

# ESTUDIO DEL NICHO ECOLÓGICO DEL AGENTE CAUSAL DEL MICETOMA EN TURKANA, KENIA.

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ  
FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES  
TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

**AUTORA:** Esther Sáez Bañuz. DNI: 23900967B.

**TUTORA:** Consuelo Ferrer Rodríguez.

**COTUTORA:** M<sup>a</sup> Francisca Colom Valiente.

**MODALIDAD:** Experimental.

**DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN VEGETAL Y MICROBIOLOGÍA.**

**CURSO ACADÉMICO 2022-2023.**

**CONVOCATORIA ORDINARIA.**

# ÍNDICE.

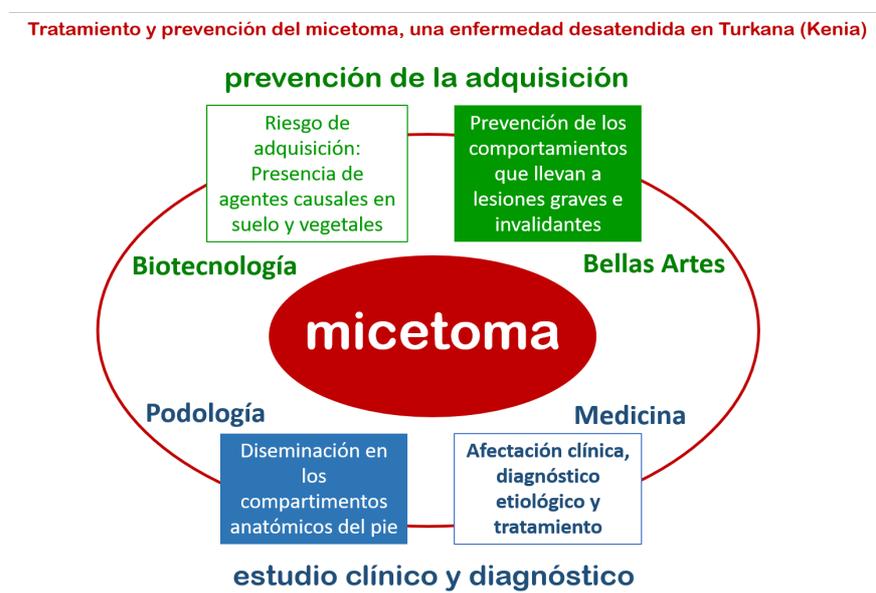
<b>1. RESUMEN Y PALABRAS CLAVE.</b>	<b>4</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN.</b>	<b>5</b>
<b>3. ANTECEDENTES, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.</b>	<b>8</b>
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS.</b>	<b>9</b>
<b>4.1. Diseño del estudio.</b>	<b>9</b>
<b>4.2. Consideraciones éticas: Protección de la biodiversidad. Protocolo de Nagoya.</b>	<b>9</b>
<b>4.3. Toma de muestras.</b>	<b>10</b>
<b>4.4. Procesado de las muestras.</b>	<b>10</b>
<b>4.4.1. Cultivo.</b>	<b>11</b>
<b>4.4.2. Observación macroscópica y microscópica.</b>	<b>11</b>
<b>4.4.3. Identificación de especies por Biología molecular.</b>	<b>11</b>
<b>Extracción de DNA</b>	
<b>Amplificación del DNA mediante PCR</b>	
<b>Visualización material genético amplificado</b>	
<b>Purificación del producto de PCR</b>	
<b>Reacción de secuenciación Sanger</b>	
<b>Identificación de especies</b>	
<b>5. RESULTADOS.</b>	<b>14</b>
<b>5.1. Resultados del cultivo.</b>	<b>16</b>
<b>5.2. Resultados de la observación microscópica.</b>	<b>17</b>
<b>5.3. Identificación molecular de los aislamientos.</b>	<b>18</b>
<b>6. DISCUSIÓN.</b>	<b>24</b>
<b>7. CONCLUSIONES.</b>	<b>27</b>
<b>8. PROYECCIÓN FUTURA.</b>	<b>27</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA.</b>	<b>27</b>

## TRABAJO FIN DE GRADO INTERDISCIPLINAR

El TFG aquí desarrollado, ha sido confeccionado en la modalidad Trabajo Fin de Grado Interdisciplinar (TFGi). Este modelo de TFG nace de un programa de Innovación Docente donde, de manera colaborativa y dentro de un equipo integrado por estudiantes y tutores de diferentes titulaciones, se desarrolla una idea de proyecto, un proyecto real, el propósito de una empresa u ONG o resolución integral de un problema. Además, sobre las bases de colaboración entre estudiantes y profesores con competencias vinculadas a diferentes cuestiones, se podrán plantear nuevas investigaciones o desarrollos novedosos.

Así pues, los contenidos de este TFG comprenden la contextualización, objetivos, metodología, y conclusiones propias de la titulación, y, además, presentan el proceso interdisciplinar desarrollado por el equipo en el desarrollo del proyecto. Este trabajo de investigación incluye de forma resumida, los aspectos más importantes de los contenidos desarrollados por el resto de titulaciones que no se pueden separar para conservar el carácter interdisciplinar de este TFGi.

En este TFGi han participado 4 estudiantes de distintos grados de la UMH: una estudiante de Titulación de Grado en Medicina, Ester García Gracia, tutorizada por la profesora María Francisca Colom Valiente, una estudiante de Grado en Podología, Génesis Zambel Tobar Cueva, tutorizada por la profesora Nuria Padrós Flores, una estudiante de Grado en Biotecnología, Esther Sáez Bañuz, tutorizada por la profesora Consuelo Ferrer Rodríguez, y un estudiante de Grado en Bellas Artes, Jaime Bernabéu Fernández, tutorizado por la profesora Rocío Cifuentes Albeza. El trabajo ha sido coordinado por las profesoras Francisca Colom Valiente y Mari Carmen Lillo Navarro. En él hemos desarrollado un proyecto titulado: Tratamiento y prevención del micetoma, una enfermedad desatendida en Turkana (Kenia) (Figura 1).



**Figura 1.** Esquema de la metodología de cada integrante del TFGi y como interaccionan todos los grados entre sí.

## 1. RESUMEN Y PALABRAS CLAVE.

*Introducción:* El Micetoma es una enfermedad infecciosa crónica que afecta la piel y el tejido celular subcutáneo, y que conlleva una significativa discapacidad. Fue reconocida por la OMS como una Enfermedad Tropical Desatendida (ETD) en el año 2016. Debido a la falta de investigación, es crucial profundizar en el conocimiento del nicho ecológico de los agentes causales de esta enfermedad para mejorar su diagnóstico, tratamiento y prevención. *Metodología:* se analizaron 26 muestras de ambiente pertenecientes al suelo y materia vegetal del condado de Turkana, Kenia. Las muestras fueron procesadas y secuenciadas para su identificación. *Resultados:* De entre las 35 especies identificadas, 10 pertenecen a agentes de micetoma. Además, se ha logrado conocer el nicho ecológico de especies emergentes de micetoma como *Cellulosimicrobium cellulans* o *Curvularia neoindica*. *Discusión:* pese a que la mayoría de microorganismos identificados residen en un arbusto espinoso (mathenge), se ha comprobado que los agentes causantes de la afección se encuentran mayoritariamente en la acacia o en el suelo que la rodea, pues es el árbol más abundante de la región y esto hace que la población sea más susceptible a clavarse sus púas o espinas. *Conclusión:* Los árboles espinosos, en especial la acacia, son un factor de riesgo de contraer micetoma, ya que es posible aislar agentes responsables de esta enfermedad en sus púas. Aunque se ha hallado el nicho ecológico de algunas de estas especies, todavía queda por descubrir el nicho ecológico de muchas de ellas.

*Palabras clave:* micetoma, Turkana, Kenia, actinomicetoma, eumicetoma, agente etiológico, nicho ecológico.

## ABSTRACT

*Introduction:* Mycetoma is a chronic infectious disease affecting the skin and subcutaneous cellular tissue, leading to significant disability. It was recognized by WHO as a Neglected Tropical Disease (NTD) in 2016. Due to the lack of research, it is crucial to deepen the knowledge of the ecological niche of the causative agents of this disease to improve its diagnosis, treatment and prevention. *Methodology:* 26 environmental samples belonging to soil and plant matter from Turkana County, Kenya were analyzed. The samples were processed and sequenced for identification. *Results:* Among the 35 species identified, 10 belong to mycetoma agents. In addition, the ecological niche of emerging mycetoma species such as *Cellulosimicrobium cellulans* or *Curvularia neoindica* was identified. *Discussion:* despite the fact that most of the microorganisms identified reside in a thorny shrub (mathenge), it has been proved that the agents causing the disease are mostly found in the acacia or in the soil surrounding it, since it is the most abundant tree in the region and this makes the population more susceptible to its barbs or thorns. *Conclusion:* Thorny trees, especially acacia, are a risk factor for contracting mycetoma, since it is possible to isolate agents responsible for this disease in their barbs. Although the ecological niche of some of these species has been found, the ecological niche of many of them remains to be discovered.

*Key words: mycetoma, Turkana, Kenya, actinomycetoma, eumycetoma, etiological agent, ecological niche.*

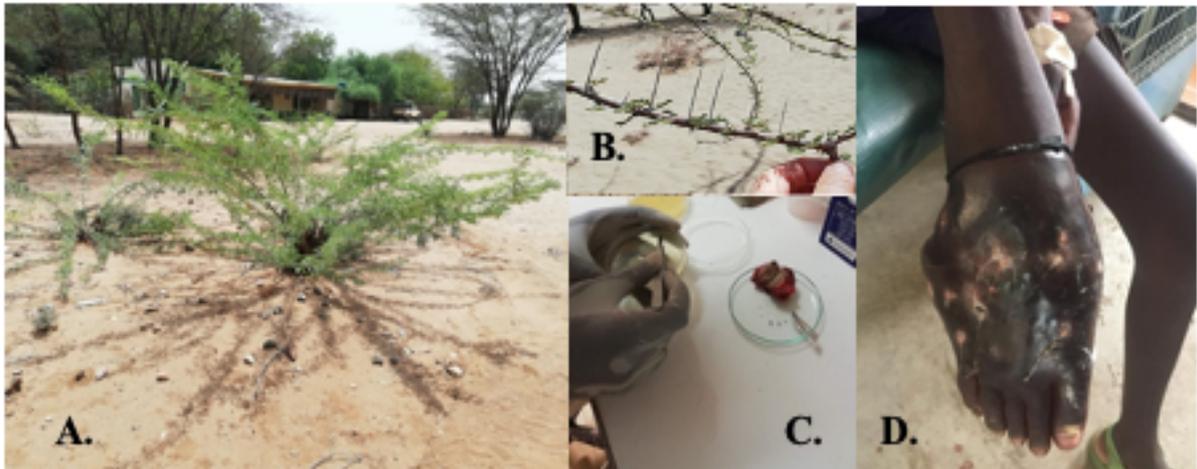
## **2. INTRODUCCIÓN.**

El micetoma, también conocido como pie de Madura o maduromicosis, ya que fue descrito inicialmente a mediados del siglo XIX en Madura (India), es una enfermedad infecciosa crónica y progresivamente destructiva. Puede afectar tanto la piel, como el tejido subcutáneo, el hueso y los vasos linfáticos, aunque en ocasiones puede diseminarse a otras partes del cuerpo como la cavidad torácica o la abdominal. Esto lleva a la deformidad, deterioro y destrucción tisular del miembro afectado, llegando a ser mortal [1]. Esta causado por diferentes especies de hongos y bacterias que se encuentran principalmente en el suelo y en la materia vegetal en descomposición (Figura 2).

