

AISLAMIENTO DE ACTINOMICETES PATÓGENOS EN UNA ZONA ENDÉMICA DE MICETOMAS EN MÉXICO

por Laura Rocío Castañón-Olivares,
Patricia Manzano-Gayosso,
Francisca Hernández-Hernández,
Rafael Romero-Martínez y
Rubén López-Martínez

ISOLATION OF PATHOGENIC ACTINOMYCETES FROM AN ENDEMIC AREA OF MYCETOMA IN MEXICO**SUMMARY**

Twelve populations of the State of Morelos, located in a endemic zone for actinomycetoma were studied, in order to isolate human pathogenic actinomycetes from soil. Thirty samples were collected from each one, which included cultivation land, streets, roads and courtyards. Soil samples were diluted and cultured in Sabouraud dextrose agar with antibiotics. An edaphological study was also realized for each sample. Results showed that from 360 samples, 114 (40%) contained pathogenic actinomycetes: 75 (20.8%) *Nocardia brasiliensis*; 30 (8.3%) *N. asteroides*; 22 (6.2%) *N. otitidis-cavarum*; 10 (2.8%) *Actinomadura madurae*; 3 (0.8%) *A. pelletieri*, and 4 (1.1%) *Streptomyces somaliensis*. Three populations from a nearby non-endemic zone were chosen as a control group, where only two from 90 soil samples (2.2%) yielded *S. somaliensis* isolation. The edaphological study showed no relevant variation between the soil of both endemic and non-endemic zones, whereas climate, altitud, and vegetation were found completely different from both regions. The type of soil was non determinant for the frequency of actinomycetes found.

RESUMEN

Se estudiaron 12 poblaciones de una zona endémica de actinomycetomas en el estado de Morelos, México, con el fin de aislar del suelo las especies de actinomycetes patógenos para el hombre. De cada población se recolectaron 30 muestras, comprendiendo tierras de cultivos, caminos, calles y patios de casas; dichas muestras fueron diluidas y sembradas en medio de

Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. 04510 México, D.F.

Sabouraud dextrosa agar con antibióticos. Se hizo análisis edafológico en cada muestra. De las 360 muestras, en 144 (40.0%) se encontraron actinomicetes patógenos: 75 (20.8%) correspondieron a *Nocardia brasiliensis*, 30 (8.3%) a *N. asteroides*, 22 (6.2%) a *N. otitidis-cavarum*, 10 (2.8%) a *Actinomadura madurae*, 3 (0.8%) a *A. pelletieri* y 4 (1.1%) a *Streptomyces somaliensis*. Se tomaron muestras de tierra de 3 poblaciones testigo de una zona no endémica de micetomas, de donde se aisló de 90 muestras solamente 2 (2.2%) *S. somaliensis*. El estudio edafológico reveló poca variación en las características de las tierras de ambas zonas; no así el clima, la altitud y tipo de vegetación las cuales fueron muy diferentes. Se concluye que el tipo de suelo no fue la principal determinante en la presencia de los actinomicetes patógenos aislados.

INTRODUCCIÓN

Los géneros más abundantes de la biota actinomicética del suelo son *Nocardia* y *Streptomyces*; así este hábitat es considerado como el principal reservorio de los actinomicetales causantes de las infecciones en el humano; por lo que habría una relación directa entre lo anterior y la gran frecuencia de micetomas en individuos que desempeñan labores agrícolas (Lavalle, 1966), calculándose que a nivel mundial éstos son ocasionados aproximadamente en un 60% por actinomicetales (Mariat, 1963).

Los factores del ambiente ecológico, tales como las condiciones climatológicas de la región, así como las características del suelo, como materia orgánica, pH, humedad, textura, biota asociada, etc., determinan la presencia y abundancia de los diferentes agentes etiológicos del micetoma, así como su distribución geográfica (Mahgoub y Murray, 1973).

Se considera que son dos factores principales los que juegan un papel importante en la frecuencia de los micetomas; por una parte la época del año, al final de la temporada de lluvias cuando se encuentran en mayor abundancia los actinomicetes en el suelo y por otra parte la actividad que realizan los agricultores en esta época, durante la cual se recolectan las cosechas, lo cual favorece el mecanismo de entrada de estos agentes al hospedero humano (Macotela y López, 1975).

