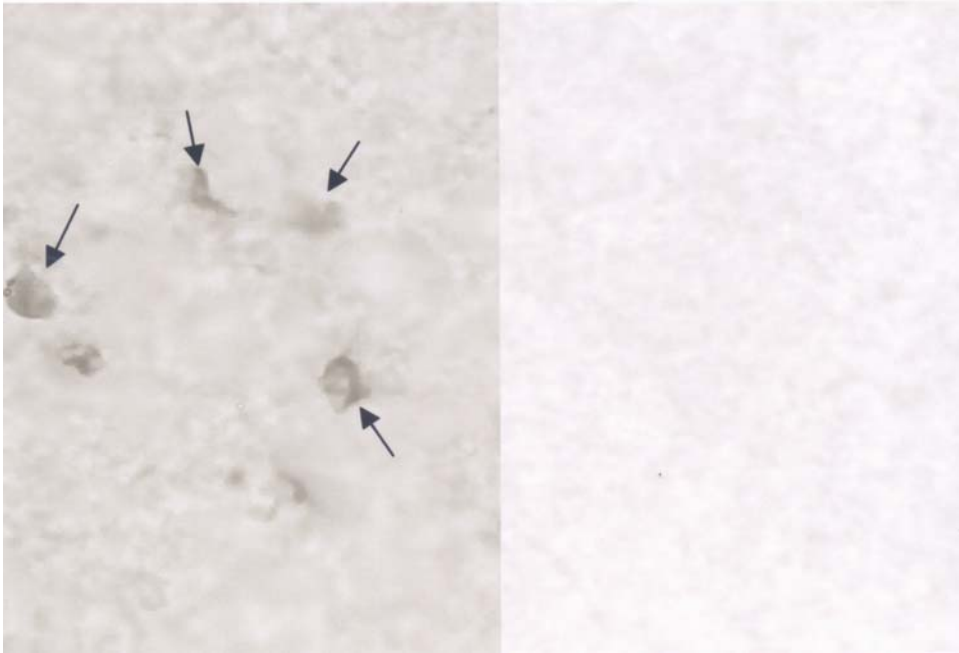


Figura 5.1. Quimiotaxis de polimorfonucleares y monocitos de un ratón BALB/c en una cámara modificada de Boyden. Las células migraron a través de un filtro y luego quedaron atrapadas en otro filtro que se fijó y tiñó. En contraste se presenta otro filtro donde no existió migración.

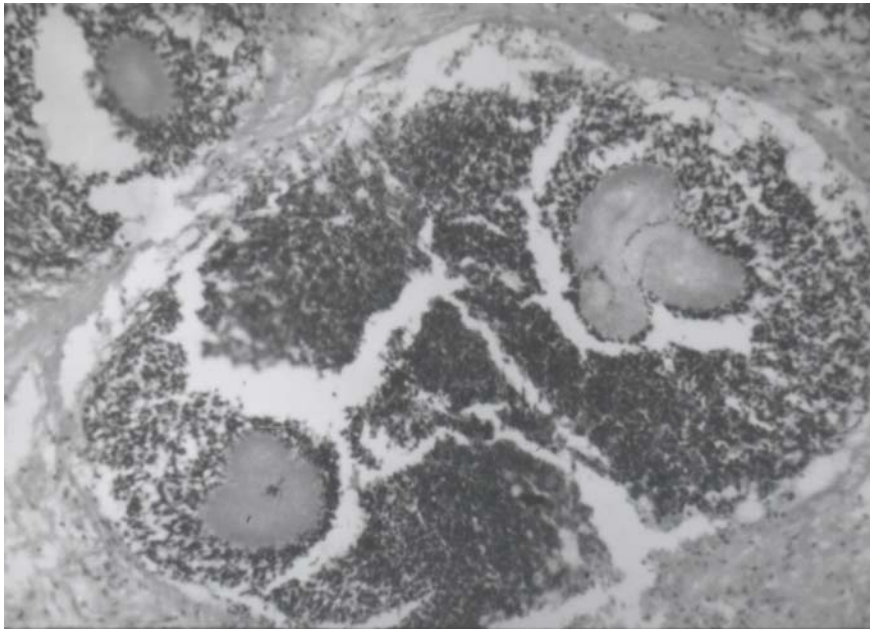


Figura 5.2. Preparación histopatológica de un actinomietoma experimental inducido por *N. brasiliensis* en ratones BALB/c. El tejido se fijó en formaldehído y luego de cortarse se coloreó con hematoxilina y eosina. Se observan varias microcolonias del agente causal, rodeadas de polimorfonucleares que forman un microabsceso.

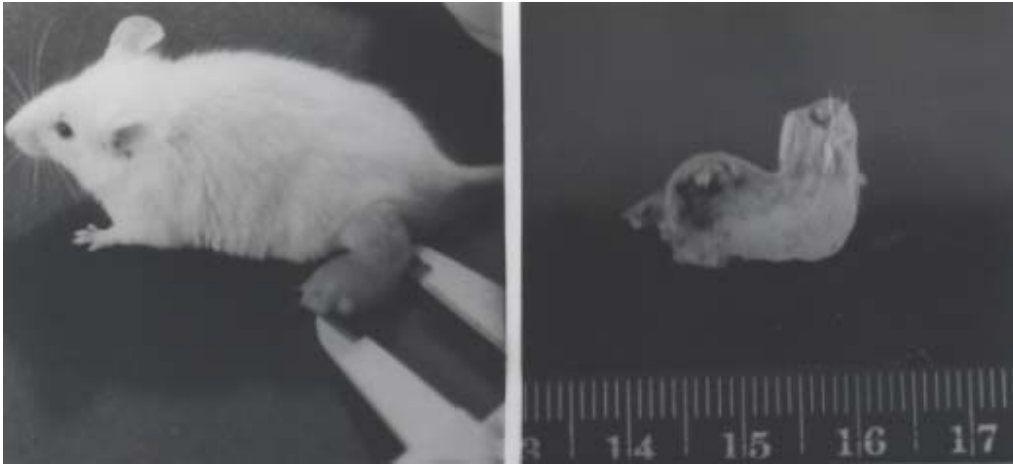


Figura 5.3. Ratón BALB/c con un micetoma experimental por *N. brasiliensis* cepa HUJEG-1 (ATCC 799358) y una sección de un micetoma donde se pueden observar algunas fístulas.



Figura 5.4. Reacción de hipersensibilidad tardía a un extracto proteico de *N. asteroides* en un paciente con infección pulmonar por esta bacteria.

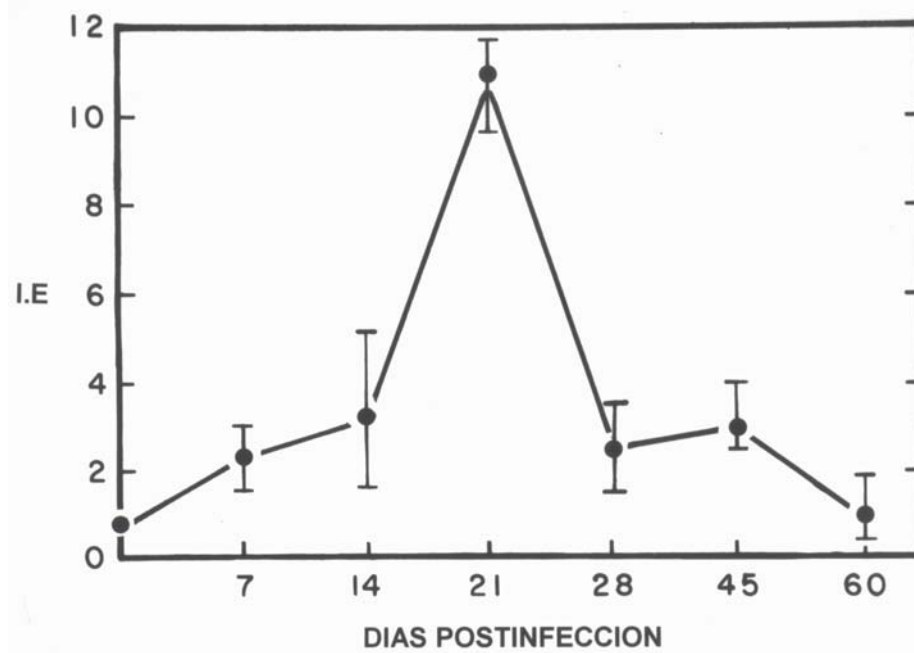


Figura 5.5. Respuesta proliferativa de linfocitos de ganglio linfático poplíteo de un ratón infectado en el cojinete plantar. Los linfocitos fueron estimulados in vitro con un extracto de *N. brasiliensis* y luego se agregó timidina tritiada. Los resultados se presentan como el índice de estimulación en función del tiempo.

CAPÍTULO VI PATOLOGÍA DEL ACTINOMICETOMA

María A. Mejía¹ y José A. Serrano²

¹ Departamento de Dermatología, Escuela de Medicina, Universidad Centro Occidental “Lisandro Alvarado” y Servicio de Dermatología Hospital Central “Antonio M. Pineda”, Barquisimeto, Edo. Lara, Venezuela. Correo electrónico (mama1961@hotmail.com)

² Instituto de Investigaciones. Sección de Biotecnología. Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, Edo. Mérida, Venezuela.
Correo electrónico (jacielo@cantv.net)

ABSTRACT

Actinomycetomas are characterized macroscopically by the presence of swelling, sinuses and grains (granules). The lesions are well circumscribed and fairly localized within a fibrous wall. Macroscopic observation of the anatomically affected region shows that the lesions tend to follow fascial planes, and the extent of the lesion is often greater than the external appearance of the lesion. Pathologically, the types of lesion resemble more closely those caused by pyogenic bacteria than those caused by most fungi. Cavities are observed in the bone and in these “geodes” may contain granules.

The study of histological tissue patterns is the bases for the identification of the etiology of actinomycetoma. Hematoxylin and Eosin (H&E) staining is frequently sufficient for generic identification. Also, one can utilize the Gram stain and/or the Kinyoun stain for acid-fastness to obtain a tentative identification of etiology. Actinomycetomas are classified according the macroscopic appearance of the lesions as well as histological tissue reactions. In addition, fine needle aspiration cytology for rapid diagnosis of the actinomycetoma may be recommended. The histological identification of the various causes of actinomycetomas is easy and is a commonly employed method. This methodology often yields the diagnosis of the genera of the causal agent and in some cases it suggests the species, but the use of microbiological culture methods is required in order to confirm the histopathological studies and to identify the species of Actinomycete involved.

Introducción

El actinomicetoma es una infección subaguda o crónica de la piel y del tejido subcutáneo, de tipo granulomatoso producida por actinomicetos aerobios patógenos, cuyo hábitat principal es el suelo y que por vía de traumatismos punzo penetrantes causados con espinas o astillas de maderas contaminadas con los agentes etiológicos logran penetrar al organismo de los humanos o de los animales. El actinomicetoma es causado por bacterias, lo que lo diferencia del eumicetoma, el cual es producido por hongos verdaderos. (Carter, 1874; Abbott 1956, Mackinnon & Artagaveytia-Allende, 1956; Mariat, 1956,1963; Mahgoub & Murray, 1973; Lacaz 1977, Mathur et al 1979, Grigoriu *et al*, 1984; Gumaa 1994, Joshi, *et al*, 2000) El actinomicetoma y el eumicetoma, representan los dos tipos principales de micetomas, los cuales son también conocidos como: pie de Madura o maduromicosis. Brumpt (1905, 1906) fue quien creó el género *Madurella* y así mismo es quien diferencia a los micetomas actinomicóticos de los otros tipos de micetoma.

En Venezuela el agente más frecuentemente diagnosticado como productor de actinomicetoma es la *A.madurae* (Serrano *et al* 1985,1988), seguido por la *N.brasiliensis* (Serrano *et al* 1985,1988), así mismo han sido reportados casos producidos por *S.somaliensis* (Vargas, 1973; Serrano *et al* 1985,1988) y menos frecuentemente casos debidos a *A.pelletieri* (Hómez Chacín *et al* 1961). Tanto

en México como en Brasil, predominan los casos de actinomicetoma debidos a la *N.brasiliensis* (González-Ochoa, 1962; Lacaz, 1981; López *et al* 1992, Castro *et al* 1993).

Los aspectos macroscópicos que caracterizan a las partes anatómicas afectadas por los micetomas (actino o eumicetoma), son la presencia de edema, (con deformación del área afectada), de tractos fistulosos (en el área de la lesión) y de granos (microcolonias del agente causal). (Lacaz, 1977; Joshi, 2000). Los granos son estructuras sólidas generalmente observables a la simple vista, conformados por agregaciones o conglomerados de los agentes etiológicos del micetoma, se pueden observar en los tejidos (bolsas de granos) o en las fistulas presentes en las lesiones infecciosas que producen los micetomas. Estos granos son expulsados al medio exterior a través de los procesos fistulosos presentes en la parte afectada, que en la mayoría de los casos es el pie o la pierna. Los granos varían en tamaño, en su consistencia y en su color dependiendo del agente causal. (Ver Tabla 1). Cuando se logra observar la presencia de estos granos, se puede hacer un diagnóstico tentativo del tipo de micetoma y del agente causal del mismo. Una identificación más certera se logra por medio del examen histológico de estos granos, por su cultivo o por estudios serológicos, inmunológicos o por el uso de técnicas más avanzadas de biología molecular, utilizando técnicas de PCR. (Serrano *et al* 1998, 2001)

El examen macroscópico de piezas anatómicas afectadas por el micetoma, pueden presentar algunas diferencias. Las lesiones en fases iniciales del eumicetoma son bien circunscritas y escasamente rodeadas por una pared fibrosa. Las lesiones tienden a seguir los planos de la fascias en su proceso de extensión tanto en sentido lateral, como profundo. En el actinomicetoma se observan lesiones mucho más extensas en el subcutáneo que en la epidermis. El edema que se observa presenta márgenes bien definidos y se confunde con los tejidos que lo rodean, es de consistencia blanda a diferencia del eumicetoma. La apariencia de la infección observada en la parte afectada es más de tipo bacteriano que de la producida por hongos. Se pueden observar la presencia de bolsas de granos presentes en los tejidos y de cavidades que contienen granos, tanto en las infecciones por actinomicetos o eumicetos, estas cavidades están interconectadas, conformando una especie de red de canales fistulosos que los comunican con la parte exterior de la parte afectada.

Examen Histológico

El estudio histológico necesario para realizar el diagnóstico e identificación de las varias especies de actinomicetos patógenos causantes del actinomicetoma es fácil y se logra por medio de la observación de los tejidos obtenidos bien por una biopsia (muestra de tejido tomada con un sacabocados o por aspiración con aguja fina), por toma de muestra de la pus o del exudado serosanguinolento que drena por los procesos fistulosos, o por la recolección de granos obtenidos a nivel de las fistulas presentes en la parte afectada. Las diferentes variables de las metodologías empleadas para el estudio histológico, como método de diagnóstico del actinomicetoma están ampliamente reportadas en la literatura (Destombes & Segretain, 1962; Destombes, 1964, 1972; Winslow, 1964; Mankody & Kanvindo 1970, Reddy *et al* 1971, Novales 1987, Serrano *et al* 1988,1998). La técnica de coloración con la Hematoxilina Eosina (H.E.) es más que suficiente para lograr la identificación de la especie etiológica de un actinomicetoma. En algunos casos se puede emplear la técnica de coloración de Gram, de Zielh Neelsen o de Kinyoun (Luna 1968, Grigoriu *et al* 1984; Serrano *et al* 1988; Joshi, 2000).

El diagnóstico histopatológico del actinomicetoma se basa en el estudio del grano presente en la lesión y en la observación del tipo de reacción del tejido afectado. El tipo de reacción del tejido generalmente no es específica para la especie de actinomiceto patógeno causante de la lesión por lo que no debe considerarse como una característica segura para el diagnóstico histológico del

actinomicetoma. (Banerjee *et al* 1961; Chouhan & Agarwal 1969; Desai *et al* 1970; Mahgoub & Murray, 1973; Novales 1987, Serrano *et al* 1988; Fahal & Hassan, 1992, El Hassan *et al* 1994; Develoux 1999).

Clasificación Patológica del Micetoma

Según Singh (1998) las lesiones macroscópicas que producen los micetomas se pueden, a efectos pedagógicos, dividirse en seis tipos:

- Tipo I** Presencia de lesiones quísticas (masas) bien definidas sin fistulas, se observan en los casos de minimicetomas.
- Tipo II** Presencia de lesiones localizadas con tejido blando difuso con márgenes de la lesión no bien definidos, con o sin presencia de tractos fistulosos
- Tipo III** Presencia de lesiones de tipo infiltrativo que pueden envolver a los tejidos blandos o a los huesos.
- Tipo IV** Presencia de lesiones en los huesos, caracterizadas por lesiones quísticas o cavidades (geodas). Se pueden observar bolsas de granos del agente etiológico, esto se observa, sobre todo en lesiones producidas por la *Actinomadura madurae*.
- Tipo V** Presencia de lesiones muy extensas e invasivas.
- Tipo VI** Presencia de lesiones de tipo proliferativo o epiteliomatosas en la piel y en el tejido subcutáneo.

Desde el punto de vista histológico, Singh (1998), tomando como base, el tipo de reacción del tejido de la lesión, divide a los micetomas en:

- Tipo de respuesta inflamatoria celular aguda (Absceso o microabscesos).
- Tipo de respuesta inflamatoria subaguda.
- Tipo de respuesta celular crónica.
- Tipo de respuesta con lesiones escleróticas o fibróticas.
- Tipo de respuesta con presencia de cápsula fibrosa con respuesta celular inflamatoria del tipo crónico.

Fahal (1992, 2000) propone tres tipos de reacción del tejido a la presencia del grano del agente etiológico del actinomicetoma.

- Tipo I** El grano se observa rodeado y algunas veces invadido por una reacción celular intensa con un infiltrado a predominio de leucocitos neutrófilos polimorfonucleares.
- Tipo II** Presencia de una capa vascular la cual contiene macrófagos, linfocitos, células plasmáticas y células gigantes. En las células gigantes se pueden observar restos o fragmentos del grano. (Se observa en lesiones producidas por *A. madurae* y/o *S.somaliensis*. Algunas de las células macrofágicas pueden presentar un citoplasma espumoso, formando una capa celular periférica externa de la lesión. (Se observa en lesiones producidas por *A. madurae*).
- Tipo III** Formación de una lesión de tipo granuloma epiteliode. (Se observa en lesiones producidas por *S. somaliensis*).

Lesiones y cambios vasculares observados en tejidos afectados por el actinomicetoma.

En las observaciones histológicas de tejidos afectados por el actinomicetoma, se puede observar la presencia de procesos de vasculitis, las arterias y las venas en la lesión pueden presentar hipertrofia de los músculos, así como la presencia de un lumen vascular estrecho, pero no completamente ocluido. De manera ocasional pueden ser observados fragmentos de granos dentro de los vasos sanguíneos. Esto quizás pueda ser una explicación de lo raro que es la diseminación hematogena del actinomicetoma. (Fahal *et al* 1997; Gutiérrez *et al* 1998).

Lesiones y cambios en el sistema linfático observados en tejidos afectados por el actinomicetoma.

Los nódulos linfáticos que drenan desde el área afectada por el actinomicetoma se pueden frecuentemente observar aumentados de tamaño, se observa una hiperplasia de tipo reactivo, la cual presenta una infiltración por células plasmáticas, se pueden observar la presencia de cuerpos de Russell, este tipo de respuesta puede estar relacionada a una respuesta a los antígenos que llegan a los nódulos desde los granos que se encuentran en la lesión primaria, pero también la presencia de infecciones secundarias pueden ser un factor para que se den estos cambios celulares. En algunos casos las metástasis de los microorganismos hacia los nódulos pueden causar linfadenitis que se pueden acompañar de la presencia de procesos fistulosos. La linfadenitis ha sido observada más frecuentemente en casos de actinomicetoma debido a *N.brasiliensis* (Alarcón *et al* 1958, Hassan & Mahgoub, 1972; Grigoriu *et al* 1984) y menos en casos de eumicetoma. A nivel de los nódulos linfáticos puede observarse la presencia de pigmento de hemosiderina aún en ausencia de granos. La hemosiderina se deriva de los tejidos de granulación presentes en los tejidos periféricos de la lesión, la cual drena hacia los nódulos, en algunos casos puede observarse la presencia de pigmento melánico.

Lesiones y cambios en el sistema óseo observados en tejidos afectados por el actinomicetoma.

El actinomicetoma produce lesiones a nivel de los huesos, las cuales se caracterizan por su carácter lítico, que conllevan a una destrucción del tejido óseo y así mismo a la neo-formación de tejido óseo. Se pueden observar la presencia de cavidades en el tejido óseo, algunas aisladas y simples o también y más comúnmente se observan de formas múltiples, pequeñas y numerosas. Estas cavidades no presentan márgenes definidos. Los estudios radiográficos de la parte afectada pueden mostrar la presencia de una reacción periostal y se puede visualizar partes de hueso neoformado y así mismo la presencia de formaciones de tipo asteroide. La observación de este tipo de formaciones, así como la presencia del triángulo de Codaman, puede simular cambios radiográficos que se pueden confundir con un sarcoma osteogénico. (Sanoja, 1986; Fahal & Hassan, 1992; 2000; Joshi, 2000). Generalmente las lesiones extensas que produce el actinomicetoma se acompañan de lesiones de los tejidos de las partes blandas, así como del tejido óseo, es raro sólo observar lesiones del tejido óseo sin la presencia de lesiones en los tejidos del subcutáneo y muscular.

Estudios citopatológicos del actinomicetoma

Las características de los granos que producen los agentes etiológicos del actinomicetoma y sus tipos de reacción tisular que provocan, pueden ser observadas por el estudio de los granos obtenidos de las zonas afectadas que drenan junto con las serosidades sanguinolentas a través de los procesos fistulosos, granos los cuales pueden ser colectados, centrifugados a baja velocidad, luego fijados en solución de paraformaldehído o de glutaraldehído al 3% en buffer cacodilato y luego incluidos, bien en parafina o en resinas de Epon o de Araldita, para su estudio bien al microscopio óptico o electrónico. También puede ser utilizada la aspiración con aguja fina, tanto de lesiones quísticas cerradas o abiertas, el material aspirado puede ser usado para estudio histológico y para el cultivo microbiológico. Por medio de la aspiración con aguja fina se puede hacer un diagnóstico bastante preciso y rápido del tipo de micetoma, en especial cuando se logra obtener en la muestra la presencia de un grano del agente causal. En los casos de actinomicetoma los granos cuando son

coloreados por H&E se presentan de color eosinófilo, variando en su forma y tamaño, generalmente rodeados por un infiltrado de neutrófilos; así mismo, con la presencia de células de tipo polimorfo y otras células inflamatorias, tales como histiocitos, linfocitos o células plasmáticas. El estudio citopatológico por aspiración por aguja fina permite diferenciar artefactos y lesiones inflamatorias causadas por otras bacterias o por hongos. (El Hag *et al* 1996).

Histopatología del actinomicetoma: características de las lesiones producidas por las nocardias.

Las nocardias productoras de actinomicetoma incluyen la *N.brasiliensis*, uno de los agentes más comúnmente reportados, la *N.asteroides*, la *N.otitidiscaviarum* (*N.caviae*) y en menor frecuencia la *N.transvaliensis*. (Mirza & Campbell, 1994); así mismo, han sido reportado casos de actinomicetoma producidos por *Rhodococcus spp.* (Severo *et al* 1987). Los granos de las nocardias, son granos pequeños, de tipo oval o redondo, pueden presentar bordes redondeados o irregulares, son de consistencia blanda, de color blanco o amarillento y no fácilmente visible al ojo desnudo. (Ver Tabla 6.1). El estudio histopatológico no permite hacer un diagnóstico diferencial de las especies de *Nocardia* productoras de las lesiones del actinomicetoma.

Los granos de *Nocardia*, cuando coloreados con H&E se observan generalmente como granos pequeños de color eosinófilo, se presentan como estructuras ramificadas de tipo filamentosas y segmentadas, que se pueden observar en la periferia del grano, conformando una especie de corona radiada. No se observa la presencia de cemento. La periferia del grano tiene forma de orla y con la presencia de células con formas de mazos “club shape” y rodeados por un infiltrado celular de polimorfonucleares leucocitos, los granos se observan embebidos en microabscesos, ocupando la parte central de los mismos (Ver Fig. 6.1a y 6.1b). Reacción del tejido afectado: Alrededor del grano no se observan espacios, se observa la presencia de numerosos neutrófilos y no se observa tejido de granulación, se pueden llegar a observar algunos macrófagos y escasas células plasmáticas. No se observan células gigantes, el tipo de reacción tisular es característico de una inflamación del tipo agudo. Puede observarse un ligero aumento de la vascularidad y un pequeño grado de fibrosis a nivel periférico de la lesión. Los granos de *Nocardia* son Gram positivos y se pueden observar los elementos celulares filamentosos ramificados, septados, así como formas celulares bacilares o cocoidales. Los granos de *Nocardia* se colorean de manera poco intensa con la técnica de Zielh Neelsen y se logra mejor con la técnica de Kinyoun para alcohol ácido resistencia. Los granos de *Nocardia* no se colorean con la técnica del PAS, ni con la de impregnación por plata de Gomori.

Características de las lesiones producidas por *Actinomadura madurae*.

Los granos de *A.madurae*, se caracterizan por ser unos granos grandes, a veces se ven fragmentados en el medio de la lesión o mezclados con granos pequeños. Son de forma redondeada u ovalada, multilobulados, con un borde orlado, irregular. Los granos pequeños se componen de filamentos densos, presentan una coloración homogénea e intensa con la hematoxilina. Los granos grandes presentan márgenes irregulares, se le conoce como “grano cartográfico”, la zona periférica del grano se observa teñida en azul profundo y la zona central de un azul menos intenso, casi claro. El patrón de reacción tisular es el de una inflamación no específica, con la presencia de numerosos microabscesos. Los granos se observan rodeados por una zona eosinofílica de tamaño variable, la cual varía con la edad del grano. La periferia del grano presenta formas filamentosas que le dan un aspecto radiado al grano. No se observa la presencia de pigmentos o de sustancia cementante del grano. El grano es Gram positivo, es negativo para la alcohol ácido resistencia utilizando la técnica de Kinyoun. El grano se presenta rodeado por un infiltrado de neutrófilos, se observa un área clara que rodea al grano y próximo a esta se observa el infiltrado celular neutrofilico. Se observa la presencia de macrófagos y de histiocitos con citoplasma espumoso, los cuales se localizan en la

porción más externa de la lesión, la presencia en la periferia de estas células con citoplasma espumoso, le da a la lesión el aspecto de un “granuloma histiocítico” (Ver Fig. 6.2a y 6.2b)

Características de las lesiones producidas por *Streptomyces somaliensis*

Los granos de *S.somaliensis* son de forma redonda u ovalada, de tamaño grande y compacto, están conformados por una matriz de material amorfo y en la superficie del mismo se observan marcas en forma de “persiana”, debidas al efecto del corte. Se puede observar una coloración de tipo eosinófilo en la periferia del grano, en la zona central del mismo se observa una coloración de tipo basófilo, no se observan formas filamentosas periféricas, en el centro del grano se pueden observar algunas formas filamentosas ligeramente basofílicas. No se observa la presencia de pigmento. El grano es Gram positivo, muestra las hifas coloreadas de morado púrpura en la zona periférica del grano, las hifas se ven separadas por la sustancia que cementa al grano. La reacción del tejido es del tipo granulomatoso, el grano presenta una zona clara y seguida a ésta neutrófilos, rodeados por la presencia de células macrofágicas, células gigantes de tipo de cuerpo extraño y de Langerhans, la zona periférica de la lesión se observa la presencia de tejido de granulación, con vascularización pobre y fibrosis. (Ver Fig. 6.3a y 6.3b).

Características de las lesiones producidas por *Actinomadura pelletieri*

Los granos de *A.pelletieri* son pequeños, de color rojo, son redondos u ovals, lobulados o en forma de semiluna, con sus bordes irregulares. El grano es basófilo, con sus bordes bien definidos y no se observan estructuras filamentosas en el mismo, se puede observar la presencia de una pequeña zona de tipo eosinifílico que rodea al grano. Los elementos miceliales son difíciles de observar. Se visualiza la presencia de sustancia que cementa al grano, ésta se colorea de azul fuerte o violeta. Los micelios son Gram positivos. La reacción del tejido es predominantemente de tipo neutrófilo, se observa la presencia de células de tipo linfocitario y algunos macrófagos, no se observa fibrosis, la vascularización es pobre. (Ver Fig. 6.4). Los casos de actinomietoma por *A.pelletieri* en las Américas son raros, se han reportado casos en Brasil (Lacaz, 1981), México (López *et al* 1992) y Venezuela (Hómez Chacín *et al* 1961), a diferencia de África (Fahal & Hassan, 1992; Develoux *et al*, 1999) y la India (Joshi, 2000) donde existen reportes de numerosos casos.

TABLA 6.1					
MORFOLOGÍA DE LOS GRANOS PRODUCIDOS POR DIFERENTES ESPECIES DE ACTINOMICETOS AERÓBICOS					
ESPECIE	TAMAÑO	CONSISTENCIA	FORMA	COLOR	OCURRE
<i>N.asteroides</i>	Pequeño (1mm de diámetro)	Blando	Lobulado, ocasionalmente en bastonetes.	Blanco o amarillento	Se encuentra en actinomicetomas y no en otros procesos
<i>N.brasiliensis</i>	Pequeño	Blando	Lobulado, ocasionalmente en bastonetes.	Blanco o amarillo pálido	En actinomicetomas, raro en otros procesos
<i>A.maduræ</i>	Grande (1.5 mm de diámetro)	Blando	Irregular oval, serpinginoso o lobulado.	Blanco o amarillento o rosado a rojizo	En actinomicetomas
<i>A.pelletieri</i>	Pequeño (0.3-0.5mm)	Blando	Bordes lisos o finamente lenticulados, irregular esférico.	Rojo fuerte o puede ser amarillento o rosáceo	En actinomicetomas
<i>S.somaliensis</i>	1-2mm de diámetro	Duro	Redondo a oval, denso y homogéneo.	Amarillo o café	En actinomicetomas
<i>S.paraguayensis*</i>	1-2mm de diámetro	Duro	Redondo a oval, denso y homogéneo.	Café o negro	En actinomicetomas

*Aislado por Almeida 1940, según Mackinnon & Artagaveytia-Allende 1956 y según Avram 1970 es un *S. albus*. Lacaz 1977.

Características ultraestructurales de los granos de *Actinoadura maduræ* y *Streptomyces somaliensis*.

Son muy pocos los reportes que existen en la literatura sobre la ultraestructura de los granos de *A.maduræ* y de *S.somaliensis*. Nasher et al, 1987 reportan un estudio de la ultraestructura tanto “*in vivo*” como “*in vitro*” de granos de *S.somaliensis*. Fahal et al, 1994; reportan un estudio preliminar de la ultraestructura de granos de *A.pelletieri* y Serrano et al, 1986; reportan observaciones ultraestructurales de granos obtenidos de pacientes con actinomicetoma por *A.maduræ* y *S.somaliensis*.

Los granos de *A.maduræ* y de *A.pelletieri* presentan hifas septadas, compactas y sin la presencia de substancia que las cimente entre si; en el citoplasma se pueden observar algunas vacuolas. En la periferia del grano se pueden observar la presencia de neutrófilos adheridos al grano y algunos degranulados. Serrano et al 1985; reportaron la presencia de numerosos gránulos y esférulas, semejantes a protoplastos con presencia en alguno de ellos de restos de pared celular y así mismo observaron células del tipo de “Formas L”, desprovistas de pared celular. (Ver Fig. 6.5a y 6.5b).

Los granos de *S.somaliensis* presentan una matriz amorfa con gran contenido de una sustancia electrón-densa, dispuesta de una manera irregular y de tipo reticulado, rodeada por áreas transparentes a los electrones o de baja densidad, en estos espacios se pueden observar la presencia de algunas formas filamentosas, bacilares largas o cortas, así como de formas cocoidales, se nota la presencia de formas celulares bacilares o cocoidales con una pared celular muy gruesa y densa y así mismo formas pleomórficas de tipo filamentosas; estas formas presentan en su citoplasma cuerpos redondeados, “elementary type bodies”. Se observa la presencia de neutrófilos activos, notándose la presencia de gránulos lisosomales en el interior de su citoplasma, todos ellos muy asociados con el grano. (Ver Fig. 6.6a y 6.6b)

Bibliografía

- Abbott, P. 1956. Mycetoma in the Sudan. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 50: 11.
- Alarcón, C. J.; Obadía, J. & Borelli, D. 1958. *Nocardia brasiliensis* aislada de un caso de linfangitis nodular aguda supurativa. *Dermatología.* 1: 269-285.
- Almeida, F. de. 1939-1940. Study of a black grain mycetoma due to *Actinomyces paraguayensis* Almeida, nsp. *Mycopathologia (Den Jaag)* 2: 201-203.
- Avram, N. Si A. 1960. Micetomul cutanat. Romine, Editura Academiei Republicii Populare.
- Banerjee, A. K., Basu, S. P. and Basu, N. 1961. Studies on mycetoma. *Bull. Cal. Sch. Trop. Med. Hyg.* 9: 113.
- Brumpt, E. 1905. Sur le mycétome à grains noirs, maladie produite par une mucédinée du genre *Madurella* n.g. *C.r. Soc. Biol.* 58 : 997.
- Brumpt, E. 1906. Les Mycétomes. *Arch. Parasit.* 10: 489.
- Carter, H. V. On mycetoma or fungus disease of India. J & A Churchill, London. 1874.
- Castro, L.G., Belda, Jr. W., Salebian, A., Cuee, L. C. 1993. Mycetoma a retrospective study of 41 cases seen in Brazil. *Mycoses* 36: 89-95.
- Chouhan, S.S. and Agarwal, S. 1969. Histological diagnosis of mycetoma A clinical study of 24 cases. *Indian J Med Res* 57: 71-77.
- Desai, S. C., Pardanani, D. S., Shreedeevi, N., Metha, R. S. 1970. Studies on mycetoma. *Indian J Surg* 32: 427-447.
- Destombes, P. and Segretain, G. 1962. Les mycetomes fongiques caracteres histologique et culturaux. *Arch Inst. Pasteur. Tunis.* 39: 273-290.
- Destombes, P. 1964. Structure histologique de mycétomes. *Ann. Soc. Belge. Méd. Trop.* 44. 4/5 897-908.
- Destombes, P. 1972. Histopathologie des Mycetomas. *Ann. Soc. Belge Méd. Trop.* 52, 4/5, 261-276.
- Develoux M. ; Dieng M. T. ; Ndiaye, B. 1999. Les Mycétomes, *J. Mycol. Med.* 9: 197-209.
- El Hag, I. A., Fahal, A. H., and Gasim, E. T. A. 1996. Fine Needle Aspiration Cytology of Mycetoma. *Acta Cytologica.* 40:461-464.
- El Hassan, A. M., Fahal, A. H., El Hag, I. A., Kalil E. A. G. 1994. The Pathology of Mycetoma. *Sudan Med. J.* 32: 23-45.
- Fahal, A.H. and Hassan, M.A. 1992. Mycetoma. *Br J Surg* 79: 1138-1141.

- Fahal, A. H., El Toum, E. A., El Hassan, A. M., Mahgoub, E. S., and Gumaa, S. A. 1994. A preliminary study on the ultrastructure of *Actinomadura pelletieri* and its host tissue reaction. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*. 32: 343-348.
- Fahal, A. H., El Hag, I. A., Gadir, A. F. A., El Lider, A. M., El Hassan, A. M., Baraka, O. Z. & Mahgoub, E. S. 1997. Blood supply and vasculature of mycetoma. *Journal of Medical Mycology*.35: 101-106.
- Fahal, A.H. 2000. Evidence Based Guidelines for Mycetoma patients' management. Internet Página Web <http://www.mycetoma.org>
- Gonzalez-Ochoa A. 1962. Mycetomas caused by *Nocardia brasiliensis*, with a note on the isolation of causative organism from the soil. *Lab. Invest.* 11: 1118.
- Gumaa S. A. 1994. The Aetiology and Epidemiology of Mycetoma. *Sudan Med. J.* 32: 14-22.
- Gutiérrez, M. M., Saeb, M., Vega, M. E., Arenas, R. 1998. Vasculitis leucocitoclástica en micetomas por *Nocardia* sp. Reporte Preliminar. *Dermatología Rev Mex.* 42: 147-51.
- Grigoriu, D., Delacrétaz, J., Borelli, D. *Traité de Mycologie Médicale: Mycétomes Chapitre 54: 433-440.* Editions <Roche>, Bâle. Editions Payot Lausanne. Suisse. 1984.
- Hassan, A.M. and Mahgoub, E.S. 1972. Lymphonode involvement in mycetoma. *Trans Royal Soc Trop Med and Hyg.* 66: 165.
- Hómez Chacín, J; Rincón, F. G.; Casas, G. y Wenger, F. 1961. Micetoma de granos rojos por *Streptomyces pelletieri*. Primer caso venezolano, *Rev. Soc. Méd. Quir. del Zulia*, Número especial.
- Joshi, K. R., Solanki, Aruna, Joshi, Y. R. Mycetoma. *Agrobios. India.* 2000.
- Lacaz, Carlos da Silva. *Micología médica; hongos, actinomicetos e algas de interesse médico.* 6. ed. Rev. E ampl. São Paulo, Sarvier; 1977.
- Lacaz Carlos da Silva. 1981. Distribuição Geografica Dos Micetomas No Brasil, *An bras Dermatol.* 56 (3): 167-172.
- Lopez, R; Welsh, O. 1992. Epidemiology of mycetoma in México study of 2105 cases. *Gac. Méd. Méx.* 128: 477- 481.
- Mackinnon, J. E. and Artagaveytia-Allende, R. C. 1956. The Main Species of Pathogenic Aerobic Actinomycetes Causing Mycetomas. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 50: 31-40.
- Mahgoub, El Sheik, Murray, Ian G. *Mycetoma.* William Heinemann Medical Books Ltd. Londón. 1973.
- Mankodi, R.C. and Kanvindo, M.S. 1970. Mycetoma – A histological study. *J Indian Med Assoc.* 54: 405.
- Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology.* Third Edition. Edited by Lee G. Luna, HT. McGRAW-Hill Book Company. USA. 1968.

- Mariat, F. Les principaux actinomicètes aérobies responsables de mycétomes. Journées de Mycologie médicale. L'Expansion Scientifique Française, Paris. 1956.
- Mariat, F. 1963. Sur la Distribution Géographique et la Répartition des Agents de Mycétomes. Bulletin de la Société de Pathologie Exotique. pp. 35-45.
- Mathur, D.R., Joshi, K.R. and Mathur, A. 1979. An aetiological and pathological study of mycetoma in Western Rajasthan. Curr Med Pract 23: 151-160.
- Mirza, S. H. and Campbell, C. 1994. Mycetoma caused by *Nocardia transvalensis*. J. Clin. Pathol. 47: 85-86.
- Nasher, M.; Wethered, D. B. et al. 1987. The ultrastructure of actinomycetoma grains caused by *Streptomyces somaliensis*. Am J Trop. Hyg Med. Hyg. 37: 174-179.
- Novalés, J. 1987. Diagnóstico Histológico de los Micetomas según los Granos. Memorias del I Simp. Int. de Micetomas. Barquisimeto-Venezuela. pp. 95-103.
- Reddy, C. R. R. M.; Sundareswar, B.; Pattabhirama, R. A. and Reddy, S. S. 1971. Mycetoma-Histopathological Diagnosis of Causal Agents in 50 Cases. The Indian Journal of Medical Sciences. pp. 733-741.
- Sanoja, T. Aspectos Radiológicos del Micetoma. Memorias del I Simp. Int. de Micetomas. Barquisimeto-Venezuela. pp. 134-138.
- Serrano, J. A. ; Beaman, B. L. ; Viloría, J. E. ; Mejía, M. A.; Zamora, R. 1985. Histological and Ultrastructural Studies of Human Actinomycetomas. Mem. Sixth International Symposium on Actinomycetes Biology, Decebre, Hungary, 26-30 August, 1985.
- Serrano, J. A., Beaman, B., Mejía, M. A., Viloría, J. E. & Zamora, R. 1988. Histological and Microbiological Aspects of Actinomycetoma cases in Venezuela. Rev Inst. Med. Trop. São Paulo. 30: 297-304.
- Serrano JA, Mejía MA, García E, Zamora R, Boiron P. 1998. *Streptomyces somaliensis* as an etiological agent of actinomycetoma in Lara state, Venezuela. An epidemiological, clinical, microbiological, molecular and histological study of five cases. J Mycol Med. 8:97-104.
- Serrano J.A.; Mejía, M. A.; Díaz-Corrales, F.; Uzcátegui-Negrón, M; Saad, C.; Couble, A.; Casoli, E.; Boiron, P. and García, E. 2001. Rapid identification by PCR of two strains of *Nocardia brasiliensis* isolated from an actinomycetoma case. J. Mycol. Med. 11:106-108.
- Severo, L. C.; Petrillo, V. F. & Coutinho, L. M. B. 1987. Actinomycetoma caused by *Rhodococcus* spp. Mycopathologia. 98: 129-131.
- Singh, H. 1998. Mycetoma-clinical staging, classification and management. Presented at 1st. National Symposium on Mycetoma: 26-28th Feb. 1998 at Dr. S. N. Medical College Jodhpur Rajasthan India.
- Vargas, M. H. 1973. Micetoma por *Streptomyces somaliensis*. Primer caso en el Estado Zulia (Venezuela). Dermatología Venezolana. 12: 161-177.

Winslow, D. J.; Steen, F. G. 1964. Considerations in the Histologic Diagnosis of Mycetoma. *The American Journal of Clinical Pathology*. 42:164-169.

Figuras

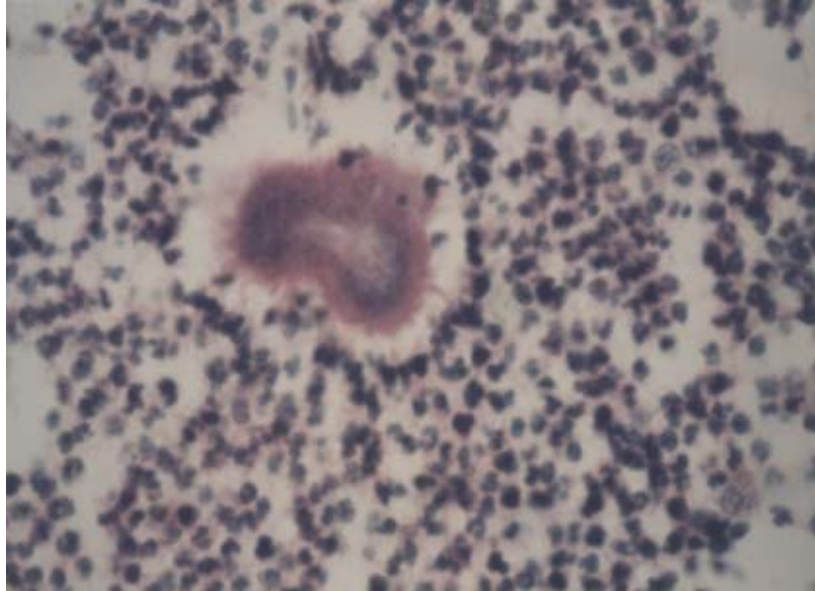


FIG. 6.1a: Grano de *Nocardia brasiliensis*. Note el tamaño del grano y la presencia en su periferia de formas celulares filamentosas y de clavaz. El grano lo rodea una fuerte reacción celular de tipo inflamatorio agudo 100x.

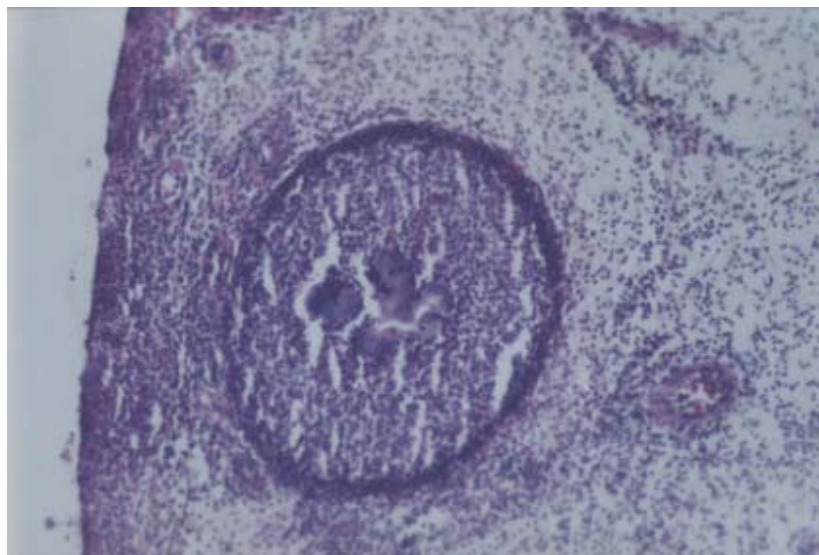


FIG. 6.1b: Grano de *N. brasiliensis*. Note la presencia de los granos rodeados por el intenso infiltrado celular y la encapsulación de los mismos por la reacción tisular 100x.

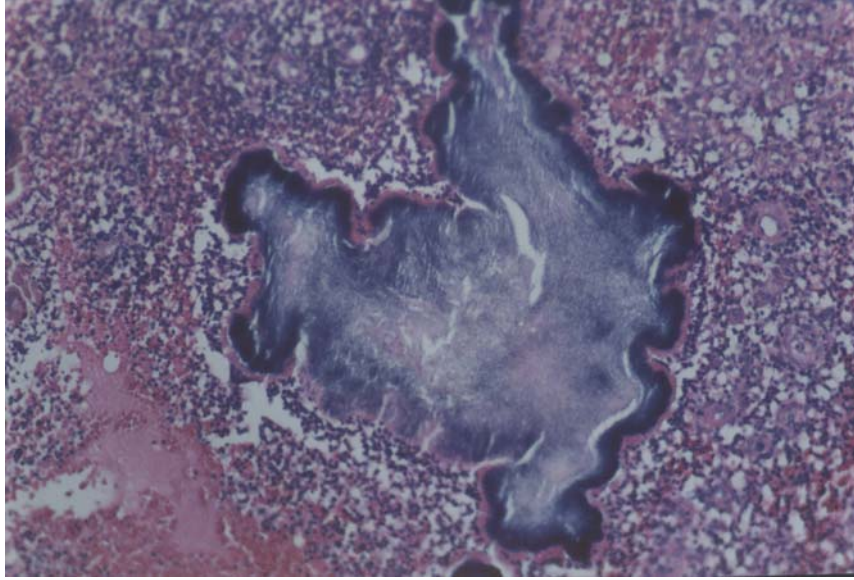


FIG. 6.2a: Grano de *Actinomadura madurae*. Note el tamaño del grano, con su forma irregular, grano de tipo “cartográfico”, con su periferia orlada e intensamente coloreada. Note la reacción celular que rodea al grano, la cual es de tipo celular agudo y sub-agudo 100x.

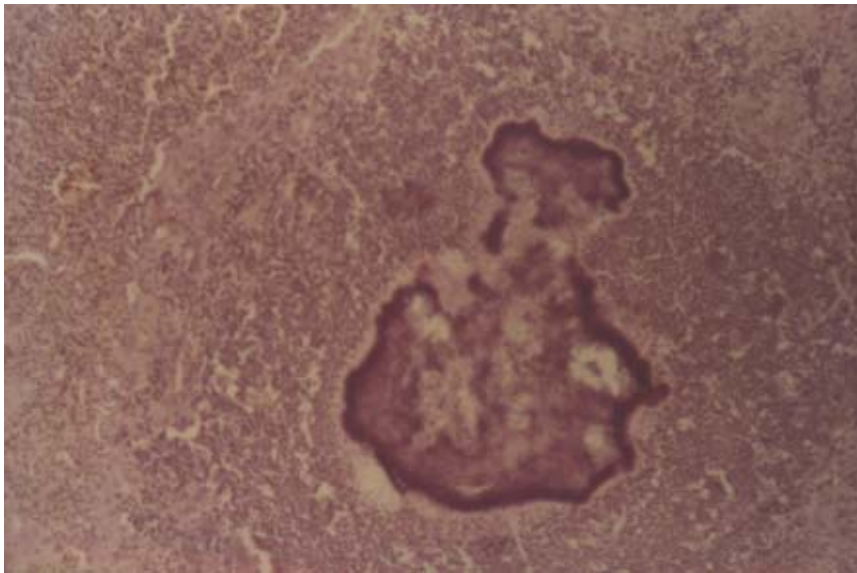


FIG. 6.2b: Grano de *A. madurae*. Note el tipo de reacción celular donde predomina un área de inflamación aguda que rodea al grano y otra más periférica donde se puede notar la presencia de linfocitos y algunos macrófago 100x.