Esta enfermedad fue declarada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una Enfermedad Tropical Desatendida (ETD) en 2016 [2]. Las ETD son un grupo diverso de 20 enfermedades prevalentes principalmente en áreas tropicales y entre cuyos causantes se encuentran virus, toxinas, hongos, bacterias y parásitos. Asimismo, afectan a más de mil millones de personas pertenecientes a comunidades empobrecidas y tienen mayor incidencia en zonas rurales, áreas afectadas por conflictos y regiones de difícil acceso, donde el acceso al agua potable y servicios de saneamiento es limitado, situación que se agrava debido al cambio climático. Sumado a ello, las ETD suelen prevaler en regiones con una calidad médica bastante escasa, quedando las poblaciones más empobrecidas expuestas a dichas enfermedades, que en su mayoría son debilitantes. Además, la desnutrición crónica que suele afectar a estas comunidades empeora el desarrollo de las enfermedades, y la falta de conocimiento sobre los riesgos impide una prevención mínima [2].

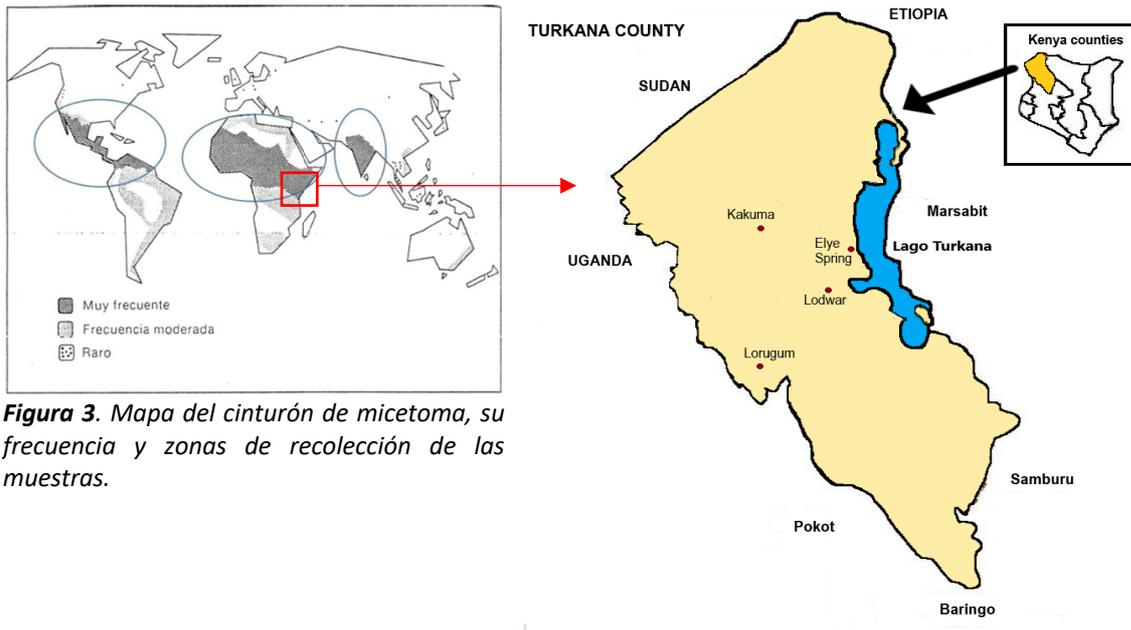
El modo de transmisión de estos microorganismos que ingresan al cuerpo es mediante penetración, causada por lesiones o traumatismos menores como pueden ser púas o espinas, atravesando el tejido cutáneo y subcutáneo [1, 3]. Suele afectar sobre todo a trabajadores varones que se dedican al pastoreo o al transporte de plantas u objetos contaminados y cuya franja de edad ronda los 15-50 años aproximadamente [4, 5]. Una vez han ingresado al cuerpo los microorganismos, se produce un nódulo o absceso subcutáneo, el cual es indoloro (Figura 2). Este se convierte con el tiempo en una tumoración que deriva en un absceso necrótico, y con él se generan fístulas hacia la superficie de la piel que secretan contenido purulento o sero-sanguinolento y un exudado que tiene granos. En los granos es donde se encuentra el agente causante de la enfermedad, con un tamaño comprendido entre 0,5 y 2 mm [5] y pueden ser de diferentes colores debido a este, yendo desde negros, pasando por amarillos

o rojos, hasta blancos. Entonces, al tratarse de una enfermedad indolora, sumada la escasez tanto de educación sanitaria como de instalaciones de salud en las áreas endémicas, muchos pacientes prescinden de atención médica hasta que la infección ha progresado significativamente. Esto desemboca en muchos casos la amputación del miembro afectado y con ello la invalidez.



**Figura 2.** A) Nimeyuka, B) Púas de acacia. C) Granos de micetoma extirpados. D) Pie con micetoma en estado avanzado.

Se distribuye por las zonas tropicales y subtropicales de Asia, América y África, lo que se conoce como “cinturón de micetoma” [1, 2, 5] (Figura 3). Esto se debe a que, a parte de las condiciones climáticas que presentan esos países, puesto que no se han reportado apenas casos en zonas templadas o frías, también se caracterizan por poseer una copiosa vegetación de plantas xerófilas y un índice pluviométrico anual de entre 50 y 1400 mm o ser áridos, cálidos y secos [6]. Se pueden diferenciar dos tipos de micetoma según el agente etiológico que lo provoque. Por una parte, se encuentra el actinomicetoma o micetoma bacteriano, generado por bacterias como *Nocardia coeliaca*, *Streptomyces albus* o *Actinomadura madurae* y que predomina en la mayoría de casos de América del Sur y Central y en Asia [4, 6]. Por otro lado, el eumicetoma o micetoma micótico, que es causado por hongos como *Madurella mycetomatis*, *Fusarium sp.* o *Leptosphaeria senegalensis* y el más predominante en África, dentro de esta región se encuentra Kenia (Figura 4).



**Figura 3.** Mapa del cinturón de micetoma, su frecuencia y zonas de recolección de las muestras.



**Figura 4.** Suelo y materia vegetal donde se encuentran los agentes de micetoma.

Kenia es un país del África Oriental, que se rige en su mayoría por la agricultura y la ganadería. Esto, sumado a la pobre economía que presenta el país, y a las elevadas temperaturas hacen que Kenia sea un país con un bajo Índice de Desarrollo Humano (IDH), siendo este de 0,575 puntos en 2021, alcanzando el puesto 152 sobre 189 países [7, 8].

Dentro de esta región se encuentra el condado de Turkana, situado en la esquina noroeste de la república de Kenia y cuyo modo mayoritario de trabajo es la ganadería [9]. En dicho condado, hay 6 ETDs que han sido descritas por la OMS: hidatidosis, micetoma, leishmaniasis visceral o Kala zar,

filariasis, mordedura de serpiente y tracoma [10]. Además, Turkana presenta el IDH más bajo de todo el país debido a la sobreexplotación de los escasos recursos naturales y a los elevados periodos de sequía. Es por ello que, la peor calidad de vida es la de la etnia Turkana, cuya actividad fundamental y fuente de ingresos es el pastoreo [9], con una importante exposición al entorno árido y seco de sus campos, que hacen que sean especialmente propensos a la aparición de micetoma.

En 2019, la organización de medicina humanitaria Cirugía en Turkana (CeT) inició el proyecto para investigar esta enfermedad junto con el grupo de investigación de Micología Médica de la Universidad Miguel Hernández, gracias a que, por un lado, la OMS declaró el micetoma como una ETD, lo que hizo que llamará la atención de los investigadores y por otro, Cirugía en Turkana alertó de la situación que se estaba viviendo en este condado [9, 11].

El proyecto está financiado por la Universidad y la Generalitat Valenciana y se desarrolla en el Hospital Gubernamental de Lodwar, en la región de Turkana [9]. Desde 2019 y a lo largo de cuatro campañas (2019, 2020, 2022 y 2023), se han recogido datos y muestras de 79 pacientes y 43 muestras ambiente del condado de Turkana, en las que se pretende detectar los agentes causales de la enfermedad.

### **3. ANTECEDENTES, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.**

La asociación de medicina humanitaria Cirugía en Turkana (CeT), fundada en 2004 gracias a un grupo de cirujanos generales del Hospital Ramón y Cajal, nació con el objetivo de proveer asistencia quirúrgica a la población de Turkana [9, 11]. Entre las campañas de 2013 y 2018, fueron atendidos 86 pacientes que presentaban micetoma, lo que constituye aproximadamente un 3% de los casos atendidos por la ONG y en un 10% de los casos se requirió amputación debido al estadio tan avanzado de la enfermedad. Es por ello que, debido a los casos registrados, en 2019 se inició el proyecto *Micetoma en Turkana* al que se unió el equipo de micología médica de la UMH. A partir de entonces, se elaboró una estrategia de valoración de la incidencia y distribución de la enfermedad en el condado, así como de los pacientes más afectados. También se comenzó con el estudio de los microorganismos más prevalentes que originan micetoma y el estudio de la posible adquisición de la infección, con la búsqueda del nicho ecológico de los mismos [11].

Desde 2019 se han realizado tres TFG centrados en la incidencia del micetoma y en la identificación del agente causal basados en el estudio de muestras clínicas recogidas durante las campañas de los años 2019, 2020 y 2022 y se ha elaborado un artículo científico sometido a publicación actualmente. En estos estudios se han determinado los agentes causales del micetoma en Turkana siendo los más frecuentes *Cellulosimicrobium cellulans*, *Streptomyces somaliensis* y *Penicillium thomii* en el actino

micetoma y *Madurella mycetomatis*, *Fusarium sp.*, *Penicillium sp.* y *Trichophyton mentagrophytes* en el eumicetoma.

El trabajo que se expone aquí se centra en el análisis de muestras medioambientales para contribuir a localizar el nicho ecológico de los agentes causales de micetoma.

**HIPÓTESIS:** Los agentes causales del micetoma han de encontrarse en el medio ambiente de los individuos que padecen la enfermedad. Por lo tanto, determinar el nicho ecológico preciso de estos, puede contribuir a la adopción de medidas específicas de prevención del micetoma en Turkana.

**OBJETIVOS:**

- Primario: Conocer el nicho de los principales agentes causales del micetoma en Turkana, Kenia.
- Secundarios:
  - Aislamiento de posibles agentes patógenos mediante cultivo microbiano de muestras del medio ambiente del condado de Turkana.
  - Identificación de posibles agentes patógenos mediante biología molecular y/o cultivo de los aislamientos de las muestras medioambientales.
  - Relacionar los posibles agentes patógenos encontrados en los aislamientos medioambientales con los obtenidos en los pacientes que presentaban micetoma en esa misma región de Turkana.

#### **4. MATERIALES Y MÉTODOS.**

##### **4.1 Diseño del estudio.**

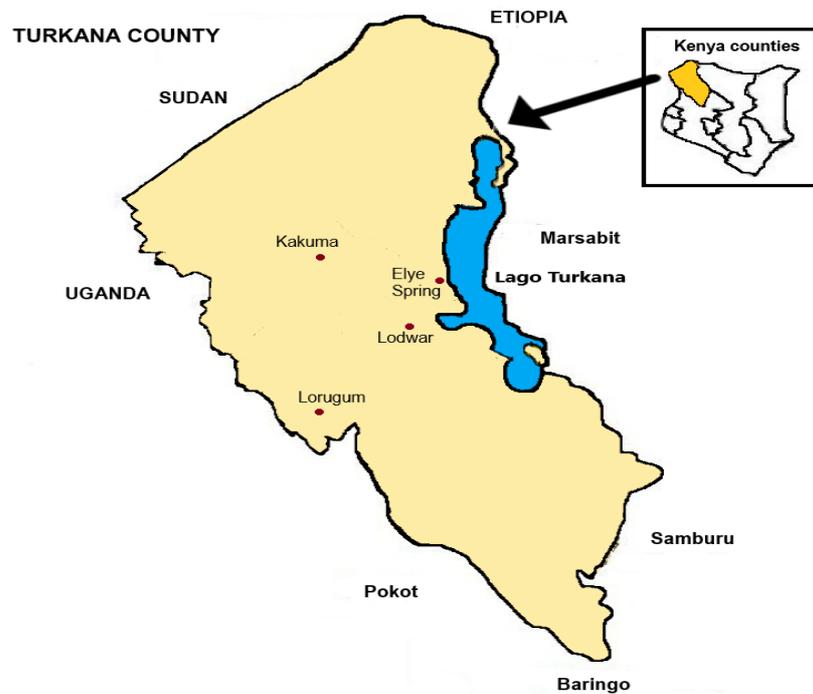
Se trata de un estudio observacional, prospectivo y multicéntrico. El estudio realizado se ha llevado a cabo con muestras de ambiente recogidas en distintos puntos del condado de Turkana.