Este trabajo se realizó con el fin de determinar la frecuencia de géneros de actinomicetes patógenos en suelos de una zona endémica de micetomas del estado de Morelos, así como para estimar la correlación que existe entre los caracteres edafológicos y climáticos de la zona con la presencia de estos microorganismos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar. Se seleccionaron dos zonas del estado de Morelos, una considerada como endémica, de clima semitropical, localizada a baja altitud, donde predomina el cultivo de la caña de azúcar, y que incluyó las siguientes 12 poblaciones: Yautepec, Temixco, Xochitepec, Chiconcuac, Oacalco, Puente de Ixtla, Cocoyoc, Cuautla, San Isidro, San Miguel, Alpuyeca y Ahuehuetzingo; la otra, una región de clima frío de alta montaña, considerada como no endémica de micetoma, y que incluyó las siguientes poblaciones: Fierro del Toro, Tres Marias y Coajomulco (Fig. 1). Las colectas se hicieron durante los meses de septiembre a diciembre.

Muestras. De cada población se tomaron 30 muestras de tierra (5 de patios de casas, 5 de calles, 5 de caminos y 15 de tierras de cultivo), para lo cual se eliminó el detritus superficial del sitio escogido, se excavó con una espátula limpia a una profundidad de 5 cm, se tomaron 500 g aproximadamente de tierra, depositándola en bolsas nuevas de plástico. En el laboratorio, cada muestra se dividió en dos partes, una para el estudio edafológico y la otra para el aislamiento de actinomicetes.

Estudio edafológico. Las muestras fueron enviadas al Laboratorio de Suelos de la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos, para obtener los datos correspondientes a textura, tipo, color, contenido de sales, materia orgánica, humedad y pH.

Aislamiento de actinomicetes. De cada muestra de tierra se separó 1 g y se suspendió por agitación en 9 ml de agua destilada estéril; a partir de esta suspensión se tomó 1 ml, el cual se sembró por estría cerrada en placas de Sabouraud dextrosa agar suplementado con cloranfenicol y cicloheximida (Bioxon de México, Mex.) (SDACC). Todas las muestras fueron sembradas por duplicado. Los cultivos se incubaron a 28°C durante 30 días, al cabo de los cuales las colonias que mostraron morfología sugestiva de actinomicetes se separaron para descontaminarlas y corroborar su naturaleza, resembrándolas nuevamente en SDACC e incubándolas durante 15 días a 28°C.

Determinación de género y especie. La identificación taxonómica de los actinomicetes patógenos se hizo con base en: 1) características macroscópicas y microscópicas de las colonias; 2) afinidad tintórea (Gram, Fite y Kinyoun); y 3) características bioquímicas, como hidrólisis o descomposición de caseína, gelatina, xantina, tirosina, fermentación de manitol e inositol y crecimiento en gelatina (González-Mendoza y Mariat, 1964).



Fig.1. Estado de Morelos. Poblaciones de la zona endémica (●) y de la zona no endémica (○) de micetomas.

RESULTADOS

Las dos zonas estudiadas se caracterizan por ser terrenos de doble ciclo de cultivo al año, antes y después de las lluvias; los suelos son de tipo arenoso en donde la materia orgánica y otros nutrientes no son muy abundantes; con lluvias que van desde moderadas a abundantes durante el verano y el otoño. La tabla 1 muestra algunos datos ecológicos, de los cuales, los que marcan diferencia entre ambos tipos de zonas son la altitud, la temperatura, el tipo de cultivo que se efectúa, la vegetación que predomina en cada una de ellas y el tipo de clima.

En la tabla 2 se encuentran anotados los resultados del análisis edafológico donde en forma general, para la dos zonas, se observó que los suelos son de textura arenosa, con 2.68 a 4.83% de contenido de humedad, con un porcentaje mediano de materia orgánica, pobres de nitrógeno, fósforo, potasio y calcio, ricos en magnesio y con un pH de 6.4 a 6.9.

De las 360 muestras estudiadas en la zona endémica, en 144 (40.0%) se encontraron organismos que correspondieron a algún género de actinomicete patógeno, de los cuales 127 (35.3%) pertenecieron a *Nocardia*, 13 (3.6%) a *Actinomadura* y 4 (1.1%) a *Streptomyces*. En la zona no endémica, se aisló *Streptomyces*, solamente en 2 muestras de 90 estudiadas (2.2%) (Tabla 3).