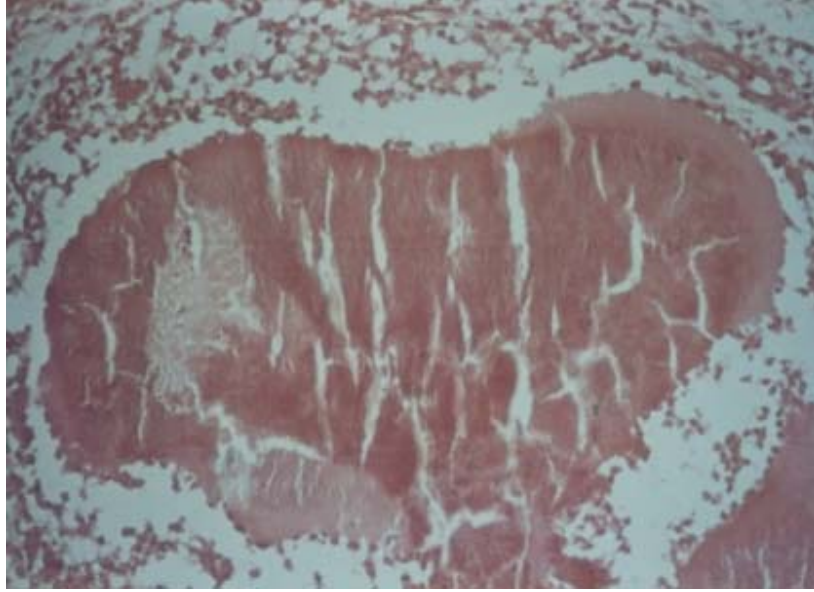


FIG. 6.3a: Grano de *Streptomyces somaliensis*. Note el tamaño del grano, el cual se ve rodeado por una sustancia bastante densa, note la estructura del grano la cual se ve de forma irregular, líneas como de una “persiana”.100x

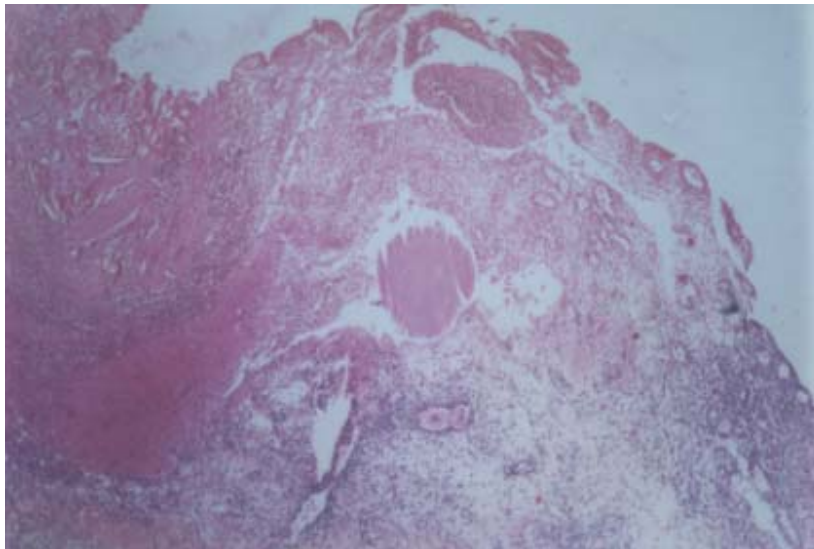


FIG 6.3b: Grano de *S.somaliensis*. Note el tipo de reacción celular donde predominan las células linfocitarias y macrófagos.100x

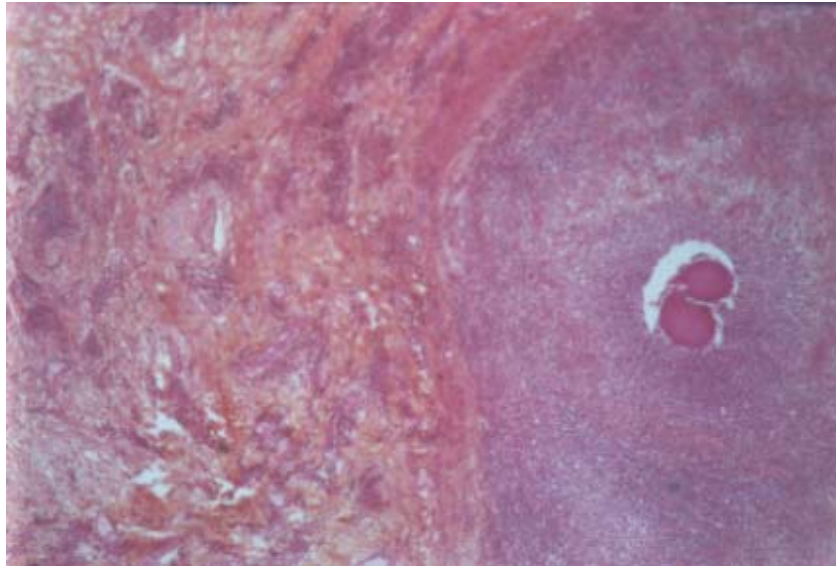


FIG. 6.4: Grano de *Actinomadura pelletieri*. Note el tamaño del grano y la intensa reacción celular que lo rodea. 100x

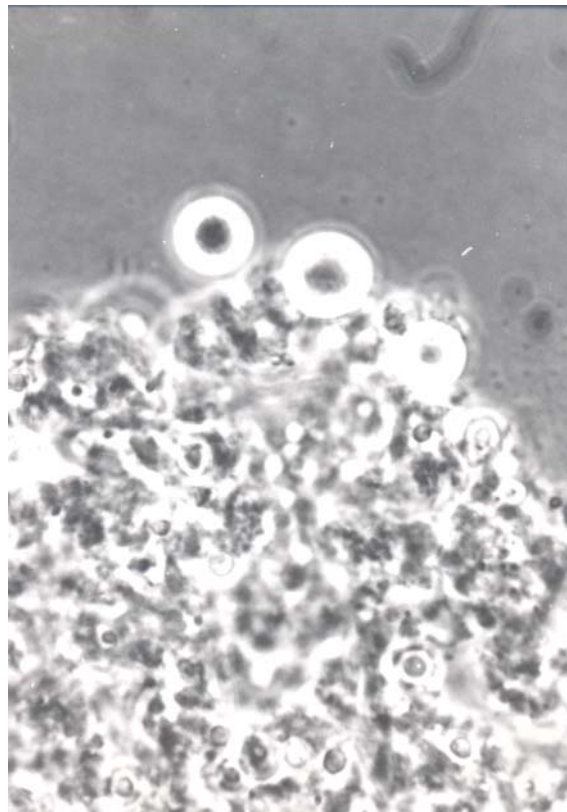


FIG. 6.5a: Microcolonia de Formas L de *Actinomadura madurae*. Vista en microscopía de contraste de fase, 100x

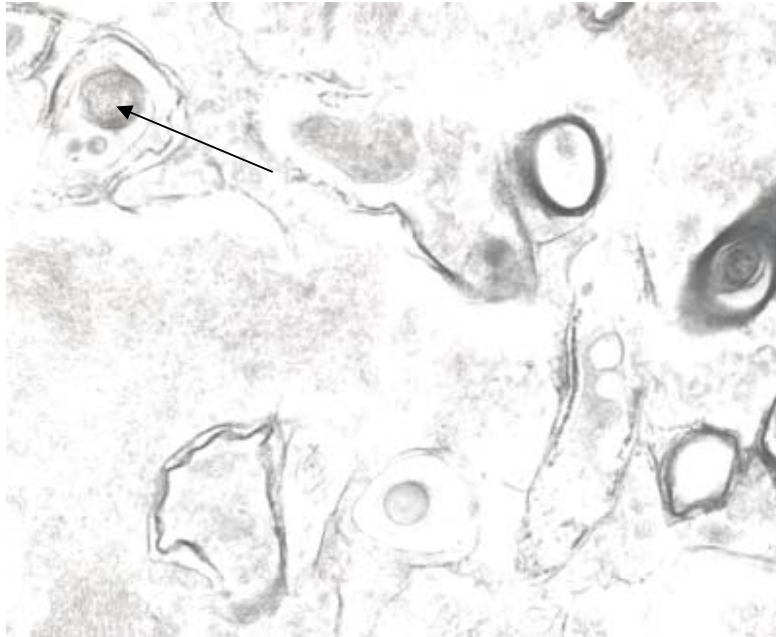


FIG. 6.5b: Grano de *A. madurae*. La flecha indica una Forma L

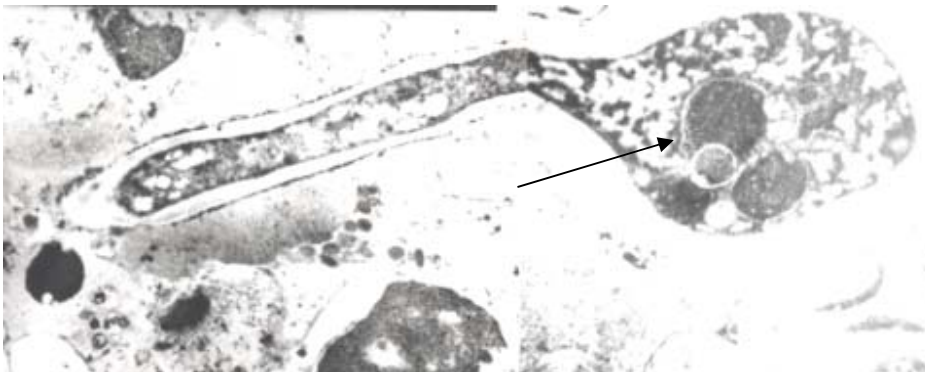


FIG. 6.6a: Grano de *Streptomyces somaliensis*. Forma pleomórfica con presencia de vacuolas intracitoplasmáticas y de Formas L, tipo B.



FIG. 6.6b: Grano de *S. somaliensis* Las flechas indican las células tipo Forma L.

CAPÍTULO VII

ACTINOMICETOMA: ASPECTOS CLÍNICOS, RADIOLÓGICOS Y TERAPÉUTICOS DEL ACTINOMICETOMA

Oliverio Welsh¹, Lucio Vera-Cabrera¹, y María Antonieta Mejía².

¹Servicio de Dermatología, Hospital Universitario “Dr. José E. González”, Monterrey, N.L., México, (e-mail: owelsh@yahoo.com; luvera_99@yahoo.com)

²Servicio de Dermatología, Hospital Universitario “Antonio María Pineda”, Barquisimeto, Estado Lara, Venezuela. (e-mail: mama1961@hotmail.com)

ABSTRACT

Actinomycetoma is a chronic, granulomatous infectious disease affecting the skin, the underlying tissue, and sometimes the bone and the neighboring organs. The disease predominates in the lower extremities, but it can appear in any region of the body. It is clinically characterized by a firm and usually painless fibrous tumefaction of the affected site, and the presence of nodules and fistulae that discharge purulent and serosanguineous exudate containing the granules of the infecting Actinomycete. The disease predominates in subtropical and tropical countries at 30 °N and 15°S of the tropic of cancer. Mexico, Venezuela, Sudan, and India have the higher prevalence of mycetoma. Sulfonamides, tetracycline, INH and rifampin have been used with variable success as treatment. At the end of the sixties trimethoprim–sulfamethoxazole became the gold standard therapy for actinomycetoma. Amoxicillin-clavulanic acid is effective in some cases, but in disseminated disease and either in those cases affecting the underlying organs or resistant to previous treatments, the combination of amikacin-trimethoprim-sulfamethoxazole is an excellent antimicrobial alternative. Audiometry and creatinine clearance studies must be performed periodically when using aminoglycosides.

El micetoma se define como una infección crónica de la piel y de los tejidos subyacentes, que puede afectar los huesos. Clínicamente se caracteriza por un aumento de volumen de la región afectada, relativamente indoloro, y la presencia de fistulas por las que drena pus que contiene gránulos. Los agentes causales son de origen exógeno y pueden ser hongos, los cuales producen los *eumicetomas*, o *actinomiketos* aerobios que producen los actinomiketomas; en ambos casos se producen gránulos, en el primero macrosifonados, y en el segundo microsifonados (Rippon, 1988).

Etiología

El actinomiketoma o micetoma actinomiketico es causado por especies aerobias del orden de los actinomiketales, tales como *Nocardia brasiliensis*, *Nocardia asteroides*, *Nocardia caviae* (*otitidis-caviarum*), *Actinomadura madurae*, *Actinomadura pelletieri*, *Streptomyces somaliensis* y *Nocardiosis dassionvillei*. Estos microorganismos penetran a la piel mediante traumatismos con objetos contaminados con el agente etiológico (generalmente espinas, astillas de madera, y otros objetos punzo cortantes). El aspecto etiológico y su patogenicidad dependen de la influencia del medio ambiente, siendo más común en individuos que laboran en el campo, y que por lo tanto están más expuestos a este tipo de lesiones. Igualmente están implicados el comportamiento del parásito “*in vivo*” y su virulencia.

Distribución geográfica

Los micetomas son consideradas enfermedades de la zona intertropical en países de alta precipitación pluvial, a excepción de los casos por *S.somaliensis*, *A.madurae*, y *A.pelletieri* que

predominan en zonas áridas intertropicales, o *N.brasiliensis* la cual predomina en América, desde México hasta Argentina (Mariat, 1977).

Aspectos clínicos

La lesión inicial se caracteriza por un nódulo eritematoso localizado en el sitio del traumatismo, generalmente indoloro. En los actinomicetomas la evolución es variable siendo más supurativos, más dolorosos y de más rápida evolución que en los eumicetomas. En ocasiones afectan el hueso causando lesiones destructivas. Las especies más agresivas son *N.brasiliensis*, y *A.pelletieri* (Mahgoub, 1973). El síndrome de micetoma está constituido por un cuadro clínico característico que incluye nódulos, fistulas, abscesos, deformidad de la región afectada, y una consistencia firme de los tejidos afectados (Borelli, 1978). La formación de granos es un signo característico de esta enfermedad, la necrosis de los tejidos produce una secreción purulenta que puede salir al exterior a través de fistulas o permanecer en forma de abscesos. Los gránulos son de forma, color, dureza y tamaño variable dependiendo del agente etiológico, el cual es conveniente identificar para determinar la conducta terapéutica más conveniente.

Los micetomas pueden localizarse en cualquier parte del cuerpo pero son más frecuentes en los miembros inferiores, por ejemplo en tobillo, pierna, rodilla, muslo, región inguinal, glúteo, dedos del pie. Con menos frecuencia se observan en miembros superiores, el tronco, la cabeza, cara, abdomen, y los párpados. Ocasionalmente se han descrito casos en dedos de la mano, mano, muñeca, codo, antebrazo, axila región escapular, y el hombro. En el tronco se han observado en las regiones lumbar, pectoral, esternal, escapular, perineal, perianal, y abdomen. Menos frecuentemente se han reportado casos afectando cabeza, cara, y otros sitios anatómicos (Mariat, 1977).

Diagnóstico diferencial

En algunas ocasiones el micetoma puede presentar características clínicas atípicas, distintas a las descritas anteriormente, lo cual puede confundir el cuadro clínico con otras dermatosis que incluyen esporotricosis, cicatrices queiloideas, tuberculosis verrugosa y/o colicuativa, queratoacantoma, granuloma piógeno, impétigo, piodermitis banales, y leishmaniasis. En todos estos casos el examen micológico y/o la histopatología constituyen la clave para el diagnóstico mediante la identificación del agente causal. Se han escrito formas clínicas pequeñas denominadas mini-micetomas que son limitadas, superficiales y con morfología atípica (Arenas, 1990).

Los micetomas actinomicóticos se diseminan a través de los planos de las fascias musculares. Los nervios y los tendones son muy resistentes a la infección. Se ha señalado que la infección por estos actinomicetos puede ascender a través de los vasos musculares más allá de lo observable por la clínica y la radiología. Este hecho explica por qué las amputaciones muy radicales y con grandes márgenes de seguridad, v.gr., la desarticulación de la cadera frente a un micetoma avanzado del tercio inferior del muslo, no garantiza la ausencia de recidivas (Magaña, 1989). Los micetomas actinomicóticos por su evolución rápida pueden atacar el hueso tempranamente. Se han descrito algunos casos con diseminación pulmonar y otros con diseminación linfática (Welsh, 1995, Pérez, 1990). Los micetomas por lo general son localizados y no causan síntomas sistémicos. Puede aparecer fiebre como consecuencia de infecciones bacterianas secundarias, y en algunos pacientes con micetomas avanzados se puede presentar caquexia y anemia secundaria, aunque esto es más frecuentemente producido por un estado de malnutrición del paciente. Los micetomas torácicos pueden ser graves, ya que pueden afectar los huesos del tronco, la medula espinal, los pulmones, el mediastino, y finalmente causar la muerte (Magaña, 1989).

Lesiones óseas

Los actinomicetos que afectan hueso producen lesiones características que se demuestran mediante un estudio de imagen. Según Maghoub (Maghoub, 1973) la destrucción es mayor en los micetomas por *N.brasiliensis* y *A.pelletieri*, y menor en aquellos producidos por *S. somaliensis*.

De acuerdo a los aspectos radiológicos se reconocen tres estadios del micetoma (Davis, 1958):

- Rápida invasión de la piel con formación de edema y fístulas en los tejidos blandos
- Ataque a la corteza del hueso desde afuera
- Ruptura de la corteza del hueso con diseminación a través del mismo produciendo un cuadro característico en la mayoría de los casos. Generalmente la invasión de la corteza marginal tiene lugar en el margen articular.

Se reconocen varios aspectos radiológicos del actinomicetoma:

- La producción de cavitación del hueso endóstico, donde oquedades quísticas erodan la sustancia del hueso. Estas cavidades son pequeñas y numerosas en el actinomicetoma.
- Erosión del hueso perióstico desde afuera con cavitación. Este cuadro es a menudo visto en los huesos del metatarso, los cuales son los más frecuentemente afectados.
- Formación de hueso nuevo perióstico formando espículas acostadas en ángulo recto con la corteza.
- Expansiones amorfas de hueso, lo cual es característico cuando esta enfermedad afecta los huesos del cráneo, y cuando son atacados por *S.somaliensis*, en cualquier localización. En este caso, las lesiones se caracterizan por un engrosamiento y pérdida del detalle de la estructura ósea. El engrosamiento del hueso afectado por láminas óseas frescas son depositadas debajo del periostio activo, a veces toma un aspecto espicular radiado que es semejante al de un sarcoma osteogénico.

Se afirma con toda razón que la afección del periostio marca el pronóstico del micetoma pues si este permanece intacto la curación es muy factible; por lo contrario si el periostio ya ha sido invadido, la recuperación completa es difícil, y dependerá de la magnitud del daño óseo. Magaña (Magaña, 1989) refiere que las lesiones óseas se establecen por contigüidad iniciándose por el periostio, con una periostitis discreta y su separación hasta la destrucción de las superficies articulares y anquilosis pasando por osteítis (cuando la cortical está irregular y de mayor densidad ósea con periostitis y pérdida del canal medular), osteofibrosis (lesión alrededor del hueso con disminución de la densidad del mismo), geodas que vendrían a ser el equivalente de nódulos y que se advierten en el estudio radiológico como espacios oscuros y que se comunican a la piel, (son las imágenes osteoblásticas que corresponden a las zonas de destrucción del hueso), osteopenia (que representa la osteoporosis de la zona afectada por falta de uso), hematomas sub-periósticos, atrofia ósea y finalmente anquilosis por la destrucción de las superficies articulares.

Patología

El estudio anatomopatológico permite establecer el diagnóstico en forma más rápida que el cultivo. La biopsia (profunda) debe ser realizada de una lesión nodular cerrada y se efectúa de una manera rutinaria en este padecimiento. Con frecuencia se puede establecer un diagnóstico etiológico de género y en algunos casos de especie. Las tinciones más frecuentemente empleadas son las de hematoxilina y eosina, azul de toluidina, Gram, tricrómica de Gallego, Ziehl-Nielsen modificado (Fite-Faraco) y la tinción de PAS.

Nocardia

Mediante el estudio histopatológico es posible distinguir el género *Nocardia*; los granos son blancos, con un tamaño entre 40 y 150 μm . De acuerdo al plano donde se corten, los granos pueden

tener un aspecto redondeado, multi-lobulado, vermiforme o anular. Sus filamentos toman la hematoxilina y se tiñen de azul pálido; se disponen densamente en la periferia y más laxamente en el centro. Pueden estar rodeados de clavas eosinofílicas, y generalmente se encuentran en microabscesos de neutrófilos rodeados de tejido de granulación. Con la técnica tricrómica de Gallego toman la fucsina, y mediante la tinción de Ziehl-Nielsen (Fite-Faraco) aparecen como organismos parcialmente ácido-resistentes. Al Gram se observan filamentos ramificados fuertemente Gram-positivos.

Actinomadura

La especie *A. madurae* presenta granos grandes que miden hasta aproximadamente 10 mm. Son filamentosos y se tiñen intensamente con la hematoxilina; tienen forma multi-lobulada o cartográfica. Los granos están formados por capas concéntricas onduladas de filamentos; en el centro los filamentos son escasos, y los granos viejos pueden contener polimorfonucleares en su interior. Alrededor de ellos hay infiltrado de neutrófilos, que a su vez está rodeado de macrófagos de citoplasma espumoso (Serrano, 1998). *A. pelletieri* produce granos rojos, de forma redondeada u oval, pequeños, con un tamaño entre 300 y 500 μm . Tienen bordes irregulares o angulados y los micelios no se observan fácilmente. En la periferia presentan una delgada franja eosinofílica de 2 a 4 micras de espesor. Los gránulos pueden observarse en gran número y generalmente están rodeados de un microabsceso de neutrófilos. Tradicionalmente estos se han descrito morfológicamente como que presentan el aspecto de un plato roto.

Género *Streptomyces*

Streptomyces somaliensis produce granos de tamaño mediano (500 a 2000 μm), redondos u ovalados, que muestran una capa hialina externa, débilmente coloreada, desprovista de filamentos; en la periferia presentan una capa de filamentos radiados cuyas extremidades externas se observan bien alineadas que se colorean excepcionalmente por la hematoxilina, pero son visibles en negativo sobre un fondo ligeramente eosinófilo. El azul de toluidina las puede poner en evidencia; el resto del grano está compuesto por un cemento que debido a su dureza se producen estrias transversales al hacer los cortes histológicos (Destombes, 1964). Alrededor de los granos se observa una reacción granulomatosa compuesta de polimorfonucleares neutrófilos, linfocitos, células plasmáticas, y células epitelioides mezcladas con células multinucleadas gigantes con reacción de fibrosis en la periferia (Serrano, 1998).

Tratamiento

Históricamente las sulfonas (DDS) fueron de los primeros compuestos antimicrobianos que se utilizaron para el tratamiento del actinomicetoma causado por *N. brasiliensis* (González-Ochoa, 1952, González-Ochoa, 1955). González-Ochoa administró dosis de 200 mg diarios por alrededor de 6 meses, y utilizó dosis posteriores más pequeñas para evitar recaídas. De estos pacientes la mayor parte fueron curados, aunque en algunos se desarrolló resistencia al medicamento, por lo que se indicaba tomarlo por períodos de 2 ó 3 años más para obtener una cura clínica y evitar las recidivas.

La sulfametoxipiridazina y la sulfadimetoxipiridazina fueron utilizadas en la década de los sesenta en pacientes infectados por *N. brasiliensis* con una dosis diaria de un gramo por períodos de 6 meses a 1 año (Lavalle, 1961) reportándose buenos resultados en aproximadamente el 86% de 14 casos tratados. Uno de los casos que no respondió era producido por *A. madurae*, lo cual sugería la posibilidad de diferencias en sensibilidad dependiendo del agente etiológico.

Una limitación en el uso de estos antimicrobianos es su toxicidad sobre la médula ósea y la producción de otros efectos secundarios tales como urticaria, hepatitis tóxica, ictericia colestática, y

eritema polimorfo (Wallace, 1982). La tasa de curación obtenida era menor del 100%, y la tasa de mortalidad, particularmente en la nocardiosis pulmonar permanecía alta. Debido a esto, otros antimicrobianos tales como el cloranfenicol, la penicilina, la ampicilina, la cicloserina y la tetraciclina (Pellegrino, 1961, Orfanakis, 1972, Hoeprich, 1968) se utilizaron en el tratamiento de infecciones por *Nocardia*, todos ellos con resultados poco concluyentes principalmente debido al número limitado de pacientes incluidos en los estudios.

En 1969, se introdujo en la terapéutica de los actinomicetomas el uso de una sulfonamida menos tóxica, el sulfametoxazol, en combinación con un derivado de la diaminopirimidina, el trimetoprim (González-Ochoa, 1969).

En 1972, Mahgoub reportó un estudio en el Sudán con 144 pacientes con actinomicetoma que incluían 133 casos producidos por *S.somaliensis*, 14 pacientes con *A.pelletieri*, 13 por *A.maduræ* y 4 por *N. brasiliensis* (Mahgoub, 1972). Los pacientes fueron distribuidos en grupos terapéuticos con trimetoprim-sulfametoxazol (TSX) (n=78), dapsona (n=53), TSX-estreptomina (n=81), dapsona-estreptomina (n=53), sulfadoxina-pirimetamina-estreptomina (n=11) y rifampicina-estreptomina (n=5). Los mejores resultados fueron obtenidos con la mezcla TSX-estreptomina con la que se obtuvo cura (sin recidivas) en el 61%. Los pacientes con micetoma por *A.pelletieri*, *A.maduræ* y *N.brasiliensis* fueron más fácilmente curados, en cambio la mayor parte de los casos que no mostraron mejoría fueron causados por *S.somaliensis*.

En 1982, Wallace y col. estudiaron la respuesta clínica a TSX en 9 pacientes con nocardiosis cutánea, la mayor parte por *N.brasiliensis*, utilizando dosis de entre 5-10 mg/kg de trimetoprim por un período entre 2 a 12 semanas obteniendo excelente respuesta clínica en ocho pacientes (Wallace, 1982). Uno de ellos desarrolló leucopenia y neutropenia, aunque no requirió la suspensión del medicamento. Estos mismos autores estudiaron el efecto del co-trimoxazole (8 mg/kg de TMP con 40 mg/kg de sulfametoxazol diariamente) en un grupo de 25 pacientes con nocardiosis pulmonar, en los cuales el 68% de los casos estaban recibiendo corticoesteroides; 23 de ellos estaban infectados con *N.asteroides* y 2 con *N.otitidiscaviarum*. De ellos, diez pacientes presentaron total resolución de la infección; cinco murieron a pesar del tratamiento, y el resto presentó resultados terapéuticos variables. En uno de los casos se desarrolló resistencia al co-trimoxazole, y cuatro de los pacientes presentaron serios efectos colaterales incluyendo mielosupresión reversible, y epidermonecrosis tóxica. Estos resultados confirman la necesidad de un sistema inmune eficiente para el correcto tratamiento de los pacientes, y de la búsqueda de otras alternativas terapéuticas para el tratamiento de estas infecciones.

En 1985, Welsh y col. reportaron el caso de un paciente con actinomicetoma con diseminación pulmonar curado después de 5 semanas de tratamiento con TSX 7-35 mg/día respectivamente, y tres semanas con amikacina 500 mg cada 12 hrs IM (Welsh, 1985). Posteriormente, el mismo autor, reportó una respuesta exitosa en nueve casos de actinomicetoma, 2 tratados con amikacina como tratamiento único y 12 combinando TSX y amikacina (Welsh, 1987) mencionando que con el tratamiento combinado observaba resultados terapéuticos más rápidos. En 1989 se reportó otro estudio de 26 pacientes con actinomicetoma respondiendo favorablemente con curación 21 de ellos al primer ó segundo ciclo de terapéutica (5 a 10 semanas de tratamiento) y 5 con tres ciclos (Welsh, 1991). Este tratamiento actualmente se indica en actinomicetomas severos y extensos que no responden al tratamiento tradicional ó que presentan riesgo de diseminación a órganos ó estructuras vitales. Debido a los efectos oto- y nefrotóxicos potenciales de la amikacina se deben de realizar estudios periódicos de depuración de la creatinina y audiometría, antes y durante cada ciclo de tratamiento

Los β -lactámicos en general no son activos contra los actinomicetos aeróbicos debido a que estos poseen enzimas que degradan dichos compuestos (β -lactamasas), sin embargo los β -lactámicos son

activos *in vitro* si se mezclan con inhibidores de estas enzimas (Wallace, 1987). En 1993, Wortman reportó un caso de un paciente con micetoma en el pie con involucro óseo tratado con amikacina-TMP-SMX por 14 semanas; sin embargo el paciente desarrolló disminución subclínica de la agudeza auditiva por lo que se decidió cambiar el tratamiento de forma alternativa con amoxicilina-ácido clavulánico durante 6 meses, obteniendo la curación del mismo (Wortman, 1993). En 1993, en México, Gómez y col., reportaron dos casos de micetomas tratados exitosamente con amoxicilina-ácido clavulánico (Gómez, 1993). Uno de ellos era un paciente con micetoma en la rodilla tratado anteriormente con DSS y TMP-SMX por 7 meses, rifampicina por 1 mes, y 3 ciclos de amikacina; el segundo paciente presentaba un micetoma en el brazo y hombro izquierdo sin antecedentes de tratamientos previos. Welsh, posteriormente reportó tres casos con resultados variables (Welsh, 1991), uno de estos casos se trataba de un paciente con micetoma en el tórax el cual fue tratado inicialmente con amoxicilina-ácido clavulánico a dosis de 1.5 g. con mejoría importante durante el primer mes pero con retorno de las lesiones a los tres meses. Los otros dos casos de actinomietomas se trataron inicialmente sin éxito con TMP-SMX y amikacina y después de tres ciclos, se cambió el esquema con amoxicilina-ácido clavulánico sin presentar mejoría clínica ni bacteriológica. Estos resultados coinciden con lo observado *in vitro* en que no se observa una sensibilidad homogénea de las cepas, y en las cuales inclusive se puede desarrollar resistencia al ácido clavulánico (Wallace, 1987).

Debido a la aparición de infecciones que son resistentes a los tratamientos anteriormente citados, se han realizado estudios *in vitro* de la susceptibilidad obteniéndose resultados variables. Recientemente se han ensayado nuevos antimicrobianos con metodología estandarizada (NCCLS, 2003), y se ha encontrado que compuestos del grupo de las oxazolidinonas, ya probadas en la clínica como el linezolid, o en fase experimental, tal como el DA-7867, tienen gran actividad sobre cepas de *Nocardia* y *A.maduræ* aisladas de pacientes con actinomietoma (Brown-Elliot, 2001, Vera-Cabrera, 2001, Vera-Cabrera, 2004a, Vera-Cabrera 2004b). Esta actividad *in vitro* se ha confirmado en un modelo experimental murino de actinomietoma por *N.brasiliensis* (Gómez-Flores, 2004), así como en pacientes infectados con *Nocardia* (Moylett, 2003). Debido a la potencial resistencia de los actinomietos a los antimicrobianos ya existentes, es necesario continuar con la evaluación de nuevos fármacos con menor toxicidad y mayor potencia que puedan ser utilizados en el tratamiento de esta enfermedad y lograr su curación en el menor tiempo posible y con las menores posibilidades de efectos adversos.

Un método diagnóstico y de evaluación de la efectividad terapéutica en actinomietomas causados por *N.brasiliensis* es la detección de anticuerpos circulantes contra dos antígenos inmunodominantes de este microorganismo, P24 y P26 (Vera-Cabrera, 1992, Salinas-Carmona, 1993). La caída en los niveles de anticuerpos aunada a la resolución clínica nos permite determinar cuando suspender el tratamiento y definir la cura del paciente.

En conclusión, el tratamiento actual de elección para el actinomietoma no complicado es el trimetoprim-sulfametoxazole (co-trimoxazole) a una dosis de 40/8 mg/kg/día por 6 meses a 2 años. En casos de resistencia o falta de respuesta se pueden utilizar amoxicilina-ácido clavulánico a una dosis de 500 mg cada 8 horas durante 6 meses. En los pacientes sin respuesta terapéutica a este régimen, y en aquellos en las que por su localización (lesiones torácicas, cuello, cabeza) ameritan un tratamiento rápido y efectivo, se emplea el tratamiento combinado de amikacina 15 mg/kg/día IV o IM, por 3 semanas y trimetoprim-sulfametoxazole 40/8 mg/kg/día por un período simultáneo de 5 semanas. A esta combinación la hemos denominado ciclo de tratamiento; hasta la fecha más de 51 pacientes han terminado este esquema de tratamiento logrando la curación de la enfermedad en períodos de 1, 2, 3 o 4 ciclos (5 a 20 semanas). En caso de resistencia a la amikacina, esta puede ser substituida por la netilmicina a dosis de 5 mg/kg/día en un esquema similar al anterior. Con el esquema terapéutico antes mencionado se ha logrado la curación de más del 90% de los casos de

actinomicetoma tratados. En el actinomicetoma el empleo de la cirugía como método de tratamiento es excepcional.

Bibliografía

- Arenas, R. y col. 1990. Micetomas en niños. Estudio de cinco casos. *Derm Revist Méx.* 34. N° 3 mayo- junio.
- Borelli, D. 1978. Le Micetome du pied. *Revue Therapeutique.* 35:888-91.
- Brown-Elliott B.A., S.C. Ward, C.J. Crist, L.B. Mann, R.W. Wilson, and R.J. Wallace. 2001. In vitro activities of linezolid against multiple *Nocardia* species. *Antimicrob Agents Chemother.* 45: 1295-1297.
- Davies, A. G. M. 1958. The bones changes of Madura foot. Observations in Uganda. *Radiology.* 70:814-847.
- Destombes, P. 1964. [histologic structure of mycetomas]. *Ann Soc Belg Med Trop.* 44:897-908.
- Gomez A.; A. Saúl, A. Bonifaz, and López M. 1993. Amoxicillin and clavulanic acid in the treatment of actinomycetoma. *Int J Dermatol.* 32:218-220.
- Gomez-Flores A, Welsh O, Said-Fernandez S, Lozano-Garza G, Tavarez-Alejandro RE, Vera-Cabrera L. *In Vitro* and *In Vivo* Activities of Antimicrobials against *Nocardia brasiliensis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004. 48:832-7.
- González-Ochoa A., J. Shields, and P. Vázquez. 1952. Acción de la 4-4 diamino-difenil-sulfona frente a *Nocardia brasiliensis* (estudios *in vitro* en la infección experimental y en clínica). *Gac. Med. Mex.* 52:345-353.
- González-Ochoa A. 1955. Effectiveness of DDS in the treatment of chromoblastomycosis and of mycetoma caused by *Nocardia brasiliensis*. 321-327. In Little, Brown, and Co. (ed), *Therapy of fungus diseases, An International Symposium*, Los Angeles, USA.
- González-Ochoa, A.; L. Tamayo. 1969. Tratamiento del micetoma actinomicótico por *Nocardia brasiliensis* con RO 2580. *Rev. Mex. Derm.* 49: 473-476.
- Hoepflich P. D, Brandt D, Parker R. H. 1968. Nocardial brain abscess cured with cycloserine and sulfonamides. *Am J. Med Sci.* 255:208-216.
- Lavalle, P. A. Saúl and J. Peniche. 1961. La sulfadimetoxipiridazina en el tratamiento de los micetomas. I Cong. Mex. Derm., Mexico, 525-535.
- Magaña Lozano, M. 1989. Los micetomas. Sus repercusiones óseas. *Derm Revist. Mex.* 33: 21-26.
- Mahgoub, E. S. 1972. Treatment of actinomycetoma with sulphamethoxazole plus trimethoprim. *Am J trop med Hyg.* 21:332-335.
- Mahgoub, E. S.; Murray, I.; Heineman, W. *Mycetoma*. Medical Books Ltd. London 1973.
- Mariat, F; Destombes, P; Segretain, G. 1977. The mycetomas: clinical features, pathology, etiology and epidemiology. *Contrib Microbiol Immunol.* 4:1-39.
- Moylett EH, Pacheco SE, Brown-Elliott BA, Perry TR, Buescher ES, Birmingham MC, Schentag JJ, Gimbel JF, Apodaca A, Schwartz MA, Rakita RM, Wallace RJ Jr. 2003. Clinical experience with linezolid for the treatment of nocardia infection. *Clin Infect Dis.* 36:313-318.

- NCCLS. Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes; Approved Standard. NCCLS document M24-A [ISBN 1-56238-500-3]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.)
- Orfanakis, M.G; Wilcox, H. G; Smith, C. B. 1972. In vitro studies of the combined effect of ampicillin and sulfonamides on *Nocardia asteroides* and results of therapy in four patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 1:215-220.
- Pérez R.; Rey A. y col. 1990. Micetoma con diseminación linfática. *Derm. Revist. Mex.* 34.
- Pellegrino, E. D; Henderson, R. R. 1961. Response of pulmonary nocardiosis to treatment with massive doses of penicillin intravenously. Report of a successfully treated case with four-year follow-up observation, together with review of the literature. *Am Rev Respir Dis.* 84:242-255.
- Rippon, J. Mycetoma. In: Rippon J, ed. *Medical Mycology: The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes.* 3rd Edition. Philadelphia: W B Saunders Company; 1988: 325-352.
- Salinas-Carmona MC, Welsh O, Casillas SM. 1993. Enzyme-linked immunosorbent assay for serological diagnosis of *Nocardia brasiliensis* and clinical correlation with mycetoma infections. *J Clin Microbiol.* 1993 31:2901-2906.
- Serrano, J.A.; Beaman, B.L.; Victoria, J.E., Mejía, M.A., Zamora, R. 1998. Histological and ultrastructural studies of human mycetomas. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 30: 297-304.
- Vera-Cabrera L, Gomez-Flores A, Escalante-Fuentes WG, Welsh O. 2001. *In vitro* activity of PNU-100766 (linezolid), a new oxazolidinone antimicrobial, against *Nocardia brasiliensis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001. 45:3629-30.
- Vera-Cabrera L, Gonzalez E, Choi SH, Welsh O. 2004a. *In vitro* activities of new antimicrobials against *Nocardia brasiliensis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 48:602-604.
- Vera-Cabrera L, Ochoa-Felix EY, Gonzalez G, Tijerina R, Choi SH, Welsh O. 2004b. *In Vitro* Activities of New Quinolones and Oxazolidinones against *Actinomadura madurae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 48:1037-1039.
- Vera-Cabrera L, Salinas-Carmona MC, Welsh O, Rodriguez MA. 1992. Isolation and purification of two immunodominant antigens from *Nocardia brasiliensis*. *J Clin Microbiol.* 30:1183-1188.
- Wallace, R. J Jr; Septimus, E. J; Williams, T. W Jr; Conklin R. H; Satterwhite T. K; Bushby, M. B, Hollowell D. C. 1982. Use of trimethoprim-sulfamethoxazole for treatment of infections due to *Nocardia*. *Rev Infect Dis.* 4:315-325.
- Wallace RJ Jr, Nash DR, Johnson WK, Steele LC, Steingrube VA. 1987. β -lactam resistance in *Nocardia brasiliensis* is mediated by β -lactamase and reversed in the presence of clavulanic acid. *J Infect Dis.* 156:959-566.
- Welsh O.; López L., J. R. 1985. Micetomas con diseminación pulmonar. *Med. Cut. I:L:A.* 13: 517-523.
- Welsh, O.; E. Saucedo, J. González, and J. Ocampo. 1987. Amikacin alone and in combination with trimethoprim-sulfamethoxazole in the treatment of actinomycotic mycetoma. *J Am Acad dermatol.* 17:443-448.
- Welsh O. 1991. Mycetoma: Current concepts in treatment. *Int J Dermatol.* 30:387-98.
- Wortman PD. 1993. Treatment of a *Nocardia brasiliensis* mycetoma with sulfamethoxazole and trimethoprim, amikacin, and amoxicillin and clavulanate. *Arch Dermatol.* 129:564-567.

Figuras



Fig. 7.1. Micetoma de cara anterior del tórax causado por *Nocardia brasiliensis* antes (izq.) y después de un ciclo (cinco semanas) de tratamiento con trimetoprim-sulfametoxazol y amikacina como se describe en el texto.



Fig. 7.-2. Actinomictoma del Tórax por *N.brasiliensis*



Fig. 7.3. Actinomictoma de cabeza por *S.somaliensis*

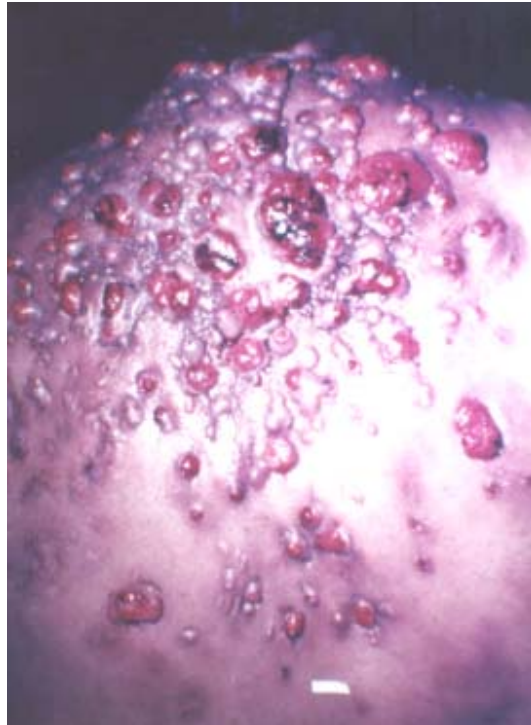


Fig. 7.4. Actinomycetoma de la espalda de etiología doble *N.brasiliensis* y *N.otitidiscaviarum*



Fig. 7.5. Actinomycetoma del brazo por *N.asteroides*



Fig. 7.6. Actinomycetoma del pie por *A. madurae*



Fig. 7.7. Actinomycetoma del dorso del pie, lesión tipo queloideana debido a *S. somaliensis*

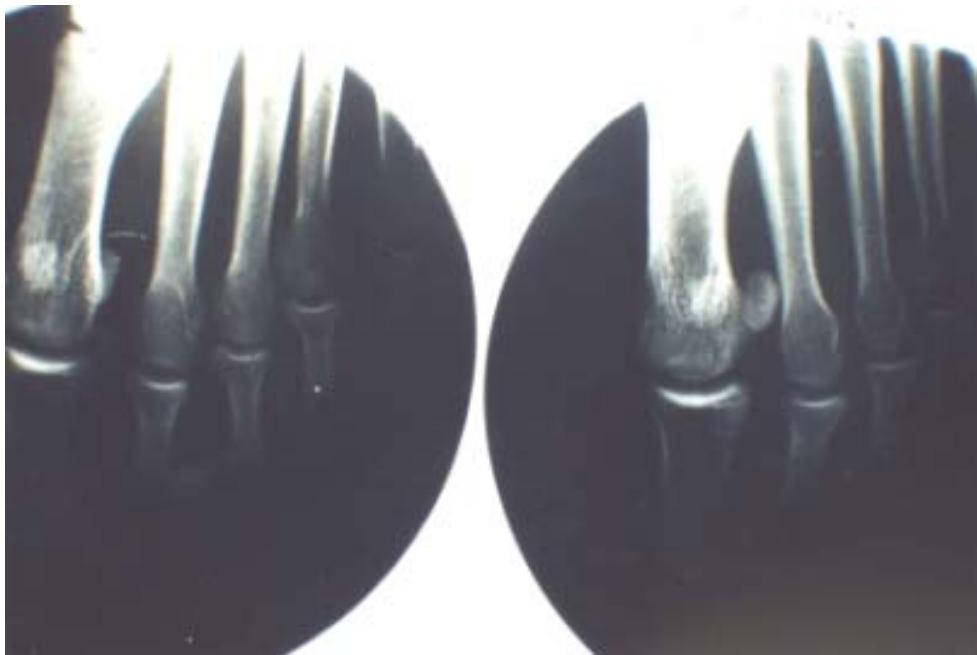


Fig. 7.8. Lesiones óseas por *Streptomyces somaliensis*

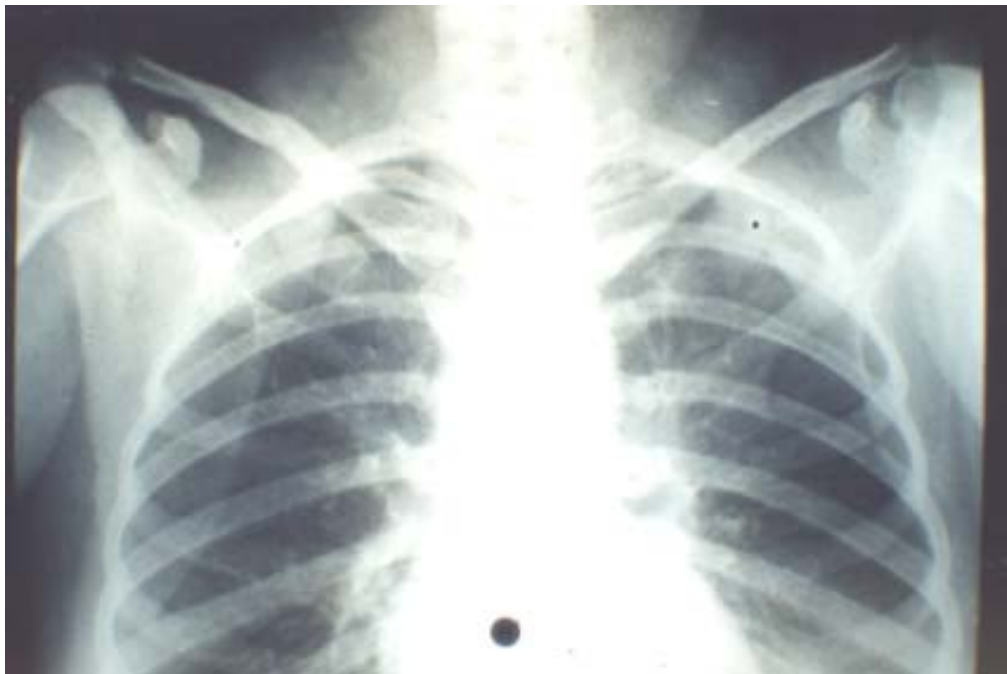


Fig. 7.9. Lesiones óseas del tórax por *Nocardia brasiliensis*

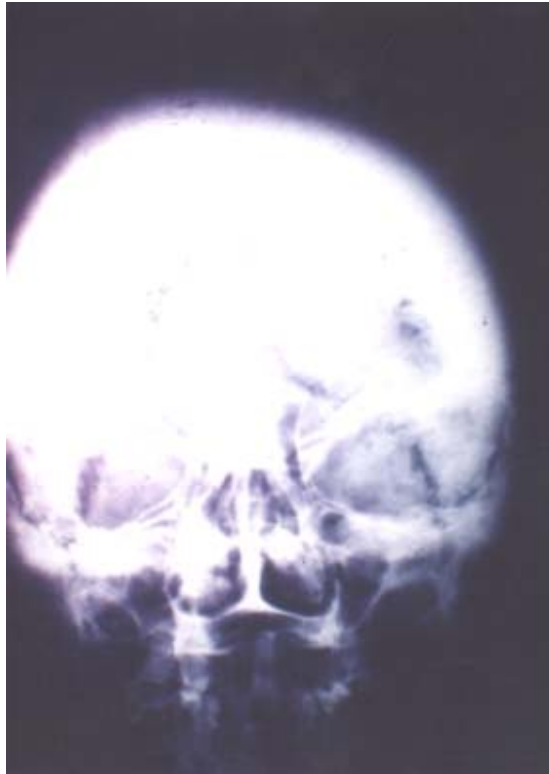


Fig. 7.10. Lesiones óseas por *Streptomyces somaliensis*



Fig. 7.11. Lesiones óseas por *Actinomaduræ maduræ*

CAPÍTULO VIII

ACTINOMICETOMA EN ÁFRICA OCCIDENTAL

M. Develoux¹

¹Service de phraseologies Hospital Tenon, 4 rue de la Chine 75020 Paris, France.

michel.develoux@tnn.ap-hop-paris.fr

ABSTRACT

In Africa, the first case of mycetoma was described in Senegal. Most of the studies concerning the disease in West Africa were done in Dakar, Senegal. The West African endemic zone is characterized by its climate: a long dry season and a short wet season with annual rainfall varying from 50 to 800 mm. Four countries are totally (Mauritania and Niger) or partially (Senegal and Mali) included in this climatic zone. Actinomycetomas are predominant except in Mauritania. Actinomycetomas due to *Streptomyces somaliensis* are often found in the arid zone of Niger and Mauritania with an annual rainfall of 50 to 250 mm. Those due to *Actinomadura pelletieri* are more often found in the southern parts of the endemic zone (Senegal, Mali, Niger) where the rainfall reaches 500 to 800 mm. The frequency of red grain mycetoma due to *A. pelletieri* is the most studied of the mycetomas in the western part of the African endemic zone. Red grain mycetoma is not found in the eastern part (Sudan, Somalia). *A. pelletieri* mycetoma is the most severe of the African mycetomas because of its rapid extension, and localization outside the foot. Medical treatment of actinomycetoma is not sufficiently used in West Africa. Sulfamethoxazole-trimethoprim is the most efficacious treatment of red grain mycetoma. *Streptomyces somaliensis* mycetomas are more resistant to this treatment, and other combination therapies should be utilized for resistant cases. In Africa, two difficulties for medical treatment of actinomycetomas must be pointed out. There is first an economic problem since mycetoma patients are contrymen with few financial possibilities, treatment must be as cheap as possible. Secondly, patients must be monitored for several years after treatment but most of them are lost to follow-up after the first treatment.

El primer caso de micetoma africano fue descrito en Senegal, África occidental, en 1894 por Le Dantec (Le Dantec, 1894). Le Dantec percibió rápidamente la importancia del factor climático en la distribución geográfica de la enfermedad. En Senegal, Brumpt aisló y describió en 1905 *Madurella mycetomatis* de micetoma por granos negros (Brumpt, 1905). También en Senegal, Laveran describió *Actinomadura pelletieri* responsable del micetoma por granos rojos (Laveran, 1906).

La mayoría de los estudios acerca del micetoma en África occidental fueron realizados en Dakar, capital de Senegal, entre 1957 y 1968. Dakar está situada en la zona africana de micetoma, en aquella época tenía la única Facultad de Medicina de los países de lengua francesa de África occidental. Tenía y tiene todavía un Instituto Pasteur, centro de investigaciones y de referencia en microbiología para toda esta parte de África. Todo eso explica la importante contribución de la escuela de Dakar en el conocimiento de la enfermedad. También hay que mencionar la contribución de los micólogos y patólogos del Instituto Pasteur de París en las investigaciones.

Los clínicos de Dakar describieron las diferentes presentaciones del micetoma en África occidental (O'Connor, 1958). Delahaye y col. hicieron una descripción con detalle de los aspectos radiológicos de los eumicetomas y actinomicetomas encontrados en los hospitales de Dakar (Delahaye *et al*, 1962). Los cirujanos ortopédicos como Bezes pusieron en su punto la cirugía particular del

micetoma (Bezes, 1961). Camain y col. presentaron el estudio histopatológico de los micetomas de Senegal y Mauritania (Camain *et al*, 1957). Tal como lo mostraron en estos trabajos, la mayoría de los agentes etiológicos encontrados en África occidental pueden ser identificados precisamente por el aspecto histológico del grano: *Madurella mycetomatis*, *Actinomadura pelletieri*, *Actinomadura madurae*, *Streptomyces somaliensis*. La identificación biológica de los agentes de micetoma en esta parte de la zona endémica africana se debió a Baylet y col. (Baylet *et al*, 1959). Hicieron la descripción de un nuevo agente etiológico: *Leptosphaeria senegalensis*.