##### **4.2 Consideraciones éticas: Protección de la biodiversidad. Protocolo de Nagoya.**

Las muestras trasladadas desde Turkana, se encuentran protegidas bajo el Convenio sobre la Diversidad Biológica (CDB) promovido por el Protocolo de Nagoya. Este tratado internacional aborda la cuestión del acceso a los recursos genéticos y la equitativa participación en los beneficios derivados de su utilización. Su principal objetivo radica en promover la conservación y el uso sostenible de la diversidad biológica [12].

### 4.3 Toma de muestras.

Las muestras ambientales se recolectaron durante las campañas de 2022 y 2023 en Lorugum, Kakuma, a orillas del lago Turkana en el *resort* Elye Springs y en uno de los poblados del distrito de Lodwar (Figura 5). Fueron recogidas por el personal de Cirugía en Turkana junto con integrantes del equipo de micología medica de la UMH y constan de distinto tipo de material vegetal y suelos.



**Figura 5.** Localización de las muestras ambiente recogidas.

Para protegerlas se utilizaron guantes y mascarilla para no contaminarlas con microorganismos que pueda portar el personal encargado de recogerlas. También se utilizaron pinzas y se almacenaron en tarros estériles para que no se contaminaran con microorganismos del aire. Posteriormente, las muestras fueron trasladadas al laboratorio de micología medica en Sant Joan D'Alacant de la UMH para su procesamiento.

### 4.4 Procesado de las muestras.

Una vez en el laboratorio, las muestras se fragmentaron con la ayuda de instrumentos estériles. Primero, antes de pasar al cultivo en placa, se extrajeron pequeños trozos de las muestras y se depositaron en un tubo de 1,5 ml con agua estéril para hidratarlas.

#### **4.1.1. Cultivo.**

En medio sólido en placa con un asa de siembra en un ambiente lo más estéril posible, se siembran las muestras tanto en Agar Nutritivo diluido, mediante siembra por estría como Agar Sabouraud Dextrosa aplicando una siembra de 3 puntos. Posteriormente, se dejan incubando a temperatura ambiente por periodos de hasta 3 semanas vigilando cada dos días la aparición de colonias.

Se realizaron microcultivos de las colonias fúngicas que eran aisladas para apreciar mejor otras estructuras que el hongo pudiera poseer.

#### **4.1.2. Observación macroscópica y microscópica.**

Tras la incubación, con los cultivos desarrollados, se procedía a la observación, primero macroscópica, es decir a ojo desnudo de las placas, distinguiendo las colonias por morfología y color. Estas se escanearon para tener un registro antes de pasar a la observación microscópica. La observación microscópica se hizo en fresco y/o con tinción de Gram (bacterias) o azul de lactofenol (hongos). Se anotaron las características morfológicas de los mismos y se tomaron microfotografías con la ayuda de una cámara acoplada al microscopio (Sistema *ImageFocus*). En el caso de las bacterias se seleccionaron para su identificación por biología molecular los bacilos Gram positivos, descartándose los cocos y las bacterias Gram negativas ya que estas no producen micetoma. En el caso de los hongos se seleccionaron todos aquellos que eran filamentosos y que no correspondían con las características propias de *Aspergillus* (fácilmente identificable sin necesidad de recurrir a la biología molecular), se descartaron las levaduras ya que tampoco producen micetoma.

#### **4.1.3. Identificación de especies por Biología molecular.**

Una vez seleccionadas las colonias que eran susceptibles de ser agentes del micetoma, se procedió a su identificación mediante biología molecular.

**Extracción de DNA.** El protocolo de extracción varió en función de si se partía de una colonia bacteriana o fúngica.

- Método 1: Extracción de DNA fúngico. Se utilizó un sistema comercial denominado *NZYTECH Plant/Fungi gDNA Isolation kit* y se siguió el protocolo recomendado por la casa. Se trata de una extracción que utiliza perlas de vidrio como agente de lisis mecánica. Estas perlas de vidrio son partículas pequeñas y uniformes que se utilizan para romper las células y liberar los ácidos

nucleicos de la muestra. Una vez liberado se procede a la purificación del material genético mediante un paso con cloroformo y la absorción del DNA en columnas de silica en presencia de alta concentración de sales.

- Método 2: Extracción DNA bacteriano. Se utilizó un sistema comercial denominado *Instagene (BioRad)*[13].

Se siguió el protocolo recomendado por la casa. En este caso la lisis de la pared de bacteriana es producida por proteasas y el material genético queda resuspendido en el medio sin restos celulares ya que estos quedan unidos a una resina que proporciona el kit. El protocolo es el siguiente:

1. Añadir 0,2 mL de matriz Instagene a una colonia bacteriana. Vórtex.
2. Incubar a 56°C durante 15 minutos y pasado ese tiempo, dar vórtex unos 10 segundos.
3. Incubar 8 minutos a 100°C y dar vórtex 10 segundos.
4. Centrifugar durante 3 minutos a 13,000 rpm.
5. Pasar el sobrenadante a un tubo de 0,5 ml, rotular y congelar hasta su uso.

**Amplificación del DNA mediante PCR:** una vez extraído el DNA se procedió a amplificar las regiones específicas mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se emplearon cebadores universales capaces de reconocer secuencias conservadas en todas las especies fúngicas y bacterianas [14]. En el caso de los hongos, se amplificó la región ITS2, mientras que, en bacterias, se amplificó la región V1-V4 del DNA ribosomal 16S.

El espaciador transcrito interno (ITS) ribosómico es considerado el “barcode” utilizado para la identificación de hongos. Proporciona información clave para que la mayoría de especies fúngicas puedan ser identificadas, todo ello gracias al análisis de sus secuencias de DNA [15]. Para amplificar el DNA extraído se ha empleado el cebador ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') específico del gen 28S del RNAr de hongos y el cebador ITS86 (5'-GTGAATCATCGAATCTTTGAAC-3') correspondiente al gen 5.8S del RNAr. Esta amplificación resultó en la obtención de un fragmento con un tamaño de aproximadamente 450 pb [14].

Por otra parte, en el caso de bacterias, se amplificó una región del gen 16S RNAr, este presenta 9 regiones hipervariables, se escogieron las regiones V1-V4 del gen 16S RNAr como “barcode”. Los cebadores empleados para la amplificación del DNA de bacterias fueron el cebador 27F (5'-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3') y el cebador 515R (5'-TTACCGCGGCKGCTGGCAC-3') [16].

Para llevar a cabo la amplificación, se realizó el protocolo descrito por *Ferrer et al* [14], que consta de varios ciclos de amplificación:

- ✓ 1 ciclo durante 5 minutos a 95 ° C.
- ✓ 35 ciclos:
  - 95 ° C durante 30 segundos.
  - 55° C durante 30 segundos.
  - 72° C durante 1 minuto.

**Visualización material genético amplificado:** una vez ha finalizado el proceso de amplificación, se realiza una electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en tampón Tris-Ácido bórico + EDTA (TBE) para visualizar, en un transiluminador ultravioleta, los productos de PCR y ver si son viables para secuenciar.

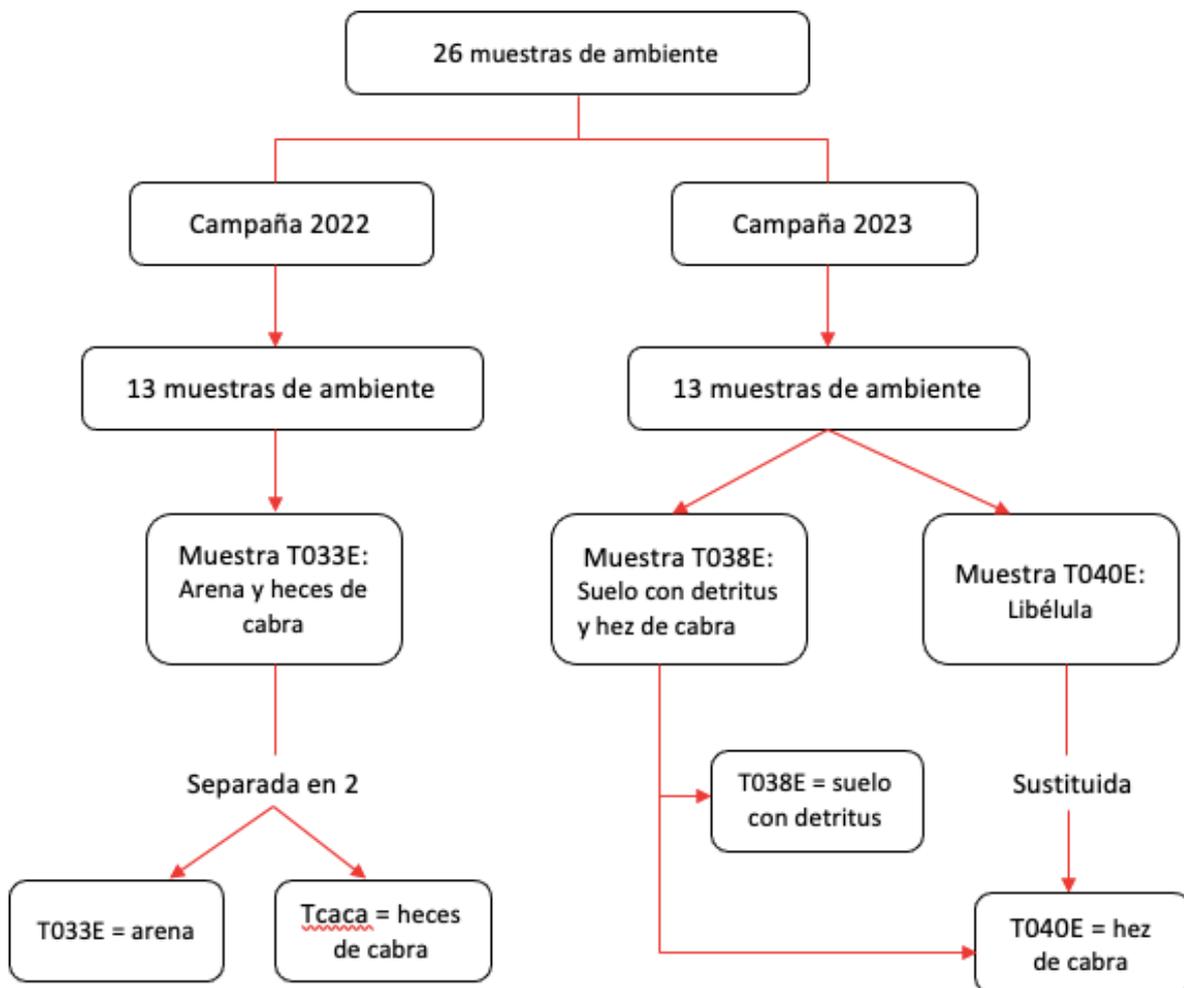
**Purificación del producto de PCR:** para eliminar los cebadores no incorporados y los nucleótidos (dNTPs) sobrantes se mezclaron 5 µl de amplicón y 1 µl de *Illustra Exostart*, durante 15 minutos a 37° C, seguido de 15 minutos a 80° C.