En cuanto a la frecuencia de las especies aisladas a partir de los suelos de la zona endémica, se observa en la tabla 4 que de las 144 cepas, 75 (20.8%) correspondieron a *N. brasiliensis*, 30 (8.3%) a *N. asteroides*, 22 (6.2%) a *N. otitidis-cavarum*, 10 (2.8%) a *A. madurae*, 3 (0.8%) a *A. pelletieri* y 4 (1.1%) a *S. somaliensis*. Por otra parte, los 2 aislamientos de la zona no endémica se identificaron como *S. somaliensis*. En la misma tabla se muestra que de las 144 cepas de actinomicetes patógenos, 63 fueron aisladas a partir de las tierras dedicadas al cultivo, siguiendo en orden decreciente las aisladas de calles, 33 cepas, de caminos, 27 cepas y de patios de casas, 21 cepas.

DISCUSIÓN

El número de casos de micetoma varía de una región a otra; de acuerdo a González-Ochoa (1967), esta variación está en relación a la distribución y abundancia de los actinomicetes patógenos en la tierra. Debido a que en este trabajo no se encontraron diferencias significativas en los estudios edafológicos en las dos zonas estudiadas, la abundancia de actinomicetes en los suelos de la zona endémica se podrían atribuir a tres factores: 1) el clima prevaleciente, 2) al tipo de vegetación, y 3) al cultivo predominante, los cuales son muy diferentes a lo que se encuentra en la zona no endémica típica de alta montaña.

Tabla 1. Principales datos ecológicos de las zonas estudiadas

	Endémica	No endémica
Altitud s.n.m.	(mín) 900 m (máx) 1640 m (med) 1270 m	(mín) 2428 m (máx) 2500 m (med) 2464 m
Contenido de humedad	Subhúmedo	Subhúmedo
Temperatura	(mín) 14°C (máx) 34°C (med) 25°C	(mín) 9°C (máx) 28°C (med) 21°C
Tipo de suelo	Arenoso-arcilloso	Limoso
Cultivo predominante	Caña de azúcar	Maíz
Vegetación predominante	Arbustos	Coníferas

s.n.m.= sobre el nivel del mar.

Tabla 2. Resultados del análisis edafológico de las zonas estudiadas

Característica	Endémica		No endémica	
	*	**	*	**
Textura:				
Area	50.00-68.56%		60.00-60.22%	
Limo	2.00-43.82%		30.35-32.36%	
Arcilla	6.64-29.80%		7.64- 9.64%	
Nombre del suelo	Migajón-arenoso		Migajón-arenoso	
Humedad	2.68-4.83%		2.93-3.90%	
Color	Diferentes tonos de marrón hasta gris oscuro		Diferentes tonos de marrón hasta gris oscuro	
Materia orgánica	0.98-2.85 (de medianamente pobre a mediano)		1.0-1.32 (mediano)	
Elementos:				
Nitrógeno	0.04-0.09% (pobre)		0.05-0.06 (pobre)	
Fósforo	4.80-7.50 Kg/Ha (de extremadamente pobre a muy pobre)		6.25-7.50 Kg/Ha (de extremadamente pobre a muy pobre)	
Potasio	75-134 Kg/Ha (muy pobre)		75-140 Kg/Ha (muy pobre)	
Calcio	1050-1600 Kg/Ha (de muy pobre a medianamente pobre)		1200-1550 Kg/Ha (de muy pobre a medianamente pobre)	
Magnesio	180-630 Kg/Ha (de rico a muy rico)		240-660 Kg/Ha (de rico a muy rico)	
pH	6.4-6.9		6.7-6.8	

*Límites mínimos.

**Límites máximos.

Tabla 3. Géneros de actinomicetes aislados en las dos zonas

Género	Endémica (n=360)		No endémica (n=90)	
	Nº	%	Nº	%
<i>Nocardia</i>	127	35.3	0	
<i>Actinomadura</i>	13	3.6	0	
<i>Streptomyces</i>	4	1.1	2	2.2
Total	144	40.0	2	2.2

Tabla 4. Especies de actinomicetes patógenos aislados de diferentes tipo de suelos en la zona endémica (360 muestras)

Especie	Cultivos	Calles	Caminos	Pacios	Total	
					Nº	%
<i>Nocardia brasiliensis</i>	37	15	13	10	75	(20.8)
<i>Nocardia asteroides</i>	14	6	7	3	30	(8.3)
<i>Nocardia otitidis-cavarum</i>	6	7	5	4	22	(6.2)
<i>Actinomadura madurae</i>	4	3	1	2	10	(2.8)
<i>Actinomadura pelletieri</i>	1	1	0	1	3	(0.8)
<i>Streptomyces somaliensis</i>	1	1	1	1	4	(1.1)
T o t a l	63	33	27	21	144	(40.0)