Todos los estudios de esta época fueron resumidos en la tesis de Rey que aún, hoy en día, constituye el trabajo más importante referido al micetoma en África occidental (Rey, 1961). Rey realizó una estadística etiológica de 214 casos, la mayoría provenientes de Senegal y Mauritania (Cuadro 8.1). La etiología fue determinada a través de 205 estudios histológicos y 67 cultivos. En los resultados se destacaba la importancia de los eumicetomas por granos negros y de los actinomictomas por granos rojos. El micetoma por granos rojos aparecía clínicamente como el más original y el más grave de los micetomas africanos. Rey pensaba atribuir ocho casos de actinomictoma a *Nocardia* spp. por sus aspectos histológicos, pero no hubo cultivo que lo confirmase.

Analizando la procedencia de los enfermos de Mauritania y Senegal se pudo distinguir tres regiones de micetoma, cada una con agentes etiológicos predominantes diferentes:

La región septentrional: Situada por completo en Mauritania en regiones desérticas tenía lluvias anuales de 50 a 250 mm. Era la zona donde *S. somaliensis* predominaba. Había una importante minoría de micetoma por granos negros debidos a *M. mycetomatis* o *L. senegalensis*.

La región del Río Senegal: Representaba la región hyper endémica. El Río Senegal constituye la frontera natural entre Senegal y Mauritania. Es una zona con 250 a 500 mm de precipitación pluvial por año. La mayoría de los micetomas eran eumicetomas por granos negros debidos a *M. mycetomatis* y *L. senegalensis* en proporciones iguales. Había una minoría de micetoma por *A. madurae* y raros casos por *A. pelletieri*.

La región meridional: Se localizaba en el centro de Senegal con precipitación anual de 500 a 800 mm. Se caracterizaba por el predominio de micetoma por granos rojos con algunos eumicetomas por granos blancos. Al sur de la línea isoyecta 800 los micetomas eran excepcionales.

Estas tres zonas se correspondían a su vez con tres zonas botánicas: la zona subsahariana con mimosáceas y acacia, la zona de «sabana armada» con más variedades de arbustos espinosos y la zona sudanesa septentrional donde se encuentran todavía arbustos espinosos pero con mayor abundancia de especies no armadas.

La parte oeste de la banda africana del micetoma que Rey describió, se sitúa en el hemisferio norte de una y otra parte del paralelo 15. La banda limitada por las líneas isoyetas 50 y 800 englobaba Mauritania, la parte norte y central de Senegal, la mayor parte de Malí y todo el territorio de la República de Níger. El clima es seco y árido con una larga temporada seca y una corta temporada de lluvia que se extiende de junio a octubre y algo menos en la parte norte subsahariana. Este régimen pluvial favorece a una flor especial de arbustos espinosos. En la parte oeste de la banda africana del micetoma se individualizaban tres focos de micetoma, dos de ellos en los que predominaban los actinomictomas: el septentrional con actinomictomas por *S. somaliensis* y el meridional con actinomictomas por *A. pelletieri*.

En 1966 y 1967 Segretain y Mariat, realizaron investigaciones sobre la presencia de agentes de micetomas en el suelo y sobre las espinas de Senegal y Mauritania (Segretain *et al*, 1968). Aislaron

N.asteroides y *N.brasiliensis* del suelo de varias partes del centro oeste de Senegal. También aislaron *M.mycetomatis* y *L.senegalensis* del Valle del Río Senegal. Fue la única investigación sobre este tema efectuado en la parte oeste de la zona endémica africana. Todos los trabajos fueron publicados en francés y por eso no han tenido una difusión apropiada.

Después hubo pocas publicaciones relativas al micetoma en África occidental durante unos veinte años. Nuevas investigaciones fueron publicadas los últimos quince años del siglo veinte. Los trabajos lograron responder algunas interrogantes: ¿Representaba todavía el micetoma un problema en África occidental?, ¿Eran todavía válidas las comprobaciones de Rey sobre la distribución de los diferentes agentes del micetoma en Senegal-Mauritania?, ¿Podían esas comprobaciones ser válidas para Malí y Níger, los otros dos países de África occidental situados en la zona hiper-endémica del micetoma? En efecto, los datos sobre el micetoma en Malí y Níger eran muy escasos.

En 1992, autores de Mauritania y Francia presentaron los aspectos clínicos y epidemiológicos de 122 casos de micetomas procedentes de los servicios de dermatología y cirugía del Hospital Nacional de Nouakchott, capital del país, (Philippon *et al*, 1992). La serie fue completada y presentaron poco después los resultados histológicos de 150 casos recogidos durante 27 meses (Ravisse *et al*, 1992). El número importante de casos de micetoma reunidos en un período tan corto, testimonia la importancia de la infección en Mauritania. Como en todas las series de micetoma de África occidental, los resultados etiológicos se basaron sobre el aspecto histológico de los granos. Los intentos de cultivos dieron pocos resultados, sólo 23 cultivos fueron positivos: *M.mycetomatis*: 8; *L.senegalensis*: 6; *Pyrenochaeta romeroi*: 1; *Microsporium audouinii*: 1; *S.somaliensis*: 4; *A.pelletieri*: 3.

Los eumicetomas predominaban claramente: 113 casos (75,3%), los actinomicetomas representaban solamente 37 casos (24,7%). Los resultados mostraron la importancia de *S.somaliensis*: (20 casos frente a 10 casos de *A. pelletieri* y 5 casos de *A.maduræ*). *Nocardia* spp. se encontraba solamente en 2 casos. Los micetomas por *S.somaliensis* se observaban en las regiones cercanas de la capital. En la serie de Rey los micetomas por *S.somaliensis* procedían de Atar, un oasis situado mucho más al norte. El cambio podría explicarse por la sequía crónica de las últimas décadas y el abandono progresivo de las zonas septentrionales. Los micetomas por granos rojos se encontraban en la región del Río Senegal, mientras que los ocasionados por *M.mycetomatis* se hallaban en todas las regiones.

En el año 2000, fue publicado una serie de 109 casos de micetomas, reunidos en el Servicio de Dermatología del Hospital Universitario de Dakar (Ndiaye *et al*, 2000). Era la primera estadística etiológica procedente de Senegal presentada después del trabajo de Rey, unos treinta años antes. Los resultados revelaban una predominancia de los actinomicetomas (60,5%). *A.pelletieri* era la especie principal (42,2%) delante de *M.mycetomatis* (24,9%) y *A.maduræ* (14,7%). *Nocardia* spp., como en Mauritania era excepcional: 3 casos. El diagnóstico etiológico se hizo por el aspecto histológico de los granos como en la mayoría de las series africanas. Diecinueve agentes fueron aislados por cultivo: *M.mycetomatis*: 12; *A.pelletieri* 3; *Exophiala jeanselmei*: 2; *Rhinocladiella atrovirens*: 1; *N.asteroides*: 1.

Por primera vez en África occidental fue identificado *N. asteroides*, aislado del suelo de Senegal algunos años antes, como agente de micetoma. La importancia de los micetomas por granos rojos hace que el micetoma se comporte de manera original en Senegal. Los resultados de la serie de Ndiaye proceden de un servicio de dermatología donde se podrían ver más actinomicetomas que ameritaban tratamiento médico. No se dispone de resultados recientes del Servicio de Cirugía Ortopédica de Dakar, que recibe también micetomas. Pero en una serie antigua de 89 casos del Servicio de Cirugía, los micetomas por granos rojos representaban 33,5% del total (Diouf *et al*, 1965).

Por primera vez se pudo comparar los resultados de Mauritania con los de Senegal. En la serie de Rey, los resultados globales incluían una mayoría de casos procedentes de Senegal y Mauritania con algunos procedentes de otros países vecinos. La gran diferencia de repartición de los agentes etiológicos vistos en los hospitales de Nouakchott y Dakar, capitales separadas por 400 kilómetros, aparece bien en los resultados de las series de Philippon y Ndiaye.

En el Cuadro 8.2, se nota la casi ausencia de *S.somaliensis* en Senegal y la rareza de *A.pelletieri* en Mauritania. Otro resultado interesante de la serie de Ndiaye que no aparecía en la de Rey, es la importancia del micetoma por *A.maduræ* en Senegal: 16 casos (14,7%).

Examinando la procedencia de los enfermos se pudo encontrar los dos focos descritos por Rey en Senegal. La mayoría de los casos por granos negros procedían de la región del Río Senegal y los de granos rojos del centro oeste del país. Los micetomas por *A.maduræ* procedían de los dos focos. Había solamente 4 casos procedentes de Casamance la provincia septentrional donde las lluvias son de más de 800 mm por año. Se notó sin embargo una diferencia con los resultados de Rey. Debido a la sequía crónica que afecta África occidental desde 1970. La línea isoyecta 800 se desplazó a 150 kilómetros hacia el sur. Durante los diez últimos años del siglo veinte se vieron algunos casos procedentes de la región del Delta del Río Salum, en la frontera con Gambia. Casi todos se debían a *A.pelletieri*. Con anterioridad no se habían observado micetomas en esta parte de Senegal. En comparación con los estudios realizados hace treinta años notamos que en Senegal y Mauritania el número de casos de micetoma no ha disminuido. Este hecho se constató también en México y pensamos, al igual que los autores mexicanos, que esto se debe a la grave condición socio-económica de la población campesina. El micetoma es ante todo una enfermedad de la pobreza.

La República de Níger tiene una superficie de un millón doscientos siete mil kilómetros cuadrados (1.207.000 Km²), está situada entre 11°37 y 22°33 de latitud. Es un país continental rodeado al norte por Argelia y Libia, al este por Chad, al sur por Nigeria y Benin, al oeste por Burkina-Faso y Malí. Se distingue una zona desértica englobando todo el norte del país con precipitaciones de 50 a 350 mm; el Sahel, zona semi desértica con precipitaciones de 350 a 750 mm; en fin; una pequeña zona con clima tropical al sur del país. La población es de diez millones de habitantes concentrados en el sur; la única parte donde se puede desarrollar la agricultura. Antes de la apertura de la primera Facultad de Medicina del país en 1975 y la creación de un Servicio de Histopatología, los datos sobre el micetoma en Níger eran muy escasos. Anteriormente Rey había presentado también en su tesis, los resultados de diez casos de micetoma procedentes de Níger cuyo diagnóstico etiológico se hizo por el aspecto histológico de los granos: *M.mycetomatis*: 5; *A.pelletieri*: 2; *Nocardia* spp: 2; *S.somaliensis*: 1. El Servicio de Histopatología de la Facultad, recibía algunas muestras de micetoma cada año y decidió realizar una investigación con el servicio de microbiología. Los casos de micetoma provenían de los servicios de cirugía de dos hospitales del país. El primero se situaba en la zona desértica de Arlit, ciudad donde hay minas de uranio, cerca de la frontera argelina. El otro era el Hospital Nacional de Niamey, capital del país a 1000 kilómetros al sur de Arlit. En Niamey, situada a orillas del Río Níger, las precipitaciones anuales son de 550 mm. Durante los cinco años del estudio de 1981 a 1986, 133 casos de micetomas fueron reunidos (Develoux *et al*, 1988). Los actinomicetomas representaban 91 casos (68,4 %): *S. somaliensis*: 41; *A. pelletieri*: 29; *Nocardia* spp: 12; *A.maduræ*: 6; actinomicetales no identificados: 3; los eumicetomas eran 42 (31,6 %); *M.mycetomatis*: 36; *Leptosphaeria* spp: 6.

Los resultados de esta primera serie de casos en Níger; enseñaron la frecuencia de los actinomicetomas en el país. Hay que notar la importancia relativa de los actinomicetomas por *Nocardia* spp (9%); inhabitual en la zona endémica africana. La mayoría se observaron en pacientes que venían de las partes más húmedas del país. Como en Senegal-Mauritania se distinguían tres regiones diferentes por la etiología de los agentes etiológicos. En la parte norte, desértica,

predominaban los micetomas por *S.somaliensis*, al sur del país los micetomas por *A.pelletieri*, entre los dos, los micetomas por *M.mycetomatis*.

El último país de la zona africana donde no existían datos relativos a los micetomas era Malí, que se encuentra entre Senegal-Mauritania y Níger. Durante nuestra investigación en Níger habíamos visto 4 pacientes procedentes de Malí en el Hospital Nacional de Niamey. Venían de la región de Gao, a orillas del Río Níger, a 400 kilómetros al norte de Niamey. 2 casos se debían a *M.mycetomatis* y 2 a *S.somaliensis*. El Instituto de Leprología de Bamako, capital de Malí que tiene un servicio de dermatología presentó 54 casos de micetoma reunidos entre 1985 y 1994; habían 30 actinomycetomas; 21 eumycetomas; granos blancos no pudieron ser indentificados en 3 casos (Mahe *et al*, 1996). Los agentes responsables de los actinomycetomas eran: *A.pelletieri*: 15; *A.maduræ*: 12; *S.somaliensis*: 3; los responsables de eumycetomas: *M.mycetomatis*: 20; *Leptosphaeria spp*: 1.

La mayoría de los micetomas por *M.mycetomatis* venían del norte de Malí (regiones de Mopti, Gao y Tombuctú) donde las lluvias anuales varían de 100 a 500 mm, los casos por *S.somaliensis* venían de las mismas regiones. La mayoría de los micetomas por *A. pelletieri* procedían de regiones más septentrionales (región de Segu y Kayes) con lluvias anuales de 400 a 800 mm; como en Senegal los micetomas por *A.maduræ*, tenían una distribución geográfica más difusa.

Las recientes series de casos procedentes de Mauritania, Senegal, Níger y Malí han permitido un mejor conocimiento de la epidemiología del micetoma en África occidental (Cuadro 8.2). Los actinomycetomas predominan con excepción de Mauritania. Contrariamente a lo que se decía antes, *S.somaliensis*, especie frecuente en la parte este de la zona endémica africana no es rara en África occidental (Segretain, 1972). Aparece claramente como el agente de la regiones desérticas y semi-desérticas, de la misma forma que se nota también en otras partes del mundo como en Venezuela (Serrano *et al*, 1998). La importancia de *A.pelletieri*, que predomina en la parte sur de la zona endémica, es el aspecto más original de la epidemiología del micetoma en esta región. *A.pelletieri* tiene también una cierta importancia en Chad-Norte, Camerún, que ya no pertenece a África occidental. Representa 24,7% de los casos en este foco (Destombes *et al*, 1970). Más hacia el este, en países como Sudan o Somalia, los micetomas por *A.pelletieri* representan solamente 6,3 y 3,3% de los casos (Gumaa *et al*, 1986; Destombes *et al*, 1977). *A.maduræ* tiene una cierta importancia y se encuentra en zonas de pluviometría variable dentro de la zona endémica oeste. Los casos por *Nocardia spp.* son raros representando de 0 a 9% de los casos según los países. En Mauritania-Senegal se observó algunos cambios en la distribución de los diferentes agentes etiológicos en comparación con los antiguos resultados. Eso se debe a las modificaciones del clima en África occidental.

Se conoce muy poco del micetoma en África occidental, fuera de la zona endémica. El norte de Nigeria se encuentra en la parte sur de la zona endémica pero hubo muy pocas publicaciones sobre el tema. En 1981, Gugnani y col. presentaron cinco casos procedentes del Hospital Universitario de Enugu, Nigeria; todos se debían a *Nocardia spp.* (Gugnani *et al* 1981). En tres casos se aisló *N.brasiliensis*. La serie más grande de Nigeria reunía 15 casos: 4 se debían a *Nocardia spp*; 3 a *S.somaliensis*; 2 a *A.pelletieri* (Agarwal *et al*, 1985). Habían 6 eumycetomas, 5 por granos negros y 1 por granos blancos. En el II Simposio Internacional de Micetomas en Taxco, México en el año 1987; se presentaron una serie de casos procedentes de Costa de Marfil (Therizol-Ferly *et al* 1987).

Costa de Marfil tiene una pluviometría anual que va de 1100 a 1800 mm. Tiene dos partes muy distintas diferenciadas climáticamente. La zona norte es una zona de sabana con una temporada de lluvia de junio a septiembre y una temporada seca de octubre a mayo. La parte sur es una zona de selva con precipitaciones frecuentes y abundantes, tiene dos temporadas de lluvia, una de larga e intensa pluviosidad de mayo a julio y una corta de octubre a diciembre, separadas por dos

temporadas secas. En total fueron reunidos 71 casos de micetoma, 42 actinomictomas y 29 eumictomas. Treinta y dos pacientes venían de la zona de sabana. 17 tenían eumictoma: *M.mycetomatis*: 10; *Acremonium* spp: 1; granos negros: 3; granos blancos: 3. 15 tenían actinomictoma: *Nocardia* spp: 7; *A.pelletieri*: 3; *A.maduræ*: 2; *S.somaliensis*: 2; granos no identificados: 1. En total treinta y nueve pacientes procedían de la zona de selva. Los actinomictomas predominaban: 27 casos; *Nocardia* spp: 21; *N.brasiliensis*: 2; *A.maduræ*: 2; *S.somaliensis*: 1; *Actinomyces israelii*: 1. Los eumictomas eran 12: *Scedosporium apiospermum*: 4, *Acremonium* spp: 1, granos blancos: 5, granos negros: 2. Los resultados de Nigeria y Costa de Marfil son típicos, de lo que se observa en las partes húmedas de África como en Congo (Vanbreuseghem, 1958): predominancia de los actinomictomas por *Nocardia* spp. y presencia de eumictomas por granos blancos, raros en la zona endémica. La zona de sabana de Costa de Marfil representaría una parte intermediaria con persistencia de eumictomas por granos negros y predominancia de actinomictomas por *Nocardia* spp.

Los análisis de las recientes series procedentes de los cuatros países de la zona endémica de África occidental, permite destacar ciertos aspectos clínicos y epidemiológicos de los micetomas en esta región del mundo. Existe una predominancia masculina clásica que varía de 72,1% a 83,3%. En México se encontraba una excepción con los micetomas por *A.maduræ*; *A.maduræ* tenía una incidencia igual en ambos sexos (Buot *et al*, 1987; López Martínez *et al*, 1992). En Senegal, 5 (31,2%) de los 16 micetomas por *A. maduræ* se observaban en mujeres; habían solamente 14 mujeres (15%) con los 93 debidos a otros agentes pero la diferencia no era significativa. La mayoría de los pacientes eran campesinos, cultivadores o ganaderos. La edad promedio variaba de 34.6 a 38 años. En Mauritania no se puso en evidencia la diferencia de tiempo de evolución (de 6 a 8 años) según los diferentes agentes etiológicos. El pie representaba la localización principal, de 70% a 82,7% de los casos. Es habitual en las estadísticas procedentes de África o India. México constituye una excepción con solamente 34% de micetomas localizados en el pie (Buot *et al*, 1987).

Los autores de Senegal insistieron sobre las particularidades del micetoma por granos rojos (Rey, 1961; Strobel *et al*, 1981; Ndiaye *et al*, 2000). En la mayoría de los casos sus fistulas son numerosas, encontrándose en la cumbre de nódulos carnosos, blandos (Figura 8.1). El diagnóstico diferencial principal del micetoma por granos rojos es el sarcoma de Kaposi endémico (africano) que se localiza en las extremidades, pero en este caso los nódulos son duros. Las fistulas de los micetomas por granos rojos no son siempre nodulosas, se pueden encontrar fistulas llanas. La actividad de las fistulas es incesante. Los granos son numerosos, difíciles de ver a simple vista pero característicos en el examen directo microscópico, aparecen como zonas rosas, homogéneas, con contornos geométricos. Un porcentaje no despreciable de micetoma por granos rojos se localiza fuera del pie: 21/41 (51,2%) en la serie de Rey (Rey, 1961); 14/20 (70%) en una serie procedente del Servicio de Dermatología del Hospital Universitario de Dakar (Strobel *et al*, 1981). Esta particularidad fue encontrada en nuestra serie (Ndiaye *et al*, 2000). Así, 36 (33%) localizaciones se hallaban fuera del pie sobre un total de 109 casos, esas localizaciones representaban 13 (30,2%) de los 43 eumictomas y 23 (34,8%) de los 66 actinomictomas, sin embargo también 22 (47,8%) de los 46 actinomictomas por *A.pelletieri* (Cuadro 8.3). Las localizaciones en rodillas, nalgas (Figura 8.2), y tórax fueron las más frecuentes que hemos encontrado fuera del pie con este agente. La osteofilia de *A. pelletieri* es clásica, la extensión al esqueleto es temprana y frecuente.

La extensión a los ganglios, con presencia de granos, es también una complicación clásica del micetoma por granos rojos (Figura 8.3). En nuestra serie, los seis casos con extensión a los ganglios, se debían todos a *A. pelletieri*. Las localizaciones primitivas eran todas extra-podales: tórax: 2; glúteos: 2; pared abdominal: 1; muslo: 1. Excepto el caso particular de los micetomas del cuello o de cráneo que se deben sobretodo a *S. somaliensis*; las complicaciones más graves de la enfermedad se observaron asociadas con *A. pelletieri* en Senegal: diseminación al perineo de

micetomas de los gluteos, reacción pleurítica debida a micetoma del tórax, y complicaciones neurológicas por extensión de micetoma hacia la región dorsal (Rey, 1961; Ndiaye *et al*, 2000; Strobel *et al*, 1981). En algunos casos las complicaciones condujeron al fallecimiento. Una observación presentada por el Servicio de Dermatología era excepcional, fue la de un micetoma de la pared abdominal que se difundió a varias vísceras. En la autopsia se encontraron granos rojos en los riñones, en el páncreas y en el hígado (Ndiaye *et al* 1989).

El problema principal del micetoma en África occidental, aún sin resolver es el manejo del paciente y de su tratamiento. En la mayoría de los hospitales de esa región se considera el micetoma como un problema únicamente quirúrgico. Se debe, sobretodo, a la ausencia de posibilidad de diagnóstico biológico, por falta de medios y de especialistas en microbiología. No se suele distinguir el actinomicetoma del eumicetoma. Un paciente ingresado en el hospital con un tumor crónico con fistulas, se cataloga como «micetoma», diagnóstico clínico fácil y es dirigido al servicio de cirugía.

En países como Níger o Malí las estadísticas etiológicas son recientes y la predominancia de los actinomicetomas no es conocida más que por pocos especialistas. Así mismo, muchos cirujanos aún desconocen la posibilidad de tratamiento médico del eumicetoma y sobre todo del actinomicetoma. Hemos visto en Níger complicaciones como extensión a ganglios, o recidiva al nivel de una cicatriz algunos años después de una intervención sobre un actinomicetoma sin tratamiento médico previo (Figura 8.4). Los dermatólogos, que también ven pacientes con micetomas conocen mejor la posibilidad de tratamiento médico y favorecen este tipo de terapia como primera opción, pero desafortunadamente estos especialistas son muy pocos en África occidental.

En Dakar, en cambio, el tratamiento médico del actinomicetoma se utiliza desde hace varios años atrás. En 1973 se publicó los resultados obtenidos con la asociación sulfone-sulfamethoxy-pyridazine y cirugía (Vovor *et al* 1973). Con los micetomas por *A.pelletieri* y *S.somaliensis* el tratamiento médico pre-operatorio era de 15 a 30 días y facilitaba la intervención, disminuyendo la reproducción y la difusión de los granos. Después de la intervención, el tratamiento era prolongado al menos por dos meses, permitiendo la cicatrización de las lesiones y la desaparición de las adenopatías. Por otro lado, esta manera de proceder evitaba las recidivas locales y linfáticas. Se realizaron después ensayos del tratamiento médico sólo con los micetomas por granos rojos (Strobel *et al* 1981). La estreptomycin y los sulfonas eran ineficaces. La asociación sulfametoxazol-trimetoprim (SMT) dio los mejores resultados con la necesidad de ser prolongado por doce meses y veces por mayor período si la respuesta era incompleta. Es el tratamiento que se utiliza todavía en Dakar para los micetomas por *A. pelletieri* y *A.maduræ* (Figuras 8.5, 8.6). Los resultados obtenidos con SMT en el tratamiento de 27 pacientes con actinomicetoma (*A.pelletieri*: 21; *A.maduræ*: 5; *S.somaliensis*: 1) procedentes del Servicio de Dermatología de Dakar fueron los siguientes: curación: 8; mejoramiento: 18; fallecimiento: 1 (Ndiaye *et al*, 1994).

La curación clínica fue obtenida después de un tratamiento de aproximadamente diez meses y 15 días. Sólo tres de ellos pudieron ser controlados después de 8 a 12 meses sin recidiva. Para 18 casos se observó una mejoría, pero el tratamiento no se completó debido a que los pacientes no regresaron para poder concluirlo. Un paciente con un micetoma en la pared abdominal por *A.pelletieri* con diseminación a varias vísceras murió después de un mes de tratamiento. Se necesitan nuevos ensayos para encontrar asociaciones más eficaces para los casos debidos a *A.pelletieri* o *A.maduræ*, resistentes al SMT o los que presenten alteraciones óseas importantes. También sería necesario hacer ensayos terapéuticos para el tratamiento de los micetomas por *S.somaliensis* que se observan en las regiones más desheredadas de África occidental. Se conoce la dificultad de tratamiento médico de esos micetomas (Gumaa *et al*, 1986; Serrano *et al*, 1998; Baril *et al*, 1999). En América Latina se utilizaban regimenes con sulfamidas y amikacina, sulfamidas y ciprofloxacina cuando había lesiones óseas, para tratar actinomicetomas (Welsh *et al*, 1995; Negroni *et al*, 1998). Uno de

los principales problemas del tratamiento médico del actinomicetoma en África occidental es el problema económico. Los países de África occidental tienen un nivel de vida más bajo que los de América Latina. Los enfermos con micetoma son campesinos con posibilidades financieras muy limitadas, no pueden asumir tratamientos antimicrobianos caros, de larga duración. El otro problema del tratamiento del micetoma no es específico a África. No se puede hablar de curación sin una vigilancia regular del paciente durante a lo menos tres años después del fin del tratamiento. La mayoría de los enfermos no vuelven a las consultas post-terapéuticas y son perdidos de vista, así como otros desaparecen antes de finalizar el tratamiento.

Para progresar en el tratamiento de los micetomas se necesita también un diagnóstico precoz de la enfermedad. El tiempo medio de evolución antes de la primera consulta en África occidental es de cinco años, de acuerdo con las estadísticas de otras partes del mundo. Los aspectos clínicos, biológicos y terapéuticos son todavía mal conocidos por la mayoría de los enfermeros y médicos de esta zona endémica. El micetoma no es bastante frecuente para estar en primer término, existen otras prioridades sanitarias como el paludismo, tuberculosis o infección por VIH.

Con mi agradecimiento a Miguel Martín por su ayuda en la elaboración del texto en español.

Cuadro 8.1: Agentes etiológicos de 214 micetomas en Mauritania-Senegal.
(Rey, 1961)

Eumicetoma	125 (58,4%)
<i>Madurella mycetomatis</i>	57 (26,6%)
<i>Leptosphaeria senegalensis</i>	44 (20,6%)
Otros granos negros	7 (3,3%)
Granos blancos	17 (7,9%)
Actinomicetoma	89 (41,6%)
<i>Actinoadura pelletieri</i>	46 (21,5%)
<i>Streptomyces somaliensis</i>	19 (8,9%)
<i>Actinoadura madurae</i>	16 (7,5%)
Otros	8(3,7%)

Cuadro 8.2: Agentes etiológicos de micetoma en los cuatros países de la zona endémica de Africa occidental

	Mauritania (1992)	Senegal (2000)	Mali (1996)	Niger (1988)
Numero de casos	150	109	54	133
Eumicetoma	113 (75,3%)	43 (39,4%)	21(38,8%)	42(31,6%)
<i>Madurella mycetomatis</i>	75	27	20	36
<i>Leptosphaeria spp</i>	30	10	1	6
<i>Pyrenochaeta romeroi</i>	1	1	-	-
Otros granos negros	2	3	-	-
Granos blancos	5	2	-	-
Actinomicetoma	37(24,7%)	66(60,6%)	33(61,2%)	91(68,4%)
<i>Streptomyces somaliensis</i>	20	1	3	41
<i>Actinoadura madurae</i>	5	16	12	6
<i>Actinoadura pelletierri</i>	10	46	15	29
<i>Nocardia spp</i>	2	3	-	12
No identificados	-	-	3	3

Cuadro 8.3: Localizaciones de actinomicetoma y eumicetoma en Senegal

Localizaciones	Actinomicetoma (n=66)		Eumicetoma (n=43)
	<i>A. pelletieri</i>	Otras especies	
Pie	24	19	30
Pierna	3	-	4
Rodilla	4	-	2
Muslo	3	-	2
Nalga	4	-	1
Pared abdominal	1	-	1
Tórax	4	-	-
Mano	1	1	1
Miembro superior	2	-	-
Cuero cabelludo	-	-	1
Piso de la boca	-	-	1

Bibliografía

- Agarwal S.C; Mathur D.R. 1985. Mycetoma in northern Nigeria Trop. Geogr. Med. 37: 133-35.
- Baril, L; Boiron, P; Manceron, V; Ely, SO; Jamet, P; Favre, E; Caumes, E; Bricaire, F. 1999. Refractory craniofacial actinomycetoma due to *Streptomyces somaliensis* that required salvage therapy with amikacin and inepen. Clin Infect Dis. 29:460-61.
- Baylet, R; Camain, R; Segretain, G. 1959. Identification des agents des maduromycoses du Sénégal et de la Mauritanie. Description d'une espèce nouvelle. Bull Soc Path Ex. 52: 448-77.
- Bezès, H. 1961. L'aspect chirurgical des mycétomes à Dakar. J Chir. 82:13-32.
- Buot, G; Lavalle, P; Mariat, F; Suchel, P. 1987. Etude épidémiologique des mycétomes au Mexique. A propos de 502 cas. Bull Soc Path Exot. 80:329-39.
- Brumpt, E. 1905. Sur le mycétome à grains noirs, maladie produite par une mucidénée du genre *Madurella* n.g. C R Soc Biol Paris. 58: 997.
- Camain, F; Segretain, G; Nazinoff, O. 1957. Etude histo-pathologique des mycétomes du Sénégal et de la Mauritanie Sem Hôp Paris, Arch biol Méd. 33:303.
- Delahaye, R. P; Destombes, P; Moutonet, J. 1962. Les aspects radiologiques des mycétomes. Ann Radiol. 5: 261-76.
- Destombes, P; Ravisse, P; Nazimoff, O. 1970. Bilan des mycoses profondes établi en vingt années d'histopathologie à l'institut Pasteur de Brazzaville. Bull Soc Path Exot. 63:315-24
- Destombes, P; Mariat, F; Rosati, L; Segretain, G. 1977. Les mycétomes en Somalie, conclusion d'une enquête menée de 1959 à 1964. Act Trop. 34:355-73
- Develoux, M; Audouin, J; Treguer, J; Vetter, JM; Warter, A; Cenac, A. 1988. Mycetoma in the republic of Niger: clinical features and epidemiology. Am J Trop Med Hyg. 38:386-90
- Diouf, B; Fustec, R; Pouye, I; Goudote, E; Fournier, JP; Benier, J; Cave, L; Serafino, X. 1965. Formes anatomo-cliniques des mycétomes à Dakar. Bull Soc Méd Afr Noire Lgue Franç. 12: 564-88
- Gugnani, H.C; Suselan, A.V; Anikwe, RM; Udeh, FN; Ojukwu, JO. 1981. Actinomycetoma in Nigeria J. Trop Med Hyg. 84: 259-63
- Gumaa, S.A; Mahgoub, E. S; El Sid, M.A. 1986. Mycetoma of the head and the neck. Am. J. Trop Med Hyg. 35: 594-400.
- Laveran, M. 1906. Tumeur provoquée par un microcoque rose en zooglées. C R Soc Biol. 58:340.
- Le Dantec, A. 1894. Etude bactériologique sur le pied de Madura au Sénégal. Arch Med Navale. 62: 447.
- López Martínez, R; Méndez Tovar L.J; Lavalle, P; Welsh, O; Saúl, A; Ruíz E.M. 1992. Epidemiologia del micetoma en México: estudio de 2105 casos. Gac Med Mex. 128: 477-81.

- Mahe, A; Develoux, M; Lienhardt, C; Keita, S; Bobin, P. 1996. Mycetomas in Mali: causative agents and geographic distribution. *Am J Trop Med Hyg.* 54: 77-9.
- Negróni, R; Robles, A.M; Helou, S; Arechavala, A; Bianchi, M; Durán A. 1998. Micetomas en el hospital de infecciosas Francisco Javier Muñiz de la ciudad de Buenos Aires, Argentina. *Rev. Patol. Trop.* 27: 187-94
- Ndiaye, B ; Guiraud, M; Traore, A; Kane, A ; Méndez, V. 1989. Mycétome actinomycosique de la paroi abdominale avec extension viscérale secondaire. A propos d'une observation. *Nouv Dermatol.* 8: 327-8.
- Ndiaye, B; Develoux, M; Langlade, M; Kane, A. 1994. Les mycétomes actinomycosiques. A propos de 27 observations dakaroises, traitement médical par le cotrimoxazole. *Ann dermatol Venereol.* 121: 161-65.
- Ndiaye, B; Develoux, M; Dieng, M.T; Kane, A; Ndir, O; Raphenon, G; Huerre, M. 2000. Aspects actuels des mycétomes au Sénégal. *J Mycol Med.* 10: 140-44.
- O'Connor, H. 1958. Les mycétomes en AOF. *Med Trop.* 18: 245-59.
- Philippon, M; Larroque, D; Ravisse, P. 1992. Mycétomes en Mauritanie, espèces rencontrées, caractères épidémiologiques et répartition dans le pays. A propos de 122 cas. *Bull Soc Path Ex.* 85: 107-14.
- Ravisse, P; Huerre, M; De Bièvre, C; Philippon, M; Larroque, D; Ave, P; Rouffaud, M.A. 1992. Les mycétomes en Mauritanie. Etude histologique de 150 cas. *J Mycol Med.* 2: 154-59
- Rey M. 1961. Les mycétomes dans l'ouest africain. Thèse, Foulon ed, Paris.
- Segretain, G; Mariat, F. 1968. Recherches sur la présence d'agents de mycétomes dans le sol et sur les épineux du Sénégal et de la Mauritanie. *Bull Soc Path Ex.* 61: 194-201.
- Segretain, G. 1972. Epidémiologie des mycétomes. *Ann Soc Belge Med Trop.* 52: 277-86.
- Serrano, J.A; Mejía, M.A; García, E; Zamora, R; Boiron, P. 1998. *Streptomyces somaliensis* as an etiologic agent of actinomycetoma in Lara state, Venezuela. An epidemiological, clinical, microbiological, molecular and histological study of five cases. *J. Mycol. Med.* 8: 97-104
- Strobel, M; Ndiaye, B; Marchand, J.P; Ball, M. 1981. Note sur les mycétomes à grains rouges (*A pelletieri*). (A propos de 20 nouveaux cas dakarois). *Bull Soc Path Exot.* 75: 155-64.
- Therizol-Ferly, M; Beaumel, A; Colin, M; Assoumon, A; Ouhon, J; Assale, G. 1987. Les mycétomes en Côte d'Ivoire. II Simposium International de Micetoma. Taxco, México.
- Vanbreuseghem, R. 1958. Epidémiologie et thérapeutique des pieds de Madura au Congo belge. *Bull Soc Path Exot.* 51: 593-614.
- Vovor, V.M; Chabal, J; Odoulami, H; Diop, A; Padonou, N; Toure, P. 1973. Notre expérience de l'association sulfone-sulfaméthoxy-pyridamine (7522 rp) et chirurgie dans le traitement des mycétomes. *Chirurgie.* 99: 405-16.

Welsh, O; Salinas, M.C; Rodríguez, M.A. 1995. Treatment of eumycetoma and actinomycetoma. *Curr Topics Med Mycol.* 6: 47-71.

Figuras



Fig. 8.1: Actinomycetoma del pie por *Actinomadura pelletieri*, se observan numerosas fistulas y nódulos.



Fig. 8.2: Actinomycetoma por *Actinomadura pelletieri* con localización en la nalga.



Figura 8.3: Actinomictoma por *Actinomadura pelletieri* con localización en la nalga y con extensión a los ganglios.



Figura 8.4: Recidiva con extensión a los ganglios y a vísceras de la cavidad pélvica debido a un micetoma por *Actinomadura madurae* del pie, operado diez años antes.



Figura 8.5: Micetoma del hombro por *Actinomadura pelletieri*.



Figura 8.6: Aspecto del hombro después de cuatro meses de tratamiento con trimetoprim-sulfametoxasol.

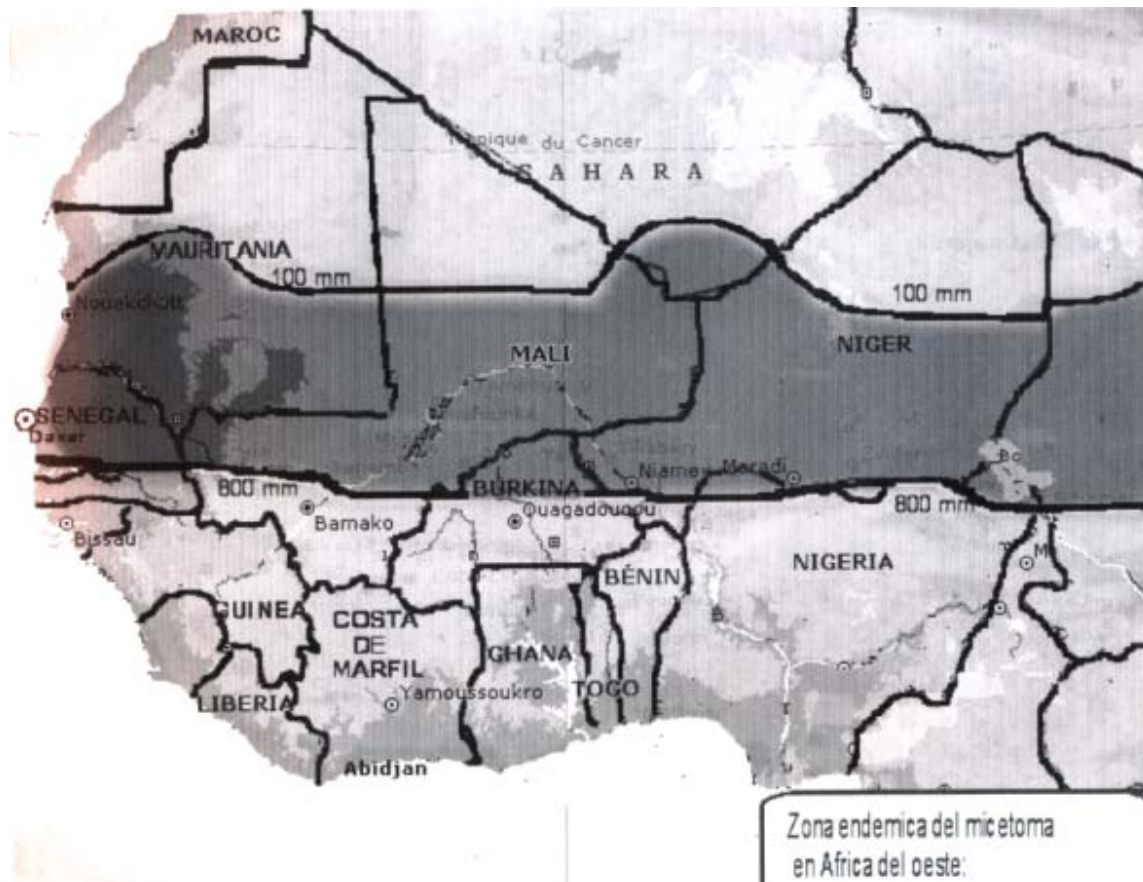


Figura 8.7: Mapa de la zona endémica del micetoma en África del oeste

CAPÍTULO IX
ACTINOMICETOMA EN NIGERIA: ESTUDIOS EPIDEMIOLÓGICOS Y
EXPERIMENTALES
Harish C. Gugnani

Department of Medical Mycology, Vallabhbhai Patel Chest Institute, University of Delhi,
Delhi –110007, India (e-mail: harishgugnani@yahoo.com)

ABSTRACT

In southern Nigeria, where the rainfall is heavy, actinomycetoma is much more prevalent than eumycetoma; while in the arid or semi-arid northern Nigeria both types of mycetoma are more or less equally common. *Streptomyces somaliensis* is exclusively recorded in the drier areas of northern Nigeria; other etiological agents of actinomycetoma in this part of the country include *Actinoadura pelletieri* and *N.brasiliensis*. In southern Nigeria, actinomycetoma is mainly caused by *N.brasiliensis*, and rarely by *N.asteroides*. *Nocardia transvalensis* has been recorded as a rare etiological agent of mycetoma in southern Nigeria where it was shown to cause mycetoma of the thumb in one case. A comprehensive investigation on the natural occurrence of etiological agents of actinomycetomas in Nigeria has shown that *Nocardia* species (*N.brasiliensis*, *N. asteroides* and *N.otitidiscaviarum*) occur naturally in soils in gardens, cultivated fields, poultry habitats, cattle sheds, compost and other related areas. *Nocardiosis dasonvillei* recorded as one of the etiological agents of actinomycetoma in the USA and some other countries but not yet known to cause mycetoma in Africa has also been recovered from several natural sources in Nigeria. In experimental studies, *N.transvalensis* was shown to cause mycetomas of the skin and footpad of laboratory mice. *Streptomyces griseus* also produced similar lesions in experimentally infected mice. There is a need for extensive studies on the prevalence of actinomycetomas in Nigeria especially in population groups at risk. There must be emphasis on the development of simple mycological and serological tests for diagnosis of early cases of this disabling infection. Health campaigns are also advocated for prevention and early treatment of mycetoma in the areas endemic for the disease. The need for economical and efficacious therapy of actinomycetomas is obvious.

Introducción

El micetoma es una infección subcutánea crónica, que se caracteriza por tumefacción, nódulos subcutáneos, y, en la mayoría de los casos, por la presencia de fistulas por las cuales drenan exudados que contienen granos. La enfermedad está marcada por la destrucción progresiva del tejido blando y las estructuras anatómicas cercanas. Los agentes etiológicos están compuestos por varias especies de hongos actinomicetos (bacterias filamentosas). El micetoma causado por hongos se llama *eumycetoma*, mientras que el provocado por actinomicetos se denomina *actinomicetoma*. El micetoma es endémico en las zonas tropicales y subtropicales, particularmente entre el Trópico de Cáncer y el de Capricornio, o sea, entre las latitudes 30° N y 15° S. Una alta tasa endémica de micetoma se ha observado en el cinturón del Sahara en África. En África occidental, el número de casos de micetoma reportados de los países angloparlantes, es mucho menor que los reportados en los países francoparlantes (Camain, 1975; Gugnani, 2002). Dependiendo de los factores socioeconómicos y climáticos, los agentes etiológicos varían en diferentes países. A pesar del hecho de que las micosis profundas son reportadas con frecuencia en diversas zonas de Nigeria, el micetoma es el menos reportado, debido a la poca frecuencia de casos reportados (Smith, 1928; Feteke, 1978; Gugnani et al 1981; Gugnani, 1983). En la mayoría de las zonas del sur de Nigeria, en donde el nivel pluviométrico es alto, el actinomicetoma es mucho más prevalente que el eumycetoma; mientras que en las zonas áridas o semi-áridas del sur de Nigeria, donde el nivel pluviométrico es menor, ambos tipos de micetomas son comunes (Onuigbo y Gugnani, 1976;

Gugnani, 1983; Mathur y Agarwal, 1986; Gugnani 2002). Sin embargo, en retrospectiva, un estudio histopatológico de micosis profunda en el Estado de Cross River, al Sur de Nigeria (Khalil *et al* 1999), se reportaron ocho casos de micetomas, distribuidos equitativamente entre actinomietoma y eumietoma.

Localización clínica de la infección y agentes etiológicos

Las zonas más comunes de infección en los casos de actinomietoma son las extremidades y en ocasiones otros lugares, como los glúteos (ver Figura 9.1), el tronco, la ingle y la vejiga (Gugnani *et al* 1981). En muchos de los informes iniciales de Nigeria, el diagnóstico se basaba sólo en los síntomas clínicos (Smith, 1998; Feteke, 1978). La incidencia del micetoma provocado por *N.brasiliensis* en Nigeria, se basó en el estudio de secciones de tejido (Cockshott y Rankins, 1960; Lucas 1968). En estudios posteriores, basados tanto en la histología como en el cultivo, demostraron que *N.brasiliensis* es el principal agente etiológico de actinomietoma en el sur de Nigeria (Gugnani *et al* 1981). Se han reportado pocos casos de micetomas producidos por *N.asteroides* en el sur de Nigeria (Gugnani, datos no publicados). En las zonas áridas del norte de Nigeria sólo han sido reportados casos de *Streptomyces somaliensis*; otros agentes etiológicos de actinomietomas en esta zona incluyen *Actinomadura pelletieri* y *N.brasiliensis* (Agarwal y Mathur, 1985; Gugnani, 2002). En su mayoría, los pacientes con lesiones de actinomietoma son hombres que laboran total o parcialmente en el área de la agricultura (Gugnani *et al* 1981; Khalil *et al* 1999). No obstante, la mayoría de los casos han sido estudiados clínicamente como micetomas. Algunos casos que en un principio se pensaba eran producto del Sarcoma de Kaposi o del melanoma, resultaron ser micetomas, basados en los estudios histológicos y de cultivos (Gugnani *et al* 1981; Khalil *et al* 1999). Las lesiones ocurren lentamente a medida que las inflamaciones se agrandan lentamente con nódulos múltiples, algunos de los cuales secretan granos que contienen pus. Con frecuencia, el hueso se ve afectado. En casos aislados conocidos en Nigeria de actinomietomas provocados por *N.transvalensis*, las lesiones ocurrieron con múltiples inflamaciones ulceradas con tractos fistulosos en el dorso y parte ventral del pulgar izquierdo. La lesión en el lado ventral se extendía hasta la palma de la mano (ver Figura 9.2).

Histología

Las secciones de tejido en los casos de actinomietomas nocardiales, muestran múltiples microabscesos, compuestos principalmente por gránulos actinomicóticos. Los gránulos son pequeños, alargados, ligeramente curvos o lobulados; con un núcleo homogéneo y una periferia orlada y bastoneada, rodeada de leucocitos polimorfonucleares y monocitos periféricos. Las secciones teñidas por la coloración de Gram muestran al gránulo compuesto de filamentos ramificados Gram positivos y con formas cocobacilares (Ver Figura 9.3). En los casos de *Actinomadura pelletieri*, los gránulos son pequeños, de color rojo pálido a rosado, tienen forma de riñón y están intensamente manchados con la hematoxilina (Ver figura 9.4).

Tratamiento médico del micetoma

Cockshott y Rankin (1960) lograron una cura aparente en tres casos de micetoma provocados por *N.brasiliensis*, utilizando 100 mg de dapsona, dos veces al día, durante dos años; acompañado por tratamiento preliminar con antibióticos de amplio espectro, para controlar la infección bacteriana. Gugnani *et al* (1981) trataron tres casos de micetomas, provocados por *N.brasiliensis*, administrando 100 mg de dapsona, 3 veces al día, en un lapso de 6 a 8 semanas. También se reportó

un caso de micetoma producido por *N.transvalensis*, tratado exitosamente con cotrimoxazole (trimetropin + sulfametoxazole) (Gugnani *et al* 1982).

Incidencia de los agentes etiológicos y los substratos naturales

Excepto por algunos reportes de Sudán, Egipto y Zaire, la información sobre la incidencia ambiental de los actinomicetos patógenos aeróbicos en el continente africano, ha sido escasa. En un estudio conformado por 206 muestras de substratos naturales diversos, saber: humus, estiércol, ensilaje de maíz, heno, bosta de vaca y excremento de pollo, para detectar actinomicetos patogénicos aeróbicos (Unaogu *et al* 1993), *Nocardia asteroides* resultó ser la especie predominante recuperada del 8,8% de las muestras, seguida por *N.brasiliensis* (6,9%), *N.otitidiscaviarum* (4,2%) y *Nocardiosis dassonvillei* (6,5%). En el estiércol y en los excrementos de pollo, *N.asteroides* fue la especie más frecuente. *N.brasiliensis* y *N.dassonvillei* fueron detectadas en todos los tipos de muestras examinados, a saber, humus, estiércol, ensilaje de maíz, heno, bosta de vaca y excremento de pollo. Aunque ningún caso de micetoma producido por *N.dassonvillei* ha sido reportado en Nigeria, se han reportado dos casos de infección pulmonar debidos a este organismo (Gugnani *et al* 1998). Sin embargo, se sabe que *N.dassonvillei* ha producido micetomas en los Estados Unidos y en otros países (McNeil *et al* 1994). No se ha reportado aún ningún caso de infección en animales o en humanos debido a *N.otitidiscaviarum* en Nigeria.

Estudios Experimentales

Se han realizado pocos estudios sobre la producción experimental de micetoma en Nigeria. Unaogu *et al* (1989) investigaron la capacidad de un aislado de *N.transvalensis* de un caso de micetoma humano para producir lesiones similares en ratones de laboratorio. El adyuvante incompleto de Freund, parece contribuir en el desarrollo de lesiones de micetoma. En los ratones inyectados subcutáneamente con este agente (1.0×10^6 CFU), aparecieron nódulos solitarios palpables (4mm) en el día 14. En la almohadilla plantar de los ratones inoculados de manera similar, aparecieron inflamaciones después de dos meses; diez semanas después, las fistulas presentaban descargas de gránulos de *Nocardia*. En el estudio histológico de las lesiones se observaron numerosos abscesos que contenían gránulos que variaban de elípticos a irregulares, lobulados o parcialmente lobulados que medían 200-400µm de diámetro. La reacción tisular, estaba básicamente compuesta por linfocitos, células plasmáticas y escasos macrófagos. Las lesiones en la piel se necrosaron, mientras que aquellas lesiones fuera de la almohadilla plantar, terminaron con destrucción ósea. Gugnani y Unaogu (1991) también produjeron micetomas experimentales en la piel y en las almohadillas plantares de ratones de laboratorio inoculados con $1,0 \times 10^7$ UFC de una cepa de *Streptomyces griseus* recolectada del esputo (ATCC 42750). Las lesiones se presentaron como nódulos subcutáneos palpables que descargaban pus de color amarillo pálido y cremoso y gránulos blanco-amarillentos de *S.griseus* (Ver Figura 9.5). Los gránulos (Ver Figura 9.6) tenían aspectos similares a los de *S.somaliensis* en los casos humanos de micetoma. Posteriormente, las lesiones nodulares se convirtieron en edemas. Los estudios histológicos de las lesiones mostraron infiltraciones celulares, fibrosis y destrucción ósea.