**Reacción de secuenciación Sanger:** a 3 µl de DNA purificado (330 a 1000 pb), se añadieron 4,5 µl de agua estéril y 2,5 µl de primer (10 pM) que dependiendo del microorganismo se añadió el primer 27F para bacterias y el primer ITS4 para hongos. Esta mezcla se envió a una empresa externa (Macrogen o STAB VIDA) para secuenciar los fragmentos amplificados.

**Identificación de especies:** Mediante el software CHROMAS se verificó que la secuencia no exhibía ambigüedades y se comparó con la base de datos NCBI a través del programa BLAST. Este proceso proporciona un listado de especies cuyas secuencias contienen una mayor similitud con la secuencia de interés. Inicialmente, si el porcentaje de homología supera el 97,5%, se considera que ambas pertenecen a la misma especie.

## 5. RESULTADOS.

De las 26 muestras recogidas, 13 pertenecen a la campaña de 2022, pero una muestra de suelo (T033E) se separó en dos (arena y heces de cabra), por lo que las heces de cabra corresponden a la muestra Tcaca. En la campaña de 2023 se recogieron 13 muestras, de las cuales una de ellas se sustituyó por una hez de cabra ya que había libélula atrapada en el frasco (T040E). Esta hez de cabra pertenecía a la muestra T038E, que contenía arena y hez de cabra. Todo ello se ve puede ver reflejado seguidamente (Figura 6, Tabla 1):



**Figura 6.** Esquema resumen del número de muestras de ambiente.

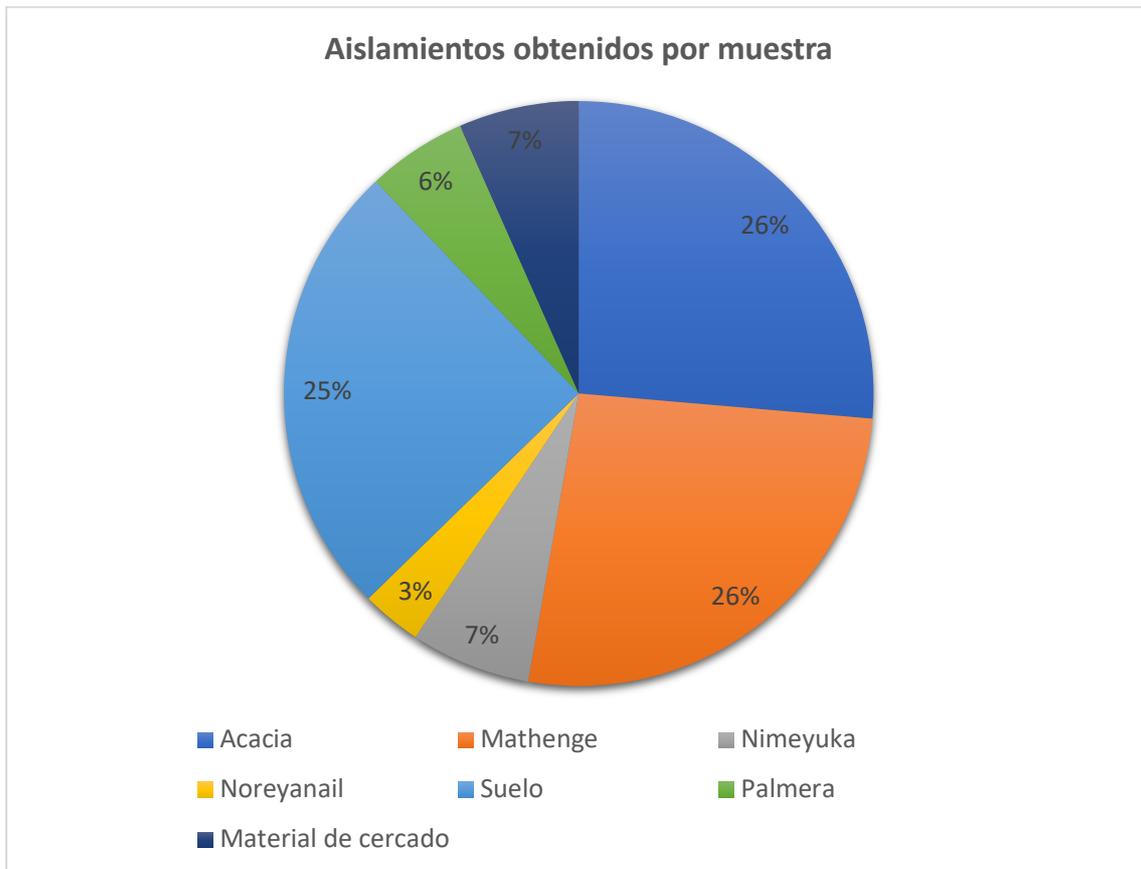
**Tabla 1.** Muestras de medioambiente recogidas y su correspondiente localización. Nimekuya, noreyanail y mathenge son arbustos espinosos de la región.

<i>MUESTRAS MEDIOAMBIENTE</i>			
<b>FECHA DE RECOGIDA</b>	<b>CÓDIGO DE IDENTIFICACIÓN</b>	<b>MUESTRA</b>	<b>LOCALIZACIÓN</b>
23/2/22	T026E	Púa acacia	Lorugum
23/2/22	T027E	nimekuya (mata con pinchos)	Lorugum
23/2/22	T028E	Espinas de noreyanail	Lorugum
23/2/22	T029E	Púas acacia	Lorugum
23/2/22	T030E	Suelo bajo acacia con heces de cabra	Lorugum
23/2/22	T031E	Arena de acacia	Lorugum
23/2/22	T032E	Corteza de mathenge	Lorugum
23/2/22	T033E	Suelo árbol dispensario	Lorugum
23/2/22	T034E	Suelo termitero	Lorugum
23/2/22	T035E	Espina mathenge	Lorugum
23/2/22	T036E	mathenge Hojas y espinas	Lorugum
23/2/22	T037E	Suelo bajo mathenge	Lorugum
4/2/23	T038E	Suelo con arena, semillas y caca de cabra	Lodward
4/2/23	T039E	Pinchos de mata baja	Lodward
4/2/23	T040E	caca cabra	Lodward
4/2/23	T041E	Púas y hojas de acacia jóven	Lodward
4/2/23	T042E	Suelo con detritus	Lodward
4/2/23	T043E	Material de cercado	Lodward
4/2/23	T044E	Suelo de arena con heces de cabra junto a la orilla del lago Manyata	Elye Sping
4/2/23	T045E	Hojas secas de palmera junto al lago	Elye Sping
4/2/23	T046E	Suelo con heces de cabra y detritus del suelo junto al lago	Elye Sping
4/2/23	T047E	corteza de palmeras junto al lago (zona de baño)	Elye Sping
5/2/23	T048E	Suelo tras bar	Kakuma
5/2/23	T049E	Paja construcción tejado	Kakuma
5/2/23	T050E	Suelo termiteros	Kakuma

### 5.1. Resultados del cultivo.

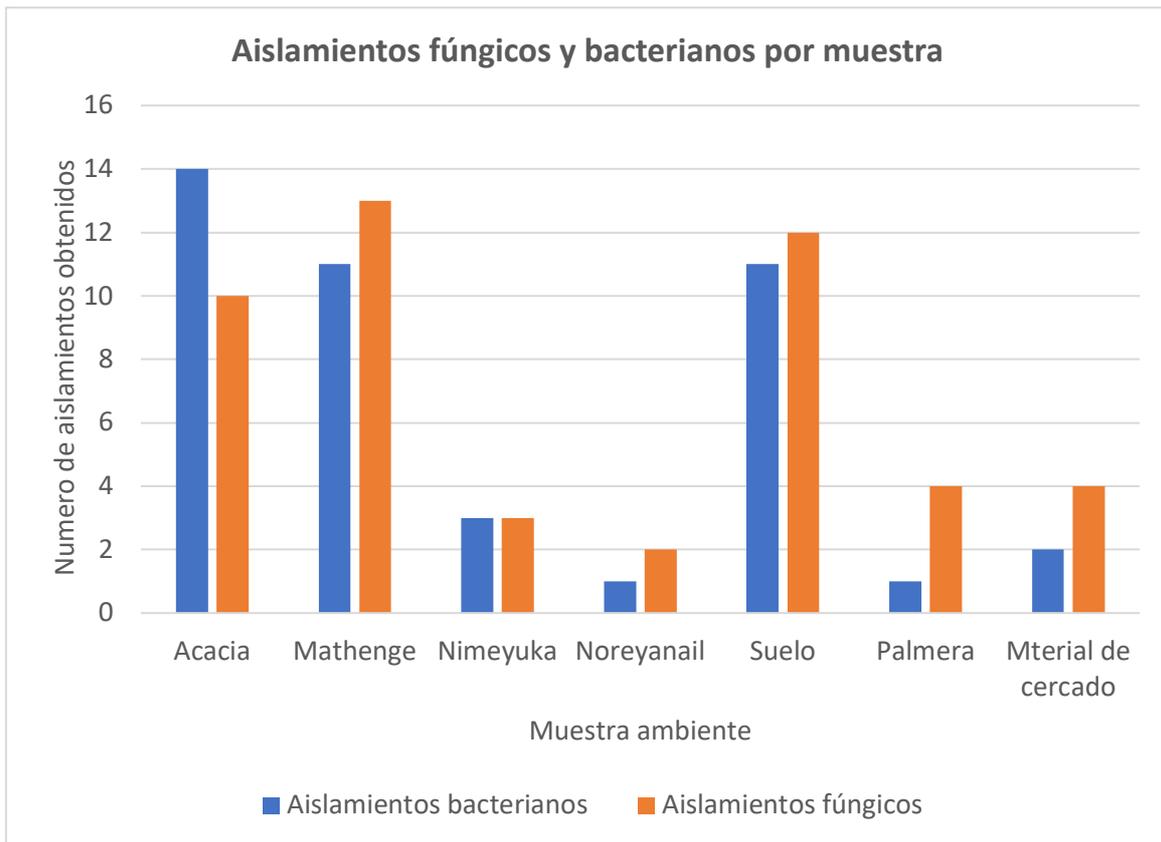
Tras el cultivo de las muestras en agar nutritivo y Sabouraud, se obtuvieron 85 aislamientos. Estos se etiquetaron con el código de la muestra seguido de un número y de la letra B, L o F según si se correspondía con bacteria, levadura u hongo filamentososo.

Los resultados de los aislamientos de cada una de las muestras, se agruparon en 7 grupos según si la muestra procedía de acacia, mathenge, nimeyuka, noreyanail, palmera, suelo o material de cercado. Una vez agrupados se obtuvo el porcentaje de aislamientos según el nicho de procedencia (Figura 7).



**Figura 7.** Porcentaje del total de aislamientos obtenidos y sus correspondientes nichos.

Estos resultados indican la alta diversidad de microorganismos presentes en cada una de los nichos estudiados. Si diferenciamos los aislamientos en bacterianos o fúngicos, vemos que en todos los nichos se han encontrado especies de ambos tipos en mayor o menor medida (Figura 8).