La mayoría de las especies causantes del micetoma actinomicético se encuentran en regiones tropicales y subtropicales, a excepción de *Streptomyces somaliensis*, la cual predomina en las áreas de menor precipitación pluvial (Lavalle, 1966). Los datos obtenidos en este estudio corroboran lo anterior pues solamente se aislaron cuatro cepas de *S. somaliensis* a diferencia de una mayor abundancia y diversidad de especies que se encontraron en estas regiones semitropicales con una altitud de 1270 m y una temperatura que fluctúa entre los 14 y 34°C, en donde predomina el cultivo de la caña de azúcar.

El mayor número de cepas fueron aisladas de los suelos dedicados a cultivos, lo cual concuerda con las publicaciones de van Gelderen et al., (1987) y de González-Ochoa, (1967), ya que en este tipo de suelos abunda la materia orgánica y por lo tanto existe una cantidad considerable de carbono disponible; por el contrario, en otros suelos, como los de patios de casa, la cantidad de materia orgánica es menor y en consecuencia la densidad de actinomicetes es menor.

En América predominan los actinomicetomas sobre los eumicetomas. En México, en la revisión realizada por López-Martínez et al. (1992), de un total de 2105 casos de micetoma el 97% són de tipo actinomicético y de éstos, el 86.6% son causados por *N. brasiliensis*, el 10.2% por *A. madurae*, el 1.2% por *N. asteroides* y el 0.5% por *A. pelletieri*. En relación a lo anterior, en este estudio el mayor porcentaje de aislamientos correspondió al género *Nocardia*, y de éstos la mayoría fueron clasificados como *N. brasiliensis*.

Debido a la similitud morfológica y fisiológica que existe entre algunos actinomicetes patógenos y no patógenos se dificulta la determinativa taxonómica (González-Ochoa y Sandoval, 1966). Por lo anterior, es importante efectuar además otro tipo de pruebas, como las de termotolerancia, producción experimental de micetoma en animales de laboratorio, taxonomía numérica, estudios de genoma, etc.

En relación a los micetomas ya se tienen conocimientos adecuados sobre la patología, la frecuencia y distribución por especies, no obstante aún es necesario investigar en torno al comportamiento biológico de los agentes en su hábitat natural, ya que cuando se conozcan mejor los factores que regulan las dinámicas poblacionales, será factible aplicar estrategias ecológicas, por ejemplo, modificando relaciones de su hábitat en la naturaleza para influir en la epidemiología de los micetomas en México y de esta manera reducir los riesgos de infección en el hombre.

LITERATURA CITADA

- González-Mendoza, A. y F. Mariat, 1964. Sur l'hydrolyse de la gélatine comme caractere différentiel entre *Nocardia asteroides* et *N. brasiliensis*. Ann. Inst. Pasteur 107: 560-564.
- González-Ochoa, A., 1967. Micetomas y Actinomycosis. Mem. XIII Congressus Internationalis Dermatologiae. München.
- González-Ochoa, A. y M. A. Sandoval, 1966. Aislamiento de *Nocardia brasiliensis* y *N. asteroides* a partir de suelos. Rev. Inst. Salubr. Enf. Trop. Méx. 20: 147-151.
- Lavalle, P., 1966. Nuevos datos sobre la etiología del micetoma en México y sobre su patogenia. Gac. Méd. Méx. 96: 545-569.
- López-Martínez, R., L. J. Méndez-Tovar, P. Lavalle, O. Welch, A. Saul y E. Macotela-Ruiz, 1992. Epidemiología del micetoma en México: Estudio de 2105 casos. Gac. Méd. Méx. 128: 336-341.
- Macotela-Ruiz, E. y R. López-Martínez, 1975. The epidemiology of mycetoma. En: *The Epidemiology of Human Micotic Diseases*. Charles C. Thomas Publisher. Illinois.
- Mahgoub, E. S. y I. G. Murray, 1973. *Mycetoma*. W. Heinemann Medical Books, Londres.
- Mariat, F., 1963. Sur la distribution géographique et la repartition des agentes de Mycétomes. Bull. Soc. Pathol. Exot. 56: 35-45.
- van Gelderen de Komaid, A., R. Runco de Laborda y R. Salim, 1987. Natural occurrence of *Nocardia* in soil of Tucumán: Physiological characteristics. *Mycopathologia* 99: 15-19.