Conclusión

El número de casos de micetomas reportados en Nigeria, apenas representa la punta del iceberg de esta afección. Muchos más casos, tanto de actinomicetomas como de eumicetomas, posiblemente ocurren en varias partes de Nigeria, pero no son detectados o reconocidos debido a varias razones, a

saber, falta de conciencia, insuficiencia de médicos especialistas, incapacidad de los pacientes para buscar atención médica apropiada, debido a su condición socioeconómica. El hecho de poder contar con instalaciones apropiadas de laboratorios y con personal debidamente entrenado en los hospitales de las diferentes regiones del país, podría ayudar a descubrir numerosos casos de actinomicetomas y eumicetomas y otras micosis profundas.

Bibliografia

- Camain R. 1975. Mycetoma in West Africa In: Simon DC, Marshall (Eds). *Essays in Dermatology*. Amsterdam, Excerpta Medical Foundation, pp. 239.
- Cockshot WP, Rankin AN. 1960. Medical treatment of mycetoma. *Lancet* 19:1112
- Feteke S. 1978. The pattern of the skin diseases in the Nigerian Guinea Savanna. *Int J Dermatol*. 17: 331-338.
- Gugnani, HC; Ojukwu, JO; Suseelan, AV; Anikwe, RM; Udeh, FN; Ojukwu JO. 1981. Actinomycetoma in Nigeria. *J Trop Med Hyg* 84: 259-263.
- Gugnani, HC; Suseelan, AV; Ojukwu JO. 1982. Mycetoma of the thumb caused by *Nocardia transvalensis*. *Mycopathologia* 80: 55-60.
- Gugnani HC. 1983. The pattern of deep mycoses in Nigeria. *W Afr. Med. J.* 2: 67-71.
- Gugnani, HC; Unaogu, IC. 1991. Experimental mycetoma due to *Streptomyces griseous* in laboratory mice. *Mycopathologia* 113: 151-154.
- Gugnani, HC; Unaogu, IC. 1998. Pulmonary infection due to *Nocardiosis dassonvillei*, *Gordona sputi*, *Rhodococcus rhodochrous* and *Micromonospora* sp. in Nigeria and literature review. *J Med Mycol*, 8: 21-25.
- Gugnani HC. 2002. Epidemiology of mycetoma in West Africa with special reference of Nigeria. Mycetoma. The International Conference (February 3-5, 2002) Abstracts, pp. 30-31.
- Khalil, M; Ekanem, IA; Gugnani, HC; Attah, Ed B. 1999. Some deep mycoses diagnosed by histopathology in South Eastern Nigeria. *Rev Iberoamer Micol* 16: 221-224.
- Lucas, AO. 1968. The clinical feature of some of the deep mycoses in West Africa. In: Ciba Foundation Symposium on Systemic Mycoses, J & Churchill Ltd, London.
- Mathur DR, Agarwal SC. 1986. Mycetoma in Nigeria. A review. *Nigerian Med Pract* 2: 79-81.
- McNeil, MM; Brown, JM. 1994. The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology. *Clin Microbiol Rev.* 7: 357-417.
- Onuigbo, WIB; Gugnani HC. 1976. Deep mycoses prevalent in Igbos of Nigeria. *Int J Dermatol* 15: 432-437.
- Smith, EC. 1928. Mycetoma in Nigeria. *Trans Roy Soc Trop Hyg.* 22: 157-160.
- Unaogu, IC; Gugnani, HC; Ikerionwu, SE. (1989) Experimental mycetoma due to *Nocardia transvalensis* in laboratory mice. *Mycoses* 33: 99-102.
- Unaogu, IC; Gugnani, HC; Akpulu, IN; Onumanu; Okeke, CN. 1993. Occurrence of aerobic pathogenic actinomycetes in natural substrates in Nigeria. *J Comm Dis* 25: 164-168.

Figuras



Fig. 9.1: Actinomycetoma debido a *N.brasiliensis*. Nótese el edema presente en la nalga derecha. Las lesiones se extienden hasta la ingle y la vejiga con presencia de tractos fistulosos intercomunicantes.

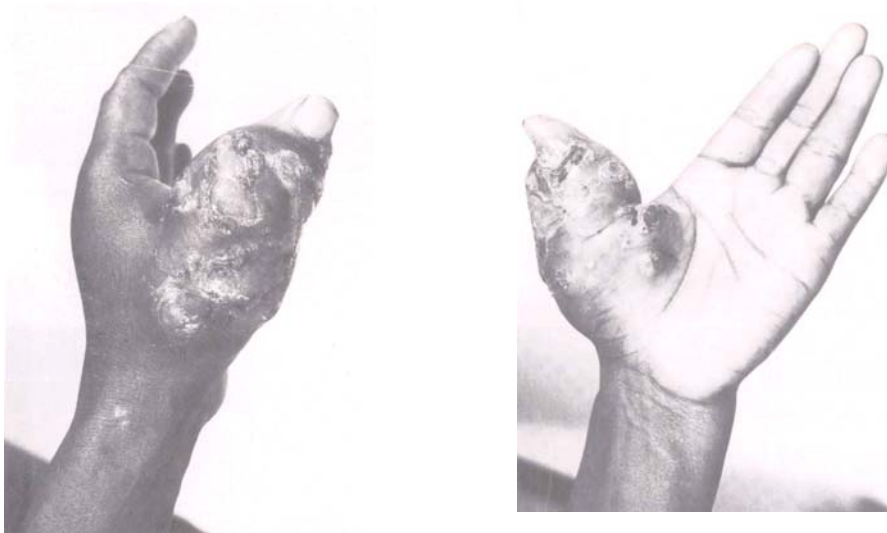


Fig. 9.2: Actinomycetoma del dedo gordo de la mano, causado por *N.transvalensis*. Nótese la presencia de los tractos fistulosos en la zona dorsal del dedo (foto de la izquierda) y la vista ventral del dedo y la mano (foto de la derecha).

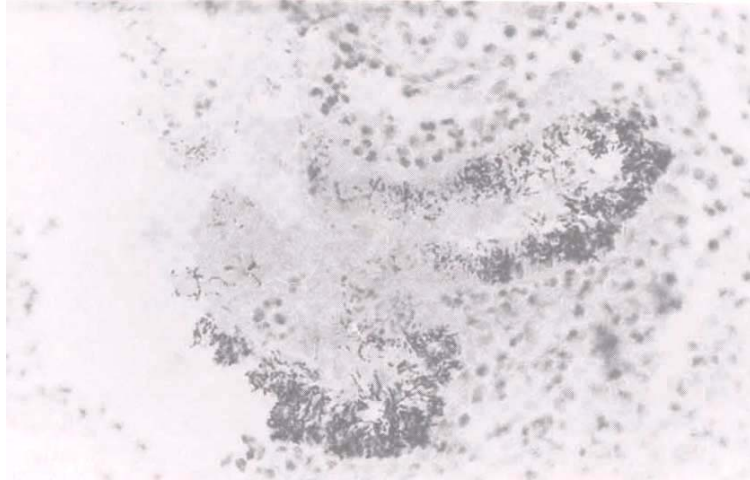


Fig. 9.3: Corte de tejido obtenido del caso de la Fig 9.1, coloreado por la técnica de Gram, en el corte se pueden observar la presencia de formas filamentosas y cocobacilares gram positivas 425x.

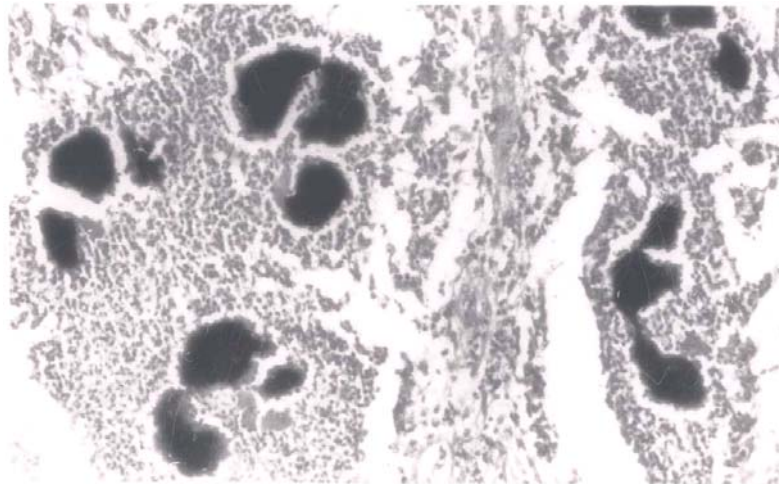


Fig. 9.4: Granos de *Actinomadura pelletieri* vistos en un corte de tejido de un caso de actinomicetoma. (H&E) 325x.

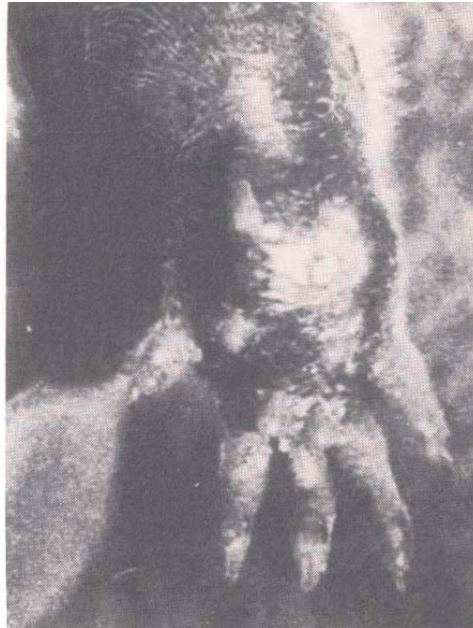


Fig.9.5: Actinomicetoma experimental en el cojin plantar de ratón, tratado con adyuvante incompleto de Freund y seguido de inoculación de *N.transvalensis*.

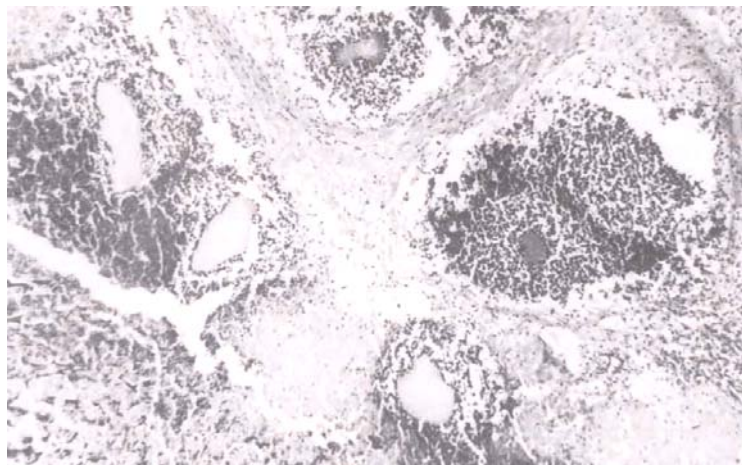


Fig. 9.6: Corte de tejido de un micetoma experimental debido a *S. griseus* en la piel, se puede observar la presencia de granos rodeados por una reacción inflamatoria. (H&E) 275x.



Fig. 9.7: Corte histológico de tejido tomado de un micetoma experimental en el cojinete plantar de ratón, debido a *S. griseus*, se puede observar la presencia de infiltrado celular, fibrosis, edema y destrucción del tejido óseo. (H&E) 425x.

CAPÍTULO X
EPIDEMIOLOGÍA DE LOS MICETOMAS ACTINOMICÓTICOS EN LA INDIA
Pankajalakshmi V.Venugopal, C.P. Abirami and Taralakshmi V.Venugopal

Malar Mangai 3 1st. Avenue. Ashok Nagar. Chennai – 600083. India.
(e-mail: pconjeevaram@hotmail.com)

ABSTRACT

Actinomycotic mycetomas are localized, chronic, suppurative and progressive infections of the skin, subcutaneous tissues and bones. They are characterized by the development of subcutaneous granulomas and abscesses with induration, formation of sinus tracts and production of granules. The etiologic agents exist as soil or plant saprophytes and gain entrance into the tissues through abrasion or implantation. Actinomycotic mycetomas are caused by aerobic actinomycetes belonging to the genera *Nocardia*, *Streptomyces* and *Actinomadura*.

The disease is prevalent in almost all parts of India. Actinomycotic mycetoma is more commonly encountered than eumycotic mycetoma. *A.maduræ* is the major cause of actinomycetoma and is the predominant pathogen in the Northern and Southern regions of India. *A.pelletieri* is rarely seen in northern India and most of the cases reported from the South were from Tamil Nadu. *Nocardia* has been reported as the most common causative agent from Kolkata, Mumbai and Pondicherry and it was the second largest group of actinomycetes causing mycetomas in southern India. *Streptomyces somaliensis* is said to cause 3 to 10% of mycetoma cases and the agent is thought to be more common in the Southern region. However, it is the second dominant pathogen in Rajasthan.

The majority of cases occur in individuals between the ages of 21 and 40. Men are more commonly affected than women. The most common location is on the foot although lesions can occur elsewhere. Injury due to thorn prick is often found to be involved in the initiation of mycetoma. Dry thorn forests occur over the plains or undulating terrain of India with thorny trees and shrubs. These shrubs constitute important rural household fuel in addition to being used for fencing thereby increasing the chances of traumatization.

Direct microscopic examination of the granules in the pus or biopsy material is sufficient to establish the diagnosis of mycetoma and histological examination permits recognition of the etiologic agent in 94 to 95% of the cases.

Early diagnosis is imperative for appropriate therapy. Excision of the mycetomatous tissue followed by chemotherapy is desirable. India is a land of agriculture where the majority of the population works in the fields without footwear. Use of footwear may help in the control of the disease, and once the general standard of living improves, mycetoma may disappear altogether from India.

Etiología

Los agentes etiológicos se encuentran presentes como saprófitas del suelo o de las plantas y acceden a los tejidos por medio del contacto abrasivo o de la implantación. Los micetomas actinomicóticos son causados por los actinomicetos aeróbicos, pertenecientes a los géneros *Nocardia*, *Streptomyces* y *Actinomadura* (ver Tablas 10.1 y 10.2).

Historia

Los micetomas se conocen en la India desde hace mucho tiempo. El tratado védico antiguo *Atharva Veda*, los describe como “Pada Valmikam”, que en sánscrito significa “hormiguero del pie”. Ya en el Siglo XVIII, los misioneros franceses en Pondicherry habían reportado la enfermedad. John Gill, en 1842, describió por primera vez las características clínicas de la enfermedad, en un informe del dispensario de Madurai (Carter, 1874). Su sucesor, Colebrook, lo denominó “Pie de Madura” y Van Dyke Carter del “Grant Medical College” en Bombay, acuñó el término “Micotoma”, que

significa *tumor fúngico* (Carter, 1860). Hasta finales del Siglo XIX, el micetoma fue reportado particularmente en la India.

Distribución Geográfica

La enfermedad prevalece en casi todas las regiones de la India, como originalmente lo reportara Carter. El micetoma actinomicótico, es más común que el micetoma eumicótico (Venugopal *et al* 1977). La *Actinomadura madurae* ha sido reportada como el agente causal del micetoma, donde quiera que se presente la enfermedad. En la India, *A. madurae* es el principal agente causal del micetoma actinomicótico, siendo responsable del 31% de los casos reportados (Desai *et al* 1970) y es el patógeno predominante en las regiones del norte y del sur (Chakrabarti y Singh, 1998; Venugopal y Venugopal, 1991). El género *A. pelletieri* no es común en el norte de la India y la mayoría de los casos reportados en el sur provienen de la región de Tamil Nadu (Venugopal *et al* 1978). A pesar de que *Nocardia* se consideró una agente etiológico poco común en el Asia, se ha reportado en un considerable número de casos. Además, el género *Nocardia* fue reportado como el agente patógeno más común en Kolkata, Mumbai y Pondicherry y fue el segundo más común entre los actinomicetos causantes de micetomas en el sur de la India (Venugopal y Venugopal, 1982). Se considera que *Streptomyces somaliensis* causa del 3% al 10% de los casos de micetoma y se cree que sea el más común en la región del sur (Venugopal *et al* 1982). No obstante, este es el segundo agente patógeno predominante en Rajastham (Joshi *et al* 1987).

Influencia climática

La distribución y prevalencia de los agentes causales dependen, en cierta medida, de las condiciones climatológicas. *S. somaliensis* es más frecuente en regiones con clima seco y árido, donde existen suelos arenosos y vegetación xerófila, con un promedio anual pluviométrico de 50-250 mm. El hecho de que en la mayoría de las regiones de la India el índice pluviométrico esté por encima de los 600 mm por año, hace poco común la presencia de esta infección en la zona. La infección provocada por *A. pelletieri* es más común en áreas relativamente húmedas, con una pluviosidad de entre 500 y 800 mm ó más por año. El clima tropical de Tamil Nadu, con su promedio anual de lluvias que va de 600 a 1300 mm, podría ser un factor determinante para el desarrollo de la infección por *A. pelletieri*. El género *Nocardia* es más común en los países con bosques húmedos, donde el promedio anual de lluvia varía entre los 1000 y 2000 mm. El clima tropical, influenciado por los monzones de la región de Tamil Nadu, caracterizado por períodos de sequía y alta humedad, y la presencia de suelos arenosos, podrían explicar la coexistencia de *Madurella micetomatis* y *S. somaliensis*, las cuales son más frecuentes en las regiones áridas y secas, con las nocardiae, más comunes en las áreas boscosas húmedas. Aunque, ciertos agentes de micetoma muestran alguna prevalencia ecológica y geográfica, la mayoría de estos agentes se han encontrado en todo el país.

Incidencia de la edad, el género y la ocupación

A pesar de que las personas de todos los grupos de edades son susceptibles a contraer la infección, en la mayoría de los casos reportados se encuentran entre los 21 y 40 años de edad. Los hombres son más propensos que las mujeres. Esta incidencia del género masculino se atribuye a las actividades ocupacionales, fuera del hogar, lo que incrementa la posibilidad de trauma en las partes del cuerpo expuestas. Sin embargo, en las áreas rurales de la India, las mujeres están igualmente expuestas a las mismas condiciones ambientales. Es posible, entonces, que las mujeres posean algún mecanismo de defensa, que evita el ingreso y la proliferación del organismo patógeno en el cuerpo. La mayoría de los pacientes son agricultores o trabajadores del campo.

Localización anatómica

El área más común de localización del actinomicetoma, es el pie; aunque las lesiones pueden ocurrir en otras partes, particularmente en aquellas áreas del cuerpo que entran en contacto directo con el

suelo al realizar actividades agrícolas, como las manos, los glúteos, la espalda, el periné, etc. El micetoma en el cuero cabelludo, se debe al hábito de cargar productos del campo en la cabeza.

Formas de infección

El micetoma no es una enfermedad contagiosa y la fuente de infección es exógena. En el 67% de los pacientes se presenta una historia de trauma antes del desarrollo de la lesión y, por lo general, como consecuencia de una herida punzante. La infección ocurre por una implantación traumática, accidental, de los agentes etiológicos presentes, en su fuente saprofitica, constituida por espinas, astillas o clavos. El micetoma es endémico en áreas donde la vegetación está constituida principalmente por arbustos o árboles espinosos, y la gente camina o trabaja descalza en los campos, exponiéndose a los agentes infecciosos. Además del trauma punzante, las pequeñas abrasiones y los traumas debidos a caídas accidentales, podrían también desempeñar un papel importante en la infección. El micetoma en el periné, se debe al hábito de los campesinos de trabajar en cuclillas, sin usar ropa apropiada alrededor de la zona de la ingle, lo que conlleva a heridas accidentales con espinas y astillas. La costumbre de utilizar arena para limpiar la región del ano después de defecar, puede provocar abrasiones menores que resultan en el ingreso de los agentes infecciosos del micetoma en la piel. Al usar pajillas para remover el cerumen de los oídos, puede conllevar a que se desarrolle un micetoma en el oído medio. Además, el hábito de transportar sobre la espalda o la cabeza madera, arbustos secos espinosos, piedras, bloques, sacos de granos y otros productos contaminados con el suelo, puede ser la causa del desarrollo de la infección en estas áreas del cuerpo. También se han reportado casos de extracción de gusanos de guinea, antes del desarrollo de los micetomas.

Hábitat del agente causal

La mayoría de los agentes causales de micetoma han sido aislados del suelo o de las plantas. El primer organismo de micetoma en ser aislado del suelo fue *Nocardia asteroides*. *N.brasiliensis* y *N.otitidiscaviarum* (*N. caviae*) han sido aislados de los suelos de la India. Hemos aislado *Nocardia spp.* de 8 muestras de suelo recolectadas en Tamil Nadu. Singhvi *et al*, aislaron agentes de micetoma del suelo y de espinas en Jodhpur y Rajastham (Singhvi *et al* 1995).

Comentarios finales

Las lesiones producidas por las espinas de cardón son la principal causa de infección por micetoma. Los bosques espinosos áridos se encuentran en las zonas de los llanos o terrenos ondulantes de la India. En esas zonas proliferan diferentes especies de arbustos espinosos, tales como: Karuvelam (*Acacia arabica*), Velvelam (*A.ferruginea*), Desi Babul (*A.nylotica*), Velikatham (*Prosopis spicigera*), Khejdi (*P.cineraria*), English Babul (*P.juliphora*), Bair (*Ziziphus numularia*), Sundra, Odai, Usil y Elandai. En las zonas rurales estos arbustos son utilizados como leña para cocinar. A su vez, el Velikatham, que significa “cerca protectora”, se utiliza en Tamil para cercar las casas de los medios rurales y urbanos. Esta práctica incrementa las posibilidades de traumatismo.

Un actinomicetoma bien desarrollado, y presente en un área de localización corporal característica, es fácilmente diagnosticable a simple vista; pero el diagnóstico en sus etapas iniciales se dificulta, particularmente cuando la lesión se presenta en áreas poco usuales del cuerpo (Fig. 10.1). La apariencia morfológica de los gránulos en las secciones tisulares, es característica de la mayoría de las especies de los organismos causales del actinomicetoma (ver Figuras 10.2 a 10.5). En un 94-95% de los casos, el examen histológico del material de la biopsia, no sólo contribuye a establecer el diagnóstico sino que también permite la identificación específica del agente etiológico (Klokke *et al* 1968). Sin embargo, el examen histológico presenta algunas limitaciones y debe ser complementado por un cultivo microbiológico. Aún así, el cultivo está limitado por el hecho de ser un proceso muy lento, tedioso y, algunas veces, imposible de realizar. Por otra parte, el diagnóstico histológico o el examen directo del gránulo por medio del microscopio constituye el método más

apropiado para determinar el tratamiento a ser usado. Con el propósito de determinar una terapia apropiada, es necesario establecer un diagnóstico específico y oportuno.

El diagnóstico temprano es una condición imperativa para poder aplicar una terapia apropiada. Se recomienda la escisión quirúrgica del tejido micetomatoso, conjuntamente con quimioterapia. El micetoma actinomicótico responde a la quimioterapia (Welsh *et al* 1987). En algunos pacientes se han reportado respuestas favorables utilizando como tratamiento único la terapia con drogas, incluso en lesiones de larga data y que comprometen a los huesos y los órganos linfáticos (Mahgoub, 1976). El tratamiento indicado para el micetoma por *Nocardia* es la sulfonamida y/o sus derivados. En pacientes con sensibilidad a las sulfas, se recomienda utilizar Minociclina o una combinación de amikacina e imipenem. En los pacientes más resistentes, la amoxicilina y el ácido clavulánico han arrojado buenos resultados (Gómez *et al* 1993). En los micetomas producidos por *A.maduræ*, *A.pelletieri* y *S.somaliensis*, la estreptomycinina se ha utilizado con éxito. Los tratamientos más efectivos se han logrado haciendo una combinación de dapsona con estreptomycinina, sulfametoxazole-trimetoprim o amikacina. En consecuencia, en la actualidad no se justifica una cirugía extrema o la amputación en los casos de micetoma, por lo que se recomienda preferiblemente un tratamiento prolongado.

Los factores que determinan la susceptibilidad de contagio de micetoma, aún se desconocen; no obstante, el cuidado de las lesiones, la higiene personal, la nutrición, el estado de salud general y el grado de virulencia de los agentes causales, juegan un papel determinante. El continuo desarrollo de infecciones genera una sensibilidad especial en el organismo, lo que lo hace más susceptible a desarrollar un actinomicetoma.

La India es un país agrícola, en el que la mayoría de sus habitantes practican las labores agrícolas sin calzado, por lo que existe una mayor posibilidad de infección, y, en consecuencia, de desarrollar la enfermedad. Una buena orientación en cuanto al uso del calzado resulta una buena recomendación para prevenir la enfermedad. Tan pronto mejoren las condiciones de vida en la India, el micetoma será erradicado del país.

Bibliografía

- Carter H. V. On Mycetoma or Fungus disease of India. London: J. and A. Churchill, 1874.
- Carter H. V. On Mycetoma or the Fungus disease of India including notes of recent cases and new observations on the structure etc., of the entophytic growth. Trans. Med. Phys. Soc. Bombay, 1860; 7: 206-221.
- Chakrabarti, A; Singh, K. Mycetoma in Chandigarh and surrounding areas. Indian J. Med. Microbiol. 1998. 16: 64-65.
- Desai, S. C; Pardanani D. S; Sreedevi, N. Mehta. Studies on Mycetoma. Indian J. Surg. 1970; 32: 427-447.
- Gómez, A; Saúl, A; Bonifaz, A, López, M. Amoxicillin and clavulanic acid in the treatment of Actinomycetoma. Int. J. Dermatol 1993; 32: 18-20.
- Joshi, K. R, Sanghvi A, Vyas MCR, JC. Etiology and distribution of Mycetoma in Rajasthan. Indian J. Med. Res. 1987; 85: 694-698.
- Klokke, A.H; Swamidasan, G; Anguli, R; Verghese, A. The causal agents of Mycetoma in South India. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg 1968; 62: 509-516.
- Mahgoub, E.S. Medical management of Mycetoma. Bull World Health Org. 1976; 54: 303-310.
- Singhvi, A.M; Malviya, A; Joshi, K. R. A study of prevalence of Mycetoma fungi in Jodhpur region. Indian Council of Med. Res. Project. 1995.
- Venugopal PV, Venugopal TV. *Actinomadura madurae* causing Mycetomas in Madras. Indian J. Pathol Microbiol 1991; 34: 119-125.
- Venugopal, P. V; Venugopal TV. Small grain Mycetomas in the Tropics. Australas J. Dermatol. 1982; 23: 39-42.
- Venugopal, T. V.; Venugopal P. V; Paramasivan, C. N. *et al.* Mycetomas in Madras. Sabouraudia 1977; 15: 17-23.
- Venugopal, T. V; Venugopal P. V; Rangaraj K. *et al.* Mycetomas caused by *Streptomyces pelletieri* in Madras, India. Arch. Dermatol 1978; 114: 204-206.
- Venugopal, T. V; Venugopal, P. V; Arumugam, S. *Streptomyces somaliensis* causing Mycetomas in South India. Indian J. Dermatol. Venereol Leprol 1982; 48: 35-41.
- Welsh, O; Saucedo, E; González, J; Ocampo, J. Amikacin alone and in combination with trimethoprim-sulfamethoxazole in the treatment of actinomycotic Mycetoma. J. Am. Acad. Dermatol. 1987; 17: 443-448.

Tabla 10.1
Agentes causales más comunes del actinomicetoma

Agente	Grano		Histología (coloración por H & E)
	Color Aproximado	Diámetro (mm)	
Actinomiceto:			
<i>N.asteroides</i>	Blanco	0.5	Pequeño, redondeado o vermiforme homogéneo acumulos dispersos de filamentos. Parcialmente coloreado por la hematoxilina.
<i>N.brasiliensis</i>	Blanco	0.2	Igual como arriba indicado.
<i>N.otitidiscaviarum</i> (<i>N.caviae</i>)	Blanco o Amarillo	0.5	Igual como arriba indicado.
<i>A.maduræ</i>	Blanco o Amarillo	2.0	Grande, redondo o lobulado; centro eosinophilico recubierto en la periferia por una capa eosinofílica que rodea el grano como una orla, presencia de "clavas" .
<i>A.pelletierii</i>	Rojo o Rosado	1.0	Pequeño, redondo o irregular Con bordes denticulados, matriz homogénea se colorea fuertemente con hematoxilina; presencia de "clavas".
<i>S.somaliensis</i>	Blanco o Amarillo	1.0	Tamaño variable, redondo o ovalado con bordes suaves, centro amorfo y ligeramente teñido; no hay "clavas".

Tabla 10.2

Características de cultivo de los principales Agentes productores de Actinomicetoma

Organismo	Cultivo	
	Microscópico	Macroscópico
<i>N.asteroides</i>	Crecimiento rápido, glabroso, blanquecino, con pliegues o arrugado, blanco a anaranjado o rosado, no actividad enzimática.	Filamentos finos, ramificados con fragmentación en formas bacilares o cocoidales, gram-positivas, parcialmente alcohol-ácido-resistentes.
<i>N.brasiliensis</i>	Crecimiento rápido, colonias pequeñas, elevadas, compactas, con pliegues o arrugadas, pigmento amarillo o anaranjado actividad enzimática.	Igual como arriba indicado.
<i>N.otitidiscaviarum</i> (<i>N.caviae</i>)	Semejante a la <i>N.asteroides</i> ; diferenciada por pruebas especiales.	Igual como arriba indicado
<i>A.maduræ</i>	Crecimiento lento, glabroso o ceroso, plegado y arrugado, colonias de color blanco a crema; adherentes al medio, enzimáticamente activas.	Filamentos finamente ramificados, filamentos no fragmentados, presencia de artrosporas, gram-positivos, no alcohol-ácido-resistentes.
<i>A.pelletierii</i>	Crecimiento muy lento; colonias pequeñas, glabrosas, cerosas, arrugadas o irregulares, plegadas; pigmento rosado o coral, colonias rojas.	Filamentos finos, no fragmentados gram-positivos, no alcohol-ácido-resistentes
<i>S.somaliensis</i>	Crecimiento rápido, glabroso, plegado o arrugado, colonias de color crema a marrón.	Filamentos finos, no fragmentados presencia de artrosporas; gram-positivos, no alcohol-ácido-resistentes.

Figuras



Fig. 10.1: Micetoma del cuero cabelludo por *A. pelletieri*.

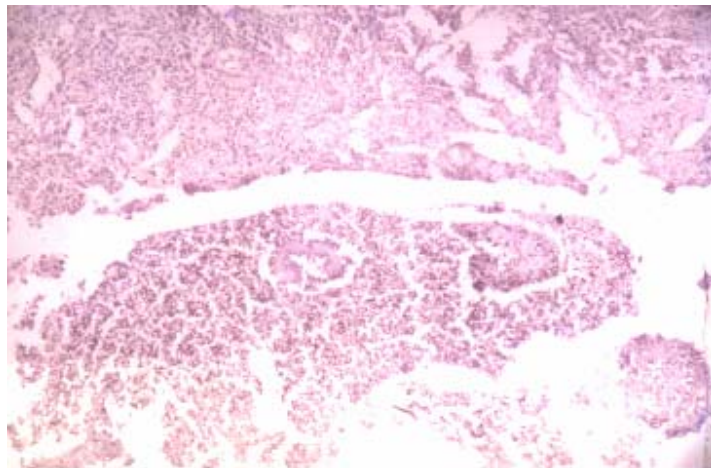


Fig. 10.2: Grano pequeño de *N. asteroides*, note el infiltrado inflamatorio que rodea al grano (x100)

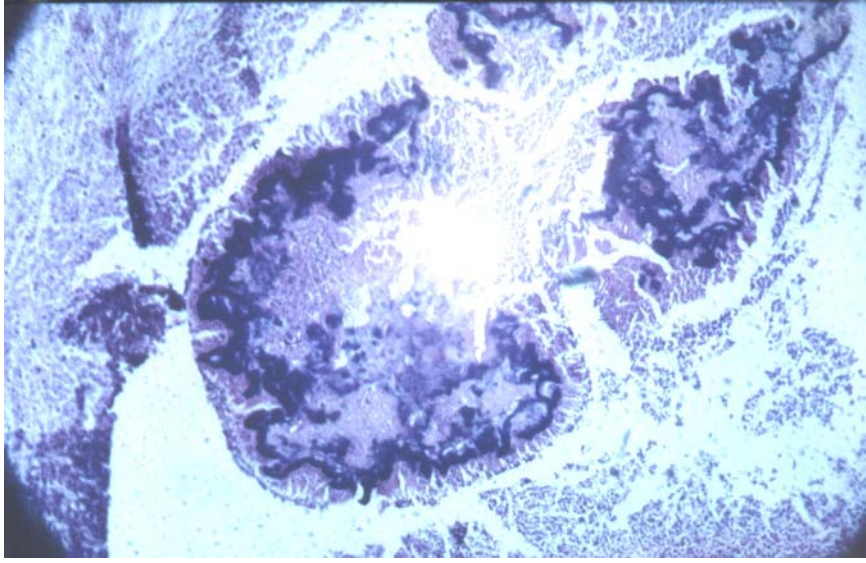
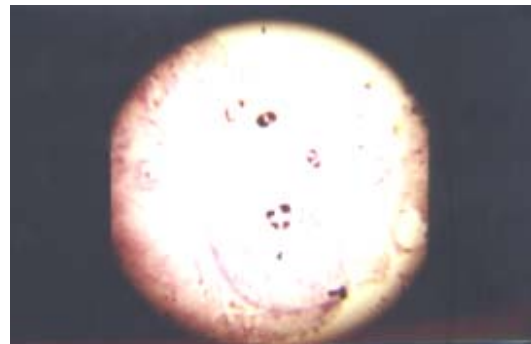


Fig. 10.3: Grano grande de *A. madurae*, note la orla periférica característica de este tipo de grano. Coloración por Hematoxilina -Eosina. (40x)



a.



b.

Fig. 10.4: Granos de *A. pelletieri*, note la matriz del grano, homogénea y fuertemente coloreada. Coloración con Hematoxilina y eosina. (40X) b. (100X)

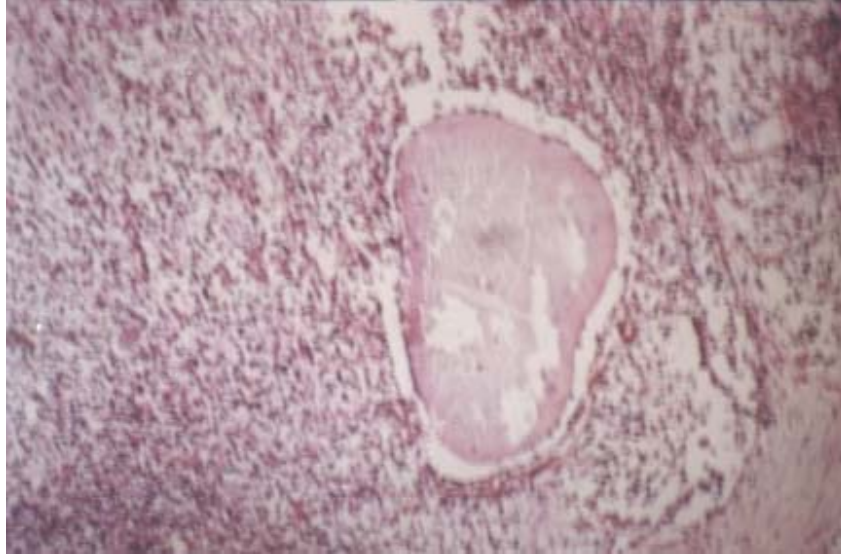


Fig. 10.5: Grano de tipo amorfo de *S.somaliensis*. Hematoxylin y eosina. (100X)

CAPÍTULO XI

ACTINOMICETOMA EN ÁFRICA

A. H Fahal*

Department of Surgery - Faculty of Medicine University of Khartoum & Mycetoma Research
Centre University of Khartoum
Department of Surgery, Faculty of Medicine, University of Khartoum PO Box 102, Khartoum-
Sudan
e-mail: ahfahal@hotmail.com, Website: www.mycetoma.org
* Profesor de Cirugía

Introducción

La historia del micetoma en África, es larga e interesante. Mucho antes del advenimiento de la medicina moderna, ya la enfermedad era conocida en el Sudán, por el nombre común de *Nebit* (i.e. “crecimiento”), que aún se utiliza en la actualidad. Desde los tiempos del Mahdeya (1885-1889) los médicos nativos trataban al micetoma por cauterización y/o por amputación. El Sudán parece ser el lugar donde se originó el micetoma (Mahgoub, 1994).

El actinomicetoma representa un serio problema de salud en muchas zonas tropicales y subtropicales, donde el micetoma presenta tasas considerables de morbilidad y mortalidad. Un micetoma se describe como una enfermedad inflamatoria crónica, granulomatosa, específica y progresiva, que generalmente compromete al tejido subcutáneo. El micetoma es causado por unas bacterias denominadas *actinomicetos*, de donde deriva el término *actinomicetoma* (Fahal y Hassan, 1992).

Epidemiología y etiología

Aún se desconocen con certeza la verdadera incidencia y la distribución geográfica del actinomicetoma, tanto a nivel mundial como, específicamente, en el África. Esto se debe al hecho de que la enfermedad no ha sido tomada en cuenta por los responsables de la salud comunitaria ni por la sociedad. Así mismo, la falta de educación sanitaria y la naturaleza misma de la enfermedad, la cual es indolora y de desarrollo lento y progresivo, contribuyen a este desconocimiento. La mayoría de los datos sobre el actinomicetoma proviene de las historias clínicas hospitalarias, y se refiere a estadios avanzados de la enfermedad. (González-Ochoa, 1975).

El actinomicetoma es endémico en muchas áreas y prevalece en el llamado *cinturón del micetoma*, el cual se extiende entre las latitudes de 15° Sur y 30° Norte. El cinturón del micetoma incluye Sudán, Somalia, Senegal, Sudamérica, el sur de la India y México (Mahgoub y Murray, 1973).

En África, el actinomicetoma es de frecuente aparición en el Sudán, Senegal, Somalia y en muchos países de África Occidental. Ha sido profusamente reportado en México, Sudamérica y Centroamérica. Sin embargo, se han reportado casos en muchas otras áreas del mundo, incluyendo zonas templadas, como Europa y Norteamérica (Mariat *et al.* 1977).

Las zonas donde prevalece el actinomicetoma, se caracterizan por su relativa aridez, con una temporada de lluvia corta y cálida, de una duración entre 4 y 6 meses, seguida por un largo período de sequía (6-8 meses).

La distribución de la enfermedad está estrechamente relacionada con la presencia de árboles, tales como las acacias, así como de una variedad de arbustos espinosos y árboles como el *Balanites aegyptica*. Los organismos causantes viven de manera saprofítica sobre o dentro de la espina. Se ha

sugerido que los agentes del actinomicetoma, por lo general, ingresan al cuerpo a través de la herida causada por un pinchazo de espina, o directamente del suelo por medio de cualquier otra herida cortante en la piel; aunque recientemente esta teoría está siendo revisada en varios estudios (Mahgoub y Murray 1973; Abbott, 1956; Ahmed *et al.*, 2002).

La distribución geográfica de los organismos individuales del actinomicetoma, muestra una variación considerable, basada en los factores ambientales prevalentes, en particular la pluviosidad, la temperatura y la humedad (Mahgoub y Murray, 1973).

Debido a la dificultad para determinar el momento de inicio de la infección, se desconoce el período de incubación del micetoma. En animales experimentales se detectó la formación de gránulos 3 semanas después de la inoculación del organismo (Mahgoub y Murray, 1973).

Los organismos causantes

Una variedad de actinomicetos son causantes de los micetomas. Se ha reportado una gran cantidad de organismos causantes de actinomicetomas en diversas partes de África (Ver Tabla 11.1).

Presentación Clínica

Los hombres son más susceptibles a la enfermedad del micetoma que las mujeres, en una proporción de 3,7:1. Los adultos en edades comprendidas entre los 20-40 años, son los más afectados, pero ninguna edad está exenta. Por lo general, los actinomicetomas afectan a cultivadores, campesinos, pastores y vaqueros, cuya ocupación los pone en contacto con el suelo contaminado. En áreas endémicas también pueden verse afectadas personas con otras ocupaciones (Fahal y Hassan, 1992; Mahgoub y Murray, 1973; Mariat *et al.*, 1977; Abbott, 1956).

Una vez presentada la enfermedad, su duración varía entre varios meses y 50 años. Los pacientes tienden a presentarse con la enfermedad avanzada, debido a su naturaleza indolora y agresiva, así como a la falta de educación sanitaria.

La tríada característica: nódulo subcutáneo –fístulas– secreción, es patognomónica del actinomicetoma. La lesión presenta un proceso de inflamación lento, progresivo e indoloro, algunas veces en el sitio de un trauma previo, aumentando gradualmente de tamaño. La misma puede extenderse y comprometer los tejidos y estructuras profundas, derivando en la destrucción ósea, provocando deformaciones y pérdida de la función. Curiosamente, los tendones y los nervios no son afectados, sino hasta una etapa avanzada de la enfermedad.

Normalmente, la inflamación se presenta de consistencia firme y redonda, pero puede ser suave, lobulada, raramente de tipo quístico y a menudo resulta móvil (Fahal y Hassan, 1992; Mahgoub y Murray, 1973). Pueden desarrollarse nódulos secundarios múltiples, supurar y drenar a través de múltiples tractos fistulosos. En el tejido profundo los tractos se conectan el uno al otro. Éstos, a menudo, secretan un exudado purulento o sero-purulento que contiene gránulos. Durante mucho tiempo se pensó que el pus asociado con el actinomicetoma era estéril y se creía que esto se debía a un antibiótico producido por el micetoma. Sin embargo, un estudio reciente demostró una alta incidencia de infección bacteriana secundaria sin evidencia de producción local de antibióticos, y el organismo asociado a la infección más comúnmente aislado fue el *Staphilococcus aureus* (Ahmed *et al* 2002).

Durante la fase activa de la enfermedad, las fístulas secretan gránulos, cuyo color depende de los organismos causantes. Los gránulos pueden ser blancos, rojos o amarillos y son de consistencia y tamaño variables. *A. pelletieri* y *A. madurae* producen gránulos rojos y blancos, respectivamente,

mientras que los *Streptomyces somaliensis* producen gránulos amarillos. Un examen visual de los gránulos, puede, por tanto, contribuir a diagnosticar el tipo de organismo causal.

La presentación clínica del micetoma es casi idéntica, independientemente del organismo causal. Sin embargo, la evolución de la enfermedad es más rápida con los actinomictomas que con los eumictomas. En el caso de los actinomictomas, la lesión crece de manera rápida, sin márgenes claros y no se encapsula. Es más inflamatoria, destructiva y se caracteriza por presentar múltiples fistulas activas o curadas, invadiendo el hueso en una etapa más temprana.

El actinomictoma es, por lo general, una afección indolora, lo que sugiere que el micetoma produce sustancias que poseen efectos anestésicos; y el dolor que podría sentirse en las etapas iniciales de la enfermedad, podría no ser percibido debido al daño producido a los nervios como consecuencia de una reacción fibrosa del tejido que lo rodea o también debido a un proceso de endoarteritis obliterante o vascularización pobre del nervio (Mahgoub y Murray, 1973). Sin embargo, en el 18% de los casos los pacientes pueden buscar orientación médica para tratar el dolor. Generalmente, el dolor es producido por la expansión del hueso afectado por el micetoma o podría deberse a una infección bacteriana secundaria.

A medida que el granuloma aumenta de tamaño, la piel que lo recubre se adhiere y se estira. La piel se torna suave, brillante y con áreas de hipo e hiper-pigmentación. En algunos pacientes con actinomictomas producidos por razones desconocidas, existe un aumento de sudoración por encima y alrededor de la lesión, desconociéndose su razón (observación personal). Algunos pacientes desarrollan linfoedemas. En pacientes con estados avanzados de la enfermedad, puede observarse la presencia de venas varicosas localizadas en el miembro afectado (observación personal). No son comunes los cambios tróficos de la piel y esto podría explicarse por la buena calidad de riego sanguíneo a nivel de las lesiones de micetoma.

En la mayoría de los pacientes se desarrollan nódulos linfáticos, locales, pequeños y pronunciados. También pueden presentarse nódulos linfáticos aumentados de tamaño, debidos a infección bacteriana secundaria o a una diseminación linfática del micetoma, o debidos a estimulación antigénica (Fahal y Hassan, 1992; Ahmed *et al* 1998).

La caquexia y la anemia pueden presentarse en una etapa avanzada del actinomictoma; con frecuencia, esto se debe a la desnutrición y a la depresión emocional. El actinomictoma puede producir muchas incapacidades y deformaciones, resultando fatal en algunos casos (El Hassan y Mahgoub, 1972).

Localización del micetoma

El lugar de localización más común (77% de los casos reportados) de los actinomictomas es el pie. La mayoría de las lesiones se presentan en la parte anterior del dorso del pie y, por razones desconocidas, el pie izquierdo es el más afectado. La mano representa la segunda localización más común. En las áreas endémicas, otras partes del cuerpo pueden verse afectadas. Con menor frecuencia, los micetomas se manifiestan en rodilla, pierna, cabeza y cuello, muslo y perineo. También se ha reportado su localización en lugares poco comunes, como el pecho, las paredes abdominales, los pómulos, la mandíbula, los testículos, las fosas nasales, en el ojo, en los párpados y en cicatrices. El micetoma extrapodal se observa con mayor frecuencia en los actinomictomas que en los eumictomas. No existe una explicación clara para esto (Fahal y Hassan, 1992; Mahgoub y Murray, 1973; Gumaa *et al* 1986; Magana, 1984; Fahal y Suliman, 1994; Develoux *et al* 1988).

Generalmente, los micetomas afectan las partes del cuerpo que entran en contacto con el suelo, bien sea estando la persona de pie, sentada o acostada. No se han reportado casos de actinomictomas

viscerales abdominales; es posible que los continuos movimientos peristálticos intestinales dificulten la posible penetración de estos organismos a los tejidos circundantes. Los casos reportados de actinomicetoma con localización retroperitoneal son poco comunes y los mismos pueden ser causados por la diseminación desde la región inguinal, vía sistema linfático. (Fahal *et al* 1994).

Diagnóstico diferencial

El diagnóstico diferencial del actinomicetoma incluye: sarcoma osteogénico, tuberculosis, sarcoma de Kaposi, neurofibroma, melanoma maligno, granuloma por cuerpo extraño –por ejemplo por espinas o astillas de madera–, osteomielitis, osteítis sifilítica, osteoclastoma y quiste óseo.

Diagnóstico del actinomicetoma

Actualmente, los instrumentos disponibles para el diagnóstico del actinomicetoma son limitados. El examen histopatológico del material de la biopsia quirúrgica y el cultivo del pus, secreciones o gránulos de las biopsias quirúrgicas, son los métodos estándar para el diagnóstico. El examen microscópico de gránulos coloreados, permite la identificación de los organismos causantes (Mahgoub y Murray, 1973; Mahgoub, 1968). Para un diagnóstico definitivo, siempre es necesario realizar el cultivo. Sin embargo, la técnica es compleja, requiere de mucho tiempo, existe el riesgo de contaminación y siempre demanda una biopsia quirúrgica profunda; exige experiencia, y en áreas endémicas resulta poco práctica y costosa (Mahgoub y Murray, 1973; Mahgoub, 1989). En muchos centros asistenciales es muy frecuente el uso de pruebas, como la de la contra-inmuno-electroforesis e inmunodifusión para el diagnóstico de actinomicetoma y para el seguimiento de los pacientes en el tratamiento médico. Una de las limitaciones de las pruebas serológicas, es la falta de especificidad de algunos de los antígenos utilizados y es común la reactividad cruzada entre los actinomicetomas individuales (Mahgoub, 1964; Gumaa y Mahgoub, 1973; Gumaa y Mahgoub, 1975). El examen histopatológico es útil, pero conlleva un riesgo sustancial de esparcimiento del actinomicetoma, ya que siempre se requiere de una biopsia quirúrgica profunda (Mahgoub y Murray, 1973; Mahgoub, 1989). Además, carece de la precisión que ofrece un cultivo (Mahgoub y Murray, 1973).

Citología del actinomicetoma

Una nueva técnica citológica para el diagnóstico del actinomicetoma es la de la aspiración con aguja fina. Esta técnica ha dado buenos resultados bastante precisos (El Hag *et al* 1996). La lesión por actinomicetoma tiene una apariencia particular a nivel del extendido citológico; el mismo se caracteriza por la presencia de células inflamatorias polimorfas, constituidas por una mezcla de neutrófilos, linfocitos, células plasmáticas, histiocitos, macrófagos y células gigantes. Este cuadro tan polimorfo puede distinguir con facilidad entre el micetoma y otras masas del tejido blando que se caracterizan por contener histiocitos, histiocitos similares a células y células gigantes; por ejemplo, tumores celulares gigantes de tejido blando y un histiocitoma fibroso. La característica clave para el diagnóstico del actinomicetoma, la constituye la presencia de los gránulos que en la mayoría de los casos pueden ser identificados. En los cortes histológicos, el grano se observa fuertemente rodeado por un infiltrado de neutrófilos, los cuales contribuyen a su fragmentación. Fuera de esta zona de células neutrofilicas, se observa la presencia de células monocíticas y de células gigantes. La lesión se encuentra rodeada de tejido granuloso, rico en fibroblastos y vasos sanguíneos. Los gránulos o agregados de actinomicetoma, pueden confundirse con otros actinomicetos anaeróbicos que causan la actinomicosis cérvico-facial.

El estudio citológico por aspiración con aguja fina permite la identificación morfológica del micetoma y su clasificación en eumicetoma o en actinomicetoma. Debido a que el tratamiento depende principalmente de los agentes etiológicos, es importante la diferenciación entre los micetomas –

eumicetomas y actinomicetomas. Estos resultados son confiables y se comparan con los de histopatología.