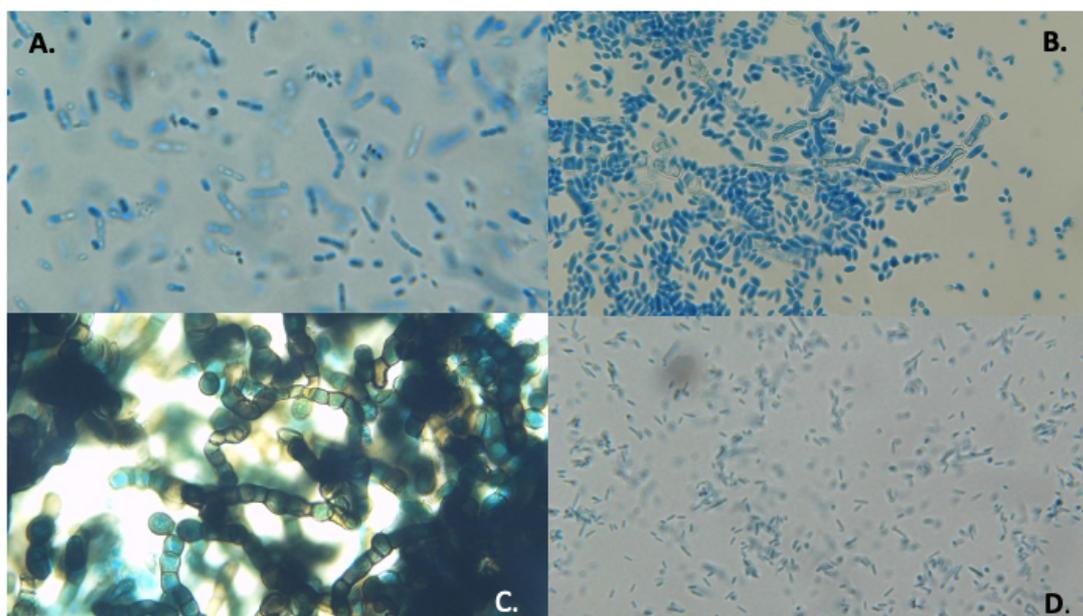


**Figura 8.** Número de aislamientos bacterianos y fúngicos encontrados en cada nicho.

## 5.2. Resultados de la observación microscópica.

Los aislamientos bacterianos obtenidos mediante cultivo se observaron al microscopio una vez realizada la tinción de Gram y se descartaron todos aquellos que tenían forma de coco (10 aislamientos), seleccionándose solo las bacterias baciliformes Gram positivas. En total se seleccionaron 18 aislamientos.

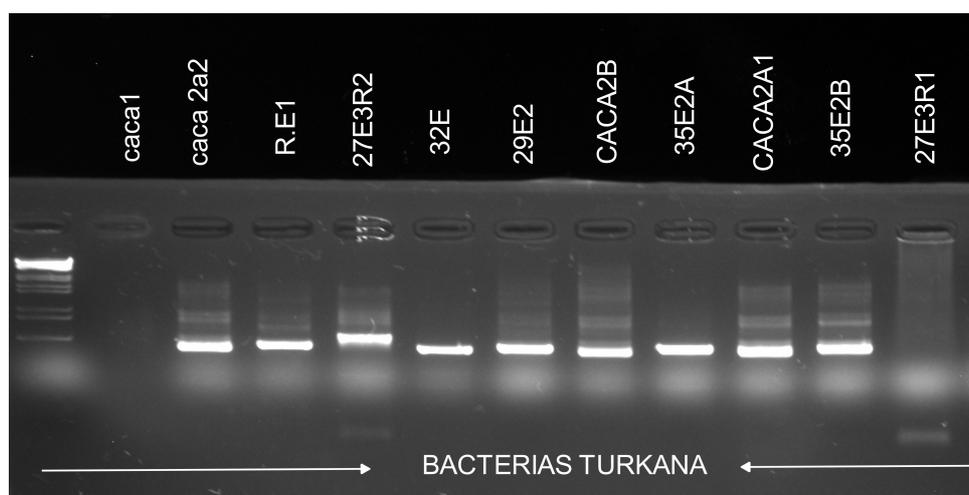
Por otro lado, en el caso de los hongos, se compararon aquellos cuyas estructuras eran similares, para evitar secuenciar una misma especie y se seleccionaron los que podrían indicar agente de micetoma, es decir 35 aislamientos. También se seleccionó una levadura que formaba pseudohifas para saber si podía ser agente de micetoma, pero el resto (12 aislamientos) se descartaron. (Figura 9).



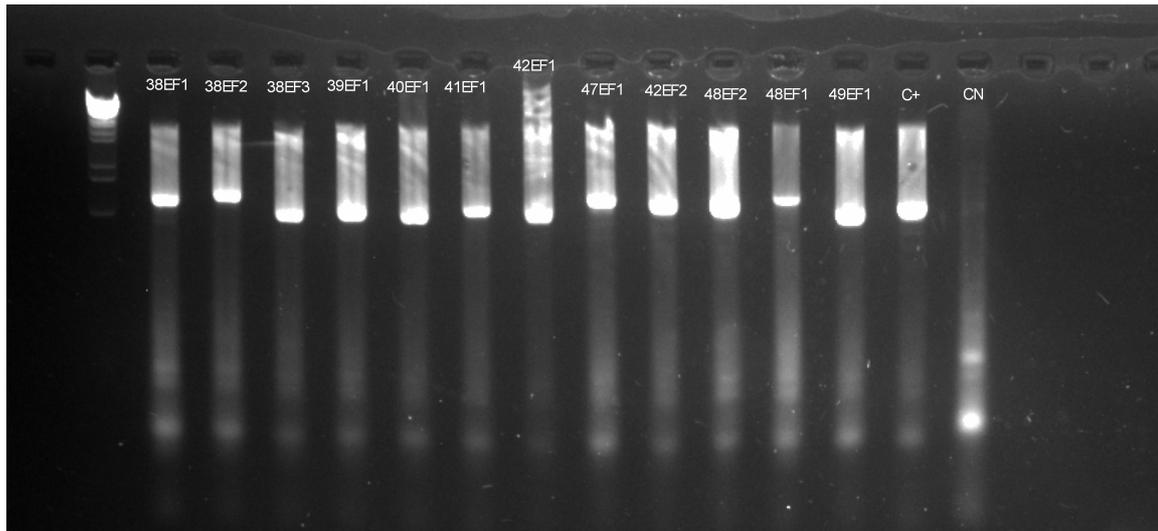
**Figura 9.** A y D) Vista al microscopio óptico de aislamientos bacterianos (Aumentos 1000X) B) Vista al microscopio de un aislamiento levaduriforme (Aumentos 400X) y C) Vista al microscopio de un aislamiento fúngico (Aumentos 400X).

### 5.3. Identificación molecular de los aislamientos.

Se realizó la PCR para la amplificación de las regiones *barcode* de los 53 aislamientos seleccionados, obteniendo 33 positivas. De estas, 25 correspondieron a muestras fúngicas y 8 a muestras bacterianas. El resto se consideró como un fallo en la extracción de DNA. Las Figura 10 y Figura 11 muestran los geles con los fragmentos amplificados de algunas de las muestras bacterianas y fúngicas, respectivamente.

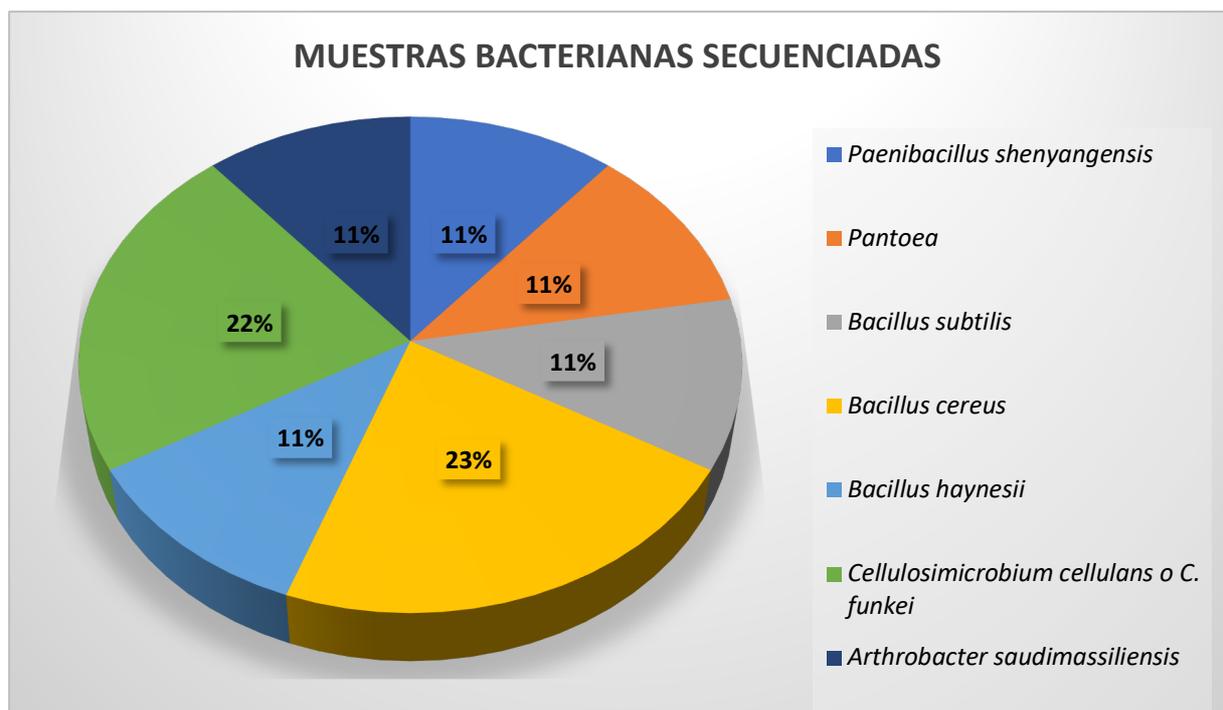


**Figura 10.** Visualización de los fragmentos amplificados mediante PCR del gen 16S ribosomal bacteriano. La primera calle corresponde con el marcador de peso molecular, y las calles 2-12 a muestras ambientales.



**Figura 11.** Visualización de los fragmentos amplificados mediante PCR de la región ITS2 de los hongos. La primera calle corresponde con el marcador de peso molecular, las calles 2-12 a muestras ambientales, la calle 13 es un control positivo y la calle 14 corresponde al control negativo.

La identificación por secuenciación de los 8 aislamientos bacterianos dio como resultado las siguientes especies de microorganismos, siendo el más numeroso el género *Bacillus*, ya que es muy abundante en el medioambiente. La figura 12 y la Tabla 2 muestran el porcentaje y la especie identificada en cada una de las muestras.



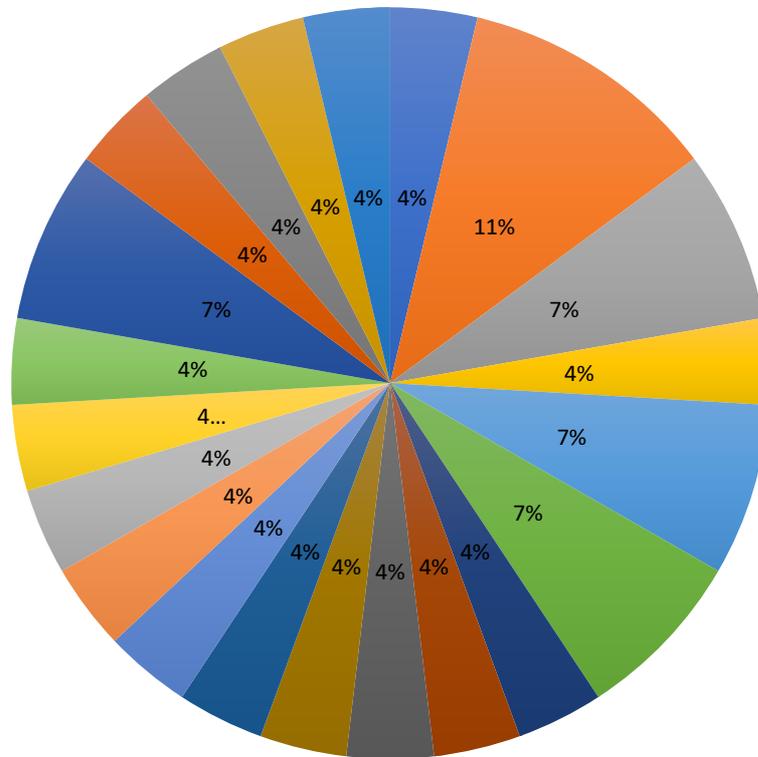
**Figura 12.** Especies bacterianas identificadas de los aislamientos obtenidos de las muestras de ambiente.

**Tabla 2.** Tabla resumen de los aislamientos bacterianos identificados

BACTERIAS				
AÑO DE RECOGIDA	CODIGO DE IDENTIFICACION	MUESTRA	Nº AISLAMIENTO	IDENTIFICACIÓN MOLECULAR
2022/T026	T026E	Púa acacia	26EB1	<i>Paenibacillus shenyangensis</i>
2022/T029	T029E	Púas acacia	29EB1	<i>Pantoea</i>
2022/T032	T032E	Corteza de mathenge	32EB1	<i>Bacillus subtilis</i>
2022/T035	T035E	Espina mathenge	35EB2A	<i>Bacillus cereus</i>
			35EB2B	<i>Bacillus cereus</i>
2022/T036	T036E	mathenge hojas y espinas	36EB2	<i>Bacillus haynesii</i>
2022/Tcaca	Tcaca. proviene de la muestra 33E	Hez de cabra	CACAEB2A	<i>Cellulosimicrobium cellulans</i>
			CACAEB2B	<i>Cellulosimicrobium cellulans</i> o <i>C. funkei</i>
2023/T040	T040E	hez de cabra	40EB2	<i>Arthrobacter saudimassiliensis</i>

Por otra parte, de la identificación por secuenciación de los 25 aislamientos fúngicos, se obtuvieron gran variedad de especies, siendo el género *Aspergillus* el más abundante, seguido del género *Chaetomium*, un posible agente eumicótico que también fue aislado en las muestras clínicas durante las campañas realizadas en los años 2020 y 2022 (Figura 13, Tabla 3).

## MUESTRAS FÚNGICAS SECUENCIADAS



- |   |                                    |
|---|------------------------------------|
| ■ <i>Aureobasidium</i>                            | ■ <i>Chaetomium</i>                |
| ■ <i>Aspergillus costaricensis</i>                | ■ <i>Canariomyces</i>              |
| ■ <i>A. flavus</i>                                | ■ <i>Aspergillus niger</i>         |
| ■ <i>A. varicolor</i>                             | ■ <i>Rhizopus</i>                  |
| ■ <i>A. tubergensis</i>                           | ■ <i>Coniochaeta rhopalochaeta</i> |
| ■ <i>Didymella</i>                                | ■ <i>Aspergillus sp.</i>           |
| ■ <i>Aspergillus fuigatus</i>                     | ■ <i>Aspergillus pipens</i>        |
| ■ <i>Neoscochyta adenii</i>                       | ■ <i>Curvularia neoindica</i>      |
| ■ <i>Didymella pedeia o D. prosopidis</i>         | ■ <i>Preussia procaviicola</i>     |
| ■ <i>Aureobasidium melanogenum o A. pullulans</i> | ■ <i>Aspergillus terreus</i>       |
| ■ <i>Pseudohelminthosporium clematidis</i>        | ■ <i>Epicoccum thailandicum</i>    |
| ■ <i>Apophysomyces variabilis</i>                 |                                    |

**Figura 13.** Especies fúngicas identificadas en los aislamientos a partir de las muestras de ambiente.

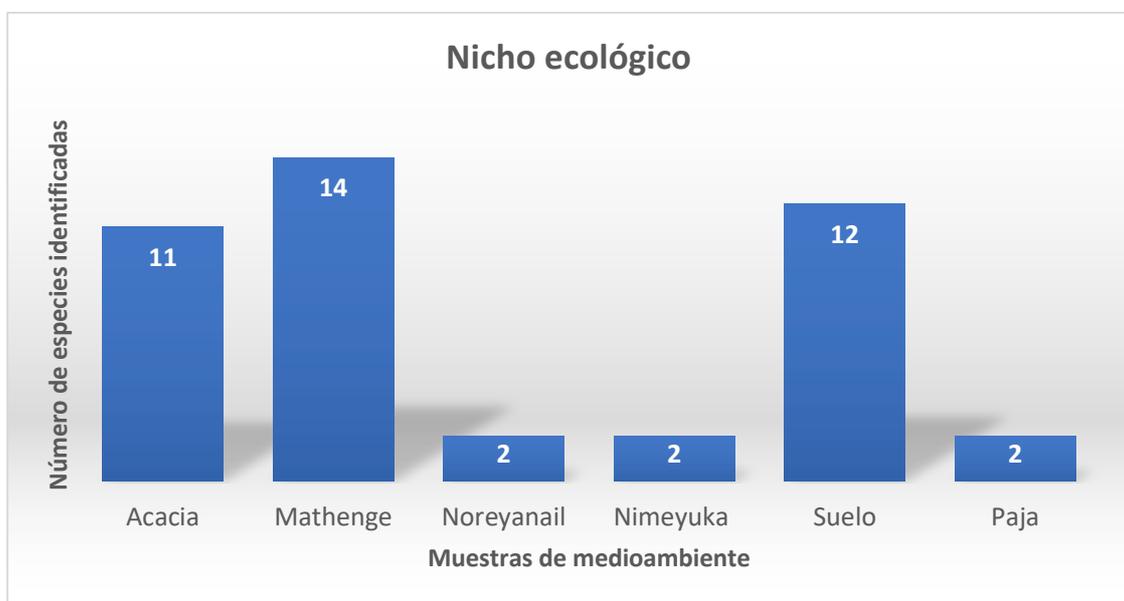
**Tabla 3.** Tabla resumen de los aislamientos fúngicos identificados.

HONGOS				
AÑO DE RECOGIDA	CÓDIGO DE IDENTIFICACIÓN	MUESTRA	Nº AISLAMIENTO	IDENTIFICACIÓN MOLECULAR
2022/T026	T026E	púa acacia pq	26EF2	<i>Aureobasidium</i>
2022/T027	T027E	nimekuya (mata con pinchos)	27EF1	<i>Chaetonium</i>
			27EF3	<i>Aspergillus costaricensis</i>
2022/T028	T028E	Espinass de noreyanail	28EF1	<i>Chaetonium</i>
			28EF2	<i>Canariomyces</i>
2022/T029	T029E	Púas acacia	29EF1	<i>Aspergillus costaricensis</i>
2022/T030	T030E	suelo bajo acacia con heces de cabra	30EF1	<i>A. flavus</i>
2022/T031	T031E	Arena de acacia	31EF1	<i>Apophysomyces variabilis</i>
2022/T032	T032E	Corteza de mathenge	32EF1	<i>Aspergillus niger</i>
2022/T033	T033E	Suelo árbol dispensario	33EF1	<i>A. varicolor</i>
			33EF2	<i>Chaetonium</i>
			33EF3	<i>A. flavus</i>
2022/T034	T034E	Suelo termitero	34EF1	<i>Rhizopus</i>
			34EF2	<i>A. tubergensis</i>
2022/T035	T035E	Espina mathenge	35EF1	<i>Coniochaeta rhopalochaeta</i>
2022/T036	T036E	mathenge Hojas y espinass	36EF1	<i>Didymella</i>
			36EF2	<i>Aspergillus sp.</i>
2022/T037	T037E	Suelo bajo mathenge	37EF4	<i>Aspergillus fuigatus</i>
2023/T038	T038E	Suelo con arena, semillas y caca de cabra	38EF1	<i>Neosascochyta adenii</i>
			38EF2	<i>Curvularia neoin dica</i>
			38EF3	<i>Didymella pedeiae</i> o <i>D. prosopidis</i>
2023/T039	T039E	Pinchos de mata baja	39EF1	<i>Didymella pedeiae</i> o <i>D. prosopidis</i>
2023/T040	T040E	Caca cabra	40EF1	<i>Preussia procaviicola</i>
2023/T041	T041E	Púas y hojas de acacia jóven	41EF1	<i>Aureobasidium melanogenum</i> o <i>A. pullulans</i>
2023/T042	T042E	Suelo con detritus	42EF1	<i>Aureobasidium melanogenum</i> o <i>A. pullulans</i>
2023/T047	T047E	Corteza de palmeras junto al lago (zona de baño)	47EF1	<i>Aspergillus</i>
			47EF2	<i>Aspergillus</i>
2023/T048	T048E	Suelo tras bar	48EF1	<i>Aspergillus terreus</i>
			48EF2	<i>Aspergillus</i>
2023/T049	T049E	Paja contrucción tejado	49EF1	<i>Pseudohelminthosporium clematidis</i>
			49EF2	<i>Epicoccum thailandicum</i>

De las 35 especies identificadas en este estudio, solo 10 pertenecen a agentes de micetoma reconocidos, 8 de ellos son responsable del eumicetoma y 2 del actinomictoma.

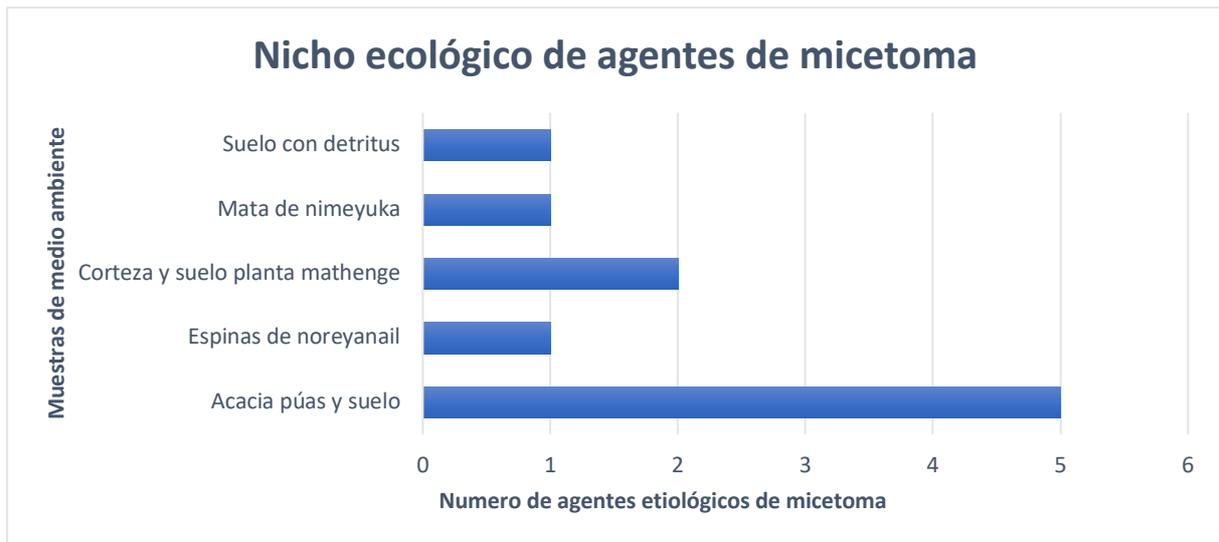
A parte de los microorganismos que ya habían sido descritos por otros grupos como agentes de micetoma, como *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* o *Chaetomium atrobrunneum*, también hemos descubierto el nicho ecológico de algunos agentes que se han identificado como posibles agentes causales de actinomictoma como son *Cellulosimicrobium cellulans* y *Cellulosimicrobium funkei*, aislados en las muestras clínicas de las campañas realizadas en Turkana por nuestro grupo de investigación [17].

En cuanto al nicho ecológico al cual pertenecen las especies que finalmente se han identificado, en Figura 14 se puede observar que el mayor número corresponde al mathenge, seguido de la acacia y del suelo.