Esta técnica es sencilla, económica, rápida, sensible y bien tolerada por los pacientes. Se puede utilizar no sólo en los diagnósticos de rutina, sino también como un medio efectivo para recolectar material para el cultivo y los estudios inmunológicos. Dada la simplicidad de esta técnica de estudio citológico, puede también utilizarse en el muestreo epidemiológico del micetoma, con la finalidad de realizar una posible detección temprana de los casos en los cuales las técnicas radiológicas y serológicas no cubran las expectativas esperadas.

Estudio del micetoma por ultrasonido (imagenología)

Tanto los gránulos como la cápsula y el tejido inflamatorio que acompañan las lesiones producidas por el actinomicetoma, muestran aspectos característicos cuando son observados por técnicas de ultrasonido (Fahal *et al*, 1997). Los estudios imagenológicos por ultrasonido permiten hacer un diagnóstico diferencial entre un eumicetoma y un actinomicetoma, así como entre los tipos de micetoma y de otras lesiones no-micetomatosas. A nivel de las lesiones del micetoma, los gránulos producen ecos de tipo hiperreflectivo, agudos y brillantes, los cuales son consistentes con la presencia de los gránulos. Es muy probable que el origen de estos tipos de ecos agudos se deba a la presencia de la sustancia que cementa a los gránulos. Los gránulos presentes en las lesiones por actinomicetoma se pueden diferenciar menos que aquellos presentes en las lesiones por eumicetoma. Esta falta de definición presente en los gránulos de los actinomicetomas, puede deberse a su menor tamaño, consistencia, disposición individual y a la ausencia de cemento en algunos de los gránulos. Se puede observar la presencia de múltiples cavidades que presentan paredes gruesas, con ausencia de un incremento acústico; esta ausencia de incremento acústico se debe a la presencia de cavidades con paredes gruesas.

En las lesiones de actinomicetoma que no presentan fistulas, el diagnóstico del mismo es más exacto. La identificación de los gránulos en las lesiones que presentan tractos fistulosos activos, es difícil, debido a dificultades de índole técnico que se presentan cuando no se logra un contacto directo del transductor con la lesión y/o a la presencia de tejido fibroso a lo largo del tracto fistuloso, pudiendo interferir la luz del mismo con el rayo de ultrasonido. El examen por ultrasonido de la lesión producida por el actinomicetoma, contribuye a determinar de manera precisa el tamaño y la extensión de la misma, lo cual es de gran utilidad para la planificación de los procedimientos quirúrgicos que se decidan aplicar.

La técnica de ultrasonido (imagenología) para el estudio del actinomicetoma, ha demostrado ser fácil, sencilla, rápida, bastante sensible y no invasiva para el diagnóstico y diferenciación de los micetomas. Esta técnica provee información difícil de obtener únicamente a través de exámenes clínicos y radiológicos; puede ser utilizada como rutinaria y en trabajos de campo epidemiológicos. Sin embargo, el estudio imagenológico no facilita el diagnóstico diferencial de los tipos de actinomicetomas (Fahal *et al*, 1997).

Estudio radiológico del actinomicetoma

El examen radiológico como medio de diagnóstico del actinomicetoma, resulta útil sobre todo en las etapas tardías del micetoma, ya que permite observar la extensión de las lesiones tanto a nivel de los tejidos subcutáneos (tejidos blandos) como a nivel óseo (Davies, 1958; Cockshott, 1968; Lewall *et al* 1985). Por medio de los estudios radiológicos se pueden identificar tres etapas del actinomicetoma:

1. Granuloma de los tejidos blandos.

Esta etapa se caracteriza por la presencia de sombras densas o por la presencia de múltiples granulomas dispersos en la lesión. También puede observarse la presencia de calcificaciones y obliteración de los planos de las facias.

2. Comprometimiento de la cortex.

La cortex ósea se puede observar comprimida desde afuera por el granuloma, produciendo un adelgazamiento del hueso. A esto sigue una reacción del periosteo, la cual varía en intensidad, produciendo un engrosamiento y aumento de la densidad del hueso. Los tractos fistulosos se observan prominentes con pérdida de definición de los márgenes corticales. Se observan también espículas de hueso periosteal neo-formado dispuestas en ángulo recto a la cortex ósea, lo que conforma una apariencia de rayos solares. El triángulo de Codman puede estar presente, sin distinguirse del que se observa en los casos de sarcoma osteogénico.

3. Comprometimiento de todo el hueso.

Se pueden observar múltiples cavidades que socavan el hueso, a través de su densidad normal. En el actinomicetoma estas cavidades son pequeñas, numerosas, sin márgenes bien definidos; a diferencia de las cavidades que se observan en los casos de eumicetoma, las cuales son de gran tamaño, escasas y presentan márgenes bien definidos. Las cavidades se producen por la sustitución del tejido óseo por los gránulos; el tamaño de estas cavidades depende del tamaño de los gránulos del agente causal. Las cavidades se observan llenas de masas sólidas que corresponden a los gránulos, que a su vez sirven de soporte al tejido óseo; esto podría explicar la poca frecuencia de fracturas patológicas en los micetomas (Fahal *et al.*, 1996). En los actinomicetomas de localización cefálica se puede observar tanto la presencia de esclerosis, como cambios de tipo osteoblástico. (Gumaa *et al.*, 1986). Se puede observar la presencia de osteoporosis distal, la cual representa una característica radiológica del actinomicetoma y puede deberse a la atrofia por falta de uso o debido a la compresión del hueso por el granuloma. El seguimiento radiológico del tratamiento del actinomicetoma permite observar los cambios y mejorías de las lesiones óseas. A medida que el tratamiento progresa hacia la mejoría, se notan cambios óseos de remodelación, absorción de la esclerosis del hueso y de nuevo se advierte la presencia de un patrón trabecular óseo normal.

Patología del actinomicetoma

Apariencia macroscópica de las lesiones

La apariencia macroscópica de las lesiones en los casos de micetoma, es casi la misma para los diferentes tipos de micetoma; sin embargo, el examen cuidadoso de las lesiones puede revelar ciertas diferencias (Mahgoub y Murray, 1973; Chouhan y Agarwal, 1969; Mahgoub, 1985). En el actinomicetoma la lesión es difusa, mal definida, no encapsulada y surge con el tejido que la rodea. El actinomicetoma tiende a ser agresivo e invade el hueso en una fase temprana de la enfermedad. Los diferentes planos de tejido presentes en la lesión, incluso hasta el hueso, pueden ser absorbidos y reemplazados por tejido fibroso. La masa que conforma la lesión puede convertirse en un tumor fibrocartilaginoso, el cual puede ser removido quirúrgicamente con bastante facilidad (Chouhan y Agarwal, 1969; Mahgoub, 1985). Este tipo de lesión es bastante característico en los actinomicetomas producidos por *A.pelletieri* y especies de *Nocardia*. La infección bacteriana secundaria conlleva a producir un mayor daño del tejido presente en la lesión.

Apariencia microscópica

Streptomyces somaliensis

Los gránulos son redondos o multilobulados y miden entre 250-600µm de diámetro. Al corte histológico presentan una apariencia de secciones homogéneas; sin embargo, las preparaciones pueden presentar un aspecto irregular de su superficie, semejante a una persiana, lo cual se debe al efecto causado por la cuchilla al chocar con el grano. Los gránulos son a menudo basofílicos, pero

con una coloración eosinofílica hacia sus orillas; ocasionalmente, se observan parches azul oscuro. Las *hifas* se observan muy bien empaquetadas e incrustadas en el cemento. Los gránulos presentan una orilla irregular de consistencia blanda, pero en ocasiones pueden ser multilobulados. Las orillas de los gránulos tienen una banda eosinofílica de filamentos radiantes (Mahgoub y Murray, 1973). Un examen, por medio del microscopio electrónico, de la sustancia de cemento que es excretada por el organismo, mostró que está compuesta de fibrillas densamente organizadas que provienen de las paredes de las células bacterianas fuertemente compactadas. Un material similar ha sido interpretado como complejos inmunes.

Actinomadura madurae

Los gránulos miden entre 150 y 400µm de diámetro. Pueden tener forma redonda, ovalada o vermiforme. El organismo produce dos tipos de gránulos: grandes y pequeños. Los primeros son multilobulados o con bordes irregulares, tienen una banda periférica de color azul oscuro y su centro no tiene color; mientras que los pequeños son redondos u ovalados, compuestos de filamentos densos que se colorean en forma homogénea y profunda con la hematoxilina. El tipo de grano pequeño absorbe el colorante más rápidamente que el grande, por lo que presenta homogeneidad. Los gránulos están a menudo rodeados por una zona eosinofílica, por lo cual incrementan su tamaño por el crecimiento del organismo. Éste muestra filamentos radiantes como los observados en *S. somaliensis* (Mahgoub y Murray, 1973).

Actinomadura pelletieri

Los gránulos son pequeños en comparación con los de las otras dos especies de actinomicetos, midiendo entre 60 y 150µm de diámetro. Son redondos, lobulados, poseen un borde angulado y regular y no se observan con facilidad elementos miceliales. El grano entero se colorea de violeta oscuro, con la hematoxilina; por lo general, se observa alrededor de los gránulos una banda muy delgada de color eosinofílico (Mahgoub y Murray, 1973; Culligan *et al* 1985; Kamalam y Thambiah, 1987).

Reacción tisular de los micetomas

Por lo general, la reacción del tejido huésped contra el organismo es idéntica en todos los tipos de actinomicetoma; es un granuloma. Existen unas zonas de leucocitos polimorfonucleares y estas células pueden observarse ocasionalmente dentro de los gránulos. Esta zona es ancha en los actinomicetomas, particularmente en las especies *A. pelletieri* y *Nocardia*, en comparación con la de eumicetoma, que es delgada (Mahgoub y Murray, 1973). La acumulación de estas células dentro y alrededor de los gránulos del micetoma y de los tractos fistulosos, se debe a la producción de sustancias quimiostáticas por los agentes del micetoma (Yousif y Hay, 1987). En la medida en que la enfermedad avanza, emerge una mezcla de células y encapsulan los gránulos. Estas son: linfocitos, células plasmáticas, histiocitos, células mononucleares pequeñas y grandes, células epiteloideas empalizadas y, ocasionalmente, cuerpos eosinofílicos de Russell-Fuchs (Mahgoub y Murray, 1973). Se observan células gigantes en los eumicetomas y éstas pueden contener fragmentos de material fúngico. Existe una densa reacción tisular en el área afectada, que es a menudo altamente vascular e infiltrada con células plasmáticas, linfocitos y macrófagos. La fibrosis, usualmente extensa, ocurre alrededor de los gránulos y puede inducir tumefacción y deformación, lo que es más predominante con el tratamiento médico. Normalmente, el tejido fibroso contiene espacios linfáticos y los vasos sanguíneos pueden presentar evidencia de endarteritis y periarteritis. Según la reacción del tejido huésped, la lesión puede clasificarse en tres tipos (Fahal *et al* 1995).

(1) Reacción Tipo I

En la reacción Tipo I están rodeados por una capa de leucocitos polimorfonucleares. Los neutrófilos, que se encuentran más adentro, están más adheridos a la superficie del grano. En ocasiones, éstos invaden la sustancia del grano y, como consecuencia, ocasionan su fragmentación.

La hifa y la sustancia cementante desaparecen y sólo quedan remanentes de cemento de color marrón pigmentado.

Fuera de la zona de los neutrófilos, existe tejido tisular granuloso, que contiene macrófagos, linfocitos, células plasmáticas y escasos neutrófilos. Las células mononucleares incrementan su número hacia la periferia de la lesión. Muchos de los macrófagos tienen gran cantidad de citoplasma vacuolado. Algunos macrófagos están compuestos por restos de fagocitina nuclear y de neutrófilos. Los macrófagos vacuolados dan una respuesta positiva para lípidos, y a menudo se observan los cuerpos de Russell. Las vénulas y los capilares están rodeados por capas de fibrina, organizadas en forma concéntrica, lo que les da una apariencia de capas de cebolla. El área más externa de la lesión, está compuesta de tejido fibroso. Las arteriolas muestran su capa muscular hipertrofiada. La íntima se engruesa y el edema y el lumen se disminuyen, los nervios muestran edema y algunas veces un infiltrado de células mononucleares. Muchas de las glándulas sudoríparas muestran hipertrofia e hiperplasia.

El estudio ultraestructural de la reacción Tipo I, muestra que los leucocitos polimorfonucleares están en posición cercana a la superficie del grano. Los núcleos están en la parte del citoplasma alejada del grano, mientras que los gránulos se acumulan sobre el lado granuloso del citoplasma. Los gránulos frecuentemente se descargan en la superficie del grano. Los neutrófilos a veces penetran y descargan sus gránulos en la sustancia del grano. La inmunoglobulina G puede ser hallada en la superficie del grano, en el área ocupada por el fenómeno de Splendore-Hoeppli. La reacción Tipo I es la más común en las lesiones de micetoma.

(2) Reacción Tipo II

Los neutrófilos desaparecen y son reemplazados por macrófagos y células gigantes multinucleadas. Estas últimas rodean el material granuloso. Están compuestas por sustancias de cemento pigmentado; sin embargo, ocasionalmente se identifican hifas. Otras células inflamatorias y cambios histológicos son iguales a los de la reacción Tipo I.

(3) Reacción Tipo III

En esta etapa existe la formación de un granuloma epiteloide bien organizado, con células gigantes de Langhans. En ocasiones, el centro del granuloma contiene restos de material bacteriano, pero en algunos no se logró identificar material. Los cambios inflamatorios e histológicos son iguales a los descritos para ambos tipos de reacción (Tipo I y II). No es común encontrar una reacción pura Tipo I ó Tipo II.

No existe una asociación estadísticamente significativa entre el tipo de grano, la reacción tisular, la presencia del fenómeno de Splendore-Hoeppli, la presencia de ADN alrededor del grano y los cambios vasculares. Tampoco existe correlación entre las características clínicas y los diferentes cambios histológicos.

En la reacción Tipo I, los neutrófilos están adheridos y se desgranán en la superficie del grano, provocando la desintegración de la matriz del grano y la destrucción de la hifa. La morfología de la adherencia, vista a través del microscopio electrónico, es una adherencia-inmune y aparenta ser una célula dependiente de los anticuerpos, mediada por la citotoxicidad (ADCC), en la cual el neutrófilo, y posteriormente los macrófagos, están sujetos al grano por IgG. La presencia del IgG en la superficie del grano y la morfología de la adherencia de la célula al grano concuerdan con esto. Sin embargo, no se puede excluir una interacción no específica entre los neutrófilos y la colonia. Siguiendo la estela de los neutrófilos, los macrófagos y las células gigantes aparecen y forman la base de la reacción Tipo II. Eliminan el grano fragmentado y los neutrófilos muertos. En la reacción Tipo III, está presente un granuloma epiteloide discreto bien desarrollado, con células gigantes de Langhans. Este granuloma se

desarrolla en relación al antígeno bacteriano. Esto se confirma por el hecho de que, en ocasiones, en alguna etapa del desarrollo de los granulomas, pueden observarse restos del grano, incluyendo pigmentos. Es muy probable que esto represente una reacción retardada de tipo hipersensible. Este tipo de reacción no es tan común como las de los Tipos I y II. Los tres tipos de reacción tisular que se observan en el micetoma, pueden verse en las lesiones tuberculosas clásicas. Independientemente de todas estas reacciones huéspedes, los gránulos no son totalmente destruidos. La respuesta inmuno-inflamatoria puede lograr destruir los gránulos viejos, mientras que los nuevos continúan desarrollándose. En realidad, gran parte de la reacción pareciera estar asociada con la eliminación total de los gránulos, acompañada por reacciones Tipo I y Tipo II en la misma lesión. Es posible que las células gigantes de reacción Tipo II, las cuales parecen contener hifa viable, puedan dar continuidad a la infección (Nasher *et al* 1987). El mecanismo de curación del micetoma no está muy claro aún, debido a que la mayoría de los pacientes con micetoma acuden al centro hospitalario cuando ya los síntomas de la enfermedad están muy avanzados. Se desconoce si ocurre una cura que sane completamente la lesión por sí sola. El incremento de la reacción de hipersensibilidad de tipo retardado, puede ayudar a sanar la infección.

Cambios inmuno-histoquímicos en el micetoma

Las respuestas inmunes en las lesiones de micetoma causadas por *Streptomyces somaliensis*, se han caracterizado por medio de la inmuno-histoquímica (El Hassam *et al* 2001). Se mostró una reacción inflamatoria intensa alrededor de los gránulos. Con base en la composición celular, se pueden diferenciar dos tipos de informaciones. En la reacción Tipo I, las células del exudado inflamatorio se observaron estratificadas en tres zonas distintivas. La zona más interna estaba compuesta de neutrófilos (coloreando positivo para CD 15), que se adherían cerca de la superficie del grano. Los neutrófilos parecían atacar a los gránulos, provocando su fragmentación. IgG y/o IgM y el complemento, pudo ser demostrado dentro de los gránulos que contenían filamentos intactos. En la zona media, existía un área de células mononucleares, la mayoría de las cuales eran caracterizadas como macrófagos por inmuno-histoquímica (coloreando positivo para CD 18). Esta zona también contenía linfocitos T (coloreando positivo para CD 3) y algunos linfocitos B (coloreando positivo para CD 20). La zona externa estaba ocupada principalmente por linfocitos B. En la reacción Tipo II, los macrófagos y células gigantes multinucleares dominaban el infiltrado. La mayoría de los gránulos en la reacción Tipo II estaba compuesta por fragmentos consistentes de sustancia cementosa sin filamentos intactos.

Se asume que la reacción Tipo II sigue a una reacción Tipo I, usualmente después de que el grano había sido fragmentado por los neutrófilos. Al parecer, los organismos resisten la acción lítica complementaria, muy probablemente debido a sus paredes gruesas. Sin embargo, parece que los leucocitos neutrófilos son capaces de digerir la sustancia cementosa, en la cual se encuentran incrustados los filamentos y a través de sus enzimas son capaces de destruir el organismo. Una vez que se han fragmentado los gránulos, los macrófagos y las células gigantes son absorbidas por los gránulos dañados e inician su función depredadora. Es posible que productos de activación complementaria jueguen un papel de quimiostasis de los neutrófilos y los monocitos al grano. Estudios *in vitro* han demostrado que el complemento era necesario para la quimiostasis de los neutrófilos a los extractos antigénicos de los diferentes agentes que causan micetoma, incluyendo *S.somaliensis* (Yousif y Hay, 1987).

En *S.somaliensis*, el perfil de citocina, tanto en la lesión como en el nódulo linfático que drena, muestra una reacción dominante parecida a la Th2 (IL-10 y IL-4). No está claro el origen exacto de las células de las diversas citocinas, pero varios tipos de células identificados en las lesiones y en los nódulos linfáticos, son capaces de secretarlas. Al menos en el nódulo linfático, las células histiocíticas producen IL-4 en los centros germinales o en el alineamiento de los sinusoides. Es más probable que las células productoras de IL-4 en la paracortex sean células T, dado que una infección bacteriana secundaria es característica del micetoma (Ahmed *et al* 1998). Es casi seguro que los antígenos bacteriales

contribuyan a que se produzca esta reacción. La prevalencia de una respuesta o reacción inmune Th2, explica los altos niveles de inmunoglobulinas encontrados en pacientes con micetoma (Mahgoub y Murray, 1973). Teóricamente, este tipo de respuesta es la mejor para eliminar la bacteria extracelular, incluyendo los actinomicetos, tales como *S. somaliensis*. Aunque los neutrófilos son atraídos hacia el grano y los mismos parcialmente logran destruir algunos filamentos por medio de una reacción que parece ser anticuerpo-dependiente, con una citotoxicidad mediada por células, el proceso no es lo suficientemente efectivo en lograr destruir la mayoría de los gránulos presentes en la lesión. Esto se puede atribuir a dos razones principales. Primero, la sustancia cementosa en el grano dificulta el acceso de los neutrófilos a los filamentos. En segundo lugar, los filamentos tienen paredes gruesas que parecen proteger los componentes de las células subyacentes del efecto lítico de los componentes activados.

S.somaliensis genera una reacción de citoquina Th2 prevalente en la lesión primaria y en los nódulos linfáticos que drenan. Esto está asociado con la presencia de IgM y se complementa dentro y sobre la superficie del grano. Los neutrófilos y los macrófagos son absorbidos por los gránulos a través de fracciones complementarias. Los neutrófilos son células encargadas de la destrucción de algunos, pero no de todos, los gránulos.

Patología de los nódulos linfáticos en el micetoma

En los pacientes con actinomicetoma, los nódulos linfáticos locales se agrandan. En los casos iniciales de la enfermedad, la arquitectura de los nódulos se mantiene y los gránulos son esparcidos en la sustancia de los nódulos. En la proximidad de los gránulos se hayan neutrófilos, polimorfos, histiocitos y células gigantes, mientras que el resto de los nódulos presenta hiperplasia reactiva y depósitos de melanina y pigmentos hemosiderinos. En los casos más avanzados, existen en cantidades variables, tejidos fibroso-vasculares, y en los casos más tardíos no se pueden observar los tejidos linfoides. En los casos de nódulos donde no se observan elementos de actinomicetos, las células foliculares y/o células sinusoides podrían estar presentes. Existen muchas células plasmáticas que contienen cuerpos de Russell (Ahmed *et al* 1998).

Manejo de la infección

El tratamiento de los actinomicetomas depende principalmente de los agentes etiológicos y de la extensión de la enfermedad. Hasta hace poco, el único tratamiento era la amputación de la parte afectada o una extracción quirúrgica que dejaba inoperante al paciente. No se ha reportado caso alguno de mejoría sin tratamiento médico.

Tratamiento médico del actinomicetoma

En muchos centros asistenciales se realizan procedimientos quirúrgicos con la excisión bastante amplia de las lesiones o la amputación de la parte afectada, siendo estas prácticas quirúrgicas la forma de tratamiento más aceptada en las etapas avanzadas de la enfermedad. Sin embargo, el actinomicetoma responde más al tratamiento médico con antibióticos y a agentes quimioterapéuticos. Una terapia combinada de fármacos resulta mejor que un tratamiento de un solo medicamento, debido a que esto ayuda a prevenir la resistencia del organismo al fármaco. El tiempo promedio de duración del tratamiento es de un año. El tratamiento debe continuarse hasta que el paciente esté clínica, serológica, ultrasónica y radiológicamente curado. Este régimen puede administrarse sólo o como un adyuvante a la cirugía (Fahal y Hassan 1992; Mahgoub y Murray, 1973; Mahgoub 1976).

Un régimen de tratamiento médico consiste en lo siguiente: sulfato de streptomina: 1.4mg/Kg diarios por 30 días y en días alternos posteriores al tratamiento inicial; dapsona: 100mg diarios. Si no existe mejoría, la dapsona puede ser reemplazada con co-tri-moxazole: 14mg/Kg 2 veces al día o

rifampicina: 300mg diarios. El sulfato de amikacin ha sido utilizado con éxito (Mahgoub, 1976; Mahgoub, 1994; Mahgoub 1972; Welsh *et al* 1987).

Independientemente del régimen utilizado, debe proporcionarse tratamiento de soporte con gluconato ferroso y ácido fólico y monitorear constantemente la concentración de hemoglobina y pruebas para detectar las funciones del hígado. Cuando aparecen efectos colaterales, el tratamiento debe suspenderse temporalmente.

Cirugía en el actinomicetoma

La cirugía cumple un papel diagnóstico y terapéutico, la biopsia quirúrgica puede realizarse para obtener un diagnóstico histopatológico y una identificación histopatológica. La escisión quirúrgica se recomienda cuando el avance de la enfermedad se limita al tejido blando, sin comprometer el hueso; y para casos resistentes, en los que está involucrado el hueso, y además, cuando no existe respuesta después de haberse realizado un tratamiento médico prolongado. El propósito de la cirugía es la remoción total de la lesión o la reducción de su tamaño, seguido por un tratamiento médico. La lesión por actinomicetoma no tiene un límite claramente definido, por lo que se recomienda eliminar tejido sano cercano a la lesión. Para los casos de lesiones óseas localizadas, se recomienda un sencillo curetaje de hueso y la remoción del tejido blando.

Un campo o área quirúrgica sin la presencia de sangre, logrado por medio de un torniquete, constituye el procedimiento ideal para identificar los gránulos. Al terminar la cirugía, se recomienda rociar la herida con tintura yodada, para destruir los gránulos ocultos. La herida puede cerrarse inicialmente con suturas primarias retardadas. En muchos casos, puede requerirse de un injerto de piel.

En los casos avanzados, sólo la amputación podría tener éxito. El promedio de amputaciones realizadas varía del 25% al 50% de los casos (Fahal y Hassam, 1992; Fahal *et al* 1994). Para reducir la práctica de la amputación, se debe proceder a un programa de remociones extensas, repetidas, del tejido enfermo, incluyendo el hueso (procedimientos de remoción). Estos procedimientos de remoción deben acompañarse con quimioterapia (Fahal, 1992; Bendl *et al* 1987).

En los casos de actinomicetoma, el índice de recurrencia puede ser local o en la región del nódulo linfático. El promedio de recurrencia post-operatoria varía entre el 25% y el 50%, debido principalmente a una remoción inadecuada de los gránulos durante la cirugía. La remoción quirúrgica se debe realizar bajo anestesia general o raquídea.

Bibliografia

- Abbott PH. Mycetoma in the Sudan. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1956; 50: 11-24.
- Ahmed AOA; Adelman D; Fahal AH; Verbrugh HA; Van Belkum A; De Hoog S. Environmental occurrence of *Madurella mycetomatis*, major agent of human eumycetoma in Sudan. *J. Clini. Micro.* 2002 40(3): 1031-1036.
- Ahmed AOA; Fahal AH; Abugroun EAM; Zijlstra E; Belkum A van; Verbrugh HA. Unexpected high prevalence of secondary bacterial infection in mycetoma. *J. Clini. Microbiol.* 1998.
- Bendl BJ; Mackey D; AL Saati F; Sheth KV; Ofole SN; Bailey TM. Mycetoma in Saudi Arabia. *J. Trop. Med. Hyg.* 1987; 90: 51-59.
- Chouhan SS; Agarwal S. Histological diagnosis of mycetoma: A clinicopathological study of 24 cases. *Indian J. Med. Res.* 1969; 57(1): 71-77.
- Cockshott WP. Radiological pattern of the deep mycoses. Systemic mycoses. A CIBA foundation symposium. J. & A. Churchill Ltd., London. 1968, pp 113-125.
- Culligan GA; Grant C; Robbs GM; Crewe Brown HH. Actinomadura Pelletieri mycetoma from the Transvaal. *South Afr. Med. J.* 1985; 68(14): 416-418
- Davies AGM. The bone changes of madura foot. Observations on Uganda Africans. *Radiol.* 1958; 70: 841-847.
- Develoux M; Audoin J; Treguer J; Vetter JM; Warter A; Cenac A. Mycetoma in the Republic of Niger: Clinical features and epidemiology. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1988, 38(2): 386-390.
- EL Hag IA; Fahal AH; Khalil EAG. Fine needle aspiration cytology of mycetoma. *Acta Cytologica.* 1996; 40(3): 461-464
- EL Hassan AM; Fahal AH; Ahmed AO; Ismail A; Veress B. The immunopathology of actinomycetoma lesions caused by *Streptomyces somaliensis*. *Trans. Trop. Med. Hyg.* 2001: 95(1); 89-92
- EL Hassan AM; Mahgoub ES. Lymph nodes involvement in mycetoma. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1972; 66: 165-169.
- Fahal AH ; Hassan MA. Mycetoma. *Br. J. Surg.* 1992; 79: 1139-1141.
- Fahal AH; EL Toum EA; EL Hassan AM; Gumaa SA; Mahgoub ES. Host tissue reaction to *Madurella mycetomatis*: New classification. *J. Med. Vete. Myco.* 1995; 33: 15-17
- Fahal AH; Hassan MA; Sanhoury M. Surgical treatment of mycetoma. *Sud. Med. J.* 1994; 32: 98-104.
- Fahal AH; Sheikh HE; EL Hassan AM. Pathological fracture in mycetoma. *Transactions of Tropical Medicine and Hygiene* - 1996; 90: 675-676
- Fahal AH; Sheikh HE; EL Lider MA; Homeida MA; EL Arabi YE; Mahgoub ES. Ultrasonic imaging in mycetoma. *Bri J. Surg.* 1997; 78: 765-766
- Fahal AH; Suliman SH. Clinical presentation of mycetoma. *Sud. Med. J.* 1994; 32 (supp): 46-66.
- Fahal AH; Suliman SH; Gadir AFA; EL Hag IA; EL Amin FI; Gumaa SA; Mahgoub ES. Abdominal wall mycetoma: an unusual presentation. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1994; 88: 78-80

- Gonzalez-Ochoa A. Mycetoma. In: Clin. Trop. Derm. Edited by Canizares O. Oxford, Blackwell Scientific. 1975; pp 24-29.
- Gumaa SA; Mahgoub ES. Counter-immuno-electrophoresis in the diagnosis of mycetoma and its sensitivity as compared to immuno-diffusion. *Sabouraudia*. 1975; 13: 309-315.
- Gumaa SA; Mahgoub ES. Evaluation of the complement fixation test in the diagnosis of Actinomycetoma. *J. Trop. Med. Hyg.* 1973; 76: 140-142.
- Gumaa SA; Mahgoub ES; EL Sid MA. Mycetoma of the head and neck. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1986; 35(3): 596-600.
- Kamalam A; Thambiah AS. A clinico-pathological study of actinomycotic mycetoma caused by *Actinomadura madurae* and *Actinomadura pelletieri*. *Mycopathologia*. 1987; 97: 151-163.
- Lewall DB; Ofole S; Bendl BJ. Mycetoma. *Skeletal Radiol.* 1985; 14: 257-259.
- Magana M. Mycetoma. *Int. J. Dermatol.* 1984; 23(4): 221-236.
- Mahgoub ES. Medical treatment of mycetoma in the Sudan. *Sud. Med. J.* 1994;32 (supp): 88-97.
- Mahgoub ES. Clinical aspects of mycetoma. *Systemic mycoses. A CIBA Foundation Symposium. J. & A., Churchill Ltd. London.* 1968; pp 125-127.
- Mahgoub ES. Medical management of mycetoma. *Bull. W.H.O.* 1976; 54: 303-310.
- Mahgoub ES. Mycetoma. *Semin. Dermatol.* 1985; 4: 230-239.
- Mahgoub ES. Mycetoma: In *Tropical mycoses. Janssen Research Council, Belgium, 1989, pp 59-74.*
- Mahgoub ES. The value of gel diffusions in the diagnosis of mycetoma. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1964; 58(6): 560-563.
- Mahgoub ES. Treatment of actinomycetoma with sulphamethoxazole plus trimethoprim. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1972; 21(3): 332-335.
- Mahgoub ES; Murray IG. *Mycetoma. London, William Heinemann, Medical Books Ltd. 1973, pp. 1-50.*
- Mahgoub, SE. History of mycetoma in the Sudan. *Sud. Med. J.* 1994;32 (supp): 1-13.
- Mariat F; Destombes P; Segretain G. The mycetomas: clinical features, pathology, aetiology and epidemiology. *Contrb. Microbiol. Immunol.* 1977; 4: 1-39.
- Nasher M; Wethered DB; Hay RJ; Mahgoub ES; Gumaa SA. The ultrastructure of actinomycetoma grains caused by *Streptomyces somaliensis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1987; 37: 174-179.
- Welsh O; Saucedo E; Gonzalez J; Ocampo J. Amikacin alone and in combination with trimethoprim and sulfamethoxazole in the treatment of actinomycotic mycetoma. *J Am. Acad. Dermatol.* 1987; 17(3): 444-448.
- Yousif MA; Hay RJ. Leucocyte chemotaxis to mycetoma agents-the effect of the antifungal drugs griseofulvin and ketoconazole. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1987; 81(2): 319-321.

Tabla 11.1
Agentes causales del Actinomicetoma

Actinomicetes
<i>Streptomyces somaliensis</i> <i>Actinomadura madurae</i> <i>Actinomadura pelletieri</i> <i>Nocardia spp.</i>

Figuras



Fig 11.1: Actinomycetoma del pie, note el tamaño y extensión de las lesiones



Fig 11.2: Actinomycetoma del pie, note el gran comprometimiento de la extremidad



Fig 11.3: Actinomictoma de la mano derecha, note la gran masa tumoral y el comprometimiento de la mano



Fig 11.4: Actinomictoma de la cabeza y del cuello. Note la presencia del gran exoftalmo



Fig 11.5: Actinomictoma de la región perineal, note la presencia de los multiples abscesos y fistulas



Fig 11.6: Radiografía del pie, note la sombra de los tejidos blandos y la presencia de multiples cavidades (geodas), lesiones compatibles con el diagnóstico de actinomictoma.

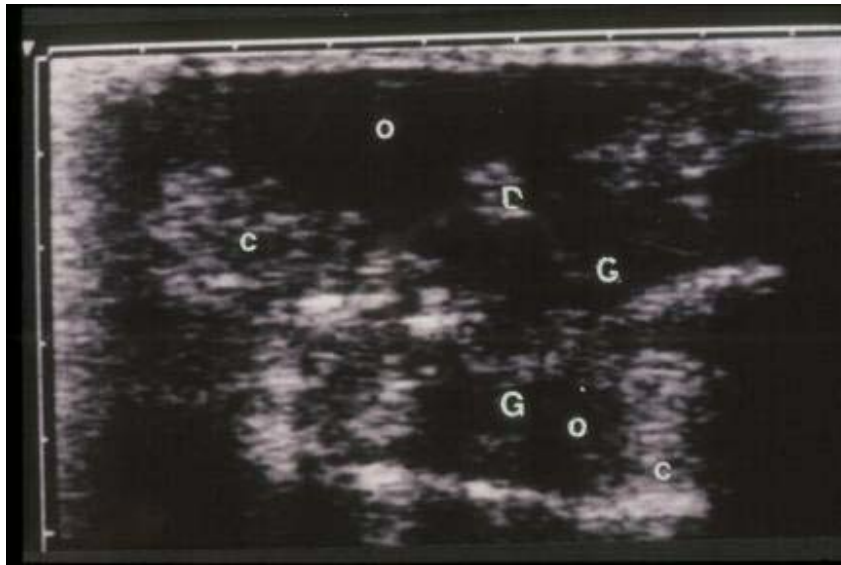


Fig 11.7: Ultrasonido del pie, se observan multiples cavidades, ecos hiperreflectivos.

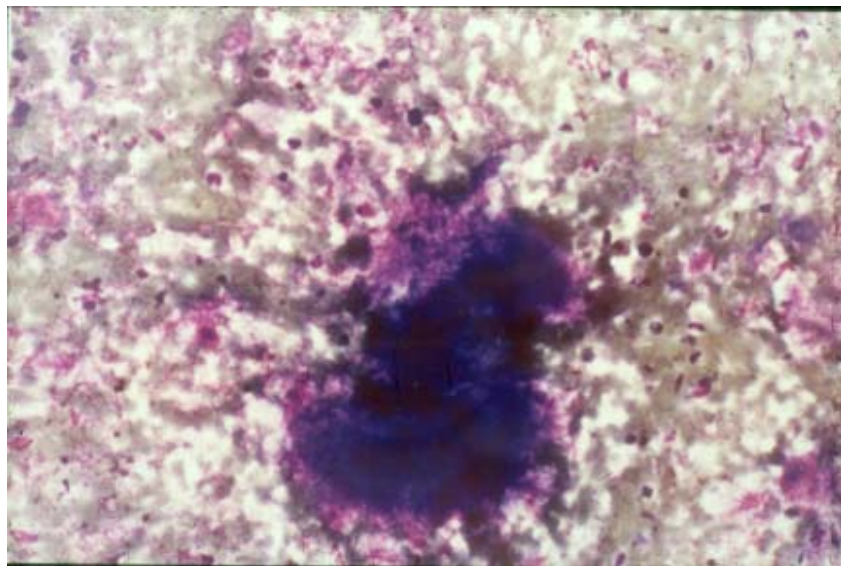


Fig 11.8: Extendido citológico en el cual se observa un grano de actinomicetoma.



Fig 11.9: Actinomicetoma de la nuca y de la cabeza antes del tratamiento.



Fig 11.10: Actinomicetoma de la nuca y de la cabeza (mismo caso indicado en la Fig. 11.9), después del tratamiento.

CAPÍTULO XII

EPIDEMIOLOGÍA DEL ACTINOMICETOMA EN LAS AMÉRICAS

José A. Serrano¹ y Darío Novoa-Montero²

¹ Instituto de Investigaciones. Sección de Biotecnología. Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, Edo. Mérida, Venezuela.

Correo electrónico (jacielo@cantv.net)

² Laboratorio Multidisciplinario de Investigación Clínico-Epidemiológica (LabMICE) y Sección de Investigación, Unidad de Medicina Interna, Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes, Mérida, Estado. Mérida, Venezuela. labmice@ula.ve; dmontero98@hotmail.com

ABSTRACT

The special features of aerobic actinomycetes infection and further evolution to clinical mycetoma from primary skin infection to clinical actinomycetoma have been studied since the early 1920's. Herein, we summarize historical, pathological, microbiologic, clinical and some aspects of ecologic and descriptive epidemiology of this chronic granulomatous infection. The cumulative knowledge about actinomycetomas gathered to date has led to international standardized criteria to define mycetomas. Advanced methods in microbiology and new serologic and biomolecular techniques have permitted defining different etiologic agents of mycetomas in humans and other animals.

A Review of publications presented in this chapter revealed that our current knowledge about actinomycetomas was derived primarily from clinical studies. Currently, there are no published reports on analytic epidemiological research based on case-control or cohort studies. Because of this, there is a lack of information between primary infection and clinical mycetomas, and estimates of the "true" prevalence of infection and incidence of clinical actinomycetomas in endemic areas are unknown. This fact motivated us to develop the "*multidisciplinary family-case biomedical and epidemiologic model to study pathogenic actinomycetes*". This model permits us to uncover unknown linkages between primary infection and clinical mycetomas based on small sample sizes within an endemic community. Thus, even with a low budget, answers as to why serological tests, biomolecular markers, genetic and immunologic markers may show that primary infection is very common in areas endemic for aerobic actinomycetes even though clinical actinomycetomas are relatively rare. Our model is especially elegant for use in third world countries, where economical resources are the main obstacles for carrying out farther epidemiologic research. Thereafter, primary and secondary prevention will be affordable to control this unsightly and incapacitating disease.

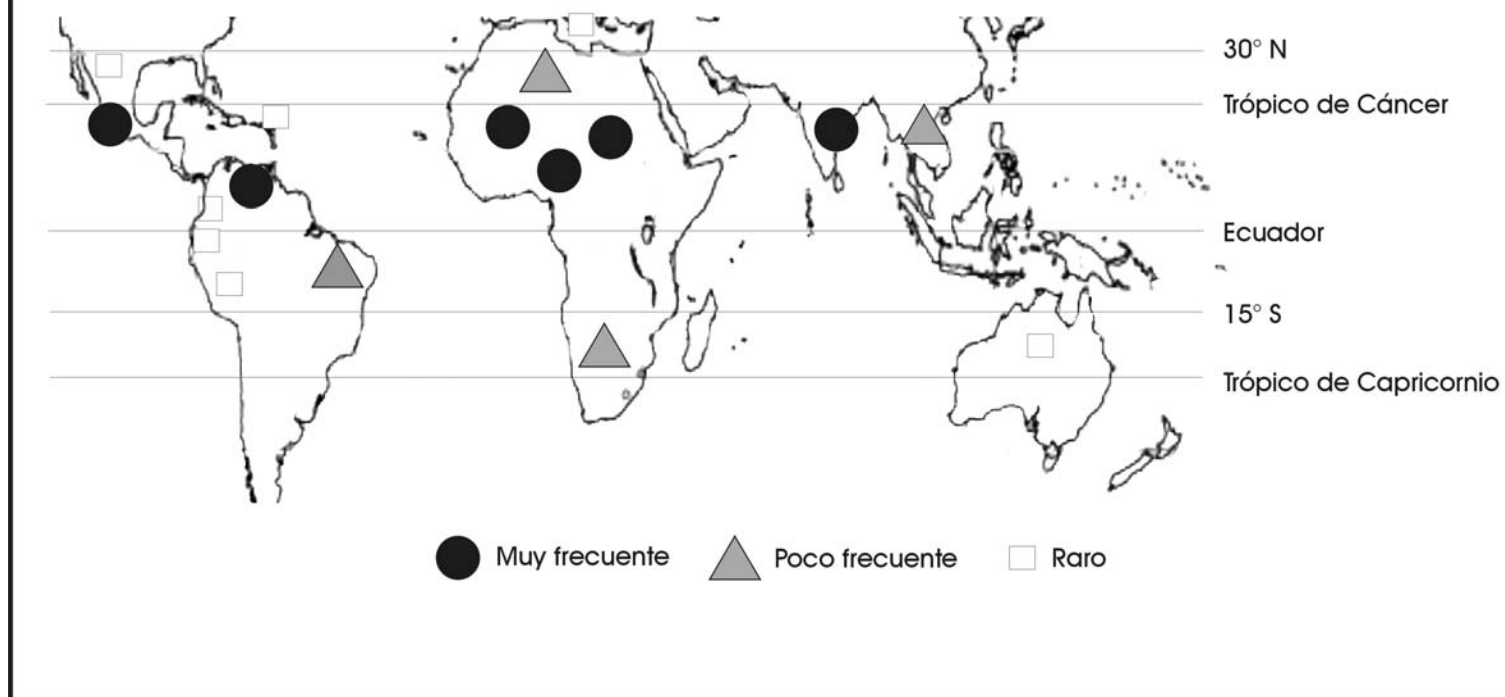
Datos generales

El actinomicetoma ha sido reportado en más o menos un 60% de las naciones del mundo, pero es mucho más frecuente en los países tropicales y subtropicales, en donde es endémico en ciertas zonas orográficas o nichos ecológicos (Ajello 1986, Develoux 1999, Joshi *et al* 2000, Serrano y Sandoval 2003). Es decir que los casos clínicos de actinomicetoma son raros en las zonas templadas o frías y, cuando se reportan, casi siempre corresponden a casos importados de las regiones endémicas. El actinomicetoma presenta una distribución de frecuencia muy desigual en los continentes donde es endémico. Además, se puede afirmar que "la verdadera" incidencia y prevalencia de la infección por actinomicetales patógenos productores del actinomicetoma en los países endémicos no ha sido establecida en forma precisa. El actinomicetoma como síndrome clínico se presenta como una enfermedad crónica casi siempre indolora, y de evolución muy lenta, es decir que la aparición del cuadro clínico es relativamente tardía en casi todas las personas que han sido infectadas por actino o eumicetos patógenos (Fahal & Hassan 1992, Gumaa 1994, Arenas 2003, Serrano & Sandoval 2003).

Casi todos los casos clínicos de actinomicetoma han sido reportados en áreas ecológicas específicas situadas entre los trópicos de Cáncer y de Capricornio. Las áreas endémicas parecen encontrarse entre las latitudes 30° norte y 15° sur de la línea ecuatorial (Serrano *et al* 1986, Joshi *et al* 2000). Esa zona es conocida como “*el cinturón geográfico del micetoma*” (*actino y eumicetoma*), e incluye a los siguientes países: Australia (Dementjeva, 1970), India (Venugopal & Venugopal 1977), naciones del África del Norte (Segretain & Destombes 1963), Somalia (Destombes *et al* 1977), Sudán (Abbott 1956; Gumaa *et al* 1978), Senegal (Develoux *et al* 1999), Nigeria (Gugnani *et al* 1981), Yemen (Yu *et al* 1993), Argentina (Serrano & Scaglione 1991; Negroni 1974); Brasil (Lacaz 1981; Londero & Ramos 1986; Wanke *et al* 1992; Castro *et al* 1993; Motta *et al* 2004), Colombia (Araujo & Castañeda, 1997); Costa Rica (Rodríguez *et al* 1988); Cuba (Albertini & Desvernini, 1901); Ecuador (Lazo 1986), Estados Unidos (Boyd & Curtehfield 1921; Green & Adams 1964; Tight & Bartlett 1981; Ajello 1986), Guatemala (Toledo 1983; Logemann, 1983; Chang & Logemann, 1992), Israel (Alteras & Feuerman, 1986), México (Lavalle 1966; López & Welsh 1992; Carrada *et al* 1995; Chávez *et al* 2002), Panamá (Burres, 1916), Uruguay (Conti-Díaz 1986) y Venezuela (Campíns 1960; Serrano *et al* 1986, 1987, 1995; Albornoz 1986; Serrano & Novoa-Montero 1994,1998,2001), Serrano & Sandoval (2003).

Mapa XII-1

Distribución de los casos de micetoma en el mundo. Estimación hecha por cantidad de casos reportados en cada país o región



Fuente Serrano JA, Sandoval AH 2003

Rev. abril 2005

Una visión de conjunto de los reportes de casos de micetomas publicados en el mundo, puede ser observada en el Mapa 12.1. El continente africano es el que presenta el mayor número de casos reportados. En general en África son más frecuentes los reportes de casos de *eumicetoma* que de *actinomicetoma*. Así, según Gumaa (1994), en Sudán, *Madurella mycetomatis* es el agente causal del 71,4% de todos los casos de *micetoma*; *Streptomyces somaliensis*, de un 18,0%; *Actinomadura madurae*, de un 5,3%; *Actinomadura pelletieri*, de un 2,7%; y el 2,6% de los casos restantes son debidos a *Nocardia brasiliensis* o *Nocardia asteroides*. En África Occidental y en India, *Actinomadura pelletieri* es un importante agente de actinomicetoma (Ver los capítulos VIII, IX, X y XI de esta obra).

Hay que tomar en cuenta que las estimaciones de mayor o menor frecuencia que presentamos en el Mapa 12.1, sobre la distribución del actinomicetoma o del eumicetoma en el mundo, no están sólo relacionadas con la distribución real de la enfermedad, sino que corresponden al interés que su estudio ha venido despertando en los clínicos e investigadores, y al otorgamiento de recursos logísticos de que dispusieron las instituciones donde se han llevado a cabo los estudios publicados en cada país.

La distribución geográfica de los agentes etiológicos del *actinomicetoma* es muy variable, pues está relacionada con los aspectos ecológico-ambientales, como son las zonas áridas en las cuales haya bajo índice pluviométrico anual (menor de 50-1000mm), estación de lluvias muy corta y una humedad relativa baja (menor de 80%) con una temperatura constante tanto en el día como en la noche, que oscila entre los 30°C a 37°C. En estas regiones se pueden distinguir dos épocas estacionales: una época de lluvias y otra de sequía. En la época de sequía la humedad relativa puede llegar del 12 al 30%, con temperaturas de 40° a 60°; y en la noche pueden registrarse temperaturas de 15°C a 18°C (Arenas 2003, Joshi et al 2000, Mahgoub & Murray 1973, Serrano & Sandoval 2003)

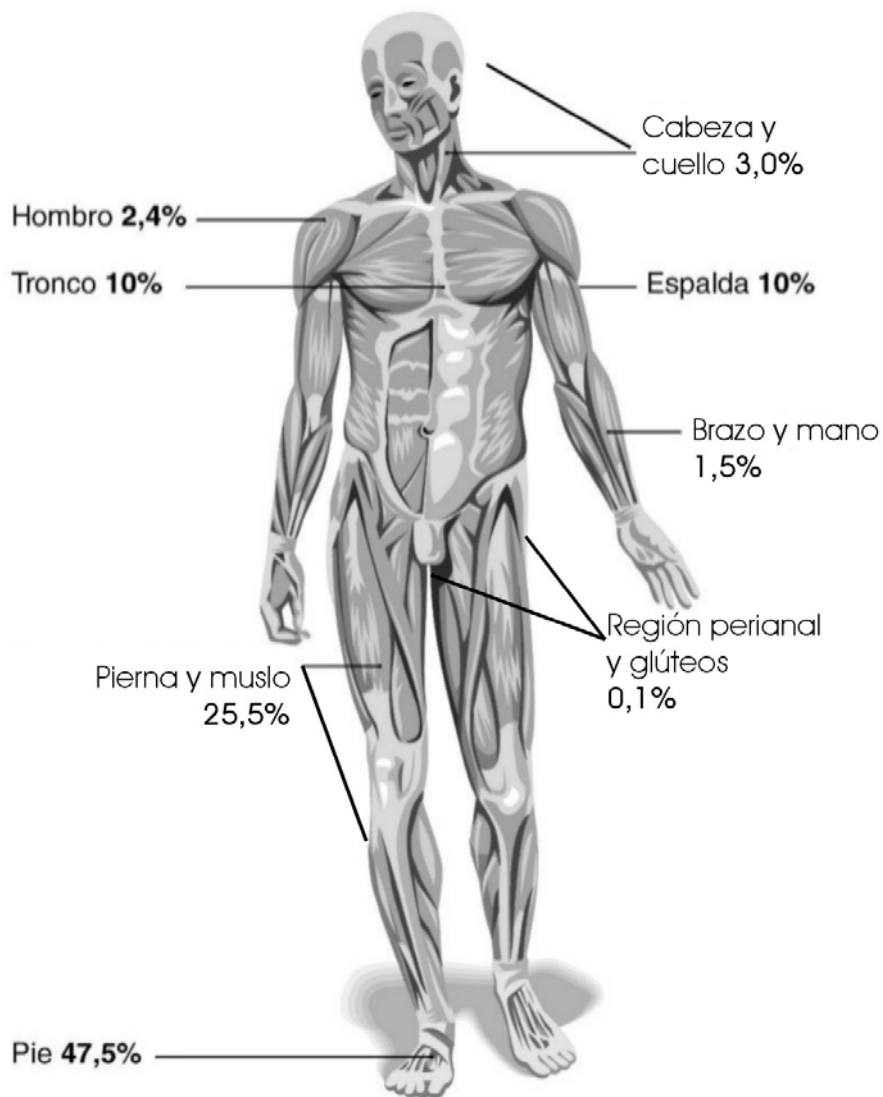
Los agentes causales del actinomicetoma son microorganismos cuyo hábitat principal es el suelo, en donde se encuentran en forma de filamentos. Es interesante observar que *N.asteroides*, *N.brasiliensis* y *A.madurae* prevalecen en zonas con un índice pluviométrico entre 500-2000mm de lluvia, y que el *S.somaliensis* es principalmente encontrado en regiones secas en las cuales se puede observar un índice pluviométrico no mayor de 50-500mm.

Cabe destacar que casos de actinomicetoma debidos a *N.brasiliensis* han sido reportados en México y en Venezuela en regiones con un índice pluviométrico de 500-1000mm de lluvia anual. (Mahgoub & Murray 1973, Serrano et al 1995; Develoux et al 1999; Joshi et al 2000).

Los agentes infecciosos penetran en los huéspedes a través de la piel, cuando sufren punciones con espinas, astillas de madera u otros objetos que causan traumas cutáneos (Serrano et al 1987; Fahal & Hassan 1992; Develoux et al 1999; Joshi et al 2000). Debe estar claro que es evidente que el trauma en la piel (cuando se establece la puerta de entrada del actinomiceto como infección primaria) es el inicio de la relación agente-huésped. Teniendo en cuenta que se trata de una enfermedad crónica, llama la atención que la incidencia del *cuadro clínico del micetoma* en los infectados no es muy elevada, a pesar de que la seropositividad como marcadora biológica de la infección debe ser muy frecuente en las zonas endémicas.

Distribución de los sitios anatómicos preferidos por el micetoma no inducido por actomicetales patógenos

En la Figura 12.1 se presentan datos sobre la distribución anatómica porcentual del actinomicetoma, basada en los reportes de 2.141 casos publicados en Las Américas. Se piensa que la infección causada por los agentes etiológicos del actino o del eumicetoma se desarrolla en forma no bien precisada aún, y que el hecho de que llegue a observarse el cuadro clínico del micetoma sería una resultante de las susceptibilidades individuales más que de la patogenicidad (o “virulencia”) del agente causal. En todo caso, quedará siempre claro que el cuadro clínico es una resultante de un “juego” cuyo punto inicial necesario pero no suficiente es la infección inicial; y luego se añaden los otros factores de riesgo de la red causal. La resultante clínica final –cuando se dan características individuales poco definidas todavía– es la aparición del cuadro clínico del micetoma. La cadena entre el evento inicial y el final es un problema heurístico que debe ser aclarado lo más pronto posible. A nivel individual la prevención de la infección inicial radica en usar la debida protección en los pies y en las manos cuando los individuos realizan labores de campo, en especial los agricultores. Entre los factores intervinientes. Para que el proceso evolucione desde la infección inicial hasta la aparición del cuadro clínico, deben considerarse las condiciones inmunológicas individuales y los defectos en la inmunidad mediada por células (Ortiz-Ortiz *et al* 1976; Salinas-Carmona, 2000).



Rev. abril 2005

Figura 12.1: Localización anatómica porcentual del actinomicetoma en el hombre, estimada con base en lo observado en 2.141 casos recopilados por diversos autores en diferentes países de Las Américas (según autores citados en la Tabla 13.5).

Antecedentes históricos en el estudio de los micetomas

En la Tabla 12.1, se presenta una secuencia cronológica de la evolución histórica en la acumulación de conocimientos tanto empíricos como clínico-científicos sobre el micetoma. Nótese que las primeras descripciones del micetoma en Las Américas datan de principios del siglo veinte.

Tabla 12.1

Antecedentes históricos del micetoma

Antes del siglo XVIII, ya el micetoma había sido descrito en los libros védicos del Atharva Veda (India) como *padvalmicum* (“hormiguero del pie”). Desde la antigüedad, en Sudán (África) lo han llamado *nebit* (“crecimiento”).

1714	Los misioneros franceses, en Pondicherry (India) describieron el micetoma como <i>fourmilier des vers</i> (“gusanera“).
1814	Gill, en Madura, (citado por H. v. Carter 1860, 1874, India) describió los aspectos clínicos fundamentales del micetoma.
1846	L. Colebrook lo denominó <i>Pie de Madura</i> . (citado por Chouhan y Agarwal 1966) J. Godfrey observó la presencia de “granos negros” y denominó al micetoma <i>morbus tuberculosis pedis</i>.
1860	Henry van Carter introdujo la definición del término micetoma [de <i>miceto</i> , hongo; y <i>oma</i> , tumor] por ser una lesión semejante a un tumor causada por infección por hongos.
1874	Henry van Carter diferenció “granos negros” y “granos claros” que observó en las lesiones del micetoma.
1884 -1929	Se reportaron los primeros casos de micetoma en África: Sudán (A. Balfouer 1904), Senegal (A. Le Dantec 1929) y otros países africanos (M. H. Vincent 1894; M. A. Laveran 1902 y E. Brumpt 1906).
1874 -1927	Se reportaron los primeros casos de micetoma en México (M’ Questin 1874; R. Cicero 1912; F Ocaranza 1914); en Estados Unidos (Kemper & Jameson 1876); en Canadá (Adami & Kirkpatrick 1895); en Cuba (Albertini y Desvernine 1901); en Panamá (Burres 1916) en Brasil (Pacheco Mendes, citado por Yazbek 1920); y en Venezuela (R. Rangel citado por Rísquez 1927).

Rev. mayo 2005

Fuente: Lavalley P 1966; Lacaz 1981; Serrano *et al* 1986, Serrano & Sandoval 2003; López & Welsh 1992; Develoux *et al* 1999; Joshi *et al* 2000; Arenas 2003; Boyd & Curtehfield 1921; Green & Adams 1964; Ajello 1986.

Criterios diagnósticos del actinomicetoma

El *actinomicetoma* está incluido entre el grupo de enfermedades transmisibles (Chin, 2000) y la Clasificación Internacional de Enfermedades (CIE/ICD) lo cataloga con el código ICD/IEA9 0039 (OMS/WHO 1975), o con el código ICD/IEA10 B47 (OMS/WHO 1990).

El actinomicetoma está definido por la OMS/WHO como “Un síndrome clínico causado por una variedad de actinomicetos aeróbicos, caracterizado por hinchazón y supuración de tejidos subcutáneos y formación de tractos cavernosos con gránulos visibles en el pus que drena de los tractos cavernosos. Las lesiones son por lo general en el pie o parte inferior de la pierna, algunas veces en las manos, hombros y espalda y raramente en otros sitios” (Chin, 2000). (Esto coincide con la recopilación que se presenta en la Figura 12.1 de este capítulo).

El “*diagnóstico final consolidado*” de cada caso de actinomicetoma se basa en la síntesis coordinada de los siguientes criterios:

Los *aspectos clínicos* en cada paciente, que correspondan a una lesión que se caracteriza por la presencia de una tríada sintomática, constituida por edema, fistulas y descarga de secreciones seropurulentas, que contengan los granos (producidos por el agente etiológico responsable). (Ver Capítulo XI de esta obra).

Los *estudios radiológicos* (u obtenidos por otros métodos de *imagenología*), que revelen la extensión de las lesiones causadas por el actinomicetoma en el tejido subcutáneo, muscular y óseo. Con las técnicas de ultrasonido (imagenológica) se puede diferenciar el eumicetoma del actinomicetoma y el micetoma de otros tipos de lesiones crónicas no micetomatosas. (Fahal y Hassan 1992; Fahal 2000, Serrano *et al* 2001a). (Ver Capítulo XII de esta obra).

Los *exámenes macro y microscópicos* de los granos expulsados a través de las fistulas presentes en la lesión, que permiten diferenciar por la forma, tamaño, color y consistencia a los diferentes agentes etiológicos del actinomicetoma. (Ver Capítulo I de esta obra).

Los *cultivos bacteriológicos* en medios enriquecidos, que permiten el crecimiento y aislamiento de los actinomicetales. Las características morfológicas del crecimiento celular obtenido es estudiado usando la coloración de Gram y de Kinyoun; y estas técnicas se pueden complementar con una serie de pruebas fisiológicas y bioquímicas, que permiten caracterizar a los diferentes agentes. (Ver Capítulo I de esta obra).

El *diagnóstico histopatológico* de las muestras tomadas por biopsia o por aspiración de las lesiones macroscópicas con aguja fina, que pongan en evidencia un tejido con una respuesta inflamatoria de tipo agudo o del tipo granulomatoso, a lo que puede unirse la presencia de granos que varían en su estructura y color según el agente causal. (Ver Capítulo VI de esta obra).

Los resultados de las *pruebas serológicas e inmunológicas*. Las técnicas básicas en uso son la contrainmunolectroforesis (Fahal, 2000), la inmunodifusión (Fahal, 2000) y la prueba Elisa (Fahal, 2000). Esas pruebas serológicas permiten detectar diferentes tipos de anticuerpos circulantes en pacientes con infecciones debidas a actinomicetos patógenos. Así mismo, con esas técnicas se puede identificar y clasificar a diferentes actinomicetos patógenos. Así se complementan los resultados obtenidos por la identificación del agente con las respuestas fisiológicas y bioquímicas que son diferentes según cada actinomiceto. (Ver Capítulo V de esta obra).

Los estudios que usan las *técnicas de PCR* (*‘polimerase chain reaction’*). El uso de sondas de ácido nucleico permite reconocer la especiación y la presencia de actinomicetos patógenos en muestras biológicas. Estas técnicas proporcionan la evidencia “final” de las pruebas (b), (e) y (f) anteriores. (Ver Capítulo II de esta obra).

La secuencia metodológica de los estudios enumerados, que debe seguirse en los pacientes para lograr el diagnóstico de confirmación del actinomicetoma, se basa en la larga experiencia acumulada por diversos clínicos e investigadores en el manejo de esta enfermedad. Fahal (2000) propone una guía general para la organización de los servicios clínicos y de estudio e investigación del micetoma. Esta guía constituye la base de la organización que se sigue en Sudán, África, en la atención clínica de los pacientes con patología sospechosa de ser micetoma. Sugerimos al lector interesado que consulte esa guía en la página Web <http://www.mycetoma.org> (Fahal, 2000).

Agentes etiológicos del actinomicetoma

Los agentes etiológicos más comunes de los micetomas (tanto eumicetomas como actinomicetomas) se encuentran listados en la Tabla 12.2. En este capítulo nos interesa destacar los agentes del actinomicetoma (Columna derecha de la Tabla 12.2).

En Venezuela, *A. madurae* es el principal agente etiológico del actinomicetoma (38.8%), seguido por *N. brasiliensis* (32.8%). En Brasil, *N. brasiliensis* es el agente más reportado (47%) (Albornoz, 1986; Serrano *et al* 1986, 1987, 1995). En México, *Nocardia brasiliensis* se ha encontrado en el 87% de los casos, seguido por *Actinomadura madurae*, *Streptomyces somaliensis*, *Actinomadura pelletieri*, *Nocardia asteroides* y *Nocardia otitidiscaviarum* (López & Welsh 1992; Dávila *et al* 1996, Chávez *et al* 2002; Arenas 2003).

Tabla 12.2
Agentes etiológicos del micetoma comprobados hasta 2003

MICETOMAS EUMICÓTICOS (Fúngicos)	MICETOMAS ACTINOMICÓTICOS (Bacterianos)
<i>Acremonium kiliense</i>	<i>Actinomadura madurae</i>
<i>Acremonium falciforme</i>	<i>Actinomadura pelletieri</i>
<i>Acremonium recifei</i>	<i>Nocardia asteroides</i>
<i>Aspergillus nidulans</i> o sp.	<i>Nocardia brasiliensis</i>
<i>Cochliobolus spicifer</i>	<i>Nocardia coeliaca</i>
<i>Curvularia geniculata</i>	<i>Nocardia dassonvillei</i>
<i>Curvularia lunata</i>	<i>Nocardia otitidiscaviarum</i> (antes <i>N. cavie</i>)
<i>Exophiala jeanselmei</i>	<i>Streptomyces albus</i>
<i>Fusarium</i> sp. (<i>F. moniliforme</i> , <i>F. solari</i> , <i>F. oxysporum</i>)	<i>Streptomyces griseus</i>
<i>Leptosphaeria senegalensis</i>	<i>Streptomyces somaliensis</i>
<i>Leptosphaeria tompkinsii</i>	
<i>Madurella grisea</i>	
<i>Madurella mycetomatis</i>	
<i>Neotestudina rosatii</i>	
<i>Pseudoallescheria boydii</i>	
<i>Pseudochetosphaerionema larense</i>	
<i>Pyrenochaeta romeroi</i>	
<i>Pyrenochaeta mackinnonii</i>	

Rev. abril 2005

Fuente: Salfelder *et al* 1979; OMS-OPS, 1990; Serrano *et al* 1995, Chin J. APHA, 2000; Serrano & Sandoval 2003.

Los actinomicetos patógenos que se han encontrado en especímenes clínicos están resumidos en la Tabla 12.3, en la que presentamos la lista de los agentes patógenos actinomicóticos que han sido reportados en el hombre y vertebrados superiores, y sus principales formas de enfermedades clínicas. Se presenta en negritas la palabra micetoma para llamar la atención sobre los agentes que nos interesa destacar en esta obra.

Tabla 12.3
Actinomicetos patógenos encontrados en especímenes
de casos clínicos hasta 2003

Agente	Actividad como patógeno	Enfermedad clínica
<i>Nocardiosis dassonvillei</i>	Común en el hombre	Micetoma
<i>Actinomadura madurae</i>	Común en el hombre	Micetoma
<i>Actinomadura pelletieri</i>	Común en el hombre	Micetoma
<i>Streptomyces somaliensis</i>	Común en el hombre	Micetoma
<i>Nocardia brasiliensis</i>	Común en el hombre	Micetoma , a veces nocardiosis
<i>Nocardia asteroides</i>	Común en el hombre	Nocardiosis, a veces micetoma
<i>Nocardia otitidiscaviarum</i>	Común en el hombre	Nocardiosis y micetoma
<i>Nocardia farcinica</i>	Rara en el hombre Común en animales	Nocardiosis
<i>Actinomyces israelii</i>	Común en el hombre	Actinomicosis
<i>Actinomyces naeslundii</i>	Común en el hombre	Actinomicosis
<i>Dermatophilus congolensis</i>	Común en animales	Dermatitis

Rev. abril 2005

Fuente: Mahgoub & Murray, 1973; Joshi *et al* 2000; Serrano & Sandoval 2003

Epidemiología descriptiva: recopilación de casos clínicos *per se*, y estudios en modelos animales

La mayoría de los pacientes que padecen micetomas son agricultores o miembros de sus familias que ayudan en labores del campo. En áreas endémicas también han sido reportados casos en comerciantes, estudiantes, deportistas, amas de casa, trabajadores y personas con otras ocupaciones que en su trajinar se exponen a la primo-infección, o porque la misma se produce por un hecho fortuito. (Albornoz 1986; Serrano *et al* 1987; Develoux *et al* 1999; Joshi *et al* 2000). Arenas *et al* (1981) reportaron diez casos de minimicetomas múltiples debidos a *Nocardia brasiliensis*.

En la Tabla 12.4 presentamos el resumen de los casos de actinomicetoma reportados en Venezuela entre 1978 y 2003 (Serrano *et al* 1995, actualizada para 2003). Puede observarse que más de la mitad, 39/69 (56.5%), corresponden al Estado Lara; y que 42% corresponden a otros ocho estados (provincias) venezolanos. En los restantes 13 estados de Venezuela sólo se ha reportado el 1.5% de los casos.

También se han reportado casos de actino o eumicetoma en animales que habitan en regiones endémicas a los actino y eumicetales, tales como chivos, caballos, perros y gatos (Gumaa *et al* 1978; Reinke *et al* 1986; Beaman & Sugar, 1983). Los mecanismos de infección de los agentes etiológicos del actinomicetoma también han sido estudiados utilizando modelos animales (Zlotnik &

Buckley, 1980; Vera-Cabrera *et al* 1998; Salinas-Carmona, 2000). Para ampliar conocimientos al respecto, se recomienda leer el Capítulo IV escrito por Zlotnik en este mismo libro.*

Recopilación de casos de actinomicetoma reportados en Venezuela y en Las Américas

En Venezuela, el actinomicetoma, como enfermedad, predomina en la región centro-occidental del país, en los estados Lara y Falcón (Serrano *et al* 1987). También se han reportado casos en los estados centrales, en el Zulia y en Guayana (Campíns 1960, 1961; Serrano *et al* 1986,1987, 1995, Serrano 1995; Albornoz, 1986; Hevia *et al* 1986; Pérez-Blanco *et al* 1996). El Mapa 12.2 muestra “la densidad” de la frecuencia de actinomicetomas diagnosticados en las diferentes regiones de Venezuela, con base en los 69 casos reportados entre 1962 y el 2003 (de la Tabla 12.4). Así en la región centro-occidental (Lara y Falcón) se recopilaron 47/69 (el 68.1%); en la región central (Miranda, Distrito Capital, Aragua y Yaracuy) se recopilaron 17/69 (24.6%); en Zulia se reportaron 3/69 (4.4%); y en Los Andes-Barinas, 2/69 casos (2.9%). En las regiones nor-oriental, sur y de Guayana, por la experiencia de Serrano (1987) se sabe que existen casos esporádicos, pero no tenemos las referencias de que se hayan publicado. Si observamos el mapa de Venezuela (Mapa 12.2), vemos que el 97.1% de los casos se atendieron en las regiones centro-occidental, central y zuliana, en las que existe vegetación xerofítica y tienen bajo índice pluviométrico; y que el 2.9% de la región de Los Andes procedió también de nichos ecológicos similares.

En cuanto a la distribución de los casos recopilados en Las Américas, podemos decir que en México se han reportado actinomicetomas en casi toda la República. Predomina en los estados de Morelos, México, Jalisco, Veracruz, Oaxaca, Michoacán, Guerrero, Hidalgo y Nuevo León (Lavalle 1966; López & Welsh 1992; Welsh *et al* 1994; Dávila *et al* 1996; Chávez *et al* 2002; Arenas 2003).

En Brasil han sido reportados casos de micetoma en los estados de Bahía, Ceará, Espírito Santo, Minas Gerais, Pernambuco, Río Grande do Sul, Río de Janeiro y São Paulo (Lacaz 1981; Londero & Ramos 1986; Wanke *et al* 1992; Castro *et al* 1993; Motta *et al* 2004). El Mapa 12.3 muestra la distribución geográfica de los casos de actinomicetoma reportados en Las Américas. Sin entrar en detalles, los comentarios que podemos hacer al mirar el Mapa XIII-3, son similares a los que hicimos sobre zonas xerofíticas, índices pluviométricos como en el Mapa XII-2 que corresponde a Venezuela.

En la Tabla 12.5 se presenta el resumen de las series de casos que se han reportado en diferentes países de Las Américas entre 1901 y 2003. El reporte de casos fue máximo en México (85.94%); mediano en Venezuela, Brasil y Guatemala (entre 2% y 4%), así juntos suman el 95,89% (2.053/2.141) de los casos reportados. El comentario pertinente es que, aún cuando los porcentajes pudieran basarse en un buen estimador del numerador de la prevalencia de casos de actinomicetoma en Las Américas, es claro que el mayor o menor número reportado debe corresponder al interés de los grupos de investigadores que estudiaron los casos en cada país. De nuevo insistimos en que el mayor o menor número de casos reportados en la literatura publicada fue una resultante de haber sido estudiados en los nichos ecológicos ya conocidos, y al interés de los grupos de investigadores clínicos que los reportaron.

Por eso se entiende que la “verdad” sobre la prevalencia de la enfermedad clínica del micetoma en Las Américas quedaría aún por ser establecida, ya que los datos censales de la población en riesgo no se

*

Para encontrar las respuestas pertinentes y armar el rompecabezas de la relación hospedero-parásito que permita entender el porqué si la infección por actinomicetales es relativamente frecuente en las personas que laboran en los nichos ecológicos de los actinomicetos patógenos, la enfermedad clínica es tan poco frecuente, Novoa y Serrano han propuesto el modelo *Multidisciplinary family case biomedical model to study actino and eumycetoma*. (Novoa-Montero *et al* 1994, 1996a, 1996b, 1997, 1999 y 2002). De esto nos ocuparemos en detalle en el Capítulo XIII de esta obra.

han establecido y los casos conocidos son un sub-registro de los que en realidad ocurren. La explicación detallada de esta aporía la presentamos en los dos párrafos finales de este Capítulo.

Frecuencia del actinomicetoma por edad, género y partes del cuerpo humano afectadas, en Las Américas

Una visión sinóptica de la distribución de los casos reportados en regiones orográficas de Las Américas se puede ver en el Mapa 12.3; y por países, en la Tabla 12.5. La enfermedad se ha observado en niños desde 3 años hasta en adultos de 80 años, pero predomina en la segunda década de la vida. Aunque es un comentario “anecdótico”, el hecho de que el micetoma se haya observado en niños de 3 años, indicaría que la aparición de la manifestación clínica de la primo-infección por actinomicetales patógenos tendría un mínimo de alrededor de unos dos y medio años para hacerse patente clínicamente. Las variables explicativas y las intervinientes que puedan acelerar o retardar la aparición clínica del micetoma, podrían ponerse en evidencia usando el modelo de investigación clínico-epidemiológica que proponemos en el Capítulo XIV de esta obra. Por ahora sabemos que el actinomicetoma es dos veces más común en hombres que en mujeres, y que el mayor número de casos se ve en campesinos. Afecta principalmente los miembros inferiores en los cuales se encuentra el 73% de la serie recopilada en la Figura 12.1 (Campíns 1960; Lacaz 1981; Arenas *et al* 1981; Arenas & Navarrete 1990; López & Welsh 1992; Serrano 1993; Serrano *et al* 1995; Develoux *et al* 1999). Chávez *et al* (2002), reportaron 20 casos de actinomicetoma en la región perianal, en México, lo cual representa una serie de casos de esta localización poco frecuente en los reportes de casos de actinomicetoma (0,1% de los casos en Las Américas). Tan sólo algunos casos de localización en los glúteos han sido reportados en África (4 casos en África del Oeste y 1 caso en Nigeria). (Gugnani H, 1981; Develoux M, 1999). (*Ver Capítulos VIII y IX de esta obra*).

TABLA 12.4

Frecuencia de casos clínicos de actinomicetoma reportados en Venezuela, por agente causal y por estados (provincias) (1962 - 2003)

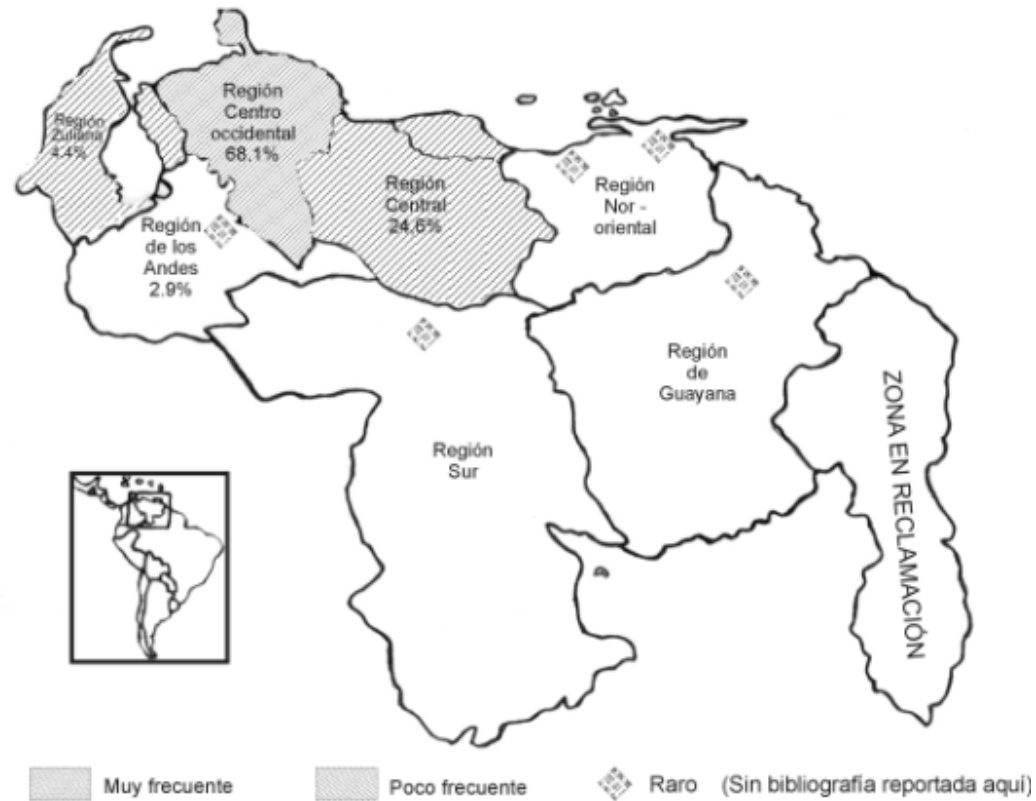
Estado (Provincia)	<i>Actinomadura</i>		<i>Nocardia</i>				<i>Streptomyces</i>	Total*
	<i>madurae</i>	<i>pelletieri</i>	<i>asteroides</i>	<i>brasiliensis</i>	<i>otitidiscaviarum</i>	(<i>Spp.</i>)	<i>somaliensis</i>	
Lara	13	-	3	9	1	8	5	39
Falcón	3	-	-	3	-	2	-	8
Miranda	3	-	-	4	-	-	-	7
D.C.	2	-	-	2	-	1	-	5
Aragua	2	-	-	1	-	-	-	3
Zulia	2	1	-	-	-	-	-	3
Yaracuy	1	-	-	1	-	-	-	2
Mérida	-	-	-	1	-	-	-	1
Barinas	-	-	-	1	-	-	-	1
Total	26	1	3	22	1	11	5	69

Fuente: Serrano *et al* (1986; 1987) (Actualizada hasta 2003)

Rev. abril 2005

* Se advierte que las estimaciones porcentuales que se presentan en el Mapa 12.2 están calculadas sobre el denominador de 69 casos, lo cual no es "ortodoxo" en epidemiología. Es decir, que aunque esas estimaciones no sean "convincientes", expresan lo que los autores de este capítulo pudimos recopilar en los trabajos publicados. Nótese que la serie de 39 casos recopilados en Lara, fueron estudiados por Serrano *et al* desde 1962 a 2003. Pensamos que en las otras zonas (Mapa XIII-2) hubiera sido mayor el número de casos si hubiera habido otro grupo de investigadores que hubieran estudiado su propia serie de casos.

Mapa XII-2
 Distribución geográfica de los 69 casos reportados de micetoma en Venezuela,
 por regiones orográficas (nichos ecológicos) 1962-2003



Fuente: Campíns 1960, Albornoz 1986, Serrano *et al* 1986, 1987 (Datos de la Tabla XIII-4) Rev. abril 2005

Estas regiones orográficas (nichos ecológicos) se caracterizan por:

- a) Poseer mucha vegetación xerofítica
- b) Índice pluviométrico anual de 50-1400 mm

Mapa XII-3
Distribución geográfica de los 2.141 casos de micetoma en Las Américas (1901-2003)



Rev. abril 2005

Fuente: Datos de la Tabla 12.5. La estimación de la frecuencia (muchas o pocas) es aproximada a lo reportado en esa tabla. La frecuencia "raro" es una estimación que puede no tener basamento en la Tabla 12.5.

Estas regiones orográficas (nichos ecológicos) se caracterizan por:

- a) **Poseer mucha vegetación xerofítica**
- b) **Índice pluviométrico anual de 50-1400 mm**

Tabla 12.5

Número de casos reportados de actinomicetoma en Las Américas, por países y agentes etiológicos (1901 – 2004)

País	Número de casos	Porcentaje	Agentes etiológicos más frecuentes	Autores (Referencias)
México	1.844	(85,85%)	<i>N.brasiliensis</i> y <i>A.maduræ</i>	M' Questin 1874; F. Ocaranza 1914; Lavalle 1966; Arenas et al 1981; Arenas & Navarrete 1990; López & Welsh 1992; Welsh 1994; Dávila et al 1996; Chávez et al 2002
Guatemala	83	(3,86%)	<i>N.brasiliensis</i>	Toledo 1983; Logemann 1983; Chang & Logemann 1992
Venezuela	69	(3,21%)	<i>A.maduræ</i> y <i>N.brasiliensis</i> <i>S.somaliensis</i>	Campíns 1960,1961; Alborno 1986; Hevia et al 1986; Pérez Blanco et al 1996; Serrano et al 1986, 1987, 1995, 1998, Serrano & Novoa-Montero 1994,1996
Brasil	61	(2,84%)	<i>N.brasiliensis</i> <i>A.maduræ</i>	Lacaz 1981; Londero 1986; Wanke et al 1992; Castro et al 1993; Motta et al 2004
Estados Unidos	30	(1,40%)	<i>N.brasiliensis</i> y <i>A.maduræ</i>	Boyd & Curtehfield 1921; Ajello 1986
Ecuador	21	(0,98%)	<i>N.brasiliensis</i>	Lazo 1986
Argentina	20	(0,93%)	<i>N.brasiliensis</i> y <i>A.maduræ</i>	Negróni 1974; Serrano & Scaglione 1991
Costa Rica	9	(0,42%)	<i>N.brasiliensis</i>	Rodríguez et al 1988
Uruguay	8	(0,37%)	<i>N.brasiliensis</i>	Conti-Díaz 1986
Cuba	2	(0,09%)	<i>Grano Agente no definido</i>	Albertini & Desvernine 1901
Panamá	1	(0,05%)	<i>Grano Agente no definido</i>	Burres 1916
Total	2.148	(100,0%)		

Rev. mayo 2005

Medidas de prevención primaria contra la infección de actinomicetales patógenos y del micetoma clínico en zonas endémicas

Las acciones médico-educativas y sociales que pueden contribuir a disminuir el impacto social de las infecciones causadas por los actinomicetos y eumicetos productores de micetoma están resumidas en la Tabla 12.6.

Tabla 12.6

Acciones médico-educativas que pueden contribuir a disminuir el impacto social de las infecciones causadas por los actinomicetos y eumicetos productores de micetoma

Solicitar a los Ministerios de Salud, Agricultura y Educación de los países en los que el micetoma es endémico, que financien y coordinen programas de información y de educación sanitaria que sean precisos (por comunicación escrita, radial, audiovisual y visitas domiciliarias). Los programas deben tener impacto positivo sobre las medidas de prevención primaria de la primo-infección, para evitar que los agricultores sufran heridas o excoriaciones en pies y manos al trabajar en el campo. Esta actividad puede implicar que -en algunas zonas- ciertas instituciones (Ministerio de Salud y Desarrollo Social, Ministerio de Agricultura y Tierras, compañías agropecuarias o sociedades no gubernamentales sin fines de lucro) subsidien los programas de educación adaptados a cada comunidad.

Lograr que los campesinos de las zonas endémicas a los *actinomicetales patógenos*, con o sin subsidio institucional, usen siempre calzado y guantes que los protejan de heridas o excoriaciones en pies y manos cuando realizan sus labores en el campo (los dueños de los fundos o de las cooperativas agrícolas deberían facilitarlos a los trabajadores que no tengan subsidio para comprarlos).

Desarrollar programas concretos de educación sanitaria en las escuelas rurales para que los niños aprendan el uso de calzado. Se debe lograr que las instituciones y compañías organizadas doten de calzado a los niños de escasos recursos que estén en riesgo de infectarse, aún cuando no sean trabajadores o ayudantes de los trabajadores en el campo.

Incentivar a las asociaciones de vecinos y a los grupos gremiales o comunales para que los agricultores y campesinos logren obtener y usar guantes y calzados en sus labores agropecuarias. Esto se puede presupuestar dentro de los financiamientos de la atención primaria en la llamada "participación comunitaria". Puede ser que muchos trabajadores los obtengan de las instituciones o en compañías en que trabajen, o de su propio peculio.

Ampliar la información biomédica y el entrenamiento sobre las técnicas de cultivo, aislamiento y tinción de las bacterias y hongos productores de micetoma. Ello debe lograrse a través de cursos de Microbiología que se dicten en las Escuelas de Medicina y Enfermería (entre otras), en las cuales se debe resaltar la importancia del diagnóstico temprano de la infección por actinomicetales, para evitar el desarrollo del cuadro clínico, e implantar el tratamiento correcto precoz del micetoma clínico, apenas se diagnostique. Así se evitaría que las personas enfermas presenten los resultados antiestéticos y discapacitantes que produce la evolución del micetoma clínico.

Lograr que las instituciones apropiadas dicten cursos de actualización de conocimientos sobre el papel protagónico que tienen las bacterias y hongos causantes de micetoma. Esos cursos deben estar dirigidos a los internos, residentes y médicos rurales. A través de las sociedades nacionales e internacionales de Dermatología, de Microbiología o de Micología, debe lograrse que las enfermeras y los bioanalistas estén alerta, y se integren al equipo multidisciplinario que se ocupe del problema en las regiones endémicas.

Solicitar ante los centros de salud públicos o privados que atienden pacientes con micetoma, que cada caso sea notificado a las autoridades sanitarias pertinentes, y que se llene y se mantenga al día la ficha epidemiológica correspondiente a cada persona enferma. En esa ficha se debe reportar si son casos probables, sospechosos o confirmados; y se debe establecer, en la medida de lo posible, si ya existe o no la infección entre los familiares y vecinos de cada caso.

Rev. abril 2005

Algunas consideraciones sobre la estimación de *incidencia* y *prevalencia* del actinomicetoma en cualquier municipio, estado (provincia), región o país

Sobre la estimación de la "verdadera" incidencia y/o prevalencia del actinomicetoma, poco se ha avanzado hasta la fecha actual. Los datos que se suelen llamar "*incidencia*" en varios trabajos

publicados, corresponden a “frecuencias” de casos que se basan en reportes de micetomasos y en series de casos clínicos, en los cuales se incluyen los reportes de “nuevos casos” (numerador) pero en los que nunca han precisado el denominador (población expuesta al riesgo). También se han publicado algunos estudios de “prevalencia”, pero en las publicaciones que así la califican, no precisan la extensión del numerador (número de casos existentes) ni la del denominador (población en riesgo). Sin embargo, si sólo se toman en cuenta los reportes de casos, se puede concluir que tanto el eumicetoma como el actinomicetoma (es decir, los casos clínicos) son un problema de salud pública en ciertas regiones de África (en particular en Sudán), sin que se tenga “el prurito” de estar queriendo calificar el problema como referido a la *incidencia* o a la *prevalencia*, cuyos denominadores están sin precisar, pero destacando, eso sí, que se trata de una enfermedad de indiscutible importancia social en ciertos países como Sudán, en África. (Serrano y Novoa-Montero, 2002; Novoa-Montero y Serrano, 2002)

En varios países de Las Américas, basándose en el número de casos reportados (Tabla 12.5), se podría afirmar que el micetoma no representa un importante problema de salud pública, pero sí lo es de carácter socio-económico (Lacaz 1981, Serrano *et al* 1986, 1987; López & Welsh 1992; Novoa-Montero & Serrano 1994, 1996a, 1996b, 1997, 2002; Novoa *et al* 1997, 1999). La recopilación de casos clínicos que se presenta en la Tabla 12.5 puede afirmarse que es la suma de los esfuerzos que tuvo cada investigador o grupo de investigadores que publicaron o recopilaron los casos clínicos, y quizá sería apropiado considerar que sean estimadores del numerador (frecuencia) de las potenciales tasas de incidencia, en las cuales el denominador censal nunca se hizo explícito en los artículos publicados.

Colofón

Los autores de este capítulo están conscientes de que resulta una tarea poco menos que imposible, sumamente costosa y poco eficiente, estimar la *prevalencia* de los infectados en las regiones donde los actinomicetales patógenos son endémicos en el hábitat. Por ello, proponemos que resulta poco productivo usar los métodos de la *epidemiología clásica* para estudiar la *prevalencia de la infección* y la de los síndromes clínicos producidos por actinomicetos patógenos en poblaciones. En consecuencia, recomendamos el empleo de la *epidemiología clínica empírica* para contestar ciertos aspectos del problema de la infección y la enfermedad (actinomicetoma). Por ello, desde 1994, Novoa-Montero y Serrano (Moscow 1994; India 1996; China 1997) y Serrano y Novoa-Montero (Moscow 1994; Sudán 2002) están proponiendo el modelo “*Multidisciplinary family-case biomedical an epidemiological model to study pathogenic aerobic actinomycetes. Emphasis on mycetoma infections*” (Novoa-Montero *et al* 1999). Invitamos a los lectores interesados, a leer con detenimiento el Capítulo XIII de esta obra, con el fin de entender las ventajas de aplicar lo que proponemos. Tenemos la esperanza de que cuando los grupos de investigación apliquen ese modelo para estudiar las infecciones producidas por actinomicetos patógenos, la eficiencia que podría lograrse al aplicar los conocimientos que se obtengan en los estudios de cada grupo humano, llevará, sin lugar a dudas, a evitar en las personas infectadas la desagradable dolencia clínica llamada *micetoma*, y en último término se podrá lograr que el tratamiento precoz (que se sabe es eficaz y efectivo) evite el desarrollo de las secuelas deformantes, mutilantes y discapacitantes que hoy día se ven en las personas que viven en las comunidades endémicas a los actinomicetales patógenos.

AGRADECIMIENTOS

A Erika Colmenares y a María Osleida Mercado por el procesamiento de palabras e imágenes en computación que terminaron en la edición de este capítulo. Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad de Los Andes (CDCHT-ULA) por el financiamiento en la realización de este trabajo (Proyecto M-738-01). A ‘Chuchú’ Serrano por haber hecho la versión en inglés del texto.

Bibliografía

- Abbott PH. Mycetoma in the Sudan. *Trans Roy Soc Trop Med. & Hyg.* 1956; 50: 11-24.
- Adami JG, Kirkpatrick RC. A case of Madura foot disease: Mycetoma pedis achroid variety. *Trans Assoc Am Phys* 1985; 18: 92-100.
- Ajello L. Mycetomas in the United States. A critical review. En *Micetomas. Memorias del Primer Simposio Internacional*. Ed. S. Barroeta. Editorial Venezolana CA, 1986; pp. 252-270.
- Albertini DAD, Desvernine CM. *Revista de Medicina Tropical Habana*; 1901; 2:73.
- Albornoz M. Distribución geográfica de los micetomas en Venezuela. En *Micetomas. Memorias del Primer Simposio Internacional*. Ed Barroeta S, Editorial Venezolana CA, 1986; pp. 296-304.
- Alteras I, Feuerman EJ. The second case of mycetoma due to *Nocardia caviae* in Israel. *Mycopathol* 1986; 93: 185-187.
- Araujo MJ; Castañeda E. Preparación de un antígeno de *Madurella mycetomatis* aplicable al diagnóstico de micetoma. *Rev Iberoam Micol.* 1997; 14: 31-35.
- Arenas R, Lavalle P, Peñaloza A, Aquino MA. Minimycetomas multiples dus a *Nocardia brasiliensis*. Presentation de deux cas. *Bull Soc Mycol Med*; 1981, 10: 73-76.
- Arenas R, Navarrete G. Micetomas en niños: Estudio de cinco casos. *Rev Méx Dermatol*, 1990; 34: 205-208.
- Arenas R. *Micología Médica Ilustrada*, 2ª ed. Micetoma Cap. 12. México: Interamericana-McGraw-Hill. 2003; pp. 112-127.
- Balfouer A. First report of Wellcome Research Laboratories. Khartoum: Sudan Government. 1904.
- Beaman BL, Sugar AM. *Nocardia* in naturally acquired and experimental infection in animals. *J Hyg Can*; 1983; 91: 393-419.
- Boyd MF, Curtehfield ED. Mycetoma in North America. *Am J Trop Med*, 1921; 1: 215-289.
- Brumpt E. Les mycétomes. *Archs Parasit*, 1906; 10: 489-564.
- Burres WT. Mycetoma in Western Panama. *Am Jour Trop Dis and Prev Med*; 1916, 3: 610.
- Campíns H. Epidemiological aspects of deep mycoses in Venezuela. *Mycopath et Mycol Applicata*, 1960; XIII: 25-32.
- Campíns H. Labor realizada en el campo micológico. *Mycopath et Mycol Applicata*, 1961 ; XV: 53-60.
- Carter, H. v. On mycetoma or the fungus disease of India including notes of recent cases and new observations on the structure, etc., of the entophytic growth. *Trans Med Phys Soc (Bombay)*, 1860; 7:206-221.

- Carter, H. v. On mycetoma or fungus disease of India J&A Churchill, London, 1874.
- Carrada T, Corrales-Sánchez JS, Corrales-Sánchez DF. Avances en el conocimiento de las micosis subcutáneas y actinomicetomas (I). Agentes etiológicos y aspectos clínico-epidemiológicos. *Piel*, 1995; 10:64-76.
- Castro LGM, Jr. Belda W, Salebian A, Cucé LC. Mycetoma. A retrospective study of 41 cases seen in São Paulo, Brazil, from 1978 to 1989. *Mycoses*, 1993; 36: 89-95.
- Chang P, Logemann H. Mini-mycetoma due to *Nocardia brasiliensis*. *Int J Dermatol*, 1992; 31: 180-181.
- Chávez G; Estrada R; Bonifaz A. Perianal actinomycetoma experience of 20 cases. *Int J Dermatol*, 2002; 41: 491-493.
- Chin J. (editor). Control of Communicable Diseases Manual. An official report of the American Public Health Association. 17th ed. Washington DC. 2000.
- Cicero R. El micetoma. *Gac Méd Méx*, 1912; 7: 291-301.
- Conti-Díaz IA. Micetomas y procesos premicematosos en el Uruguay. *Mycopathologia*, 1986; 72: 59-64.
- Colebrook L. Indian Army Medical Reports, 1846, cited by Chouhan SS and Agarwal S *Indian J Med Res*, 1966; 57: 71-77.
- Dávila M; Arenas R; Salazar JJ; Suárez R; Campos P; García S; Padilla MC; Bonifaz A. Micetomas en el Estado de Guanajuato. *Rev Mex Dermatol*, 1996; 40: 408-411.
- Dementjeva GR. Studies on a case of actinomycetoma pedis in Queensland; I. *Sabouraudia*, 1970; 8:81-92.
- Destombes P, Mariat F, Rosatii L, Segretain G. Mycetoma in Somalia. Conclusion of a study between 1959 and 1964. *Acta Trop*, 1977; 34: 35-373.
- Develoux M, Dieng MT, Ndiaye B. Les Mycétomes. *J Mycol Med*, 1999; 9: 197-209.
- Fahal AH, Hassan MA. Mycetoma. *Br J Surg*, 1992; 79: 1138-1141.
- Fahal AH. 2000. Evidence based guidelines for mycetoma patients management. Web site <http://www.mycetoma.org>.
- Godfrey, J. "Disease of the foot not hitherto described." *Lancet I*, 1946; 593-594.
- Green WO, Adams TE. Mycetoma in the United States. *J Clin Epidemiol*, 1964; 4: 75-91.
- Gugnani HC, Suseelan AV; V de FN, Ojukwu JD. Actinomycetoma in Nigeria *J Trop Med*, 1981; 84: 259-263.

- Gumaa SA, Mohamed FHA, Mahgoub ES, Adam, EEI, El Hassan AM, Imbabi SE. Mycetoma in goats. *Sabouraudia*, 1978; 16: 217-223.
- Gumaa SA. The aetiology and epidemiology of mycetoma. *Sudan Med J*, 1994; 32: 14-22.
- Hevia Y, del Pino J, Pérez Alfonso R, Álvarez MT, Rondón AJE, Albornoz MC. Micetoma podálico por actinomadura. Reporte de 4 casos. *Dermat Ven*, 1986; 24: 11-15.
- Joshi KR, Solanki A, Joshi YR. Mycetoma. Agrobios, 131 p; India. Jodhpur 2000.
- Kemper GWH, Jameson A. A case of podeloma with microscopic examination of the diseased structure. *American Practitioner*, 1986; 14: 129-135.
- Lacaz Carlos da Silva. Distribuição geográfica dos micetomas no Brasil. *An Bras Dermatol*, 1981; 56: 167-172.
- Lavalle PA. Nuevos datos sobre la etiología del micetoma en México y sobre su patogenia. *Gac Méd Méx*, 1966; XCVI: 545-569.
- Laveran MA. "Au subject d'un cas de Mycetoma a grains noirs" *Bull Acad Med Paris*, 1902; 47, 773-776.
- Lazo, R. Micetomas en el Ecuador. En *Micetomas. Memorias del Primer Simposio Internacional*. Ed. Barroeta S. Editorial Venezolana C.A, 1986; pp. 329-339.
- Le Dantec A. *Precis de Pathologie Exotique*. Gaston Doin & Cie, Editeurs, Paris, 1929.
- Logemann H. Los micetomas en Guatemala. *Bol Soc Mex Microbiol*, 1983; 18:33-40.
- Londero A, Ramos C. Micetomas actinomicóticos no Río Grande do Sul. Relato de cuatro casos. *Mem Inst Osw Cruz*, 1986; 81:73-77.
- López R, Welsh O. Epidemiology of mycetoma in Mexico. Study of 2.105 cases. *Gac Méd Méx* 1992; 128: 477- 481.
- Mahgoub ES; Murray IG. Mycetoma. William Heinemann Medical Books Ltd. The Whitefriars Press Ltd. London, 1973.
- Mac Questin C. *Pacific Med and Surg Jour of Sci*; 1874, 2B, 477.
- Motta RL; Rocha-Vilela RV; Lambertucci JR. Actinomycetoma caused by *Nocardia brasiliensis*. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2004; 37: 287-288.
- Negrón R. Contribución al estudio de los micetomas en la República Argentina. *Med Cután Ibero Lat Am*, 1974; 5:353-362.
- Novoa-Montero D; Serrano JA. Multidisciplinary family-case comparison epidemiologic study (1994-1996). *Proceedings of the Ninth International Symposium on the Biology of the actinomyces*. Moscow, Rusia, 1994.

- Novoa-Montero D; Serrano JA. Mycetoma in Venezuela – a series of cases in the State of Lara, Venezuela. Proceedings. International Conference on Current Status and Challenges in Medical and Veterinary Research, particularly in Third World countries. Jabalpur, India, 1996a.
- Novoa-Montero D; Serrano JA. Venezuelan multidisciplinary family-case comparison epidemiologic study of mycetoma (1966-1995). Proceedings. International Conference on Current Status and Challenges in Medical and Veterinary Research, particularly in Third World Countries. Jabalpur, India, 1996b.
- Novoa-Montero D; Serrano JA. Multidisciplinary family-case biomedical and epidemiologic model to study pathogenic aerobic actinomycetes. Emphasis on mycetoma infections. Proceedings. Xth International Symposium, on Biology of Actinomycetes. (ISBA) Beijing, China, 1997.
- Novoa-Montero D; Serrano JA; Boiron P; Mejía MA. Multidisciplinary family-case biomedical and epidemiological model to study pathogenic aerobic actinomycetes. Emphasis on mycetoma infections. *J Mycol Med* 1999; 9: 127-129.
- Novoa-Montero D; Serrano JA. Multidisciplinary family-case biomedical and epidemiologic model to study actino and eumycetoma. Mycetoma. Proceedings. The Mycetoma International Conference. Khartoum, Sudan, 2002.
- Ocaranza F. El micetoma en Sonora. *Boletín de Ciencias Médicas, México D.F.*, 1914; 4: 433.-437
- Organización Mundial de la Salud (OMS), Oficina Sanitaria Panamericana (OSP), Organización Panamericana de la Salud (OPS). Clasificación Internacional de Enfermedades IX Revisión (CIE-9). Washington DC, 1975.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). Oficina Sanitaria Panamericana (OSP), Organización Panamericana de la Salud (OPS), Clasificación Internacional de Enfermedades y Problemas relacionados con la Salud. Publicación Científica N° 554. X Revisión (CIE-10) Washington, DC, 1990.
- Ortiz-Ortiz L, Contreras MF, Bojalil LF. Delayed hypersensitivity to *Nocardia* antigens. En *Biology of Nocardiae*. Editado por M Goodfellow; GH Brownell; JA Serrano. Academic Press. 1976; London: pp. 418.
- Pérez-Blanco M, Hernández-Valles R, Fernández-Zeppenfeldt G, Yegres F. Micetoma: Reporte de tres casos en el Estado Falcón, Venezuela. *Invest Clin* 1996; 37: 61-73.
- Reinke SI, Ihrke PJ, Reinke ID, Staunard AA, Jang SS, Gillette DM, Hallock KW. Actinomicotic mycetoma in a cat. *J Am Vet Med Assoc* 1986; 189; 4: 446- 448.
- Rey M. Les mycétomes dans l'Quest Africain. These. R, Foulon and Company. Paris. 1961.
- Rísquez, JR. A propósito de pie de Madura. *Boletín de los Hospitales*. 1927; XVIII, 10:454-457.
- Rodríguez JV, Gamboa A, Alvarado AA. Etiología y epidemiología de los micetomas en Costa Rica. *Rev Ibér Micol* 1988; 5: 144-148.
- Salfelder K, Schwarz J, Saverteig E. *Micosis Profundas en el hombre*. Atlas en color F.K. Schattaver Verlag, Stuttgart. New York. 1979.

Salinas-Carmona MC. *Nocardia brasiliensis*: from microbe to human and experimental infections. *Microbes and Infection* 2000; 2:1373-1381.

Segretain G, Destombes P. Les mycetomas en Afrique du Nord. *Maroc Med* 1963; 42: 445-450.

Serrano JA, Beaman BL, Vilorio JE, Mejía MA, Vilorio JE, Zamora R. Histological and ultrastructural studies of human actinomycetoma. In B. Szabo, S. Biro, M. Goodfellow. (eds). *Biological and biochemical aspects of actinomycetoma*, Akadémicae Kiadó, Budapest, Hungary. 1986; pp. 647-662.

Serrano JA, Beaman BL, Mejía MA, Vilorio JE, Zamora R. The actinomycetoma in Venezuela: A ten year study (1976-1986). *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1987; 30:297-304.

Serrano JA, Scaglione S. Micetomas actinomicóticos en Santiago del Estero. *Rev Arg Micol.* 1991; 14: 13-22.

Serrano JA. Epidemiological aspects of diseases produced by *Nocardia*. En *Actinomicetos microorganismos de la luz*. Ed. Sandoval H. UAM-Xochimilco, México. 1993; pp. 159-184.

Serrano JA, Novoa-Montero D. Mycetoma in Venezuela. Series of cases in the State of Lara (1975-1994). *Proceedings of the Ninth International Symposium on the Biology of the actinomyces*. (ISBA) Moscow, Rusia, 1994.

Serrano JA, Novoa-Montero D, Mejía MA, García E. Mycetoma in Venezuela. Series of cases in the State of Lara (1976-1994). *Multidisciplinary family-case comparison epidemiologic study* (1994-1996). *Biotechnology*. 1995; 7-8: 289-93.