**Figura 14.** Relación entre las especies microbianas identificadas y donde se encontraban en el medio ambiente.

Pese a que el mathenge encabeza la lista donde se encuentran la mayoría de los microorganismos, no es donde se agrupan la mayor parte de los agentes de micetoma, pues es en la acacia o en el suelo que se encuentra rodeando al árbol, donde aparecen la pluralidad de los microorganismos causantes de la afección (Figura 15). En la acacia se aislaron 5 agentes causales de micetoma, 2 colonias de *Aspergillus flavus*, 2 colonias de *Cellulosimicrobium cellulans* y *C. funkei* y 1 colonia de *Chaetomium*, seguido del mathenge, de donde se han aislado 2 colonias de *Aspergillus niger*. En las espinas de noreyanail se aisló *Chaetomium* al igual que en la mata de nimeyuka y en el suelo con detritus la especie *Curvularia neoindica*.



**Figura 15.** Relación entre los agentes de micetoma identificados y su ubicación en el medio ambiente.

## 6. DISCUSIÓN.

El micetoma es una enfermedad endémica encontrada predominantemente en las zonas tropicales y subtropicales, más concretamente en el área del Trópico de Cáncer y el de Capricornio, correspondiéndose a las latitudes 30° N y 15° S [3, 18]. Los agentes etiológicos implicados en micetoma son bacterias y hongos saprófitos del suelo y de la materia vegetal en descomposición y difiere significativamente de región a región. En cuanto al continente africano, en Senegal se ha reportado que la mayoría de casos está causada por *Actinoadura pelletieri* (71%), seguido de *Actinoadura madurae* (22%) y *Streptomyces somaliensis* (7%), así como, en Níger, dependiendo de la zona geográfica, predomina un agente u otro. Esto quiere decir que, en la región norte, predomina *Streptomyces somaliensis* debido a ser una zona más desértica, mientras que *Actinoadura pelletieri* es más común en la región sur del país [6]. En contraste, *Madurella mycetomatis* es frecuente en ambas regiones. También en Sudán, donde *M. mycetomatis*, *F. senegalensis* o *Curvularia lunata* son agentes eumicóticos prevalentes [19].

A pesar de contar con abundantes datos sobre los agentes causales de micetoma en varios países, hasta el momento, no se dispone de información publicada sobre la incidencia de micetoma en Kenia. Por lo tanto, este estudio representa una contribución a la comprensión de la etiología de la enfermedad en Kenia, específicamente en el condado de Turkana. El objetivo principal de este estudio fue establecer el nicho ecológico de los agentes causales de micetoma. Durante la investigación, se identificaron 10 microorganismos responsables de esta afección en el medio ambiente, incluyendo 4

pertenecientes al género *Chaetomium*, 2 al género *Cellulosimicrobium*, 1 al género *Curvularia* y 3 al género *Aspergillus*.

Los resultados obtenidos revelaron una diversidad de hongos asociados con la enfermedad. Algunos de estos hongos, como *Aureobasidium*, *Chaetomium* y *Aspergillus*, se encontraron en varias muestras, lo que sugiere su adaptabilidad a diferentes nichos ecológicos. Por ejemplo, *Aureobasidium* se identificó en púas de acacia y detritus, lo que indica una posible relación con la planta hospedera y la descomposición de materia orgánica. Sin embargo, aún no se ha demostrado que esta especie sea causante de la enfermedad, aunque sí se ha asociado con la feohifomicosis [20, 21], una enfermedad con síntomas parecidos a los provocados por micetoma, lo que a veces podría llevar a confundirse con esta enfermedad. *Chaetomium* [22], por su parte, se encontró principalmente en suelo, espinas y corteza de acacia, lo que sugiere una afinidad por ambientes ricos en materia orgánica en descomposición, especialmente material vegetal, y la acacia podría ser su posible nicho ecológico.

En varias muestras también se identificaron especies de *Aspergillus*, presentes en suelo, corteza de palmeras y detritus. Este género de hongos es conocido por su capacidad para degradar una amplia gama de sustratos orgánicos, lo que podría explicar su presencia en diferentes ambientes [23]. Sin embargo, se observó una mayor diversidad de especies de *Aspergillus* en la muestra de suelo bajo el árbol dispensario (T033EF3) y en la corteza del mathenge (T032EF1). Esto sugiere que el mathenge podría actuar como un nicho ecológico, ya que se han descrito anteriormente tanto *Aspergillus niger* [24, 25] como *Aspergillus flavus* [26] como agentes causantes de eumicetoma.

En cuanto al género *Curvularia*, se identificó la especie *Curvularia neoíndica* en una muestra de suelo que contenía arena, semillas y heces de cabra. Este hallazgo es relevante, ya que *Curvularia neoíndica* se ha asociado con infecciones oportunistas en humanos y animales [27], lo que sugiere un posible riesgo para la salud en el entorno estudiado.

Dentro de la clasificación de los principales hongos productores de micetoma realizada por Alejandro Bonifaz [28] se encuentra el género *Chaetomium* y en concreto la especie *C. atrobrunnem*, así como el género *Curvularia* y la especie *C. neoíndica*. Las características que presentan ambos géneros y por lo que son principales productores de micetoma, es que pertenecen a la división Ascomycota, son hongos dematiáceos que presentan hifas tabicadas y poseen estructuras características como conidios y conidióforos. Por otro lado, se encuentra *Aspergillus flavus*, patógeno por excelencia de este género que causa micetoma [26] y también se ha descrito un caso extraño de micetoma por *Aspergillus niger*

[25], que suele causar normalmente aspergiloma pulmonar. El género *Aspergillus* se encuentra dentro de los hialohifomicetos debido a que genera granos blancos [28].

Sin embargo, también se identificaron varias especies fúngicas de interés. Por ejemplo, se encontró *Pseudohelminthosporium*, una variante de *Helminthosporium*, asociado previamente con maduromicosis dérmica y nasal en una vaca [29]. También se ha aislado *Canariomyces* que, aunque no existen datos previos que lo relacionen directamente con la patología subcutánea en humanos, pertenece a la familia *Chaetomiaceae* [30], lo que lo relaciona de alguna manera con el género *Madurella*, conocido por causar micetoma en humanos.

En relación al género *Cellulosimicrobium*, se encontró su presencia en una muestra de heces de cabra (CACAEB2A). *Cellulosimicrobium cellulans*, pertenece a la clase Actinomycetia, posee características baciloformes similares a las del género *Nocardia*, lo que lo señala como un posible agente actinomicótico. Esta especie también ha sido aislada en muestras clínicas de micetoma por nuestro grupo, así que es considerado como un posible agente de micetoma. También se ha descrito como responsable de provocar enfermedad en personas inmunodeprimidas y como causante de infecciones debido a la inoculación de material extraño [31]. Otra especie estrechamente relacionada, *C. funkei*, se aisló en una muestra similar (CACAEB2B). Estos hallazgos son relevantes, ya que *Cellulosimicrobium* no ha sido ampliamente estudiado en relación con el micetoma, y su presencia en muestras de acacia y alrededores sugiere que este podría ser inoculado bajo la piel, dando lugar al micetoma. Las cabras son capaces de comerse las púas de acacia, por lo que es de esperar que aparezcan también en las heces de estos animales.

Por último, en la muestra de heces de cabra también se identificó la especie *Arthrobacter saudiensis* y en las púas de acacia la especie *Pantoea*. Aunque ninguna de ellas se ha asociado directamente con el micetoma, su presencia indica una posible interacción con otros microorganismos presentes en el nicho ecológico. Esto destaca la importancia de considerar no solo los agentes causales conocidos, sino también otros microorganismos presentes en el ambiente que podrían desempeñar un papel en la enfermedad.

Es imprescindible la identificación de los agentes etiológicos que causan micetoma para poder localizar su nicho ecológico y así mantener a la población informada de donde pueden contraer la enfermedad.

## 7. CONCLUSIONES.

1. Del total de aislamientos de medio ambiente, analizados e identificados como agentes de micetoma, la gran mayoría corresponde a agentes de eumicetomas (67%), mientras que los agentes de actinomicetomas constituyen una minoría, representando el 33% restante.
2. En las muestras medioambientales recolectadas en Turkana hemos encontrado agentes causantes del micetoma como *Chaetomium* y *Aspergillus flavus*, así como posibles agentes emergentes de micetoma (*Cellulosimicrobium cellulans*, *C. funkei* y *Curvularia neoindica*).
3. La acacia supone el mayor factor de riesgo a la hora de contraer micetoma ya que en ella se han encontrado varias especies responsables de producirlo y es muy abundante en la región, lo que aumenta la probabilidad de que la población se clave sus púas.

## 8. PROYECCIÓN FUTURA.

En base a los resultados obtenidos, sería conveniente seguir investigando para completar los muestreos de ambiente y conocer el nicho ecológico de más agentes de micetoma.

Por otra parte, sería interesante que, en base a las muestras obtenidas e identificadas, se realizara un mapa de distribución de actinobacterias y hongos causantes de micetoma encontrados tanto en el suelo como en los vegetales atañidos al condado de Turkana, con el objetivo de comparar entre la distribución de casos clínicos y muestras de ambiente para ver si concuerdan los datos obtenidos de los pacientes con los microorganismos identificados en el ambiente y de esa manera, se puede acotar también el nicho ecológico.

## 9. BIBLIOGRAFÍA.

1. World Human Organization. Micetoma. Data and numbers. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/mycetoma#:~:text=El%20micetoma%20es%20una%20enfermedad,especies%20de%20bacterias%20u%20hongos>
2. World Health Organization. Neglected tropical diseases: questions and answers. <https://www.who.int/es/news-room/questions-and-answers/item/neglected-tropical-diseases>

3. SERRANO, JA; SANDOVAL, AA. El micetoma. revisión. Rev. Soc. Ven. Microbiol., Caracas, v. 23, n. 1, p. 70-79, enero 2003. Disponible en [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1315-25562003000100016](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562003000100016) accedido en 17 jun. 2023.
4. Cirugía en Turkana. Micetoma–Madura foot. Disponible en: <https://www.cirugiaenturkana.com/micetoma-pie-de-madura-madura-foot/>
5. Manual MSD. Enfermedades infecciosas. Hongos. Micetoma. Disponible en: <https://www.msdmanuals.com/es-es/professional/enfermedades-infecciosas/hongos/micetoma>
6. Libro completo. Actinomicetoma. Mérida -Venezuela, 2005. [http://www.saber.ula.ve/bitstream/handle/123456789/32976/libro\\_completo.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://www.saber.ula.ve/bitstream/handle/123456789/32976/libro_completo.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
7. Kenia – Índice de Desarrollo Humano. Disponible en: <https://datosmacro.expansion.com/idh/kenia#:~:text=El%20%C3%ADndice%20de%20desarrollo%20humano,elabora%20cada%20a%C3%B1o%20Naciones%20Unidas.>
8. Oficina de Información Diplomática. Ficha país. Kenia. República de Kenia. Disponible en: [https://www.exteriores.gob.es/documents/fichaspais/kenia\\_ficha%20pais.pdf](https://www.exteriores.gob.es/documents/fichaspais/kenia_ficha%20pais.pdf)
9. Fundamentos e importancia de la ganadería en la región de Turkana Norte (República de Kenia). <https://foroagroganadero.com/fundamentos-e-importancia-de-la-ganaderia-en-la-region-de-turkana-norte-republica-de-kenia/>
10. Entrevista a la profesora de la UMH, Kika Colom, que desarrolla en Turkana un proyecto de cooperación para mejorar la salud del pueblo keniano. Disponible en: <https://internacional.umh.es/2022/04/11/entrevista-a-la-profesora-de-la-umh-kika-colom-que-desarrolla-en-turkana-un-proyecto-de-cooperacion-para-mejorar-la-salud-del-pueblo-keniano/>
11. Cirugía en Turkana. ¿Qué es? Disponible en: <https://www.cirugiaenturkana.com/que-es-cirugia-en-turkana/>