Serrano JA, Novoa-Montero D. Mycetoma in Venezuela –a series of cases in the State of Lara, Venezuela. *Proc. International Conference on Current Status and Challenges in Medical and Veterinary Research, particularly in Third World Countries*. Jabalpur, India, 1996.

Serrano JA, Mejía MA, García E, Zamora R, Boiron P. *Streptomyces somaliensis* as an etiological agent of actinomycetoma in Lara State, Venezuela. An epidemiological, clinical, microbiological, molecular and histological study of five cases. *J Mycol Med* 1998; 8:97-104.

Serrano JA, Díaz-Corrales F, Uzcátegui-Negrón M. El género *Actinomadura*. Aspectos de su taxonomía, microbiología, patología, clínica y terapéutica. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 2001a; 21: 34 –37.

Serrano JA, Mejía MA, Díaz-Corrales F, Uzcátegui-Negrón M, Saad C, Couble A, Casoli E, Boiron P, García E. Rapid identification by PCR of two strains of *Nocardia brasiliensis* isolated from an actinomycetoma case. *J Mycol Med* 2001b; 11: 106-108.

Serrano JA, Novoa-Montero D. Mycetoma in Venezuela: A social disease. *Epidemiologic and Basic Sciences Approach Proceedings*. The Mycetoma International Conference. Khartoum, Sudan, 2002.

Serrano JA, Sandoval AH. El Micetoma. Revisión. *Rev Soc Ven Microbiol* 2003; 23: 70-79.

Toledo IL. The mycetomas in Guatemala. *Bol Soc Méx Micol* 1983; 18: 33-40.

- Venugopal TV & Venugopal PV. Mycetoma in Madras. *Sabauraudia* 1977; 15: 17-22.
- Vera-Cabrera L, Rodríguez-Quintanilla MA, Boiron P, Salinas-Carmona MC, Welsh O. Experimental mycetoma by *Nocardia brasiliensis* in rats. *J Mycol Med* 1998; 8:183-187.
- Vincent, MH. Étude sur le parasite du pied de Madura. *Annls. Inst. Pasteur, (Paris)* 1894; 8:129-151.
- Wanke NC, Wanke B, Caiuby MJ, Towersay L, Londero AT, Díaz MF, Siqueira SP. Mycetoma due to *Actinomadura madurae*. A report of 2 cases. *Rev Int Med Trop São Paulo* 34; 1992: 367-372.
- Welsh O, Salinas-Carmona MC, Rodríguez MA. Mycetoma. *Infectious Diseases Ed. Hoeprich. Fifth edition.* 1994; p.p. 1402-1406.
- Yazbek, AK. Dos mycetomas. Subsídios para o seu estudo. São Paulo o Estado de São Paulo, 1920 (Tese de doutoramento-Faculdade de Medicina e Cirurgia de São Paulo).
- Yu AM, Zhao S, Nie LY. Mycetomas in Northern Yemen. Identification of causative organisms and epidemiological considerations. *Am J Trop Med Hyg* 1993; 48: 812-817.
- Zlotnik, H; HR. Buckley. Experimental production of actinomycetoma in BALB/c mice. *Infection and Immunity* 1980; 29: 1141-1145.

CAPÍTULO XIII
LOS MODELOS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICOS APLICADOS A LA
INVESTIGACIÓN DEL ACTINOMICETOMA.
PROPUESTA PARA USAR PRAGMÁTICAMENTE LA EPIDEMIOLOGÍA
EMPÍRICA EN LATINOAMÉRICA

D. Novoa-Montero¹ y J. A. Serrano²

¹Laboratorio Multidisciplinario de Investigación Clínico-Epidemiológica (LabMICE), Sección de Investigación, Unidad de Medicina Interna, Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes, Mérida, Edo. Mérida, Venezuela. labmice@ing.ula.ve; dmontero98@hotmail.com

²Instituto de Investigaciones. Sección de Biotecnología. Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, Edo. Mérida, Venezuela.
Correo electrónico (jacielo@cantv.net)

Abstract

The special features of aerobic actinomycetes infection in endemic areas have eluded the understanding of evolution from primary skin infection to clinical actinomycetoma, in spite of many studies published since the early 1920's. In fact, current epidemiologic knowledge is fundamentally based on clinical series. So far, descriptive and analytical epidemiologic researches on actinomycetoma in communities have been scanty... and results from clinical series have been waiting for completing the natural history of actinomycetes infection from clinical disease to risk factors (through well-designed hospital based case-control studies), or from risk factors to clinical disease (based on hospital or community cohort studies). Either kinds of research have not been carried out yet. The "true" incidence and the geographical distribution of the clinical actinomycetoma throughout the world are not yet well-known, due to the nature of the disease, usually painless and slowly progressive, which seldom leads to late clinical actinomycetoma in few persons infected in each endemic areas. In addition, the epidemiologic researches on etiological agents of the actinomycetoma have been incipient, and most pathogeneses to explain evolution of natural history facts between infected and clinically impaired persons, as well as in animals, continue to be unclear, and should be revealed soon. Since 1994 to now-a-days Novoa-Montero & Serrano have proposed a new design, the "*multidisciplinary family case-biomedical and epidemiologic model to study actino and eumycetoma*" (ISBA' 94, 97, 99). This model will potentially allows putting the missing pieces together from the primary-infection to clinical actinomycetoma. Then after, results and epidemiologic inferences would also be applicable to other bacterial and mycotic environment-to-man transmitted infections.

Introducción

El desarrollo de la medicina en todas sus ramas, pero especialmente en las disciplinas clínicas, está pidiendo a los profesionales de la salud que practican en hospitales o en áreas similares, que se mantengan al día sobre los conceptos cambiantes que un Comité de Expertos de la OMS-WHO/PAHO-OPS, revisan cada cierto tiempo, y que son convertidos en códigos de uso obligatorio internacionalmente. Tal es la clasificación internacional de morbilidad y de mortalidad en humanos. Esto es importante tenerlo en cuenta porque esa clasificación estandarizada ha sido producto del consenso de varios grupos de expertos que han determinado incluir en cada categoría la definición precisa de cada enfermedad o síndrome, actualizados desde el momento en que "entra en vigencia" cada revisión, hasta que una nueva publicación las modifique. El sistema clasificatorio debe ser respetado por la comunidad médica y de otros profesionales de la salud de los que depende que las clasificaciones estadísticas de las enfermedades y problemas relacionados con la Salud sean lo más confiables posible. Se han propuesto las clasificaciones estandarizadas de la Organización Mundial de la Salud (OMS/PAHO), cuya IX edición de 1975 (CIE-9) fue actualizada en 1990; y publicada con el nombre de Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades y Problemas

Relacionados con la Salud, Décima Revisión (CIE10-1995 en español, o IDC10-1995, en inglés) (Organización Mundial de la Salud, 1975 y 1990).

Las CIE-9 y CIE-10 le han dado especial vitalidad y homogeneidad a la formulación de los diagnósticos que se registran en los hospitales y clínicas en todo el mundo. Ello permite que cuando se realizan trabajos de investigación en grupos humanos, los diagnósticos de las enfermedades que se estudian puedan ser codificados con confianza, de modo que las variables importantes (red de multicausalidad) se puedan medir en distribuciones de frecuencia y que se pueda también estimar asociaciones estadístico-epidemiológicas entre ellas y cada enfermedad, utilizando los métodos de análisis bioestadísticos que sean apropiados. En lo que a los micetomas corresponde, el micetoma asociado a nocardia se codifica B47.0; y el pie de Madura, como micetoma *actinomicótico*, se codifica B47.1; y cuando el micetoma no está especificado se codifica B47.9. Sin embargo, en el CIE-10 no especifican códigos para los otros agentes causales que se enumeran en el Capítulo XII de esta obra. Nuestra expectativa es que si lo que proponemos en este capítulo se convierte en resultados tangibles para el mejor conocimiento de las infecciones y enfermedades producidas por los actinomicetales patógenos, la codificación de esos procesos patológicos sea ampliada a nivel del CIE/ICD de la OMS/OPS, WHO/PAHO.

Es de advertir que cuando se trata de realizar investigaciones clínicas en hospitales, o centros de investigación de enfermedades transmitidas del medio ambiente al hombre, pero que no se transmiten de hombre a hombre, se necesita la colaboración, así sea modesta, de microbiólogos especializados y actualizados. Esos microbiólogos son los que aportan datos para precisar el tipo de “agente causal” cuando reportan la aparición de una determinada patología, en nuestro caso para precisar cuál de los actinomicetales es el que está produciendo los cuadros clínicos que se estén observando en un grupo humano (en una determinada región geográfica, en la que se observan cuadros clínicos de micetoma). Con los aportes de los microbiólogos se completa la etapa etiológica en el diagnóstico clínico de confirmación de cada actinomicetomatoso. El conjunto de los diagnósticos etiológicos confirmados constituye la base pragmática para realizar estudios de investigación en epidemiología clínica.

Si se parte de una base de datos confiable, el investigador que estudie grupos humanos puede determinar la distribución de la enfermedad (micetoma) por persona, lugar y tiempo (epidemiología descriptiva); y, más aún, también puede estimar asociación de las infecciones por actinomicetales con determinadas características individuales y factores medio ambientales que existan en las poblaciones o comunidades que atienden (epidemiología analítica). Los resultados que el investigador obtenga pueden estar dirigidos a lograr prevención primaria o secundaria de la infección actinomicótica (que son útiles o al menos aplicables a la población a la que pertenecen los individuos que estudie).

En la Tabla 13.1 se presenta una clasificación comprensiva de los *principales tipos de estudios de investigación que se pueden realizar en áreas de las ciencias de la salud*. Como se puede cotejar en esa tabla, existen tres grupos de estudios que aparecen como tres rectángulos cerrados en líneas negras resaltantes:

Grupo I: Las investigaciones que se realizan *sin material clínico y sin finalidad epidemiológica* (campo de las ciencias básicas).

Grupo II: Las investigaciones que se realizan con base en *datos clínicos de pacientes o con material clínico de pacientes*, cuyos resultados se presentan sin compararlos con los de grupos de control (estudios clínicos propiamente dichos, que podemos llamar estudios clínicos *per se*). Su objetivo es completar los criterios diagnósticos clínicos y/o establecer criterios pronósticos en cada

paciente sintomático o asintomático. Este grupo ha sido acumulado en cada proceso morboso, por la actividad clínica de los médicos desde tiempos hipocráticos.

Grupo III: Las investigaciones clínicas que se realizan con *enfoque epidemiológico*, que incluye a los estudios de investigación en grupos humanos en comunidades o poblaciones, y a los estudios de epidemiología clínica de grupos humanos, que casi siempre tienen su soporte en bases o banco de datos (historias clínicas; registros microbiológicos, anatomopatológicos, imagenológicos, inmunológicos, etc.) que se obtienen y se mantienen en hospitales o instituciones similares.

La investigación clínico-epidemiológica del actinomicetoma en el conjunto de las infecciones por actinomicetales

En la Tabla 13.2 se enumeran y detallan las 5 etapas clásicas que explícita o implícitamente se siguen cuando se realiza investigación clínica con enfoque epidemiológico para estudiar diferentes aspectos de cualquier enfermedad. Por supuesto que estas etapas son no solamente superponibles, sino que algunas de ellas ya se han desarrollado en el campo del *actinomicetoma*. Se sugiere que el lector revise la Tabla 13.2 antes de continuar la lectura de este capítulo.

La relación de los estudios que ya se han realizado sobre el actinomicetoma se encuentra enumerada y brevemente comentada en el Capítulo XII de este libro. En la Tabla 12.4 (Capítulo XII) el lector puede encontrar la casuística de actinomicetoma reportada en Venezuela por Serrano *et al* (1995), que acumula los casos de actinomicetoma desde 1962. En la Tabla 13.3 se ha actualizado la casuística hasta 2003.

TABLA XIII-1
CLASIFICACIÓN COMPRENSIVA DE LOS TRES GRANDES GRUPOS
DE INVESTIGACIÓN QUE SE PUEDEN REALIZAR EN LAS
ÁREAS DE CIENCIAS DE LA SALUD

(I)

(III)

GRUPO I: LOS ESTUDIOS QUE SE REALIZAN SIN EMPLEAR PERSONAS
<p>TIPO 1: APLICABLES A ENFERMEDAD HUMANA Y SIN FINALIDAD EPIDEMIOLÓGICA INMEDIATA (MODELOS ANIMALES)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Estudios experimentales aplicables a enfermedad humana a través de modelos animales: (a) Aspectos fisiológicos. (b) Aspectos bioquímicos. (c) Aspectos patológico-microbiológicos [Postulados de Henle-Koch] o no microbiológicos. 2. Estudios observacionales aplicables a enfermedad humana a través de modelos animales: (a) Aspectos fisiológicos. (b) Aspectos bioquímicos. (c) Aspectos patológicos (microbiológicos) [Postulados de Henle-Koch], o no microbiológicos.
<p>TIPO 2: APLICABLES A ENFERMEDAD HUMANA Y CON FINALIDAD EPIDEMIOLÓGICA (MODELOS ANIMALES)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Estudios experimentales de aspectos fisiológicos o patológicos, (a) experimentos naturales. (b) Experimentos planeados por el investigador. (c) Experimentos teóricos y matemáticos. 2. Estudios observacionales de aspectos fisiológicos, bioquímicos, patológicos. Modelos: (a) Descriptivos. (b) Transversales. (c) Prospectivos concurrentes y/o no concurrentes ("cohorte" de animales).
<p>TIPO 3: LA INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL QUE SE REALIZA EMPLEANDO MARCADORES BIOLÓGICOS (MODELOS ANIMALES)</p> <p>En ellos el material clínico que se aporta para estudio es considerado per se, en relación con los grupos de estudio del que proceden, para estimar la confiabilidad, la concordancia, la consistencia y en general, la validez de las pruebas que se intenta estandarizar empleando un modelo animal sobre: (a) Aspectos fisiológicos. (b) Aspectos bioquímicos. (c) Aspectos patológicos (microbiológicos o no microbiológicos).</p>
<p>TIPO 4: NO APLICABLES A ENFERMEDAD HUMANA: No se consideran pertinentes en este esquema de clasificación.</p>

(II)

GRUPO II: LOS ESTUDIOS QUE SE REALIZAN CON PACIENTES O CON MATERIAL CLÍNICO DE PACIENTES SIN EMPLEAR GRUPOS DE COMPARACIÓN
<p>TIPO 1: LA INVESTIGACIÓN OBSERVACIONAL CLÍNICA PER SE QUE SE REALIZAN SIN ENFOQUE EPIDEMIOLÓGICO (modelos fundamentalmente descriptivos).</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. La observación de un caso clínico raro. 2. La observación de casos clínicos esporádicos agrupados para sugerir patogenias/etiologías o servir de base de una hipótesis. 3. Los estudios clínicos seriados realizados en instituciones, conjunto de instituciones, recogidos por médicos aislados o equipos de médicos (sin o con "controles", pero que se llevan a cabo sin criterio epidemiológico). 4. Otros tipos de estudios (observaciones anatomopatológicas, terapéuticas, inmunológicas, radiológicas, biomoleculares, etc.)
<p>TIPO 2: LA INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL QUE SE REALIZA EMPLEANDO MARCADORES BIOLÓGICOS HUMANOS PARA CLÍNICOS PARA COMPLETAR DIAGNÓSTICOS CLÍNICOS INDIVIDUALES.</p> <p>En este tipo de investigación el material clínico que se aporta es considerado per se, en relación con cada caso o grupo de casos del que proceden, y se examina con el fin de estimar la confiabilidad, la concordancia, la consistencia, y en general, la validez de las 'tests' que se someten a prueba sobre: (a) Aspectos fisiológicos. (b) Aspectos bioquímicos. (c) Aspectos patológicos (microbiológicos o no microbiológicos).</p>

GRUPO III: LOS ESTUDIOS QUE SE REALIZAN PARA COMPARAR ASPECTOS DE UNA ENFERMEDAD/NO ENFERMEDAD EN UN GRUPO HUMANO CON OTRO (CRITERIO EPIDEMIOLÓGICO)
<p>TIPO 1: OBSERVACIONALES</p> <p>(1^o) Descriptivos: (que el investigador los planea sin hipótesis previa) en el campo de la morbilidad o de la mortalidad.</p> <p>(2^o) Análiticos: en los que el investigador somete a prueba una hipótesis determinada.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Estudios transversales <ol style="list-style-type: none"> (a) Estudios de prevalencia en grupos (con definición pragmática de enfermedad y con denominador censal conocido). <ul style="list-style-type: none"> - en serie - en paralelo (b) Estudios de tamizaje en grupos de alto riesgo <ul style="list-style-type: none"> - en serie - en paralelo (c) Estudios de prueba versus prueba en grupos <ul style="list-style-type: none"> - en las dos pruebas se mide la misma variable - en las dos pruebas se miden variables distintas. (Submodelo de caso control). 2. Estudios retrospectivos (de caso-control) <ul style="list-style-type: none"> - de grupos de individuos - de casos prevalentes por rastreamiento - de casos prevalentes por encuesta - de casos incidentes - de dos series de casos clínicos ya acumulados o por acumular. - de "nested case-control" - de grupos de pares de individuos ("matched case controls"). - de evaluación de servicios y cuidados médicos por el modelo de caso-control. 3. Estudios prospectivos (longitudinales) (de "cohortes") <ol style="list-style-type: none"> (a) Concurrentes (contemporáneos) <ul style="list-style-type: none"> - Longitudinales concurrentes por seguimiento de "cohortes". - Longitudinales concurrentes por estudios transversales sucesivos en una "cohorte". (b) No concurrentes (no contemporáneos) <ul style="list-style-type: none"> - Longitudinales no concurrentes por estudio de "cohortes". - Longitudinales no concurrentes por estudios transversales, sucesivos, anteriores. (c) Longitudinales mixtos prospectivos no concurrentes + prospectivos concurrentes. (d) Longitudinales mixtos transversales + prospectivos concurrentes de seguimiento. 4. Evaluación observacional de servicios y cuidados médicos. <ol style="list-style-type: none"> (a) Estudios de comparación "antes-después" (pasado-presente, presente-futuro) para estimar eficacia, efectividad y eficiencia comparadas entre dos servicios médicos. (b) Estudios de comparación simultánea (pasado-pasado, presente-presente) para estimar eficacia, efectividad y eficiencia comparada entre dos tipos de servicios médicos.
<p>TIPO 2: EXPERIMENTALES (QUE POR DEFINICIÓN SE PLANEAN CON HIPÓTESIS PREVIA).</p> <p>(1^o) Experimentos naturales o "cuasi experimentales" (se realizan con poca frecuencia)</p> <p>(2^o) Experimentos planeados por el investigador</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Estudios experimentales etiológicos 2. Experimentos profilácticos o por agentes farmacológicos. <ol style="list-style-type: none"> (a) de prevención primaria (tipo vacuna) (b) de prevención secundaria (tipo intervención de factores de riesgo) 3. Experimentos clínicos (pruebas terapéuticas): eficacia y/o efectividad y/o eficiencia comparadas entre grupos. 4. "clinical trials". 5. Estudios de intervención/no intervención de factores de exposición en una enfermedad (prevención clínica secundaria) comparada entre grupos humanos. 6. Evaluación experimental de servicios y cuidados médicos, (ensayo experimental aleatorio presente-futuro entre grupos humanos). 7. Estudios experimentales de validez de prueba versus prueba en grupos humanos. (Submodelo experimental de caso-control).

TABLA XIII-2
ENFOQUE EPIDEMIOLÓGICO PARA ESTUDIAR CUALQUIER ENFERMEDAD O SÍNDROME
POSIBLEMENTE ASOCIADO A AGENTES ACTINOMICETOS PATÓGENOS EN
CENTROS DE SALUD ESPECIALIZADOS

- A. PRIMERA ETAPA: ESTUDIOS CLÍNICOS PROPIAMENTE DICHOS O CLÍNICOS *PER SE***
- (1) Observación inicial de laboratorio o por hallazgo clínico de algún actinomiceto patógeno productor de actinomicetoma
- (2) Definición de actinomicetoma por:
- Observaciones histológicas o anatomopatológicas de casos clínicos (Véase Capítulo I y 5 de esta obra)
 - Características clínicas de las lesiones (definición estandarizada en Capítulo XIII de esta obra)
 - Presencia de agentes etiológicos específicos (según 5, Capítulo XIII de esta obra)
- B. SEGUNDA ETAPA: ESTUDIOS DE EPIDEMIOLOGÍA DESCRIPTIVA EN GRUPOS HUMANOS, QUE SE REALIZAN PARA MEJORAR EL CONOCIMIENTO SOBRE EL ACTINOMICETOMA, DETERMINANDO SU DISTRIBUCIÓN DE FRECUENCIA POR:**
- persona
 - lugar
 - tiempo
 - agrupamiento ('cluster') de lugar y tiempo
- C. TERCERA ETAPA: ESTUDIOS EPIDEMIOLÓGICOS OBSERVACIONALES ANALÍTICOS ELEMENTALES (CON HIPÓTESIS) QUE SE REALIZAN EN GRUPOS HUMANOS (ESTOS MODELOS SON DE DIFÍCIL APLICACIÓN EN EL ESTUDIO DEL ACTINOMICETOMA)**
- Estudios analíticos de relación entre al menos una variable principal y la enfermedad o síndrome causado por actinomicetos patógenos productores del actinomicetoma que se estudie, para determinar la asociación cruda (o preferiblemente ajustada para las covariables más importantes) en un grupo humano en comparación con otro grupo humano apropiado (que no tiene enfermedad actinomicótica).
- estudios de caso-control o casos-referentes (varios submodelos, como se enumeran en la TABLA XIII-1)
 - estudios trasversales (de prevalencia, de tamizaje, de prueba vs prueba) [para ser confiables exigen gran tamaño de la muestra] (Varios submodelos como se enumera en la TABLA XIII-1)
- D. CUARTA ETAPA: ESTUDIOS EPIDEMIOLÓGICOS OBSERVACIONALES ANALÍTICOS AVANZADOS (CON HIPÓTESIS MÁS REFINADAS) (ESTUDIOS EN COHORTES) ["Las cohortes" hospitalarias son confiables para estimar frecuencias aproximadas a la incidencia de infección o enfermedad actinomicótica en cada grupo. También lo son para estimar riesgos relativos o razones de proporcionalidad ("odds ratios")] como estimador de riesgo.**
- Estudios prospectivos concurrentes (presente - futuro) (a través de observaciones de una cohorte en comunidad u hospitalaria)
 - Estudios prospectivos no concurrentes (pasado - presente) (a través de datos que existen en registros clínicos confiables de instituciones especializadas)
- E. QUINTA ETAPA: ESTUDIOS EPIDEMIOLÓGICOS EXPERIMENTALES**
- Estudios y pruebas más refinadas de las hipótesis etiológicas en grupos de actinomicéticos (ensayos clínicos y terapéuticos en cualquier tipo de actinomicetoma, para estimar efectividad o eficiencia) que eviten o disminuyan la aparición de los resultados clínicos del micetoma (prevención secundaria).
 - Estudios epidemiológicos experimentales de intervención de factores de exposición (modificación de los factores de exposición en grupos humanos libres de la infección, a los que se sigue ("follow-up") con la finalidad de controlar y prevenir el síndrome infeccioso) en cualquier tipo de actinomicetoma en la población (aproximación a la prevención primaria).

Investigaciones sobre actinomicetomas que han sido publicadas en lo que corresponde a la primera etapa de la Tabla 13.2

Siguiendo las diferentes etapas que se establecen en la Tabla 13.2, podemos comentar que en la primera etapa ya se han realizado estudios sobre los actinomicetos o actinomicetoma, así.

(1º) Observaciones de hallazgos clínicos (series clínicas). En esta etapa invitamos al lector a que revise los reportes de casos clínicos de *actinomicetoma* que se presentan en el Capítulo XII de esta obra. Lo que se ha publicado en Las Américas está resumido en la Tabla 12.5 y la Figura 12.3. La casuística de Venezuela está resumida en la Tabla 12.4 y la Figura 12.2. Los datos de la Tabla 12.4 los simplificamos en la Tabla 13.3 de este capítulo. Las referencias originales para conocer las fuentes de esos reportes están en el trabajo de Serrano *et al* (1987).

(2º) Definición de los *actinomicetomas* a través de descripciones anatomopatológicas. Los agentes causales del actinomicetoma producen desde lesiones de tipo inflamatorio agudo hasta lesiones con respuesta tisular del tipo granulomatoso crónico (Serrano *et al* 1987). Esas lesiones han permitido hacer una clasificación de los agentes según el tipo de reacción tisular. Salfelder *et al* (1979) precisaron que microscópicamente “la reacción tisular consiste preferentemente en una exudación granulocitaria con formación de abscesos. En la periferia de éstos puede verse también una reacción granulomatosa sobre todo en las fases avanzadas de la enfermedad” (Revisar además el Capítulo VI de esta obra). Los aspectos anatomopatológicos constituyen el “criterio (e)” entre los siete que se piden para completar el diagnóstico de certeza del micetoma clínico (véase Capítulo XII de esta obra). Como un soporte histórico de la magna tarea que realizaron los anatomopatólogos para comodidad en los conocimientos clínicos del micetoma destacamos las publicaciones de Carter (1859-1860), Kanhack (1893), Brumpt (1905, 1906), Pinoy (1913), Winslow & Steen (1964), Mariat (1965, 1977), Zaias *et al* (1969), Winslow (1971) y Mahgoub & Murray (1973) y Serrano *et al* (1986). Sin embargo, debemos destacar que, de cara a los criterios actuales, los investigadores que se propongan enviar a publicación algún trabajo sobre actinomicetoma (y por extensión sobre eumicetoma), tengan en cuenta que resulta poco relevante presentar resultados que se basen fundamentalmente o únicamente en la presentación de un “caso clínico” en el que se compruebe la etiología con base a descripciones anatomopatológicas. Fundamentalmente, a pesar de ello, observamos que Motta *et al* (2004) todavía publicaron *un caso* de micetoma producido por *Nocardia brasiliensis*, en el cual describen las características clínicas (criterio diagnóstico del actinomicetoma, Capítulo XII); las características macroscópicas de los granos (criterio diagnóstico del actinomicetoma, Capítulo XII), la observación de gérmenes bacterianos tipo Gram positivos, que por la tinción de Kinyoun crecieron en cultivos de Sabourad, con lo que comprobaron que era *Nocardia brasiliensis* (criterio diagnóstico del actinomicetoma, Capítulo XII)...

Tabla 13.3

Grupo de casos conocidos y diagnosticados con base en los criterios microbiológicos y patológicos ya estandarizados* . Estado Lara, Venezuela (1962-2003)

Estado (Provincia)	<i>Actinomadura</i>		<i>Nocardia</i>				<i>Streptomyces</i>	Total*
	<i>madurae</i>	<i>pelletieri</i>	<i>asteroides</i>	<i>brasiliensis</i>	<i>otitidiscaviarum</i>	(<i>Spp.</i>)	<i>somaliensis</i>	
Lara	13	-	3	9	1	8	5	39

Fuente: Serrano JA *et al* (1987) (Actualizada hasta 2003)
2005

Rev. abril,

* Ese grupo de 39 casos de actinomictoma será el punto de partida para el inicio del estudio usando el modelo multidisciplinario biomédico y epidemiológico de caso/control-familia/control-vecinos que proponemos al final de este capítulo, y que sugerimos sea imitado por cualquier grupo de investigadores de micetomas (por actino o eumicetales) en cualquier parte del mundo.

Deseamos destacar en esta obra que el problema heurístico actual no tiene como prioridad el conocimiento clínico de casos: lo que interesa es tomar conjuntos de casos clínicos similares y avanzar en el conocimiento de las aproximaciones entre variables que nos lleven en definitiva a realizar programas de prevención primaria o secundaria de esta infección y/o de las afecciones clínicas que son socialmente molestas. Tiene más importancia el reporte contemporáneo de casos de infecciones por nocardia (y eventualmente de micetomas) que se están produciendo en personas inmuno-competentes (Zaraggen *et al* 2001). Esto sí tiene mucha razón de ser, heurística, actualmente, pues los estudios comparativos entre los defectos de inmunidad (con o sin inmunocompetencia) en los casos de infecciones emergentes, y los que puedan evidenciarse usando el modelo que proponemos al final de este capítulo, serán de gran importancia en salud pública.

(3°) Estudio de los aspectos biológicos y biomoleculares de los actinomicetales. En los “Proceedings” del *IX International Symposium on the Biology of Actinomycetes*, que se celebró en Moscú (ISBA’ 94, Rusia, 1994); del *X International Symposium on the Biology of Actinomycetes* (ISBA’ 97’, Beijing, China, 1997); del *XI International Symposium on the Biology of Actinomycetes* (ISBA’ 99’, Creta, Grecia, 1999); del *XII International Symposium on the Biology of Actinomycetes* (ISBA’ 2001), Vancouver, Canadá, 2001); y del *XIII International Symposium on the Biology of Actinomycetes* (ISBA’ 2003, Melbourne, Australia, 2003)... se encuentra abundante bibliografía de vigencia actual sobre los agentes actinomicetales patógenos en las siguientes áreas: la biología (morfología, ecología, estructura del genoma) de los actinomicetos patógenos, la morfología (desarrollo y diferenciación) de los actinomicetos patógenos, los nuevos compuestos bioactivos y biomoleculares, el metabolismo primario y la interacción con el metabolismo secundario, la bioquímica, la biosíntesis y la relación genética del metabolismo secundario, la ingeniería genética y la regulación, expresión de los genes incluyendo los heterólogos y la estructura del genoma, en los actinomicetos patógenos.

La manipulación genética (plásmidos, fagos y transposomas); las enzimas y los inhibidores enzimáticos; la taxonomía y la nueva sistemática de los actinomicetos; y los actinomicetos que producen antibióticos y sustancias bioactivas.

Es decir que, según lo presentado en esos eventos internacionales, ya se conocen bastante bien los aspectos biológicos y biomoleculares de los actinomicetos patógenos. Estos conocimientos son de suficiente validez para que sirvan de base en la conducción de modernos estudios clínico-epidemiológicos en comunidades y especialmente en áreas hospitalarias. Por ejemplo, insistimos en que la aplicación del submodelo de caso-control que desarrollamos al final de este capítulo podría constituirse en el método ideal para completar y concatenar heurísticamente los conocimientos faltantes sobre la infección y su relación con los cuadros clínicos producidos por los actinomicetales patógenos. Lo que es más atractivo para los investigadores es que, potencialmente, todas las interrogantes se pueden contestar empleando grupos humanos relativamente pequeños. Ese submodelo tiene la gran ventaja de que, debido a su cuidadoso diseño, con el grupo de casos de micetoma con que se cuente y con al menos igual número de familiares y otro de vecinos, que sirvan de grupos de comparación, se obtienen evidentes resultados confiables para hacer inferencias válidas, aplicables al campo de la Salud pública.

Investigaciones sobre el actinomicetoma publicadas en lo que corresponde a la segunda y tercera etapas de la Tabla 13.2 (Series clínicas y epidemiología descriptiva elemental)

Los estudios publicados sobre la epidemiología descriptiva de los *actinomicetomas* han correspondido fundamentalmente a *las series de casos* que resumimos a continuación. En Brasil y en México, al igual que en otros países de Las Américas, se han realizado estudios de casos clínicos o de series de casos de actinomicetoma. Destacan el trabajo de Lacaz (1981) que recopiló datos sobre la distribución geográfica de los casos de micetoma en Brasil; los artículos de Londero & Ramos (1986) y de Wanke *et al* (1992), quienes reportaron casos de la región sureste de Brasil;

Castro *et al* (1993) quienes presentaron una serie de casos en el Estado de São Paulo, Brasil. En México, destaca el trabajo de López & Welsh (1992) quienes presentaron una revisión de 2.105 casos reportados en la república mexicana. Así mismo Carrada *et al* (1995) reportaron una serie de casos de actinomicetoma en México; y Chávez *et al* (2002) presentan una serie de casos clínicos de actinomicetoma localizados en la región perianal. Destacamos que, en el fondo, esas investigaciones no llegan a ser estudios de caso-control (caso-referentes) que hubieran sido los más elementales que utiliza la epidemiología observacional descriptiva, es decir que apenas llegan a formar parte de uno de los tipos de estudio de la primera etapa de la Tabla 13.2 o del Grupo II, Tipos 2 y 3 de la Tabla 13.1 de este capítulo.

Investigaciones sobre el actinomicetoma publicadas en lo que corresponde a la cuarta y quinta etapas de la Tabla XIII-2 (epidemiología clínica analítica observacional y experimental)

Como se ve en la Tabla 13.1, grupo III, y en la Tabla 13.2 grupo D y E, las investigaciones de la epidemiología analítica sobre actinomicetoma comprenden a los estudios de caso-control (o casos-referentes); los estudios de prevalencia en comunidades cuyo censo es conocido; los estudios de tamizaje en centros de atención clínica más o menos especializados; los estudios de seguimiento de cohortes en zonas endémicas (a ser posible comparados con los de zonas no endémicas)... cuando se comparan los resultados de un grupo de seropositivos con otro de seronegativos a la infección por uno o varios actinomicetos patógenos en lo que concierne a las manifestaciones o síndromes clínicos. También se incluyen los estudios de ensayos terapéuticos controlados o no. Novoa-Montero & Serrano (2001) y Serrano & Novoa-Montero (2001) publicaron recopilaciones de trabajos realizados sobre las micosis humanas en Venezuela y en Latinoamérica, respectivamente. Esas recopilaciones resumen los trabajos publicados con respecto a los eumicetales y otras micosis profundas, pero resaltaron que no aparecen investigaciones específicas sobre el actinomicetoma.

Sin embargo, una aproximación rudimentaria en cuanto a prevalencia del micetoma en comunidades del Estado Lara (Venezuela) lo constituye el proyecto de Novoa-Montero & Serrano (1999), de Mejía *et al* (2000), y el de Vergara de Novoa *et al* (2001).

Los grandes campos de investigación para estudiar el actinomicetoma en grupos humanos

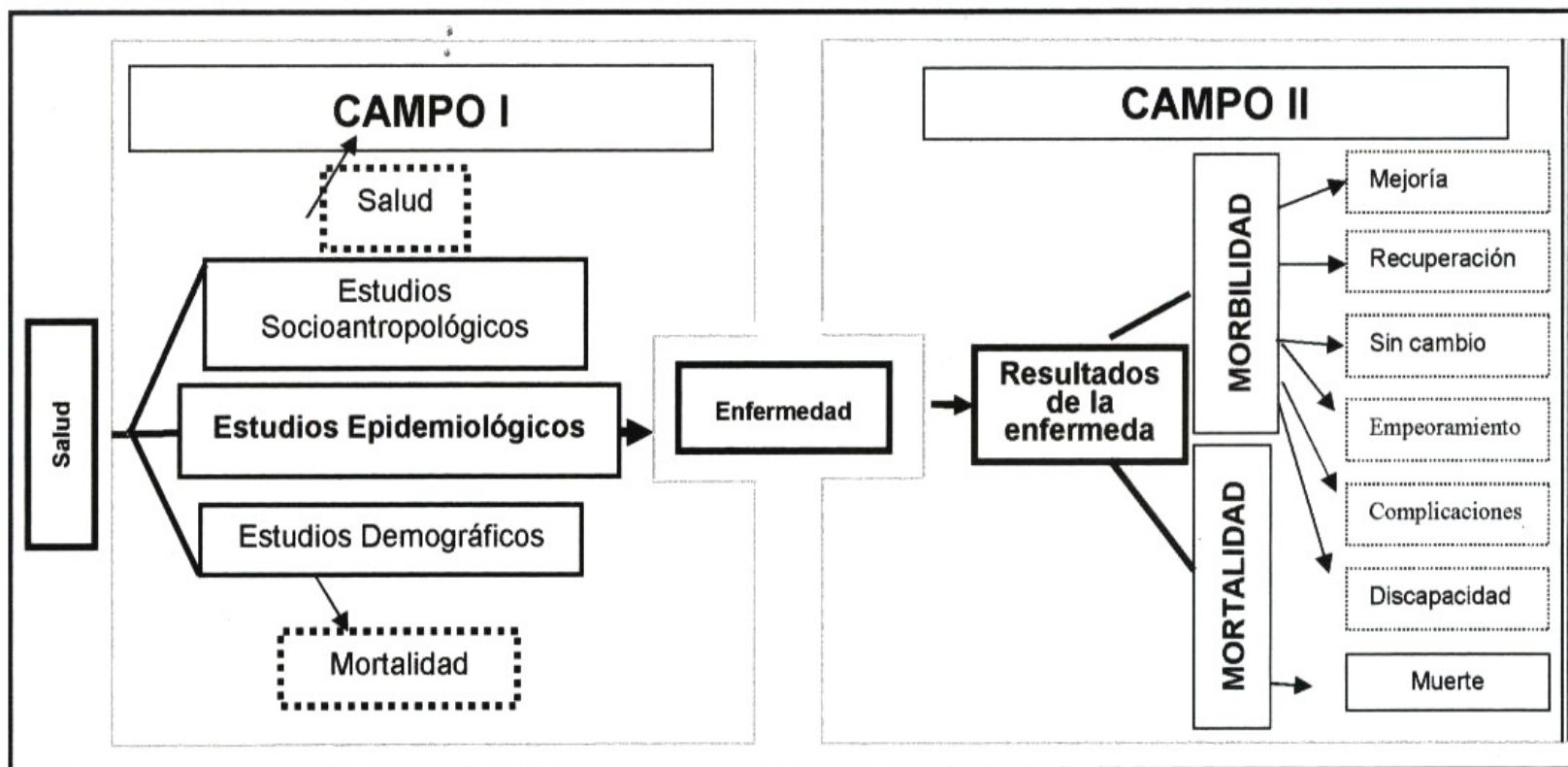
Por lo comentado en los párrafos anteriores, el *micetoma* no es una patología que se preste para ser estudiada siguiendo las etapas clásicas de la epidemiología clínica de las enfermedades crónicas (como se lista en el tercer recuadro de la Tabla 13.1). Esto resulta obvio si se considera que, en su conjunto, todos los estudios sobre el actinomicetoma que han sido publicados hasta ahora no han pasado de ser series clínicas, y algunos “han intentado” ser epidemiológicos pero no lo son, ya que o no han presentado datos de “controles”, o los controles que emplearon no fueron epidemiológicamente ortodoxos. Más aún, queda claro que ni siquiera se han publicado estudios correspondientes a la tercera, cuarta y quinta etapas que se sistematizan en la Tabla 13.2.

Por ello, en este capítulo vamos a revisar el camino más expedito y más eficiente posible que sirva para contestar el máximo de interrogantes que se requieren para estimar la magnitud de la asociación que existe entre las variables demográficas, los agentes etiológicos (actinomicetales patógenos más frecuentes), las variables explicativas e intervinientes que se encuentren en los individuos involucrados en cada grupo humano que se estudie desde el momento en que se produce la primo-infección por actinomicetales patógenos hasta la aparición del actinomicetoma clínico evidente (que es similar a la patología que producen los eumicetales). En ambas infecciones, la incidencia del micetoma clínico es baja.

Veamos cómo podemos acercarnos al conocimiento de los aspectos prácticos del estudio epidemiológico del micetoma, con la esperanza de que los resultados que se obtengan y las

inferencias que se formulen redunden en la reducción de su impacto patológico, social y sanitario, al menos en las regiones donde la infección es endémica.

En la Figura 13.1 se esquematizan los dos grandes campos de investigación en los que las enfermedades crónicas pueden ser estudiadas por los interesados cuando los investigadores hacen estudios en comunidades o grupos humanos. Iremos mencionando lo que pudimos averiguar que se ha publicado sobre la infección o la enfermedad por actinomicetales patógenos en cada uno de esos campos o “secciones” de esos campos.



© (2006) Darío Novoa-Montero

Rev. marzo 2006

FIGURA XIII-1

Los dos campos en los que se pueden desarrollar los estudios de integración en ciencias de la salud en grupos humanos

(1) *Campo I:* el de los estudios epidemiológicos clásicos de morbilidad y mortalidad que van desde la salud hasta la enfermedad, que corresponden a la *epidemiología tradicional*, y eventualmente a la llamada *epidemiología clínica*. En este *Campo I* se enmarcan también los estudios socio-antropológicos y demográficos de relación entre variables que podemos considerar 'de la salud a la salud' y que, aunque no pertenezcan propiamente a la epidemiología, pueden emplear la misma metodología inductiva para observar fenómenos socio-antropológicos (por ejemplo rendimiento escolar comparado en una escuela secundaria) o demográficos (por ejemplo, mortalidad comparada entre dos grupos de individuos sanos en distintas comunidades). (2) *Campo II:* el de los estudios clínicos que van desde la enfermedad hasta los resultados de la enfermedad; y que corresponden a la *epidemiología clínica* propiamente dicha. Desde el punto de vista de la salud pública, en el campo I se pueden realizar *prevenciones primarias*, mientras que en el *Campo II* se pueden realizar *prevenciones secundarias*.

En el campo I de la Figura 12.1, se destacan los estudios que comienzan en un punto en el cual el grupo humano que se estudia *no está enfermo* (tiene “salud” con respecto al *actinomicetoma*). Nos corresponde enfatizar y sistematizar lo siguiente:

(1°) Los estudios socio-antropológicos. En ellos, el investigador tiene por objetivo resaltar los aspectos sociales (tipo de comunidad, características antropométricas de los habitantes, estatus socioeconómico, tipos de trabajo al que se dedican, hábitos familiares, creencias mágico-religiosas...) de las personas que viven en una determinada región, provincia, país, continente... en los cuales el *actinomicetoma* es endémico.

El objetivo principal de este tipo de investigación no es el estudio de la enfermedad clínica (micetoma), sino de las características socio-antropológicas que podrían servir de base para desarrollar planes de saneamiento ambiental y de educación para la salud con respecto a la patogenicidad de los *actinomicetales* en las regiones donde se realicen los estudios. Una posible aproximación a este modelo es el trabajo de M. A. Mejía *et al* (2000) y el de S. Vergara de Novoa (2001).

(2°) Los estudios demográficos. Corresponden a un caso especial de los estudios socio-antropológicos, en los que el objetivo fundamental es estudiar las tasas de mortalidad y otros aspectos demográficos (rendimiento en el trabajo o ausencia laboral, repercusiones económicas en la comunidad...), con el fin de sustentar la creación, dotación adecuada y mantenimiento de centros de salud profesional y técnicamente adecuados para atender los problemas que ocasiona, o puede ocasionar la prevalencia del *actinomicetoma* en las comunidades que se han estudiado, se están estudiando y deben ser atendidas. No tenemos información de trabajos que se hayan publicado en Latinoamérica, que estén orientados por este modelo.

(3°) Los estudios epidemiológicos. Cuando se dirijan a investigar la forma de *prevenir* la aparición de los actinomicetomas clínicos en los individuos que viven en nichos ecológicos en que los actinomicetales patógenos son endémicos, y que persigan recomendar medidas preventivas para evitar que la infección se produzca en los trabajadores y personas en riesgo. Un tipo de estudio ideal en este campo sería investigar la aplicación de “vacunas” que impidan que a los individuos en riesgo sean infectados por actinomicetos patógenos. Así se bloquearía el efecto de la primo-infección a través de la puerta de entrada cutánea desde el medio ambiente al hombre. Es decir que esa posible “vacuna” tendría por objetivo evitar que la primo-infección por actinomicetales evolucione hasta el micetoma clínico. Este tipo de estudio podría tener relevancia si el modelo que se propone al final de este capítulo produce resultados que apunten hacia la aplicación de mecanismos inmunológicos o biomoleculares que así lo expliquen, y que sean la sustentación racional para lograr el “bloqueo” de la enfermedad clínica. Entonces los métodos que se empleen se aplicarían a las personas que viven en comunidades en riesgo solamente, o a personas que se trasladen a zonas endémicas y que estén expuestos a infectarse cuando realicen tareas en el medio ambiente contaminado con actinomicetos patógenos, para evitar en ellas la primo-infección.

También entran en este Campo I de la Figura XIII-1 los estudios epidemiológicos de *incidencia y prevalencia* de las infecciones por actinomicetales patógenos, o de los actinomicetomas clínicos que existan en comunidades, regiones, estados (provincias), países, subcontinentes o continentes. Buscar los denominadores para estimar la “verdadera” prevalencia de la infección, y el denominador para estimar la incidencia de los actinomicetomas en comunidades... es una tarea económicamente costosísima, consumidora de una enorme cantidad de tiempo, y poco práctica; ya que su estimación terminaría por inferir que “el micetoma no es una enfermedad prioritaria en el campo de la salud”, aunque pueda ser un problema social en grupos humanos determinados.

En cuanto a los estudios epidemiológicos sobre las infecciones producidas por *actinomicetales patógenos*, las investigaciones que sugiere la epidemiología clásica son:

a) Las estimaciones de *prevalencia* de infecciones en grupos humanos, definidas por seropositividad a los *actinomicetos* patógenos, o definidas por cualquier otro marcador biológico o biomolecular que sea conocido. Actualmente este tipo de estudios no tiene mayor aplicación práctica, ya que no se sabe todavía con precisión cómo los marcadores biológicos conocidos están relacionados con la frecuencia mayor o menor de la aparición de los actinomicetomas. Si los investigadores usan el modelo que proponen Novoa-Montero & Serrano (1996b, 1997, 2000); Novoa-Montero et al (2000), los autores tienen la esperanza de que si se cuenta con fondos suficientes y se realiza la investigación en grupos apropiados, cuando se publiquen los resultados que se obtengan a través del modelo multidisciplinario de caso/control-familia/control-vecinos que proponen... serían muy útiles para disminuir la morbilidad y la discapacidad asociada al micetoma que afecta a los campesinos que viven en zonas endémicas a los actinomicetales patógenos.

b) Los estudios de *prevalencia* de infecciones clínicas conspicuas, en nuestro caso específico del *micetoma clínico evidente*, cuando la frecuencia se estima en comunidades completas, cuyo denominador censal es conocido. Es decir que se puede estimar verdaderas tasas de *prevalencia* o de *incidencia* de micetoma clínico y de infección por actinomicetales, a través de estudios de campo, que son muy costosos. Este tipo de estudio tropieza con el obstáculo de que dado que el *actinomicetoma* no está catalogado como un problema prioritario de salud pública ni por la Organización Mundial de la Salud, ni por la Comunidad Europea, es difícil conseguir financiamiento para realizarlos en América Latina. Quizá sería más asequible que el financiamiento se logre en ciertos países de África (Sudán, Senegal, Mauritania, Nigeria y Etiopía). Así lo propusimos en la “The Mycetoma International Conference”, celebrada en Khartoum, Sudán en 2002 (Novoa-Montero y Serrano, 2002).

En el Campo II de la Figura 13.1 se enumeran los estudios que *van de la enfermedad a los resultados de la enfermedad* (recuperación, mejoría, sin cambio, empeoramiento, complicaciones, discapacidad, o muerte). Los estudios en este campo atraen en forma especial a los investigadores clínicos, que parten del conocimiento clínico “completo” de un grupo de pacientes con *actinomicetomas* ya semiológicamente evidente y cuando ya haya sido suficientemente diagnosticado a través de técnicas de laboratorio, exploraciones complementarias (véase “Criterios diagnósticos del actinomicetoma” en el Capítulo XII), y a los investigadores les interesa observar uno o varios de los resultados de la enfermedad *actinomicótica*. Por supuesto que para realizar estudios en grupos humanos existen varias alternativas:

A través de series *clínicas per se* (cuya categoría corresponde al Grupo II, tipo 1 de la Tabla 13.1 y a la “Primera Etapa” de la Tabla 13.2). Las series clínicas agrupan las descripciones de los síndromes y de la patología que se observa en grupos clínicos “coleccionados” en un servicio, institución, etc., sin que los investigadores usen grupos de comparación o control para constatar las diferencias en las frecuencias de las variables más importantes. Como resaltamos al explicar el modelo que presentamos al final de este capítulo, llevar a cabo investigaciones clínicas *per se* no tiene mayor sentido para formular inferencias válidas que puedan aplicarse en salud pública. En efecto, en el momento actual no se justifica gastar tiempo y dinero para estudiar el actinomicetoma en series clínicas solamente, y que se publiquen resultados sin compararlos con los resultados observados en grupos clínicos de control, ya que con los datos que se obtienen en cada serie de casos sólo se pueden formular inferencias anecdóticas, aunque muchos autores quieran extenderlas para “generalizarlas” al conocimiento del actinomicetoma.

A través del estudio de variables (de persona, lugar y tiempo) que se observen en *series clínicas de actinomicetoma* (grupo de casos) que se comparan con las observadas en otra serie de individuos de la misma comunidad de donde proceden los casos y que no tienen *actinomicetoma* (grupo control). El objetivo que persigue este modelo es obtener datos sobre la asociación del *actinomicetoma* clínico con variables ecológicas, demográficas y/o con determinados factores de exposición. Al realizar estos estudios se persigue estimar el peso específico que cualquier característica o factor de exposición pueda tener como factor de riesgo o de protección en la aparición de las manifestaciones clínicas del micetoma. Lo mismo se haría con respecto a otras características que sean de interés en la historia natural del *actinomicetoma*. Esto es extensible a la determinación de las características o de la existencia de marcadores biológicos, inmunológicos o biomoleculares que se hipotetice sean importantes en la aparición clínica del *micetoma* en grupos humanos. Por lo tanto, los grupos de comparación pueden conformarse con individuos que nunca hayan tenido la infección o que hayan tenido la infección, y que debido a que una gran mayoría de ellos tenga presencia o ausencia de algunos marcadores inmunológicos o biomoleculares, no aparezca el micetoma como enfermedad clínica evidente. Este tipo de estudio es el punto de partida del modelo que presentamos al final de este capítulo. Enfatizamos el hecho de que al emplear ese modelo sólo se *requiere un número pequeño de participantes*, sin que por ello se disminuya la validez de las inferencias que puedan formularse, y teniendo la ventaja práctica de no requerir muchos recursos financieros, lo que es muy importante en los países del tercer mundo.

Como podemos entrever, las investigaciones que se realizan en el campo *de la enfermedad a los resultados de la enfermedad* son ideales para ser llevados a cabo en centros de atención médica hospitalaria de III ó IV nivel; o de II nivel cuando los investigadores pueden realizar trabajos multidisciplinarios en conjunto con técnicos o tecnólogos de centros especializados en los que se emplean pruebas sofisticadas y técnicas avanzadas para caracterizar a los actinomicetales patógenos y definir las respuestas inmunológicas que esos agentes patógenos producen en los humanos o en algunos vertebrados superiores.

Proposición de modelos clínico-epidemiológicos eficaces, efectivos y eficientes en la investigación contemporánea del actinomicetoma

Ya revisamos lo que se ha publicado sobre las investigaciones del micetoma y de los actinomicetales asociados al mismo (observaciones de laboratorio, reportes de casos, series clínicas *per se*, series clínicas con controles que se aproximan a los estudios de caso-control, aproximaciones a estudios socioantropológicos...) (Tabla 13.2). Ahora, nos resulta imperativo informar al profesional de salud interesado, *cuáles son los modelos* de estudio que debe emplear para contestar preguntas relacionadas con la investigación sobre *actinomicetomas*, y *cuáles son las aplicaciones prácticas* que puede recomendar a los habitantes de comunidades endémicas, y que luego puedan aplicarse para minimizar el impacto que los actinomicetales patógenos pueden ocasionar en las comunidades que viven en medios endémicos.

Por lo que hemos recopilado y comentado anteriormente, es obvio que resulta fuera del sentido práctico proponer que para investigar sobre la etiopatogenia del actinomicetoma se sigan las cinco etapas del enfoque epidemiológico presentados en la Tabla 13.2. En efecto, ese es un camino extraordinariamente largo para estudiar los aspectos aún no bien conocidos de esa enfermedad infecciosa crónica que se trasmite del medio ambiente al hombre. El establecer la secuencia de ese proceso tiene fundamental importancia si se piensa que no está bien definido todavía con precisión si las lesiones óseas ...se producen por “osteomielitis y periostitis micóticas o [son] sólo osteoporosis” (Salfelder *et al* 1979), por qué a veces se producen sólo “minimicetomas” ...y por qué “los micetomas en animales son escasísimos, y por qué los actinomicetomas ocurren más en los países occidentales y los eumicetomas en los orientales... y por qué los órganos internos aparecen afectados tan pocas veces... (Salfelder *et al* 1979). Es decir, que resulta de primordial importancia

conocer a fondo por qué si la infección por actinomicetales patógenos es un lugar común en ciertos nichos ecológicos, resulta que los *micetomas clínicos* por sí mismos son tan infrecuentes. El período de latencia entre ambos hechos es tan largo, que es común que un gran número de personas de áreas endémicas estén infectadas y que nunca en su vida desarrollen la clínica del micetoma, a pesar de vivir y trabajar en labores agrícolas dentro de nichos ecológicos en los que abundan los actinomicetales patógenos. Esto indudablemente está relacionado con mecanismos genético-biomoleculares e inmunológicos, celulares y humorales, cuyo conocimiento resulta perentorio concatenar en forma pragmática.

Por ahora sabemos que el tiempo mínimo de evolución entre la primo-infección por actinomicetales y la aparición del micetoma clínico ha sido reportada entre la casuística surgida y presentada en el capítulo XII, en al menos un niño de 3 años (Arenas & Navarrete, 1990). Pero esta observación no es razón suficiente para inferir que esa sea una regla en una población completa en la que conviven todos los grupos de edad, y en los que se sabe que la infrecuencia del actinomicetoma no constituye una prioridad como problema de Salud pública.

Repetimos que los estudios de *prevalencia clínica* de actinomicetoma en medianas o grandes poblaciones (de comunidades con censo no conocido o conocido) exigen la inversión de cuantiosas sumas de dinero, consumen gran cantidad de tiempo, y puede que no sean útiles para iniciar programas de prevención primaria o de prevención secundaria.

Los dos grupos de investigación que pueden ser empleados en el estudio epidemiológico del micetoma, si tenemos en cuenta las argumentaciones expuestas en el párrafo anterior, cuando se parte de una recopilación de casos clínicos bien diagnosticados que viven en nichos ecológicos endémicos son el de la *Epidemiología Clínica Empírica* (Szklo 1994) y el *Modelo Multidisciplinario Biomédico y Epidemiológico de casos/no-casos familia/no-casos vecinos* Novoa-Montero & Serrano (1996b,1997, 2002) y Novoa-Montero et al (1999, 2000)

Debemos dejar sentado que las dos alternativas para estudiar los aspectos epidemiológicos del actinomicetoma son válidas. Surge la pregunta, ¿Cuándo utilizar el modelo de la *epidemiología clínica empírica* y cuándo el modelo epidemiológico y multidisciplinario de *casos/no-casos familia/no-casos vecinos* para llevar a cabo investigaciones clínico-ecológico-epidemiológicas en los estudios *ad hoc* que se realicen sobre el actinomicetoma?

Estas son las respuestas:

(1) La *epidemiología clínica empírica* (Szklo, 1994) debe ser utilizada en las investigaciones sobre el *actinomicetoma* que se observa en nichos ecológicos determinados cuando los investigadores, partiendo de sus propias investigaciones “rutinarias”, quieran responderse preguntas específicas como:

Cuando los investigadores estén interesados en conocer las características propias o específicas de los actinomicetales que estén produciendo el micetoma, esto es de la microbiología básica de cada parásito y las respuestas inmunológicas que presenten los huéspedes, como son la identificación de los tipos de inmunoglobulinas, la descripción de las respuestas de inmunología celular, y la determinación de los marcadores biológicos o biomoleculares que correspondan a los diferentes actinomicetales patógenos.

Cuando los investigadores publican reportes de casos clínicos o de una serie de casos clínicos de *micetoma* en la institución o área ecológica en que viven los pacientes. En general, se recomienda que los investigadores, cuando publiquen los artículos, no se limiten a incluir solamente los datos

que encuentren en la serie clínica *per se*, sino que procuren compararlos con las mediciones y datos que obtengan en un grupo de pacientes que padezcan *otra* enfermedad no relacionada con la infección por actinomicetales y que sean atendidos en el mismo centro de salud (personas que son similares a los casos en cuanto a género, edad, procedencia, condiciones socioeconómicas, etc.), de modo que, constituyéndose en grupo testigo, al publicar los resultados se pueda confiar en las potenciales inferencias que se formulen. Es decir, que se puede tener la confianza de que al comparar los resultados de las variables más importantes en ambos grupos, las inferencias clínico-epidemiológico-empíricas tienen sentido heurístico, y su aplicación puede dirigirse a solucionar o aminorar los efectos en por lo menos el grupo humano en el que trabaja cada investigador.

Cuando los investigadores realizan estudios de intervención de factores de exposición en una “cohorte” hospitalaria en la que se sabe o se sospecha que los pacientes estén en riesgo en cuanto al contagio de la infección por actinomicetales patógenos. El objetivo que perseguiría este tipo de investigación sería lograr la prevención primaria de la infección por sí misma, o la prevención secundaria de los resultados antiestéticos y discapacitantes de la enfermedad cuando ya el *actinomicetoma* se ha manifestado clínicamente en ese grupo de personas. El diseño simple para lograr la prevención primaria, podría verse en una serie de personas que viven en zonas de riesgo a los que se les indica que sigan ciertas medidas de intervención de factores que se consideran o se sabe son de riesgo para así evitar la infección (prevención primaria) y de esta forma evitar la enfermedad por los actinomicetales patógenos. Si se utiliza un grupo control, el estudio clínico-empírico adquiere el aspecto de ensayo clínico no aleatorizado pero heurísticamente útil, que presenta la gran ventaja práctica de poder realizarse empleando grupos pequeños de personas, en los que se establezca la diferencia en los resultados en cuanto a las mediciones de primo-infección en el grupo no protegido con respecto del grupo protegido por los métodos de intervención que se propongan (estudio de eficacia y efectividad de métodos profilácticos).

Cuando los investigadores realizan estudios de ensayo terapéutico en series *clínicas per se* (experimentos terapéuticos no controlados), o para comparar la eficacia, la efectividad o la eficiencia de una droga (generalmente la más asequible y/o económica en los países del tercer mundo) en comparación con otra droga o procedimiento terapéutico conocido estándar (el diseño correspondería a un ensayo terapéutico controlado). Este diseño de la epidemiología clínica empírica es de gran importancia práctica en nuestros países del tercer mundo, y es de mucha utilidad para los residentes de áreas hospitalarias. Su aplicación en la práctica de salud es evidente.

(2) Al modelo de casos/no-casos familia/no-casos vecinos, que hemos venido proponiendo en diversos eventos internacionales como el de Moscú, Rusia (Novoa-Montero & Serrano, 1994), el de Jabalpur, India (Novoa-Montero & Serrano, 1996b), Beijing, China (Novoa-Montero & Serrano, 1997), Estados Unidos (Novoa-Montero *et al* 2000) y Sudán (Novoa-Montero & Serrano, 2002). A este submodelo de caso-control le dedicamos todo el acápite siguiente.

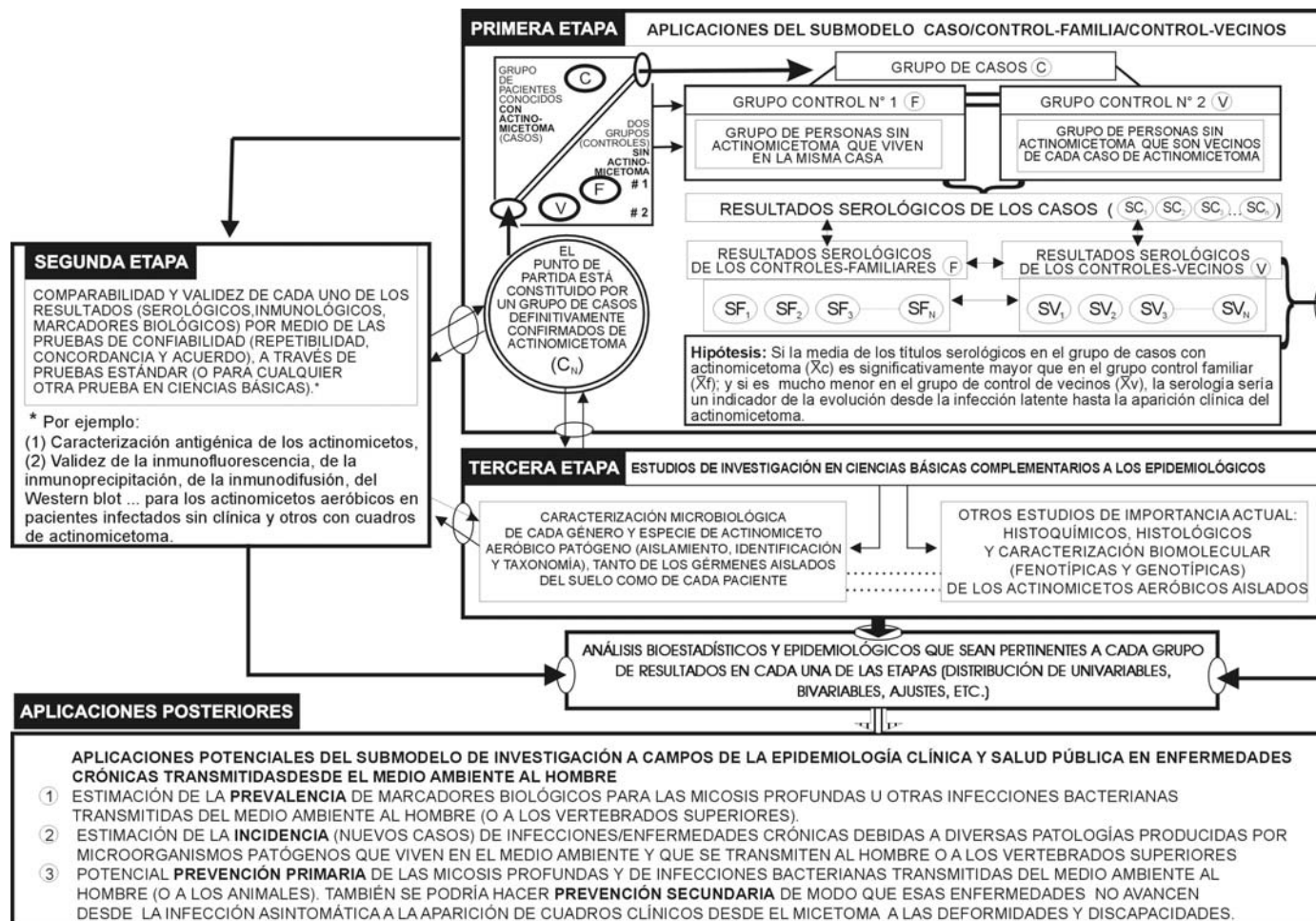
Modelo multidisciplinario biomédico y epidemiológico de casos/no-casos familias/no-casos vecinos. Potencial método para estudiar simultáneamente muchos aspectos de la etiopatogenia de la infección por actinomicetales y de su evolución hasta el actinomicetoma

Basándonos en un artículo que publicamos anteriormente (Novoa *et al* 1999), proponemos en esta obra emplear un nuevo submodelo de estudio de caso-control para ser aplicado cuando se busca estudiar conjuntamente varios aspectos del actinomicetoma, partiendo de una serie de casos reunidos por uno o varios médicos, y que procedan de comunidades de un área endémica definida. Esas condiciones se dan en el trabajo asistencial que realizan los grupos de médicos especialistas y micólogos clínicos que trabajan en los centros de Salud en el que se atienden comunidades que viven en nichos ecológicos donde los actinomicetales patógenos son endémicos y el micetoma se ve con cierta frecuencia. El submodelo que proponemos permite elucidar conjuntamente los aspectos biomédicos y ecológico-epidemiológicos de las infecciones y enfermedades producidas por los actinomicetales aeróbicos en humanos; específicamente en lo que respecta al actinomicetoma, que es producido por varios agentes. El uso del submodelo permite que se emplee un número de testigos (grupo de comparación) para comparar la distribución de las variables entre ambos grupos. Para lograr ese objetivo basta con que el grupo de comparación (que debe ser idóneo y pertinente) sea al menos del mismo tamaño que el de los casos.

La bondad del submodelo estriba en que se puede contar con dos grupos de comparación: el de *no-casos familia* y el de *no-casos vecinos*. Así, aparece claro que los 3 grupos “están a la disposición” del equipo de investigadores. Es decir que todos los participantes son asequibles y manejables logísticamente por cualquier institución de asistencia médica, aunque sólo cuente con recursos limitados, lo que es la norma en los países del tercer mundo.

Tenemos la firme convicción de que al proponer este sub-modelo, que requiere del trabajo sincronizado de un equipo multidisciplinario de investigadores, es una herramienta potencial para desarrollar concatenadamente diversas líneas de investigación en el campo no sólo de los actinomicetales, sino en el de cualquier otra enfermedad infecciosa que se transmita del medio ambiente al hombre. Aunque parezca extraño, actualmente este submodelo, está siendo empleado en una investigación que desarrollamos conjuntamente entre Trino Baptista, Carlos Delgado y Darío Novoa Montero. El Proyecto se titula “Frecuencia del síndrome metabólico entre pacientes esquizofrénicos y bipolares comparados con familiares sin patología psiquiátrica. Estudio de caso/control-familia/control-vecinos” (2004).

Una visión de conjunto, en forma de diagrama de flujo, que comprende todos los aspectos de este modelo, está detallada en la Figura 13.2. Para entenderla sugerimos que el lector la vaya siguiendo paulatinamente a medida que lea este capítulo. El punto de comienzo en la investigación es que se cuente con un grupo de casos que hayan sido muy bien diagnosticados, es decir



© 2005 Darío Novoa-Montero

Rev. abril, 2005

FIGURA 13.22 Diagrama de flujo del modelo multidisciplinario biomédico y epidemiológico de caso/control-familia/control-vecinos para investigar la infección por actinomicetales patógenos y sus manifestaciones clínicas (micetoma) y/o deformidades y discapacidad. Aplicación del modelo a otras infecciones crónicas que se transmiten del medio ambiente al hombre (micosis sistémicas, etc.).

“que indudablemente padezcan actinomicetoma”, de acuerdo con los criterios clínicos, serológicos, microbiológicos y anatomopatológicos, como está establecido en la definición estándar del Capítulo XIII de este libro. Corresponde pues al criterio que se emplea al iniciar investigaciones de los llamados “nested cases” (Tabla 13.1). En nuestra experiencia, para comenzar con el estudio del problema, se partió de 39 casos de actinomicetoma, que ya han sido reunidos por Serrano *et al* desde 1962 a 2003 (Tabla 13.3). Se llama la atención que la Tabla 13.3 es la simplificación de los datos presentados en la Tabla 13.4 (Ver Capítulo XIII de esta obra).

Recapitulando decimos que el submodelo de investigación de caso-control que se propone está dirigido a estudiar grupos de casos clínicos que han estado siendo atendidos en centros bien equipados en los cuales han sido diagnosticados por padecer, sin lugar a dudas, *micetoma clínico* (actinomicetoma). El grupo entero de actinomicetomatosos (en nuestro grupo de investigación corresponde a 39 casos diagnosticados entre 1962 y 2003 [Serrano *et al* 1987, 1996; Novoa-Montero *et al* 1999; Novoa-Montero & Serrano 1996b, 1997, 2002; Novoa-Montero *et al* 2000]). Esa serie constituye el grupo de casos (o *grupo de estudio*) que en la Figura XIV-2 se codifican ($C_1, C_2, C_3...C_n$). Para realizar el diseño de caso-control (primera etapa de la Figura XIV-2), se toma como *grupo control N° 1*, al conformado por al menos un conjunto igual de familiares de cada uno de los pacientes, y que por supuesto no tienen *micetoma* (en el diagrama de flujo se codifican como $(F_1, F_2, F_3...F_n)$). Más aún, para optimizar los contrastes de los resultados, proponemos que se conforme un *segundo grupo de control* con un conjunto de personas elegidas al azar, que no sean familiares y que vivan en casas vecinas a las de cada caso, y que, por supuesto, ninguna padezca *micetoma* (en el diagrama de flujo se codifican como $(V_1, V_2, V_3...V_n)$). Resulta obvio señalar que cuando alguno de los testigos (controles) que vivan en cualquiera de esas casas (propias o vecinas) se descubra que padezca *micetoma*, engrosaría el grupo de los casos (C_i).

Teniendo conformado el grupo de casos ($C_1, C_2, C_3...C_n$), y habiendo seleccionado los dos grupos de control [$(F_1, F_2, F_3...F_n)$ y $(V_1, V_2, V_3...V_n)$], se parte de los datos de los resultados serológicos ya conocidos en el grupo de casos ($SC_1, SC_2, SC_3...SC_n$) y se comparan con los resultados serológicos que se obtengan *ad hoc* en cada uno de los adultos seleccionados del grupo de familiares sin *micetoma* ($SF_1, SF_2, SF_3...SF_n$) y con los resultados serológicos de los vecinos sin *micetoma* ($SV_1, SV_2, SV_3...SV_n$).

Se sugiere que el lector siga con detenimiento y atención el contenido del diagrama de flujo de la Figura 13.2 y que observe que la *hipótesis sobre las diferencias* entre los resultados serológicos debería ser la siguiente:

“Si la media (\bar{X}_{SC}) de los títulos serológicos en el grupo de casos ($SC_1, SC_2, SC_3...SC_n$) es significativamente mayor que la media (\bar{X}_{SF}) entre el grupo control de familiares ($SF_1, SF_2, SF_3...SF_n$); y si a su vez ambas medias ($\bar{X}_{SC}, \bar{X}_{SF}$) fueran significativamente mayores que la media del grupo de control de los vecinos (\bar{X}_{SV}), el aumento de los títulos serológicos sugeriría que el incremento en los títulos de seropositividad para el o los agentes actinomicetales patógenos que se estén estudiando, debería corresponder a un indicador de mayor probabilidad de aparición clínica del cuadro clínico de micetoma”.

Por supuesto que, de acuerdo con que la infección sea producida por uno u otro actinomiceto patógeno, la variable seropositividad podría tener diferentes respuestas inmunológicas, según fueran las inmunoglobulinas que se comporten como anticuerpos en el huésped. Pensamos que la reacción inversa entre el aumento de los títulos serológicos en el curso evolutivo del actinomicetoma clínico, no debería observarse; pero si lo fuera, constituiría un hallazgo muy importante, digno de una publicación especial. El que la respuesta fuera mixta, es decir que con la infección por un actinomiceto produjera aumento, y que por otro produjera disminución o no variara... plantearía un

problema heurístico, sobre el cual no nos parece pertinente hacer comentarios especulativos en este momento.

La *segunda etapa* del modelo que se presenta en la investigación multidisciplinaria de “caso/control-familia/control-vecinos” es la del establecimiento de la comparabilidad y validez de los resultados de cada una de las pruebas de laboratorio (serológicas, inmunológicas, marcadores biológicos) que se empleen para cada actinomiceto patógeno. (Véase la parte correspondiente de la Figura 13.2, *segunda etapa* del diagrama de flujo).

Para que los resultados de las pruebas que se emplean tengan *validez* o confiabilidad al realizar un trabajo de investigación, es conveniente que el grupo de investigadores interesados en el estudio de los actinomicetomas revisen las técnicas de laboratorio que se emplean (Tercera etapa del modelo que se propone en el diagrama de flujo), en cuanto a:

Supervisar la *caracterización antigénica* de cada actinomiceto patógeno que estudien. Por lo tanto, el investigador responsable de ese “sector” del proyecto debe asegurarse de que los reactivos que se utilicen hayan pasado todas las pruebas estándar de calidad internacionales que estén vigentes. Si fuera posible, esa tarea debe ser cumplida en lo que corresponde al *estudio piloto* del proyecto que prevean cuando los investigadores realicen la investigación. También deberían comprobar que los reactivos y antígenos, etc., que utilizarán sean de óptima calidad.

Precisar la validez de las pruebas de medición de anticuerpos presentes en las muestras de suero sanguíneo, a través de los métodos de: (a) inmunofluorescencia; (b) inmunoprecipitación; (c) inmunodifusión; (d) Western blot... y/o de cualquier otra prueba que se invente o que se estime sea pertinente para completar la investigación con respecto a cada actinomiceto patógeno cuando éste se realice.

La *tercera etapa* del diagrama de flujo de la Figura 13.2 que se presenta en la investigación gracias a este sub-modelo multidisciplinario de “caso/control-familia/control-vecinos” destaca la facilidad que el modelo ofrece para:

Realizar estudios precisos de investigación en ciencias básicas, que complementen y contribuyan a elucidar la *caracterización microbiológica* de cada agente a través de su aislamiento, identificación y taxonomía. Es muy importante que en cada actinomicetoma se determine las características de los agentes patógenos, tanto de los gérmenes que se encuentran en los suelos y en las plantas, como de los que se aíslan de los humanos (y de algunos vertebrados superiores) que viven en las zonas endémicas que sean objeto de la investigación que se lleva a cabo. Precisar esos datos orientaría mucho acerca de la virulencia de los géneros y especies que producen cuadros clínicos de *micetomas* en comparación con otros géneros y especies de actinomicetos que no lo hacen. Por ejemplo, ese tipo de estudio podría encontrar la explicación posible del por qué en zonas endémicas para los micetomas, se aíslan del suelo y de las plantas varios géneros y especies de actinomicetos; y sólo se ha encontrado presente una de las especies en los micetomas que se han diagnosticado. En otras zonas endémicas los resultados pudieran apuntar en otro sentido.

Realizar investigaciones muy sofisticadas sobre las características histológicas, histoquímicas y caracterizaciones biomoleculares (tanto fenotípicas como genotípicas) de cada actinomiceto aeróbico que haya sido aislado en cada grupo humano estudiado. Esto quizá permitiría explicar por qué un mismo género y especie es a veces más virulento que otro, si su sub-caracterización es diferente en un grupo humano que en otro en el mismo nicho ecológico. Es también importante estudiar y determinar el tipo de resistencia a los antimicrobianos y si la misma es de origen exógeno o endógeno, para así poder comprender mejor los mecanismos de resistencia de una determinada

cepa a uno o a varios antibióticos en particular. Esto implica el estudiar la resistencia a los antibióticos o quimioterápicos, tanto de las cepas aisladas de los pacientes con actinomicetoma, como la de cepas aisladas del medio ambiente. El estudio de Mayela Uzcátegui titulado “Género *Nocardia*: Características morfológicas, bioquímicas, citoquímicas y susceptibilidad antimicrobiana” (Uzcátegui-Negrón, 2004) constituye un intento para aclarar este punto.

Análisis bioestadísticos y epidemiológicos aplicables al submodelo que se propone

En la Tabla 13.5 se presentan los métodos estadísticos que se usan para estimar la asociación entre variables cualitativas (atributos) o cuantitativas (variables propiamente dichas) en los estudios en grupos humanos (cuando se presume que los eventos son binomiales independientes). Esos tipos de análisis son aplicables al modelo que estudiamos en la *primera etapa* del diagrama de flujo de la Figura 13.2, es decir en los estudios epidemiológicos propiamente dichos. Se recomienda que el lector los revise y reflexione sobre lo que ellos significan. Los paquetes estadísticos más conocidos mundialmente para estos análisis son el SPSS, el SAS, y EpiINFO. Utilizándolos apropiadamente se pueden obtener resultados confiables. Las bases bioestadísticas en las que se fundamentan los análisis de esos paquetes de computación pueden consultarse en buenos libros de la especialidad, por ejemplo Daniel (1991).

Los análisis estadísticos que se utilizan en la *segunda etapa* de la investigación (Figura 13.2) son:

Los correspondientes a la comparabilidad entre las lecturas del mismo método de laboratorio (“reliability”, repetibilidad) o sea las lecturas que ha hecho el mismo técnico o tecnólogo cuando emplea la misma técnica en el mismo laboratorio. El método de análisis es la “*intrasubject correlation*” (Ross & Novoa-Montero 1993).

Los correspondientes al llamado “*inter rater agreement*”, propuesto por Landis y Koch (1977) y que se mide por el estadístico *Kappa* (Fleiss 1981). Este tipo de análisis, encierra dos conceptos:

- (a) La comparación de los resultados de una misma prueba en distintos laboratorios (“concordance”, concordancia) (Ross & Novoa-Montero 1993).
- (b) La comparación de los resultados del mismo método en diferentes laboratorios (“agreement” o acuerdo) (Ross & Novoa-Montero 1993).

A los lectores interesados les sugerimos que lean el artículo “*Comparability and reliability of Elisa, immunofluorescence, and indirect hemagglutination assays for Trypanosoma cruzi and Trypanosoma rangeli*”, publicado en The Journal of Infectious Diseases (Ross & Novoa-Montero, 1993) y que utilicen un diseño similar para determinar la validez de las pruebas de laboratorio que utilicen en el estudio que realicen.

Una vez que la validez de una prueba determinada haya sido estimada, los investigadores que cuenten con un grupo de enfermos de *micetoma*, podrían definir en su propia pesquisa qué significan las pruebas de laboratorio con respecto a la infección y con respecto a la patología que observen en el *actinomicetoma* y cómo son diferentes o semejantes entre los diferentes agentes

Tabla 13.5

Métodos que se usan para estimar la asociación estadística según se contrasten variables cualitativas (atributos) o cuantitativas (variables propiamente dichas) en estudios en grupos humanos cuando los eventos se presume que son binomiales independientes

Categoría de combinación para análisis de variables	Tipos de variables confrontadas	Método estadístico que se debe usar para definir la asociación
Tipo 1	Atributo* (Variable independiente) Atributo* (Variable dependiente)	Tablas de contingencia y aplicación del chi-cuadrado (cuando $n \geq 30$)** y/o prueba exacta de Fisher (cuando $n < 30$).**A veces se usan otros métodos [<i>métodos no paramétricos</i>]
Tipo 2	Atributo* (Variable Independiente) (Variable) (Variable dependiente)	Distribución normal (cuando $n \geq 30$)** Distribución de Student “t” ($n < 30$)** Regresión lineal simple [<i>métodos paramétricos</i>]
Tipo 3	Variable* (Independiente) Variable* (Dependiente)	Regresión lineal simple Regresión lineal múltiple [<i>métodos paramétricos</i>]
Tipo 4	Las dos son variables* y ambas son independientes	Correlación lineal simple Correlación lineal múltiple [<i>métodos paramétricos</i>]
AJUSTES	Atributos/variables que se hayan confrontado en una o varias de las categorías anteriores	Ajuste indirecto Ajuste directo Métodos logísticos Análisis discriminantes Análisis de múltiples variables Análisis logístico múltiple (binario, etc.)***

© 2005 Darío Novoa Montero

Rev. abril, 2005

* Todos los “atributos” son *cualitativos*; todas las “variables” son *cuantitativas*. Las variables “cuantitativas” se pueden convertir en “cualitativas” si se establece el criterio de corte en un valor límite determinado (en general estandarizado por un comité de expertos) [variables categóricas]. Por ejemplo, se acepta como hipertensos sistólicos los que tengan TA >140 mHg y como no hipertensos sistólicos los que tengan TA ≤ 140 mHg.

** n= tamaño de la muestra que se estudia.

*** El ajuste que emplea el análisis logístico múltiple binario es el que más se usa actualmente en los estudios epidemiológicos.

actinomicetales que pudieran encontrarse en otros casos de la misma región que estudian. Esta metodología es confiable para presentar los resultados y hacer inferencias que puedan explicar el por qué de la aparición del cuadro clínico en unos pocos individuos mientras que en la mayoría de sus familiares y vecinos infectados es silencioso o asintomático. Esto sería especialmente “convinciente” cuando los resultados de los análisis se presenten “ajustados” para las diferentes variables que sean pertinentes en cada grupo estudiado.

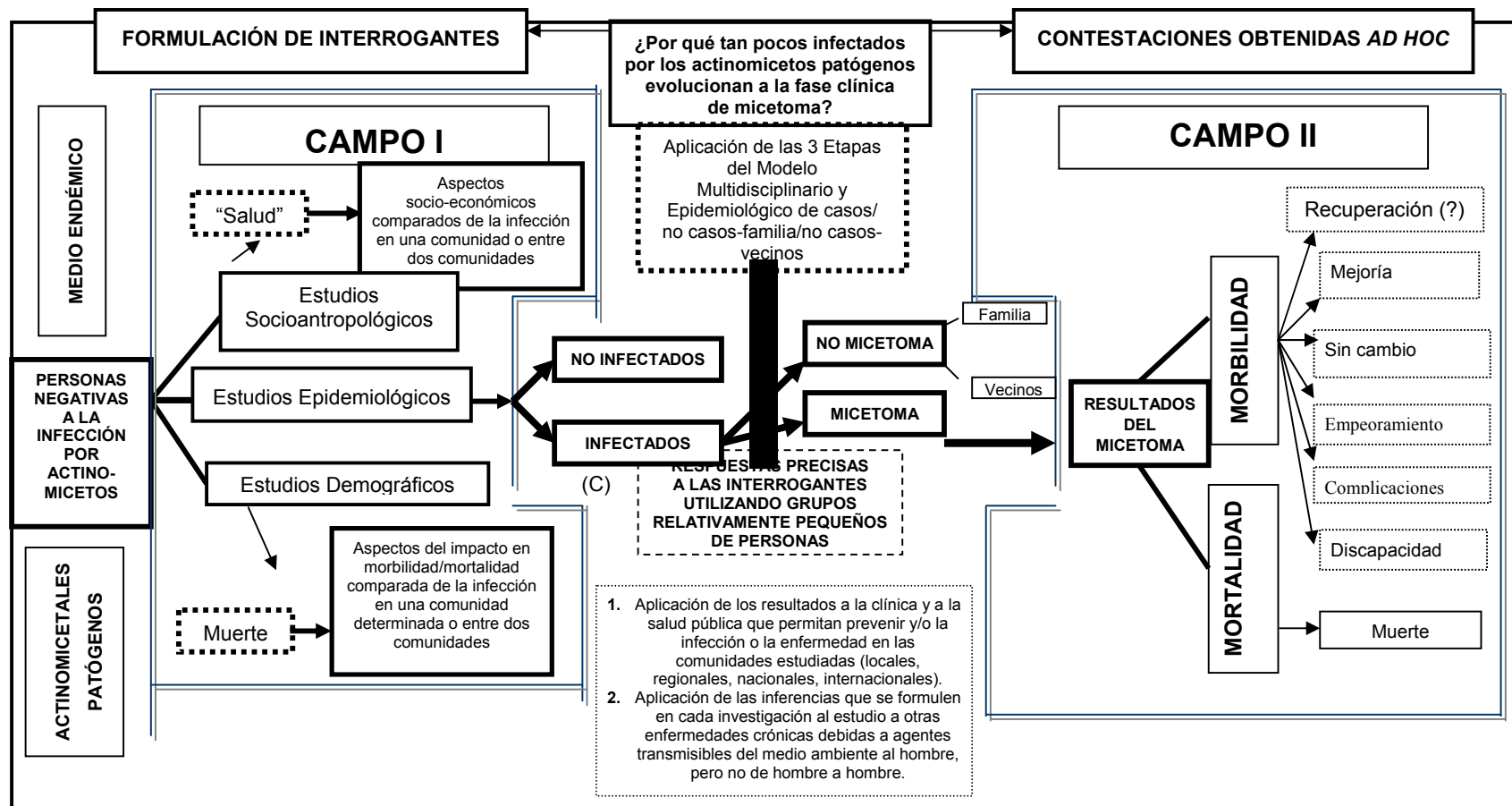
Los análisis estadísticos de los estudios que se realicen en la *tercera etapa* del diagrama de flujo de la Figura XIV-2 no exigen mayores explicaciones. En realidad corresponderían a *estudios* en el campo de las ciencias básicas como microbiología, histopatología, caracterizaciones biomoleculares (fenotípicas y genotípicas) de los agentes que se encuentren en los individuos que participen en los estudios, y de los productos del micetoma, pero fundamentalmente de los actinomicetos aeróbicos mismos aislados en cada grupo de estudio.

En la Figura 13.3 presentamos, en forma de diagrama de flujo simplificado, los pasos sucesivos que se deben seguir cuando se emplea el modelo de investigación que presentamos en este Capítulo. En ese diagrama integramos los mensajes de la Figura 13.2, de modo que en su centro se interconectan los estudios que se pueden realizar en el Campo I con los del Campo II, y se desarrollen los estudios correspondientes al modelo caso/no-caso familia/no-caso vecinos, para contestar concatenadamente todas las interrogantes que heurística y científicamente están esperando ser aclaradas en el estudio del micetoma. Esperamos que el lector de este texto pueda seguir esa integración, y ojalá que algún grupo de investigadores lo emplee en su sitio de trabajo, y que los resultados que se obtengan sean provechosos y productivos para su aplicación en la salud pública local, regional o nacional del país donde trabajen. Entonces, con su triunfo, nos sentiríamos académicamente retribuidos.

Aplicaciones potenciales del modelo caso/no-caso familia/no-caso vecinos en estudios de epidemiología clínica y de salud pública en otras infecciones transmitidas desde el medio ambiente al hombre

El desarrollo de las investigaciones sobre la infección por actinomicetales aeróbicos y sobre el actinomicetoma clínico en un grupo humano determinado, cuando se haya realizado a través de las *tres etapas* del diagrama de flujo de la Figura 13.2 que se integran en la Figura 13.3, utilizando series de casos clínicos, es aplicable *mutatis mutandi* a pesquisas similares de otros *actinomicetos patógenos* en humanos (o en algunos vertebrados superiores). El modelo es también efectivo para estudiar la epidemiología de otros microorganismos que se transmiten del medio ambiente (generalmente el suelo y las plantas xerófitas) al hombre (o vertebrados superiores); pero no lo es cuando la transmisión se realiza de humano a humano (*antrónosis*), de animal a humano (*zoonosis*), o de animal a animal (*enzootia*).

Una vez obtenidos los resultados preliminares con el sub-modelo casos/no-casos familia/no-casos vecinos, se pueden realizar estudios de estimación de la *prevalencia* de los marcadores biológicos en grupos humanos en los que se defina



2005 Darío Novoa Montero

Rev. abril, 2005

Figura XIII-3
Visión esquemática del aporte que hace la aplicación del Modelo casos/ no-casos-familia/ no-casos-vecinos, como método de investigación multidisciplinario en el estudio de la infección por actinomicetales patógenos y su evolución/no evolución hacia el micetoma clínico.

y se estime la tasa de prevalencia de la infección en las comunidades endémicas a los actinomicetos o eumicetos patógenos, y de otras bacterias de comportamiento similar, donde lógicamente se produce la cadena de transmisión medio ambiente-hombre.

Basándose en los mismos resultados, debidamente jerarquizados, se puede definir con la mayor claridad posible la *incidencia* (casos clínicos nuevos) de *micetoma* que aparezcan en una determinada comunidad de un área de estudio, cuyo “*denominador*” puede ser relativamente fácil de estimar por medio de censos *ad hoc*. Parece lógico inferir que una vez establecida la secuencia entre las variables a ser incluidas en una investigación determinada y cuando se haya obtenido respuestas con el empleo del modelo que proponemos, se podría estimar el *pronóstico*, en cada persona en particular, desde la determinación de la infección inaparente hasta la aparición de *cuadros clínicos de micetoma*, o de la otra enfermedad bacteriana que se trasmite del medio ambiente al hombre o animal superior.

De lo descrito y comentado anteriormente se infiere fácilmente que el lograr el conocimiento multidisciplinario de todos los problemas descritos para completar los conocimientos sobre la infección y enfermedad por actinomicetales patógenos, pondrá en manos de cada grupo de investigadores las herramientas necesarias para mejorar la *prevención primaria* y, lo que es más práctico aún, lograr la *prevención secundaria* de los eventos de la enfermedad en cada enfermo, de manera que se reduzca al mínimo la aparición de micetomas (o de la clínica de la enfermedad en otros tipos de infecciones transmitidas del medio ambiente al hombre [o vertebrados superiores]). Las aplicaciones de los resultados que se obtengan reducirían evidentemente las consecuencias socio-económicas de este tipo de enfermedades. Ciertos grupos humanos que viven en zonas endémicas de varios países del tercer mundo y del mundo en desarrollo, lo están esperando.

Esperamos que los investigadores interesados nos ocupen en caso necesario a través de las direcciones de correo electrónico: Darío Novoa, labmice@ing.ula.ve; dmontero98@hotmail.com; y José A. Serrano, jacielo@cantv.net.

AGRADECIMIENTOS

A Erika Colmenares y a María Osleida Mercado por el procesamiento de palabras e imágenes en computación que terminaron en la edición de este capítulo. Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad de Los Andes (CDCHT-ULA) por el financiamiento en la realización de este trabajo (Proyecto M-738-01).

Bibliografía

- Araujo MJ; Castañeda E. Preparación de un antígeno de *Madurella mycetomatis* aplicable al diagnóstico de micetoma. Rev Iberoam Micol. 1997; 14: 31-35.
- Arenas R; Navarrete G. Micetomas en niños: Estudio de cinco casos. Dermatología Rev Mex, 1990; 34: 205-208.
- Baptista T; Novoa-Montero D; Delgado C. Frecuencia del Síndrome metabólico entre pacientes esquizofrénicos y bipolares en comparación con familiares sin patología psiquiátrica. (Estudio de caso/control-familia/control-vecinos). Proyecto CDCHT-ULA M783-03-07A, 2004 e-mail: <darionovoa>labmice@ula.ve.
- Brumpt E. Mycetomes humaines. Compt Rend Soc Biol. 1905; 58: 997-999.
- Brumpt E. Les Mycetomes. Arch Parasitol. 1906; 10: 489-572.
- Carter, H. v. On mycetoma or the fungus disease of India including notes of recent cases and new observations on the structure, etc., of the entophytic growth. Trans Med Phys Soc (Bombay), 1860; 7:206-221.
- Carter, H. v. On mycetoma or fungus disease of India J&A Churchill, London, 1874.
- Carrada T; Corrales-Sánchez JS; Corrales-Sánchez DF. Avances en el conocimiento de las micosis subcutáneas y actinomicetomas (I). Agentes etiológicos y aspectos clínico-epidemiológicos. Piel, 1995; 10: 64-76.
- Castro LGM Jr; Belda W; Salebian A; Cucé LC. Mycetoma. A retrospective study of 41 cases seen in São Paulo, Brazil, from 1978 to 1989. Mycoses, 1993; 36: 89-95.
- Chang P; Logemann H. Mini-mycetoma due to *Nocardia brasiliensis*. Int J Dermatol, 1992; 31: 180-181.
- Chávez G; Estrada R; Bonifaz A. Perianal actinomycetoma, experience of 20 cases. Int J Dermatol, 2002; 41: 491-493.
- Daniel WW. 1991. Biostatistics: a foundation for analysis in the health sciences. 5th ed. John Wiley and Sons. New York.
- Fleiss JL. 1981. Statistical methods for rates and proportions. 2nd ed. John Wiley and Sons. New York.
- International Conference on Current Status and Challenges in Medical and Veterinary Research, particularly in Third World countries. 1996, Jabalpur, India.
- ISBA '94. IX International Symposium on the Biology of Actinomycetes. Book of Abstracts. Moscú, Russia, 10-15 de julio, 1994.
- ISBA '97. X International Symposium on the Biology of Actinomycetes. Book of Abstracts. Beijing, China, _____, 1997.

ISBA'99. XI International Symposium on the Biology of Actinomycetes. Book of Abstracts. Creta, Grecia, 1999.

ISBA'2001. XII International Symposium on the Biology of Actinomycetes. Book of Abstracts. Vancouver, Canadá, 5-10 agosto, 2001.

ISBA'2003. XIII International Symposium on the Biology of Actinomycetes. Book of Abstracts. Melbourne, Australia, 1-5 diciembre, 2003.

Kanhack AA. Madura Disease (mycetoma) and actinomycetes. J Pathol I; 1893; I: 140-162

Lacaz CS. Distribuição geográfica dos micetomas no Brasil. An Bras Dermatol, 1981; 56: 167-172.

Landis JR; Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. Biometrics, 1977; 33: 159 – 179.

Lilienfeld AM; Lilienfeld DE. 1980. Foundations of Epidemiology. 2nd edition. Oxford University Press, New York.

Londero A; Ramos C. Micetomas actinomicóticos no Ríó Grande do Sul. Relato de cuatro casos. Mem Inst Osw Cruz, 1986; 81:73-77.

López R; Welsh O. Epidemiology of mycetoma in Mexico. Study of 2.105 cases. Gac Méd Méx, 1992; 128: 477-481.

Mahgoub ES; Murray IG. Mycetoma. William Heinemann Medical Books Ltd. The Whitefriars Press Ltd. London, 1973.

Mariat F. Étude comparative de souches de *Nocardia* isolées de mycétomes. Ann Inst Pasteur. 1965; 109-190.

Mariat F; Destombes P; Segretain G. The mycetomas: Clinical features, pathology, etiology and epidemiology. Contrib Microbiol Immunol. 1977; 4:1-39.

Mejía MA; Serrano JA; García E; Novoa-Montero D; Zamora R. El Micetoma en Venezuela. Estudio de una serie de casos en el Estado Lara. (1976-1996). Estudio multidisciplinario (biomédico) y epidemiológico de casos-familia (1995-1996). Informe al Consejo Desarrollo Científico Humanístico y Tecnológico de la Universidad de Los Andes. Enero 20 de 2000.

Motta RL; Rocha-Vilela RV; Lambertucci JR. Actinomycetoma caused by *Nocardia brasiliensis*. Rev Soc Bras Med Trop. 2004; 37: 287-288.

Novoa-Montero D; Serrano JA. Multidisciplinary family-case comparison epidemiologic study (1994-1996). Proceedings of the Ninth International Symposium on the Biology of the actinomycetes. Moscow, Rusia, 1994.

Novoa-Montero D; Serrano JA. Mycetoma in Venezuela – a series of cases in the State of Lara, Venezuela. Proceedings. International Conference on Current Status and Challenges in Medical and Veterinary Research, particularly in Third World countries. Jabalpur, India, 1996a.

Novoa-Montero D; Serrano JA. Venezuelan multidisciplinary family-case comparison epidemiologic study of mycetoma (1966-1995). Proceedings. International Conference on Current Status and Challenges in Medical and Veterinary Research, particularly in Third World Countries. Jabalpur, India, 1996b.

Novoa-Montero D; Serrano JA. Multidisciplinary family-case biomedical and epidemiologic model to study pathogenic aerobic actinomycetes. Emphasis on mycetoma infections. Proceedings Xth International Symposium on Biology of Actinomycetes. Beijing, China, 1997.

Novoa-Montero D; Serrano JA; Boiron P; Mejía MA. Multidisciplinary family-case biomedical and epidemiologic model to study pathogenic aerobic actinomycetes. *J Mycol Med* 1999; 9:127-129.

Novoa-Montero D; Serrano JA; Boiron P. Epidemiologic models to develop new research on human mycoses. *Boletín de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, (Venezuela) 2000; 20: 21-29.

Novoa-Montero D; Serrano JA. Review on human mycoses in Venezuela. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, Caracas, 2001; 21: 49-68.

Novoa-Montero D; Serrano JA. Multidisciplinary family-case biomedical and epidemiologic model to study actino and eumycetoma. Proceedings The Mycetoma International Conference. Khartoum, Sudan, 3-5 de febrero de 2002.

Novoa-Montero D. Epidemiología clínica para investigadores en Hospitales. Modelos básicos de investigación clínico-epidemiológica en ciencias de la salud. 6ª ed. Laboratorio Multidisciplinario de Investigación Clínico-Epidemiológica (Lab-MICE), 2003; Mérida, Venezuela. *e-mail*: labmice@ula.ve; www.netsaluti.com/es/dnovoa.

Organización Mundial de la Salud (OMS). Oficina Sanitaria Panamericana (OSP). Organización Panamericana de la Salud (OPS), Clasificación Internacional de Enfermedades, IX Revisión (CIE-9), Washington, DC, 1975.

Organización Mundial de la Salud (OMS). Oficina Sanitaria Panamericana (OSP). Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades y Problemas Relacionados con la Salud. Décima Revisión (CIE-10), Washington, DC, 1995.

Pinoy E. Actinomycoses and mycetomes. *Paris Bull Inst Pasteur*. 1913; 11: 929-938.

Ross A; Novoa Montero D. Comparability and reliability of ELISA, immunofluorescence, and indirect hemmagglutination assays for *Tripanosoma cruzi* and *Tripanosoma rangeli*. *JID*, 1993; 168:1581-1584.

Salfelder K, Schwarz J, Sauerteig E. Micosis profundas en el hombre. Atlas en color F.K. Schattaver Verlag, Stuttgart. New York. 1979.

Serrano JA, Beaman BL, Viloría JE, Mejía MA, Zamora R. Histological and ultrastructural studies of human actinomycetoma. In B. Szabo, S. Biro, M. Goodfellow. (eds) Biological and biochemical aspects of actinomycetoma, Akadémicae Kiadó, Budapest, Hungary. 1986, pp 647-662.

Serrano JA; Beaman B; Mejía MA; Viloría JE; Zamora R. The actinomycetoma in Venezuela: A ten year study (1976-1986). *Rev Inst Med Trop*, São Paulo, 1987; 30:297-304.

Serrano JA; Novoa-Montero D; Mejía MA; García E. Mycetoma in Venezuela. Series of cases in the State of Lara (1975-1994). Proceedings IX Simposio Internacional sobre la Biología de los actinomicetales. Abstract N° S 10-2,3, pp. 77; Moscow, Rusia, 1994.

Serrano JA; Novoa-Montero D; Mejía MA; García E. Mycetoma in Venezuela. Series of cases in the State of Lara (1976-1994). Multidisciplinary family-case comparison epidemiologic study (1994-1996). *Biotechnology*, 1995; 7-8: 289-93.

Serrano JA; Novoa-Montero D. Mycetoma in Venezuela – a serie of cases in the State of Lara, Venezuela. Proceedings International Conference on Current Status and Challenges in Medical and Veterinary Research, particularly in Third World Countries. Jabalpur, India, 1996.

Serrano JA, Novoa-Montero D. Review on human mycoses in South America. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, Caracas, 2001a; 21: 66-77.

Serrano JA, Mejía MA, Díaz-Corrales F, Uzcátegui Negrón M, Saad C, Couble A, Casoli E, Boiron P, García E. Rapid identification by PCR of two strains of *Nocardia brasiliensis* isolated from an actinomycetoma case. *J Micol Med*; 2001b; 11:106-108.

Serrano JA; Novoa-Montero D. Mycetoma in Venezuela: A social disease. Epidemiologic and Basic Sciences Approach. Proceedings The Mycetoma International Conference. Khartoum, Sudán, 2002.

Szklo M. Estudios epidemiológicos de efectividad, una prioridad en Latinoamérica. Symposium Epidemiología: Restricciones, retos, y oportunidades en Latinoamérica. Resúmenes (Abstracts) Congreso Regional de la Asociación Internacional de Epidemiología Cuernavaca, Morelos, México. pp. 15, 24-26 enero 1994.

Uzcátegui-Negrón M. Género *Nocardia*: Características morfológicas, bioquímicas, citoquímicas y susceptibilidad antimicrobiana. Monografía de Grado (mimeografiada) Escuela de Bioanálisis, Facultad de Farmacia, Universidad de Los Andes, Mérida, 2004; 55 pp.

Vergara de Novoa S. Mictetoma y factores sociodemográficos en el Estado Lara 1976-1997 (Trabajo de Ascenso). Facultad de Medicina Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela. 2001.

Vergara de Novoa S; Serrano JA; Novoa-Montero D. Social demographic factors and mycetoma in the Lara-State. Venezuela. 1976-1997. XVIth IEA World Congress of Epidemiologic. Final Programme & Book of Abstracts WP64. WP. August 18-22, 2001 Montreal, Canada.

Wanke NC; Wanke B; Caiuby MJ; Towersay L; Londero AT; Díaz MF; Siqueira SP. Mycetoma due to *Actinomadura madurae*. A report of 2 cases. *Rev Int Med Trop São Paulo*, 1992; 34: 367-372.

Winslow DT; Steen FG. Consideration in the histologic diagnosis of mycetoma. *Am J Clin Pathol*. 1964; 164-169.

Winslow DT. 1971. Mycetoma in *The Pathologic Anatomy of Mycoses Human Infection with Fungi, Actinomycetes and Algae*. RD Baker ed Springer-Verlag. Berlin pp. 589-613.

Zaias N; Taplin D; Rebell G. Mycetoma. *Arch Dermatol*. 1969; 99; 215-225.

Zaraggen WJ; Bregener H; Arnoux A; LaengH; Itin PH. Primary cutaneous nocardiosis in an immunocompetent patient, *European Journal of Dermatology*. 2001; 11: 569-571.