12. Estrategia Nacional de Biodiversidad. Protocolo de Nagoya. Disponible en: [https://www.argentina.gob.ar/ambiente/biodiversidad/genetica/nagoya#:~:text=El%20Protocolo%20de%20Nagoya,la%20Diversidad%20Biol%C3%B3gica%20\(CDB\)](https://www.argentina.gob.ar/ambiente/biodiversidad/genetica/nagoya#:~:text=El%20Protocolo%20de%20Nagoya,la%20Diversidad%20Biol%C3%B3gica%20(CDB))
13. Instruction Manual, InstaGene™ Matrix, Rev G. Disponible en: <https://www.bio-rad.com/es-es/node/50646>
14. Ferrer C, Colom F, Frases S, Mulet E, Abad JL, Alió JL. Detection and identification of fungal pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8S ribosomal DNA typing in Ocular infections. J Clin Microbiol. 2001 Aug;39(8):2873-9. doi: 10.1128/JCM.39.8.2873-2879.2001. PMID: 11474006; PMCID: PMC88253.
15. Edwards U, Rogall T, Blöcker H, Emde M, Böttger EC. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. Nucleic Acids Res 1989; 17:7843-53.
16. Lane DJ, Pace B, Olsen GJ, Stahl DA, Sogin ML, Pace NR. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. Proc Natl Acad Sci USA 1985; 82:6955-9.
17. Colom Valiente, MF (IP). Proyecto CUD: Mejora de la salud del pueblo Turkana (Kenia) mediante la prevención y el tratamiento de las enfermedades tropicales desatendidas. Dirección General de Cooperación y Solidaridad de la Generalitat Valenciana. Ayudas para Proyectos de investigación de carácter internacional para consecución de los objetivos de desarrollo sostenible de la agenda 2030 de Naciones Unidas.2020. Referencia: SOLCIF/2020/0005.
18. Barry, S M. (2009). Micetoma. *Revista argentina de dermatología*, 90(1), 50-62. Recuperado en 18 de junio de 2023, de [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1851-300X2009000100001&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-300X2009000100001&lng=es&tlng=es).
19. Develoux M. Epidemiologic Aspects of Mycetoma in Africa. J Fungi (Basel). 2022 Nov 29;8(12):1258. doi: 10.3390/jof8121258. PMID: 36547591; PMCID: PMC9781793. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36547591/>
20. Infeccions per fongs. *Infeccions per altres fongs: experiència*. Ferran Sánchez-Reus Servei de Microbiologia Hospital de Sant Pau. Disponible en: <http://www.acmcb.es/files/425-13173-DOCUMENT/Sanchez2318.01.2018.pdf>

21. Juan S. Frasset-Artés, Javier Pemán, Marino Blanes, Miriam Hernández-Porto, Josep Cano, Enrique Jiménez-Herrero, José Luis López-Hontangas, Feohifomicosis cerebral: descripción de un caso y revisión de la literatura, *Revista Iberoamericana de Micología*, Volume 31, Issue 3, 2014, Pages 197-202, ISSN 1130-1406, <https://doi.org/10.1016/j.riam.2012.12.008>.
22. Mhmoud NA, Santona A, Fiamma M, Siddig EE, Deligios M, Bakhiet SM, et al. (2019) *Chaetomium atrobrunneum* causing human eumycetoma: The first report. *PLoS Negl Trop Dis* 13(5): e0007276. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6542518/pdf/pntd.0007276.pdf>
23. Vargas Manotas, José Enrique, Vélez Ascanio, Joaquín Fernando, & Chalela Blanco, Nashla Andrea. (2021). *Aspergillus*, un asesino desconocido. *Acta Neurológica Colombiana*, 37(1, Suppl. 1), 112-116. Epub May 23, 2021. <https://doi.org/10.22379/24224022342>
24. Sawatkar GU, Narang T, Shiva Prakash MR, Daroach M, Sharma M, Nahar Saikia U, Dogra S. *Aspergillus*: An uncommon pathogen of eumycetoma. *Dermatol Ther.* 2017 Jan;30(1). doi: 10.1111/dth.12411. Epub 2016 Sep 9. PMID: 27612290.
25. Mallick YA. Eumycetoma due to *Aspergillus niger*: First case report and successful treatment with voriconazole. *J Pak Assoc Dermatol* [Internet]. 2019Oct.22 [cited 2023Jun.20];29(4):428-32. Available from: <https://www.jpac.com.pk/index.php/jpac/article/view/1335>
26. CandidiasisWeb. Tipos. Otras infecciones. Por hongos. Micetoma. <https://candidiasisweb.com/tipos/otras-infecciones/por-hongos/micetoma.php>
27. Iturrieta-González I, Gené J, Wiederhold N, García D. Three new *Curvularia* species from clinical and environmental sources. *MycKeys*. 2020 Jun 17;68:1-21. doi: 10.3897/mycokeys.68.51667. PMID: 32607056; PMCID: PMC7314867.
28. Micetoma. Bonifaz Trujillo J(Ed.), (2015). *Micología médica básica, 5e*. McGraw Hill. Disponible en: <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1529&sectionid=98867015>
29. Patton CS. *Helminthosporium speciferum* as the cause of dermal and nasal maduromycosis in a cow. *Cornell Vet.* 1977 Apr;67(2):236-44. PMID: 870286.

30. X.W. Wang, F.Y. Bai, K. Bensch, M. Meijer, B.D. Sun, Y.F. Han, P.W. Crous, R.A. Samson, F.Y. Yang, J. Houbraken, Phylogenetic re-evaluation of Thielavia with the introduction of a new family Podosporaceae, *Studies in Mycology*, Volume 93, 2019, Pages 155-252, ISSN 0166-0616, <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2019.08.002>.
31. Trindade Torres M, Sousa Nunes B, Varandas L, Maltez F. Actinomycetoma by *Cellulosimicrobium cellulans* in a Young Man from Guinea-Bissau: Short Literature Review Regarding a Case Report. *Acta Med Port* [Internet]. 2023 Mar. 15 [cited 2023 Jun. 25];. Available from: <https://www.actamedicaportuguesa.com/revista/index.php/amp/article/view/17356>

## **AGRADECIMIENTOS**

Quisiera agradecer primeramente a la ONG Cirugía en Turkana y al equipo de micología médica de la UMH, por dar visibilidad a una enfermedad poco conocida como es el micetoma y ayudar a gente que lo necesita y no tiene los recursos posibles para poder tratarla. Sobre todo, quisiera dar las gracias al departamento de Producción Vegetal y Micología, a mi tutora Consuelo Ferrer y mi cotutora Kika Colom por confiar en mí para realizar este trabajo de investigación y por enseñarme día a día lo bonito e interesante que puede resultar ser el mundo de la micología, que, gracias a ellas, me han despertado el interés de seguir aprendiendo más sobre este mundo y la microbiología en general. También agradecer a Javi, por ayudarme siempre que lo he necesitado en el laboratorio, también has sido imprescindible para la elaboración de mi TFG.

Este trabajo, que forma parte del proyecto Micetoma en Turkana, ha sido financiado por la Generalitat Valenciana y la Universidad Miguel Hernández.

Para el desarrollo de este proyecto, he sido beneficiaria de la beca de Prácticas en Actividades de Fomento a la Investigación (PAFI), llevado a cabo en el laboratorio de microbiología situado en el campus de San Joan D'Alacant de la Universidad Miguel Hernández.

**ANEXO:** cumplimentación del certificado de capacitación del procedimiento coir tfg/tfm.



Dra. Dña. M<sup>a</sup> Francisca Colom Valiente  
Dpto. de Producción Vegetal y Microbiología

Investigador/a	M <sup>a</sup> Francisca Colom Valiente	
Tipo de actividad	Otros	Proyecto de colaboración para el desarrollo sostenible
Título del proyecto	ENFERMEDADES TROPICALES DESATENDIDAS EN TURKANA: Estudio de la situación epidemiológica. Formación y capacitación para la prevención el diagnóstico y el tratamiento de las mismas.	
Códigos GIS estancias donde se desarrolla la actividad	S02P1072, S02P1073. La mayor parte se realiza en el Condado de Turkana (Kenia), en el Hospital de referencia del condado en Lodwar y en los puestos de salud de los subcondados	
<b>Evaluación riesgos laborales</b>	<b>Conforme condicionado</b>	
<b>Evaluación ética uso muestras biológicas humanas</b>	<b>No solicitado</b>	
<b>Evaluación ética humanos</b>	<b>Favorable (Aprobado por el CEIm del Departamento de Salud de Alicante- Hospital General)</b>	
<b>Evaluación ética animales</b>	<b>No solicitado</b>	
Registro	Expte. 2020/32348	
<b>Referencia</b>	<b>DPV.MCV.01.20</b>	
<b>Caducidad</b>	<b>5 años</b>	

Se considera que el presente proyecto carece de riesgos laborales significativos para las personas que participan en el mismo, ya sean de la UMH o de otras organizaciones.

No se ha evaluado el uso de muestras biológicas humanas porque no se ha solicitado, ni se ha considerado necesario en base a la información aportada.

No se ha evaluado el uso de animales en un proyecto de investigación porque no se ha solicitado, ni se ha considerado necesario en base a la información aportada.

La evaluación de la participación de voluntarios humanos en un proyecto de investigación, desde el punto de vista ético, ha sido evaluado por el CEIm del Departamento de Salud de Alicante- Hospital General), siendo este favorable.

Por todo lo anterior, el dictamen del OEP es **favorable**.

Atentamente,

ALBERTO|  
PASTOR|  
CAMPOS

Firmado digitalmente por  
ALBERTO|PASTOR|CAMPOS  
Fecha: 2020.09.10 13:20:43  
+02'00'

Alberto Pastor Campos  
Secretario del Órgano Evaluador de Proyectos  
Vicerrectorado de Investigación

DOMINGO  
LUIS|OROZCO|  
BELTRAN

Firmado digitalmente  
por DOMINGO LUIS|  
OROZCO|BELTRAN  
Fecha: 2020.09.10  
16:01:18 +02'00'

Domingo L. Orozco Beltrán  
Presidente del Órgano Evaluador de Proyectos  
Vicerrectorado de Investigación

Página 1 de 2

**Órgano Evaluador de Proyectos**  
**VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN**  
UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE



Código Seguro de Verificación(CSV): UMHF5T2t7m09rL21z2zwpvjk  
Copia auténtica de documento firmado digitalmente. Puede verificar su integridad en <https://sede.umh.es/csv>  
Firmado por ALBERTO PASTOR CAMPOS el día 2020-09-10  
Firmado por DOMINGO LUIS OROZCO BELTRAN el día 2020-09-10



Información adicional:

- En caso de que la presente actividad se desarrolle total o parcialmente en otras instituciones es responsabilidad del investigador principal solicitar cuantas autorizaciones sean pertinentes, de manera que se garantice, al menos, que los responsables de las mismas están informados.
- Le recordamos que durante la realización del proyecto debe cumplir con las exigencias en materia de prevención de riesgos laborales. En concreto: las recogidas en el plan de prevención de la UMH y en las planificaciones preventivas de las unidades en las que se integra la investigación. Igualmente, debe promover la realización de reconocimientos médicos periódicos entre su personal; cumplir con los procedimientos sobre coordinación de actividades empresariales en el caso de que trabaje en el centro de trabajo de otra empresa o que personal de otra empresa se desplace a las instalaciones de la UMH; y atender a las obligaciones formativas del personal en materia de prevención de riesgos laborales. Le indicamos que tiene a su disposición al Servicio de Prevención de la UMH para asesorarle en esta materia.





# CERTIFICADO DE CAPACITACIÓN DEL PROCEDIMIENTO COIR TFG/TFM

Se otorga a:

**Esther Sáez Bañuz, con DNI: 23900967B**

Por realizar la capacitación previa al inicio del procedimiento de obtención del  
CÓDIGO DE INVESTIGACIÓN RESPONSABLE (COIR), con una puntuación de 10 / 10.

FIRMADO POR:  
ALBERTO PASTOR CAMPOS  
OFICINA DE INVESTIGACIÓN RESPONSABLE  
VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y  
TRANSFERENCIA  
UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

24/05/2023